

II

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

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 22 de febrero de 2001

por la que se establecen los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de determinadas enfermedades de los peces y se deroga la Decisión 92/532/CEE

[notificada con el número C(2001) 426]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2001/183/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 91/67/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 98/45/CE ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 15,

Considerando lo siguiente:

- (1) La Decisión 92/532/CEE de la Comisión ⁽³⁾, modificada por la Decisión 96/240/CE ⁽⁴⁾, establece los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de determinadas enfermedades de los peces.
- (2) Desde que se adoptó la Decisión 92/532/CEE, se han producido novedades prácticas y científicas y se ha modificado la Directiva 91/67/CEE. Por ello, deben actualizarse los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico.
- (3) La actualización ha de centrarse en el examen y la identificación de los virus que originan la septicemia hemorrágica viral (SHV) y la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) y en los cambios necesarios de conformidad con las últimas modificaciones de la Directiva 91/67/CEE.
- (4) Se ha consultado al laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces establecido en la Directiva 93/53/CEE del Consejo ⁽⁵⁾.

(5) En aras de la claridad, deben derogarse los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de determinadas enfermedades de los peces establecidos por la Decisión 92/532/CEE.

(6) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

En el anexo se establecen los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de la septicemia hemorrágica viral (SHV) y la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI).

Artículo 2

En virtud de la presente Decisión queda derogada la Decisión 92/532/CEE.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 22 de febrero de 2001.

Por la Comisión

David BYRNE

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 46 de 19.2.1991, p. 1.

⁽²⁾ DO L 189 de 3.7.1998, p. 12.

⁽³⁾ DO L 337 de 21.11.1992, p. 18.

⁽⁴⁾ DO L 79 de 29.3.1996, p. 19.

⁽⁵⁾ DO L 175 de 19.7.1993, p. 23.

ANEXO

PLANES DE MUESTREO Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN Y LA CONFIRMACIÓN DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL (SHV) Y LA NECROSIS HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA (NHI)

INTRODUCCIÓN

El presente anexo:

- a) establece directrices y requisitos mínimos aplicables a los planes de muestreo y métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de la presencia de septicemia hemorrágica viral (SHV) y necrosis hematopoyética infecciosa (NHI);
- b) integra las disposiciones de los anexos B y C de la Directiva 91/67/CEE para la obtención y el mantenimiento de la autorización de zonas y de explotaciones situadas en zonas no autorizadas;
- c) establece disposiciones para el correcto diagnóstico de la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa y el reconocimiento oficial de la autorización de zonas y de explotaciones situadas en zonas no autorizadas de conformidad con los artículos 5 y 6 de la Directiva 91/67/CEE;
- d) está destinado a las autoridades responsables a la lucha contra la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa y al personal de laboratorio que lleve a cabo las pruebas de estas enfermedades. En consecuencia, se presta especial atención a los procedimientos de muestreo, los principios y las aplicaciones de las pruebas de laboratorio y la evaluación de sus resultados, así como a las técnicas de laboratorio detalladas. No obstante, cuando proceda, los laboratorios podrán modificar las pruebas recogidas en el presente anexo o utilizar pruebas diferentes, siempre que se pueda demostrar que tienen una sensibilidad y especificidad equivalentes.

La parte I comprende los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la vigilancia de la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa con objeto de obtener y mantener la autorización de una zona o de una explotación situada en una zona no autorizada.

En la parte II se describen los procedimientos de diagnóstico para confirmar la existencia de la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa en caso de que se sospeche su presencia.

En la parte III se establecen los criterios y directrices de un programa oficial de inspección sanitaria que documente la ausencia histórica de septicemia hemorrágica viral y necrosis hematopoyética infecciosa.

En la parte IV se recogen recomendaciones sobre el procedimiento empleado para la titulación del virus de la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa y para comprobar la sensibilidad de los cultivos celulares a la infección.

En la parte V se recogen los acrónimos y abreviaturas.

PARTE I

Planes de muestreo y métodos de diagnóstico para la vigilancia de la septicemia hemorrágica viral y la NHI y con objeto de obtener y mantener la autorización de una zona o de una explotación situada en una zona no autorizada**I. Inspecciones y muestreo**

1. *Disposiciones generales sobre las inspecciones sanitarias clínicas, la recogida y la selección de muestras para la vigilancia de zonas o explotaciones situadas en zonas no autorizadas con objeto de lograr o mantener la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa*

En los cuadros 1A, 1B y 1C se resumen las inspecciones sanitarias clínicas y el muestreo de tejidos de los peces, del fluido ovárico o de ambos que deberá realizarse en las zonas o en las explotaciones situadas en zonas no autorizadas para lograr o mantener la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa de conformidad con los anexos B y C de la Directiva 91/67/CEE. En las partes I.I.2 a I.I.4 se recogen detalles más precisos. Los cuadros 1A y 1B no serán aplicables a las nuevas explotaciones ni a las explotaciones que vuelvan a dar comienzo a sus actividades con peces, huevos o gametos procedentes de una zona autorizada o de una explotación autorizada situada en una zona no autorizada, siempre que cumplan lo dispuesto en las letras a) o b) de la parte I.A.6 o en las letras a) o b) de la parte II.A.3 del anexo C de la Directiva 91/67/CEE.

Las inspecciones clínicas deberán efectuarse durante el período comprendido entre octubre y junio o siempre que la temperatura del agua esté por debajo de los 14 °C. Cuando las explotaciones deban ser inspeccionadas clínicamente dos veces al año, los intervalos entre ambas visitas deberán ser de un mínimo de cuatro meses. Todas las unidades de producción (estanques, tanques, jaulas de red, etc.) deberán inspeccionarse para comprobar si hay peces muertos, débiles o que actúen de manera anormal. Deberá prestarse especial atención a la zona de desagüe, donde los peces débiles tienen tendencia a acumularse debido a la corriente de agua.

Los peces que se tomen como muestra se seleccionarán de la siguiente manera:

- Si hay truchas arco iris, toda la muestra estará compuesta de peces de esa especie. En caso contrario, la muestra deberá incluir peces de todas las especies presentes siempre que sean sensibles al virus de la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa (de conformidad con la lista recogida en el anexo A de la Directiva 91/67/CEE). Las especies deberán estar representadas de manera proporcional en la muestra.
- Si se emplea más de una fuente de agua para la producción de peces, la muestra deberá incluir peces que representen a todas las fuentes.
- Si hay peces débiles, que actúen de manera anormal o muertos recientemente (sin descomponer), tales peces serán los primeros que se incluyan en la muestra. En caso de que no los haya, ésta deberá estar compuesta de peces sanos, de apariencia normal, recogidos de tal modo que estén representadas proporcionalmente todas las partes de la explotación y las clases de edad.

2. *Disposiciones específicas, incluida la recogida de muestras, para la vigilancia de zonas o explotaciones situadas en zonas no autorizadas con objeto de lograr o mantener la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa*

1. Una zona o una explotación situada en una zona no autorizada sometida a supervisión por los servicios oficiales puede obtener la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa siempre que se someta a uno de los dos modelos siguientes:

a) Modelo A — un programa de vigilancia de dos años

Tras un plazo mínimo de dos años de ausencia de signos clínicos o de otro tipo de septicemia hemorrágica viral o necrosis hematopoyética infecciosa, todas las explotaciones de la zona o toda explotación situada en una zona no autorizada que deseen ser autorizadas, deberán someterse a una inspección sanitaria dos veces al año durante dos años. A lo largo de este período de control de dos años que precede a la consecución de la autorización, se deberá mantener la ausencia de signos clínicos o de otro tipo de septicemia hemorrágica viral o de necrosis hematopoyética infecciosa y se deberán recoger muestras para su examen de conformidad con lo establecido en el cuadro 1A. Además, las muestras deberán seleccionarse, prepararse y examinarse de conformidad con lo dispuesto en las partes I.I a I.IV y los resultados de los exámenes de laboratorio para detectar la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa deberán ser negativos.

b) Modelo B — un programa de vigilancia de dos años con una muestra de tamaño reducido

Tras un programa oficial de inspección sanitaria que documente la ausencia histórica de septicemia hemorrágica viral o necrosis hematopoyética infecciosa durante al menos cuatro años, todas las explotaciones de la zona o toda explotación que esté situada en una zona no autorizada que deseen ser autorizadas deberán someterse a inspección sanitaria dos veces al año durante dos años. A lo largo de este período de control de dos años que precede a la consecución de la autorización, se deberá mantener la ausencia de signos clínicos o de otro tipo de septicemia hemorrágica viral o de necrosis hematopoyética infecciosa y se deberá recoger muestras para su examen de conformidad con lo establecido en el cuadro 1B. Además, las muestras deberán seleccionarse, prepararse y examinarse de conformidad con lo dispuesto en las partes I.I a I.IV y los resultados de los exámenes de laboratorio para detectar la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa deberán ser negativos. Para que los servicios oficiales reconozcan un programa de inspección sanitaria a efectos de documentación de la ausencia de septicemia hemorrágica viral o necrosis hematopoyética infecciosa, éste deberá cumplir los criterios y directrices recogidos en la parte III.

2. Disposiciones especiales para la autorización de nuevas explotaciones y de explotaciones que vuelven a dar comienzo a sus actividades con peces, huevos o gametos procedentes de una zona autorizada o de una explotación autorizada situada en una zona no autorizada

Las nuevas explotaciones y las explotaciones que vuelvan a dar comienzo a sus actividades con peces, huevos o gametos procedentes de una zona autorizada o de una explotación autorizada situada en una zona no autorizada podrán obtener la autorización de conformidad con lo dispuesto en las letras a) y b) de la parte I.A.6 o en las letras a) y b) de la parte II.A.3 del anexo C de la Directiva 91/67/CEE. Por tanto, las disposiciones de muestreo establecidas en los ya citados modelos A y B [letras a) y b) de la parte I.I.2.1] no serán aplicables a dichas explotaciones.

3. Programa de vigilancia para el mantenimiento de la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa

Con objeto de mantener la autorización de una zona o de una explotación situada en una zona no autorizada con respecto a la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa, las inspecciones y el muestreo para realizar los exámenes deberán llevarse a cabo de conformidad con lo establecido en el cuadro 1C. Las muestras deberán seleccionarse, prepararse y examinarse de conformidad con lo dispuesto en las partes I.I a I.IV y los exámenes de laboratorio deberán ser negativos con respecto a los agentes causantes de la septicemia hemorrágica viral o la necrosis hematopoyética infecciosa.

3. *Preparación y envío de muestras procedentes de los peces*

Antes de su envío o traslado al laboratorio, se extraerán de los peces partes de los órganos que deban examinarse con instrumental estéril de disección y se introducirán en tubos de plástico estériles que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con un 10 % de suero de ternera y antibióticos. Se recomienda la combinación de 200 UI de penicilina, 200 µg de estreptomina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque podrán utilizarse asimismo otros antibióticos de eficacia probada. Los tejidos que se deberán examinar son el bazo, la parte anterior del riñón y, además, bien el corazón o bien el encéfalo. En algunas ocasiones, deberá examinarse el fluido ovárico (cuadros 1A-1C).

El fluido ovárico o las partes de órganos de un máximo de 10 peces (cuadros 1A-1C) podrán recogerse en un solo tubo estéril que contenga al menos 4 ml de medio de transporte, para constituir una muestra conjunta. El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 0,5 gramos como mínimo.

Los tubos se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo, cajas de poliestireno de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo o de bloques de enfriamiento para garantizar la refrigeración de las muestras durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación. La temperatura de las muestras durante el transporte nunca deberá exceder de 10 °C y en el momento de la recepción todavía deberá haber hielo en el recipiente de transporte, o, alternativamente, uno o más bloques de enfriamiento deberán estar aún helados parcial o totalmente.

El examen virológico deberá iniciarse lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido 48 horas desde la recogida de las muestras. En casos excepcionales ⁽¹⁾, el examen virológico podrá empezar a más tardar en un plazo de 72 horas desde la recogida del material, siempre que éste quede protegido con medio de transporte y se cumplan los requisitos de temperatura durante el transporte (véase el punto 3 de la parte I.I.3).

En caso de que puedan cumplirse los requisitos de temperatura durante el transporte, podrán enviarse peces enteros al laboratorio. Los peces enteros podrán envolverse en papel absorbente y deberán enviarse en bolsas de plástico refrigeradas según se indica más arriba. También podrán enviarse peces vivos.

El embalaje y etiquetado deberán realizarse de conformidad con la normativa de transporte nacional e internacional actualmente vigente que corresponda.

4. Recogida de material de diagnóstico suplementario

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

II. Preparación de las muestras para el examen virológico

1. Congelación en casos excepcionales

En caso de que surjan dificultades prácticas (por ejemplo, condiciones meteorológicas adversas, días festivos, problemas de laboratorio, etc.) que impidan inocular las células en las 48 horas siguientes a la recogida de las muestras de tejidos, se podrán congelar estas muestras en medio de cultivo celular a una temperatura igual o inferior a -20 °C y realizar el examen virológico en un plazo de catorce días. En cualquier caso, el tejido sólo podrá congelarse y descongelarse una única vez antes de su examen. Se deberá llevar un registro de los motivos por los que se han congelado las muestras de tejido en cada ocasión en que se haya hecho (como, por ejemplo, tormenta, muerte de las líneas celulares, etc.).

2. Homogeneización de los órganos

Una vez en el laboratorio, se homogeneizará completamente el tejido de los tubos (con un triturador, mezclador o mortero con arena estéril) y a continuación se suspenderá el homogeneizado en el medio de transporte original.

Si la muestra está formada por peces enteros de menos de 4 cm de longitud, éstos se desmenuzarán con unas tijeras estériles o un escalpelo tras haberse eliminado la parte del cuerpo posterior a la cloaca. Si la muestra está formada por peces enteros de una longitud comprendida entre 4 y 6 cm, se recogerán las vísceras, sin descartar los riñones. Si la muestra está formada por peces enteros de más de 6 cm de longitud, se recogerán muestras de tejido de conformidad con el procedimiento descrito en la parte I.I.3. Las muestras de tejido se desmenuzarán con escalpelo o tijeras estériles y se homogeneizarán según el procedimiento arriba descrito; se suspenderá el homogeneizado en medio de transporte.

La proporción final entre tejidos y medio de transporte deberá ajustarse en el laboratorio a 1:10.

3. Centrifugado del homogeneizado

El homogeneizado se centrifugará a una aceleración de entre 2 000 y 4 000 × g durante 15 minutos, en una centrifugadora refrigerada a una temperatura comprendida entre 2 y 5 °C, y el sobrenadante se recogerá y se tratará durante 4 horas a 15 °C o durante toda la noche a 4 °C con antibióticos; por ejemplo, 1 mg/ml de gentamicina puede ser útil en esta fase.

Si la muestra ha sido enviada en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos), podrá omitirse el tratamiento con antibióticos del sobrenadante.

El tratamiento con antibióticos tiene por objeto luchar contra la contaminación bacteriana de las muestras y hace innecesaria la filtración con filtros de membrana.

Si el sobrenadante recogido se almacena a -80 °C en el plazo de 48 horas siguiente a la toma de muestras, podrá ser reutilizado una sola vez para el examen virológico.

⁽¹⁾ En casos excepcionales, como, por ejemplo, cuando los peces se recojan en zonas muy remotas que no dispongan de correo diario.

En caso de que surjan dificultades prácticas (por ejemplo, avería de la incubadora, problemas con los cultivos celulares, etc.) que impidan inocular las células en las 48 horas siguientes a la recogida de las muestras de tejidos, se podrá congelar el sobrenadante a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y realizar el examen virológico en un plazo de catorce días.

Antes de la inoculación de las células, el sobrenadante se mezclará a partes iguales con un conjunto de antisueros de los serotipos autóctonos de virus de la necrosis pancreática infecciosa (NPI), diluidos en la proporción adecuada, y la mezcla se incubará durante una hora como mínimo a una temperatura de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ o durante 18 horas como máximo a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El título del antisuero deberá ser como mínimo de 1:2 000 en una prueba de neutralización en placa del 50 %.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero del virus de la NPI (virus que en algunas partes de Europa está presente en el 50 % de las muestras de peces) tiene por objeto evitar el desarrollo de efectos citopatogénicos (ECP) debidos a este virus en los cultivos celulares inoculados. Con ello se logra reducir la duración de los exámenes virológicos, así como el número de casos en que la presencia de ECP debería considerarse como indicador potencial de la presencia del virus de la septicemia hemorrágica viral o del de la necrosis hematopoyética infecciosa.

Cuando las muestras procedan de unidades de producción consideradas indemnes de NPI, podrá omitirse el tratamiento de los inóculos con antisuero del virus de dicha enfermedad.

III. Examen virológico

1. Medios y cultivos celulares

Se cultivarán células BF-2 o RTG-2 y bien EPC o bien FHM a una temperatura comprendida entre 20 y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un medio adecuado como, por ejemplo, MEM de Eagle (o sus modificaciones) con adición de un 10 % de suero vacuno fetal y antibióticos en concentraciones normales.

Si las células se cultivan en frascos cerrados, es recomendable amortiguar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas podrá amortiguarse con Tris-HCl (23 mM) y bicarbonato sódico (6 mM). El pH deberá ser de $7,6 \pm 0,2$.

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

2. Inoculación de los cultivos celulares

La suspensión de órganos tratada con antibióticos se inoculará en cultivos celulares en dos diluciones, es decir, la dilución original y, además, una dilución 1:10 de la misma, que darán lugar a diluciones finales del material tisular en el medio de cultivo celular de 1:100 y 1:1 000, respectivamente (a fin de evitar interferencias homólogas). Deberán inocularse, como mínimo, dos líneas celulares (véase la parte I.III.1). La proporción entre el tamaño del inóculo y el volumen del medio de cultivo celular será aproximadamente de 1:10.

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

3. Incubación de los cultivos celulares

Los cultivos celulares inoculados se incubarán entre siete y diez días a una temperatura de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, lo que indica la acidificación del medio, se llevará a cabo el ajuste del pH con una solución estéril de bicarbonato, o con una sustancia equivalente, para garantizar la sensibilidad celular a la infección vírica.

Al menos una vez cada seis meses o si se sospecha que la sensibilidad celular ha descendido, se efectuará la titulación de material congelado de virus de septicemia hemorrágica viral y necrosis hematopoyética infecciosa para comprobar la sensibilidad de los cultivos celulares a la infección. En la parte IV se describe el procedimiento recomendado.

4. Microscopia

Se observarán periódicamente (al menos tres veces por semana) a 40-150 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si hay signos evidentes de ECP, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus de conformidad con la parte I.IV.

5. Subcultivos

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

Se reunirán alícuotas del medio (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos pertenecientes al cultivo primario, por líneas celulares, siete o diez días después de la inoculación. El resultado se inoculará en cultivos celulares homólogos sin diluir y en una dilución de 1:10 (que darán lugar a diluciones finales de 1:10 y 1:100, respectivamente, del sobrenadante) como se describe en la parte I.III.2. De manera alternativa, se pueden inocular directamente en un pocillo que contenga cultivo celular fresco alícuotas de un 10 % del medio que constituía el cultivo primario. (subcultivo de pocillo a pocillo). La inoculación podrá ir precedida de la preincubación de las diluciones con el antisuero del virus de la necrosis pancreática infecciosa a una dilución adecuada, tal y como se describe en la parte I.II.3.

Los cultivos inoculados se incubarán entonces durante siete a diez días a una temperatura de 15 °C y se mantendrán bajo observación, según se indica en la parte I.III.4.

Si se producen ECP tóxicos en los tres primeros días de incubación, se podrá realizar un subcultivo en esa etapa, pero entonces las células deberán incubarse durante siete días y volver a subcultivarse durante otros siete días. Si se desarrollan ECP tóxicos después de tres días, las células podrán subcultivarse una vez e incubarse hasta que transcurra el total de catorce días desde la inoculación primaria. En los últimos siete días de incubación no deberá registrarse ninguna señal de toxicidad.

Si, pese al tratamiento con antibióticos, se produce una contaminación bacteriana, antes de proceder al subcultivo se deberá centrifugar el sobrenadante a 2 000-4 000 × g durante un período de 15 a 30 minutos y a una temperatura de 2 a 5 °C, o filtrarlo a través de un filtro de 0,45 µm (por una membrana con baja afinidad por las proteínas), o someterlo a ambos procedimientos. Por lo demás, los procedimientos de subcultivo son los mismos que los aplicados a los ECP tóxicos.

IV. Identificación del virus

1. Pruebas de identificación del virus

Si se observa la existencia de ECP en un cultivo celular, se recogerá medio (sobrenadante) y se examinará sometiéndolo a una o varias de las pruebas siguientes: neutralización, IF o ELISA. Si estas pruebas no permiten identificar el virus con seguridad en una semana, el sobrenadante deberá enviarse para su identificación inmediata a un laboratorio nacional de referencia o al laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces.

2. Neutralización

Se eliminarán las células del sobrenadante recogido mediante centrifugación (2 000-4 000 × g) o filtración por membrana (0,45 µm) por una membrana con baja afinidad por las proteínas y éste se diluirá a 1:100 y 1:10 000 en un medio de cultivo celular.

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

- Suero que contenga un anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la septicemia hemorrágica viral a una dilución de 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾.
- Suero que contenga un anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa a una dilución de 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾.
- Conjunto de antisueros frente a los serotipos autóctonos del virus de la necrosis pancreática infecciosa a una dilución de 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾.
- Medio solo (control positivo).

De cada mezcla de sobrenadante y virus, se inocularán al menos dos cultivos celulares con 50 µl cada uno y se incubarán a 15 °C. Se controlará si aparecen ECP de la forma descrita en la parte I.III.4.

Algunas cepas del virus de la septicemia hemorrágica viral no reaccionan en las pruebas de neutralización. Tales cepas deben identificarse mediante la prueba de IF o la de ELISA.

Podrán usarse alternativamente otras pruebas de neutralización de eficacia probada.

3. IF

Para cada cepa vírica que se desee identificar, se sembrarán con células al menos ocho cubres o sus equivalentes, a una densidad que permita alcanzar una confluencia del 60 al 90 % aproximadamente después de 24 horas de cultivo. Se recomienda utilizar células EPC por su fuerte adherencia a las superficies de cristal, pero también se pueden utilizar otras líneas celulares, como BF-2, RTG-2 o FHM.

Cuando las células hayan sedimentado en la superficie del cristal (aproximadamente una hora después de la siembra) o cuando los cultivos se hayan incubado durante un período de hasta 24 horas, se inoculará el virus que se desee identificar. Se inocularán cuatro cultivos en la proporción de 1:10 en volumen y otros cuatro en la proporción de 1:1 000, que, posteriormente, se incubarán a 15 °C durante un período de 20 a 30 horas.

Tras la incubación, los cultivos se aclararán dos veces en MEM de Eagle sin suero, se fijarán con acetona helada al 80 % y se teñirán con ayuda de una IFAT de doble capa. La primera capa de reactivo consistirá en anticuerpos policlonales o monoclonales de calidad de referencia. La segunda capa de reactivo estará formada por un antisuero conjugado con fluorocromo con afinidad por la inmunoglobulina utilizada en la primera capa. Por cada uno de los antisueros sometidos a la prueba, deberá teñirse al menos un cultivo inoculado con una dosis alta y otro inoculado con una dosis baja. La prueba incluirá controles negativos y positivos adecuados. Se recomiendan para esta prueba fluorocromos como el FITC o el TRITC.

Los cultivos teñidos se prepararán utilizando solución salina de glicerol y se examinarán con luz ultravioleta incidente, utilizando oculares de 10 o 12 aumentos y objetivos de 25 o 40 aumentos con aperturas numéricas > 0,7 y > 1,3, respectivamente.

La técnica de IF descrita se ofrece como ejemplo. Podrán usarse alternativamente otras técnicas de IF (diferentes en relación con los cultivos celulares, la fijación y los anticuerpos de calidad de referencia) de probada eficacia.

⁽¹⁾ O como indique el laboratorio de referencia en relación con la posible citotoxicidad de los antisueros.

4. ELISA

Los pocillos de las placas de microtitulación se recubrirán durante una noche con las diluciones recomendadas de fracciones inmunoglobulínicas purificadas de anticuerpos de calidad de referencia.

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

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

CUADRO 1A

Plan de inspección y muestreo para las zonas y explotaciones situadas en zonas no autorizadas para el período de control de dos años que precede a la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa

(de conformidad con los anexos B y C de la Directiva 91/67/CEE y las disposiciones establecidas en la parte I del presente anexo)

	Nº de inspecciones clínicas anuales (dos años)	Nº de exámenes de laboratorio anuales (dos años)	Exámenes de laboratorio para detectar la presencia del virus ⁽¹⁾	
			Nº de peces en crecimiento (material de los órganos)	Nº de reproductores (fluido ovárico)
Zonas y explotaciones continentales				
a) Explotaciones con reproductores	2	2	120 (primera inspección) ⁽²⁾ 150 (segunda inspección)	30 (primera inspección) ⁽³⁾ 0 (segunda inspección)
b) Explotaciones únicamente con reproductores	2	1	0	150 (primera o segunda inspección) ⁽³⁾
c) Explotaciones sin reproductores	2	2	150 (primera y segunda inspecciones)	0
Zonas y explotaciones costeras				
a) Explotaciones con reproductores	2	2	120 (primera inspección) 150 (segunda inspección)	30 (primera inspección) ⁽³⁾ 0 (segunda inspección)
b) Explotaciones de salmónidos sin reproductores	2	2	30 (primera y segunda inspecciones) ⁽⁴⁾	0
c) Explotaciones sin salmónidos y sin reproductores	2	2	150 (primera y segunda inspecciones)	0

Número máximo de peces por muestra conjunta: 10.

⁽¹⁾ Asimismo, se podrá utilizar una muestra reducida de conformidad con lo establecido en el cuadro 1B si se cumplen las condiciones establecidas en las partes II.1, letra b) de la parte II.2.1 y parte III.

⁽²⁾ Inspecciones clínicas.

⁽³⁾ En circunstancias excepcionales, si fuera imposible obtener fluido ovárico, en su lugar se podrían tomar órganos.

⁽⁴⁾ Las muestras deberán recogerse como muy pronto tres semanas tras el traslado de los peces de aguas dulce a agua salada.

CUADRO 1B

Plan de inspección y muestreo para el período de control de dos años que precede a la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa en zonas y explotaciones situadas en zonas no autorizadas con un historial documentado de ausencia de estas enfermedades oficialmente reconocido

(de conformidad con los anexos B y C de la Directiva 91/67/CEE y las disposiciones establecidas en las partes I y III del presente anexo)

	Nº de inspecciones clínicas anuales (dos años)	Nº de exámenes de laboratorio anuales (dos años)	Exámenes de laboratorio para detectar la presencia del virus	
			Nº de peces en crecimiento (material de los órganos)	Nº de reproductores (fluido ovárico)
Zonas y explotaciones continentales				
a) Explotaciones con reproductores	2	2	0 (primera inspección) ⁽¹⁾ 30 (segunda inspección)	30 (primera inspección) ⁽²⁾ 0 (segunda inspección)
b) Explotaciones únicamente con reproductores	2	1	0	30 (primera o segunda inspección) ⁽²⁾
c) Explotaciones sin reproductores	2	2	30 (primera y segunda inspecciones)	0
Zonas y explotaciones costeras				
a) Explotaciones con reproductores	2	2	0 (primera inspección) 30 (segunda inspección)	30 (primera inspección) ⁽²⁾ 0 (segunda inspección)
b) Explotaciones de salmónidos sin reproductores	2	2	30 (primera y segunda inspecciones) ⁽³⁾	0
c) Explotaciones sin salmónidos y sin reproductores	2	2	30 (primera y segunda inspecciones)	0

Número máximo de peces por muestra conjunta: 10.

⁽¹⁾ Inspecciones clínicas.

⁽²⁾ En circunstancias excepcionales, si fuera imposible obtener fluido ovárico, en su lugar se podrían tomar órganos.

⁽³⁾ Las muestras deberán recogerse como muy pronto tres semanas tras el traslado de los peces de agua dulce a agua salada.

CUADRO 1C

Plan de inspección y muestreo para las zonas y explotaciones situadas en zonas no autorizadas con vistas a mantener la autorización con respecto a la septicemia hemorrágica viral y la necrosis hematopoyética infecciosa

(de conformidad con los anexos B y C de la Directiva 91/67/CEE y las disposiciones establecidas en la parte I del presente anexo)

	Nº de inspecciones clínicas anuales	Número de peces de una muestra conjunta sometida a examen de laboratorio ⁽¹⁾	
		Nº de peces en crecimiento (material de los órganos)	Nº de reproductores (fluido ovárico)
Zonas y explotaciones continentales			
a) Explotaciones con reproductores	2	20 (primera o segunda inspección)	10 (primera o segunda inspección) ⁽²⁾

	Nº de inspecciones clínicas anuales	Número de peces de una muestra conjunta sometida a examen de laboratorio ⁽¹⁾	
		Nº de peces en crecimiento (material de los órganos)	Nº de reproductores (fluido ovárico)
b) Explotaciones únicamente con reproductores	2	0	30 (primera o segunda inspección) ⁽²⁾
c) Explotaciones sin reproductores	1	30	0
Zonas y explotaciones costeras			
a) Explotaciones con reproductores	2	20 (primera o segunda inspección)	10 (primera o segunda inspección) ⁽²⁾
b) Explotaciones sin reproductores	1	30 ⁽³⁾	0

Número máximo de peces por muestra conjunta: 10.

⁽¹⁾ En las zonas autorizadas sólo será necesario recoger muestras por rotación en un 50 % de las explotaciones cada año. En las explotaciones autorizadas situadas en zonas no autorizadas se deberán recoger muestras cada año.

⁽²⁾ En circunstancias excepcionales, si fuera imposible obtener fluido ovárico, en su lugar se podrían tomar órganos.

⁽³⁾ Las muestras deberán recogerse como muy pronto tres semanas tras el traslado de los peces de agua dulce a agua salada.

PARTE II

Procedimientos de diagnóstico para la confirmación de la necrosis hematopoyética infecciosa y de la septicemia hemorrágica viral en presuntos brotes

Se emplearán una o más de las siguientes técnicas para el diagnóstico de estas enfermedades:

- A. Aislamiento convencional de los virus y posterior identificación serológica de los mismos.
- B. Aislamiento e identificación serológica simultánea de los virus.
- C. Otras técnicas de diagnóstico (IFAT, ELISA).

En las explotaciones de las zonas autorizadas, el primer caso de estas enfermedades no deberá confirmarse basándose únicamente en el método C. Deberá utilizarse también el método A o el B.

Es posible que en algunos casos el material tisular destinado al examen virológico tenga que ir acompañado de material suplementario para exámenes bacteriológicos, parasitológicos, histológicos o de otro tipo que permitan un diagnóstico diferencial.

A. Aislamiento convencional de los virus y posterior identificación serológica de los mismos

I.1. Selección de muestras

Para el examen se seleccionarán como mínimo 10 peces que muestren los signos típicos de la necrosis hematopoyética infecciosa o de la septicemia hemorrágica viral.

I.2. Preparación y envío de muestras de peces

Procédase del modo indicado en la parte I.I.3.

I.3. Recogida de material suplementario para diagnóstico

Procédase del modo indicado en la parte I.I.4.

II. Preparación de las muestras para el examen virológico

Procédase del modo indicado en la parte I.II.

III. Examen virológico

Procédase del modo indicado en la parte I.III.

IV. Identificación del virus

Procédase del modo indicado en la parte I.IV

B. Aislamiento e identificación serológica simultánea de los virus

I.1. Selección de muestras

Procédase del modo indicado en la parte II.A.I.1.

I.2. Preparación y envío de muestras de peces

Procédase del modo indicado en la parte I.I.3.

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

Procédase del modo indicado en la parte I.I.4.

II.1. *Homogeneización de los órganos*

Procédase del modo indicado en la parte I.II.2.

II.2. *Centrifugado del homogeneizado*

El homogeneizado se centrifugará a una aceleración de entre 2 000 y 4 000 \times g durante 15 minutos, en una centrifugadora refrigerada a una temperatura comprendida entre 2 y 5 °C, y el sobrenadante se recogerá y se tratará durante cuatro horas a 15 °C con antibióticos, por ejemplo, 1mg/ml de gentamicina, o se filtrará (0,45 μ g) por una membrana con baja afinidad por las proteínas.

II.3. *Tratamiento del sobrenadante con antisuecos para diagnóstico*

La suspensión de órganos tratada con antibióticos o filtrada por membrana se diluirá a 1:10 y 1:1 000 en medio de cultivo celular; se mezclarán alícuotas cuyas partes iguales con los reactivos enumerados en la parte I.IV.2 y se incubarán durante 60 minutos a 15 °C.

III.1. *Medios y cultivos celulares*

Procédase del modo indicado en la parte I.III.1.

III.2. *Inoculación de los cultivos celulares*

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

III.3. *Incubación de los cultivos celulares*

Procédase del modo indicado en la parte I.III.3.

III.4. *Microscopia*

Se observarán diariamente a 40-150 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si se evita la aparición de ECP con alguno de los antisuecos utilizados, el virus podrá considerarse identificado.

En caso contrario, se iniciarán los procedimientos de identificación del virus de conformidad con la parte I.IV.

III.5. *Subcultivos*

Si no se han observado ECP después de siete a diez días, se realizarán subcultivos a partir de los cultivos inoculados con sobrenadante y medio (parte II.B.II.3) con arreglo a la parte I.III.5.

C. *Otras técnicas de diagnóstico*

Las técnicas IFAT o ELISA descritas en las partes I.IV.3 y I.IV.4, respectivamente, se podrán aplicar al sobrenadante, que se habrá preparado del modo indicado en la parte I.II.2. Estas técnicas rápidas se completarán con un examen virológico con arreglo a los puntos A o B antes de que hayan transcurrido 48 horas desde la toma de la muestra, si:

- a) se obtiene un resultado negativo, o
- b) se obtiene un resultado positivo con material que constituya el primer caso de necrosis hematopoyética infecciosa o septicemia hemorrágica viral en una zona autorizada.

El material tisular podrá someterse a otras técnicas de diagnóstico como la RCP-TI, la IF realizada con cortes congelados o la inmunohistoquímica realizada con material fijado con formol. Estas técnicas deberán completarse siempre con la inoculación en cultivos celulares de material tisular no fijado.

PARTE III

Demostración documental de la ausencia de septicemia hemorrágica viral, de necrosis hematopoyética infecciosa o de ambas en zonas o en explotaciones situadas en zonas no autorizadas

Directrices y criterios aplicables a un programa oficial de inspección sanitaria

1. Sólo se podrá iniciar un programa de inspección sanitaria:
 - tras haber aplicado un programa de erradicación del virus de la septicemia hemorrágica viral o del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa reconocido oficialmente, en virtud del cual se hayan retirado todos los peces de las instalaciones y éstas se hayan limpiado, desinfectado y dejado en reposo antes de volver a abastecerlas con peces procedentes de explotaciones autorizadas, o
 - en explotaciones piscícolas en las que no haya precedentes de infección con los virus de estas enfermedades.
2. El programa de inspección sanitaria deberá constar tanto de inspecciones clínicas como de exámenes de laboratorio.
3. El programa deberá incluir dos inspecciones sanitarias clínicas anuales realizadas de conformidad con las directrices recogidas en la parte I.

4. En al menos una de las inspecciones llevadas a cabo cada año, se recogerán 30 muestras de tejidos de peces o de fluido ovárico de cada explotación piscícola. Las muestras se seleccionarán, prepararán y someterán a examen de laboratorio de conformidad con las partes I, II y IV.
5. El programa de inspección sanitaria se llevará a cabo durante al menos cuatro años en todas las explotaciones de la zona o en la explotación (situada en una zona no autorizada) que vayan a autorizarse.
6. Para que se reconozca oficialmente el programa, no deberá darse ni detectarse ningún caso de septicemia hemorrágica viral ni de necrosis hematopoyética infecciosa (ni infecciones clínicas ni aislamientos de virus).

PARTE IV

Procedimiento de titulación para comprobar la sensibilidad de los cultivos celulares a la infección

A continuación se recogen los procedimientos de titulación recomendados mencionados en la parte I.III.3.

Se deberán emplear al menos dos cepas de virus de la septicemia hemorrágica viral y una cepa de virus de la necrosis hematopoyética infecciosa. Las cepas deberán representar los principales grupos de virus presentes en la Unión Europea; por ejemplo, en el caso del virus de la septicemia hemorrágica viral, se deberá elegir una cepa patogénica para la trucha arco iris de agua dulce y una cepa de agua salada patogénica para el rodaballo, y en el caso del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa se deberá elegir una cepa patogénica para la trucha arco iris de Europa. Deberán emplearse cepas bien definidas procedentes de los Estados miembros. El laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces puede suministrar cepas de referencia.

En tubos de cultivo celular con células BF-2 o RTG-2, en el caso del virus de la septicemia hemorrágica viral, y con células EPC o FHM, en el del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, se propagarán lotes de virus de un número bajo de pases en cultivos celulares. Se deberá emplear un medio de cultivo celular con, al menos, un 10 % de suero. En la inoculación deberá emplearse una MOI baja (< 1).

Con los ECP totales presentes, se recogerá el virus mediante centrifugado del sobrenadante del cultivo celular a $2\,000 \times g$ durante 15 minutos, se esterilizará pasándolo por un filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ y se distribuirá en criotubos etiquetados. El virus se mantendrá a -80°C .

Una semana después de la congelación, se descongelarán tres tubos de cada virus colocándolos en agua fría y se titularán con sus líneas celulares respectivas. Cada cepa de virus se descongelará y titulará al menos cada seis meses o si se sospecha que la sensibilidad de una línea celular se ha visto reducida.

Se deberán describir detalladamente los procedimientos de titulación y se deberá seguir el mismo procedimiento cada vez.

La titulación por dilución hasta el límite se efectuará utilizando al menos seis tubos en cada fase de dilución. Los títulos se compararán con los obtenidos previamente. Si el título de uno de las tres cepas de virus es inferior en un factor igual o superior a 2 unidades logarítmicas, respecto al título inicial, no deberá volver a utilizarse la línea celular para fines de vigilancia.

Si en el laboratorio se guardan distintas líneas celulares, cada una deberá examinarse por separado.

Los registros se conservarán al menos diez años.

PARTE V

Acrónimos y abreviaturas

BF-2	Fibroblasto de alevín de <i>Lepomis macrochirus</i> (línea celular)
ECP	Efectos citopatogénicos
LCR	Laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces
ELISA	Prueba de inmunoabsorción enzimática
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (línea celular)
FHM	<i>Pimephales promelas</i> (línea celular)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Hepes	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etano-sulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano
IF	Inmunofluorescencia
IFAT	Prueba de fluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos
(V)NHI	(Virus de la) necrosis hematopoyética infecciosa
(V)NPI	(Virus de la) necrosis pancreática infecciosa
MEM	Medio mínimo fundamental

MOI	Multiplicidad de infección (proporción del número de partículas víricas infecciosas añadido a un número conocido de células de un cultivo)
OPD	Orto-fenilendiamina
PBS	Solución salina amortiguadora fosfatada
RTG-2	Gónadas de trucha arco iris (línea celular)
RCP-TI	Reacción de polimerización en cadena con transcripción inversa
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano-HCl
TRITC	Isotiocianato de tetrametil-rodamina
(V)SHV	(Virus de la) septicemia hemorrágica viral.
