

20180310521

АГЕНЦИЈА ЗА ХРАНА И ВЕТЕРИНАРСТВО

Врз основа на член 49 став (4) Законот за ветеринарно здравство („Службен весник на Република Македонија“ бр. 113/07, 24/11, 136/11, 123/12, 123/15, 154/15 и 53/16), директорот на Агенцијата за храна и ветеринарство донесе

ПРАВИЛНИК ЗА ИЗМЕНУВАЊЕ И ДОПОЛНУВАЊЕ НА ПРАВИЛНИКОТ ЗА СУЗБИВАЊЕ И ИСКОРЕНУВАЊЕ НА ОДРЕДЕНИ БОЛЕСТИ КАЈ ВОДНИТЕ ЖИВОТНИ (*)

Член 1

Во Правилникот за мерки за сузбивање и искоренување на одредени болести кај водните животни („Службен весник на Република Македонија“ бр. 185/11 и 114/14), во членот 2, став (2) по точката 7) се додава нова точка 8) која гласи:

„8) „транспортен медиум“ е медиум за клеточна култура со 10% телешки серум и 200µg пеницилин, 200 µg стрептомицин и 200 µg канамицин на милилитар или со други антибиотици со докажана ефикасност.“

Член 2

Во членот 14, став (1) во точката 1) сврзникот „и“ се брише.

Во точката 2) точката се заменува со сврзникот „и“.

По точката 2) се додава нова точка 3) која гласи:

„3) За сузбивање и искоренување на ВХС, ИХН, КХВ и ИСА покрај мерките утврдени во членовите 15, 16, 17 и 19 од овој правилник, се применуваат и мерките утврдени во Прилог 4 кој е составен дел од овој правилник.“

Член 3

Во членот 22 ставот (4) се менува и гласи:

„(4) Лабораторијата од ставот (1) на овој член во лабораториската дијагностика за откривање и потврдување на вирусна хеморагична септикемија (ВХС) и инфективна хематопоемска некроза (ИХН) кај пастрмките ги користи дијагностичките методи и постапки дадени во Прилог 5 кој е составен дел на овој правилник.“

По ставот (4) се додаваат два нови става (5) и (6) кои гласат:

„(5) Лабораторијата од ставот (1) на овој член во лабораториската дијагностика за откривање и потврдување на болеста кои херпес вирус кај крапот ги користи дијагностичките методи и постапки дадени во Прилог 6 кој е составен дел на овој правилник.

(6) Лабораторијата од ставот (1) на овој член во лабораториската дијагностика за откривање и потврдување на болеста инфективна салмонидна анемија кај пастрмките ги користи дијагностичките методи и постапки дадени во Прилог 7 кој е составен дел на овој правилник.“

Член 4

Прилогот 4 се заменува со нов Прилог 4 кој е составен дел на овој правилник.

(*) Со овој правилник се врши усогласување со Одлуката за спроведување (ЕУ) 2015/1554 на Комисијата од 11 септември 2015 година за утврдување на правила за примена на Директива 2006/88/ЕЗ во однос на барањата за надзор и дијагностички методи, (CELEX бр. 32015D1554).

Член 5

Овој правилник влегува во сила наредниот ден од денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија“.

Бр. 02-602/1
13 февруари 2018 година
Скопје

Агенција за храна
и ветеринарство
в.д. Директор,
Зоран Атанасов, с.р.

Прилог 4

МЕРКИ ЗА СУЗБИВАЊЕ И ИСКОРЕНУВАЊЕ НА ВХС, ИХН, КХВ И ИСА

Дел I:

I.1 Општи мерки за сузбивање и искоренување на ВХС и ИХН

Држава, зона или оддел со здравствен статус од Категорија V во однос на ВХС или ИХН или и двете може да добие здравствен статус од категорија I во однос на болестите, доколку во сите одгледувалишта во кои се одгледуваат приемчиви видови на риба, во рамките на таа држава, зона или оддел, се спроведува програма за искоренување на болеста во согласност со точките од 1) до 5) од овој прилог:

1) минималните контролни мерки утврдени во член 14 и 15 од овој правилник се применуваат ефективно, и формирани се заштитна зона и зона под надзор во повеќето од одгледувалиштата кои се официјално потврдени за заразени одгледувалишта во однос на ВХС или ИХН или и двете.

Областа каде треба да се спроведат мерки за сузбивање се определува според локацијата на заразеното одгледувалиште земајќи ги предвид факторите кои влијаат на ризиците од ширење на болеста помеѓу риби кои се одгледуваат на одгледувалиштето и дивите популации на риби, како што се: бројот, стапката и ширењето на смртни случаи меѓу рибите во одгледувалиштата заразени со ВХС или ИХН или и двете; растојанието и густината до соседните одгледувалишта; близината до кланици; контактни одгледувалишта; видови на риби присутни во одгледувалиштето; начинот на одгледување на рибата во заразените одгледувалишта и во соседните одгледувалишта; хидродинамичните услови и други епидемиолошки фактори.

2) Заштитна зона и зона под надзор се воспоставува во зависност од географските карактеристики на тие зони и тоа:

(а) заштитната зона се воспоставува во непосредна близина на одгледувалиштето кое е официјално прогласено за заразено со ВХС или ИХН или и двете, и ја опфаќа целата област на водниот слив на одгледувалиштето кое е официјално прогласено за заразено со ВХС или ИХН или и двете. Официјалниот ветеринар може да го ограничи опсегот на зоната до делови од областа на водниот слив или површината на одгледувалиштето, под услов да не е загрозувано спречувањето на ширењето на ВХС или ИХН или и двете;

(б) зона под надзор се воспоставува од страна на официјалниот ветеринар надвор од заштитната зона и одговара на проширена област надвор од утврдената заштитна зона;

3) во сите одгледувалишта кои се лоцирани во заштитната зона и во кои се одгледуваат приемчиви видови на риба, а кои не се официјално прогласени за заразени со ВХС или ИХН или и двете, се спроведува официјална контрола при што:

(а) се собираат примероци за лабораториско испитување од 10 риби, кога во одгледувалиштето се забележани клинички знаци или посмртни промени кои одговараат на знаците за инфекција со ВХС или ИХН или и двете, или од минимум 30 риби, во случај кога во одгледувалиштето не се забележани клинички или посмртни знаци;

(б) во одгледувалиштата каде тестовите наведени во став (а) од оваа точка дале негативни резултати, официјалните ветеринари треба да спроведат здравствена контрола еднаш месечно во текот на периодот кога температурата на водата е веројатно да постигне вредност под 14°C, освен кога рибниците или мрежните -кафезите се покриени со мраз, додека заштитната зона не биде повлечена во согласност со точка 4);

4) сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени со ВХС или ИХН или и двете, се празнат, чистат, дезинфицираат и се ставаат вон употреба. Времетраењето на периодот вон употреба е најмалку шест недели. Во сите одгледувалишта официјално прогласени за заразени во рамки на иста заштитна зона откако ќе се испразнат, се спроведува синхронизиран период на неактивност од најмалку 3 недели. Овој став се применува и во однос на нови одгледувалишта, официјално прогласени за заразени во текот на извршувањето на програмата за искоренување.

Додека трае периодот на неактивност на официјално прогласените заразени одгледувалишта, заштитната зона преминува во зона под надзор.

Официјалниот ветеринар може да побара празнење, чистење, дезинфекција и ставање вон употреба и на други одгледувалишта кои се наоѓаат во заштитната зона и зоната под надзор. Времетраењето на периодот на неактивност за оние одгледувалишта се воспоставува од страна на официјалниот ветеринар врз основа на проценката на ризикот за секој поединечен случај;

5) сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени со ВХС или ИХН или и двете од овие болести, како и сите други обработени одгледувалишта во рамки на заштитните и зоните под надзор, како што е наведено во точка 4) од овој дел, повторно се населуваат со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија I- слободни од болест од во однос на ВХС или ИХН или и двете.

Повторно населувањето со риби се врши само кога сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени биле испразнети, исчистени, дезинфицирани и неактивни во согласност со точка 4) од дел I.1 од овој прилог;

б) од сите одгледувалишта во кои се одгледуваат приемчиви видови на риба, во рамки на држава, зона или оддел во кои се спроведува програма за искоренување на болест, кога се спроведува надзор на диви популации, изборот на точките за земање примероци како и спроведувањето на надзорот треба да се врши во согласност со Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

I.2. Критериуми за враќање на статус слободна од болест за копнени оддели кои вклучуваат единствено одгледувалиште, кое претходно било прогласено за одгледувалиште со здравствен статус од категорија I во однос на ИХН и ВХС или и двете

Копнениот оддел кој вклучува единствено одгледувалиште кое претходно било прогласено за слободно од ИХН и ВХС или двете, чиј здравствен статус во однос на оние болести не зависи од околните природни води во согласност со точка 3 од Дел II од Прилог 5 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура и чиј здравствен статус од категорија I е повлечен во согласност со член 16-д од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура, може да го поврати здравствениот статус од категорија I веднаш откако официјалниот ветеринар потврдил дека се исполнети следниве услови:

(а) одгледувалиштето официјално прогласено за заразено со ВХС или ИХН или и двете, се празни, чисти, дезинфицира и станува неактивно; а времетраењето на периодот на неактивност е најмалку шест недели;

(б) одгледувалиштето официјално потврдено за заразено со ВХС или ИХН или и двете, се порибува со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија I во однос на ВХС или ИХН или и двете.

I.3. Критериуми за престанување на мерките утврдени во член 15 од овој правилник заради преминување на држава, оддел или зона од здравствен статус од категорија V кон здравствен статус од категорија III во однос на ВХС или ИХН или и двете болести

Одгледувалишта во држава, зона или оддел кои имаат здравствен статус од категорија V во однос на ВХС или ИХН или и двете болести можат да добијат здравствен статус од категорија III, доколку:

(а) барањата утврдени во ставовите 1), 2), 3) и 4) од точка I.1 на овој дел се исполнети. Доколку поради технички причини не е можно да се спроведе ставање на одгледувалиштата вон употреба, во тие одгледувалишта треба да се спроведат други алтернативни мерки кои даваат иста гаранција за искоренување на ИХН или ВХС или и двете од одгледувалиштето;

(б) во сите одгледувалишта кои се официјално прогласени за заразени, како и сите други одгледувалишта во кои се ставиле вон употреба во согласност со став (а) од оваа точка, а кои се лоцирани во рамки на утврдените заштитни и зони под надзор, треба да бидат порибени со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија I, во однос на ВХС или ИХН или и двете.

Порибување може да се одобри и со риба со потекло од одгледувалишта од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија II или III во однос на ВХС или ИХН или и двете доколку со лабораториска дијагностика се потврди отсуство на болестите кај рибата со која се порибува.

(в) порибувањето со риба се врши откако сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени се испразнети, исчистени, дезинфицирани и биле неактивни или било постапено во согласност со став (а) од оваа точка.

I.4. Земање примероци и дијагностички методи за да се потврди или отфрли присуството на ВХС или ИХН

При пријава на сомнеж за ВХС или ИХН или и двете болести на одгледувалиште, истиот треба да биде потврден или отфрлен во согласност со член 5 од овој правилник. Официјалниот ветеринар спроведува контрола на одгледувалиштето со земање примероци и лабораториска дијагностика и тоа:

1) во одгледувалиштето во кое е пријавен сомнеж официјалниот ветеринар спроведува барем една здравствена контрола со земање примероци за испитување од 10 риби, кај кои се забележани клинички знаци или посмртни промени, кои одговараат на знаците за инфекција со ВХС или ИХН или и двете болести. Доколку во одгледувалиштето не се забележани клинички знаци или посмртни промени примероци се земаат од минимум 30 риби. Примероците се испитуваат со употреба на еден или повеќе дијагностички методи, утврдени во точки (а) и (б) во согласност со деталните дијагностички методи и постапки утврдени во Прилог 6 од овој правилник:

(а) конвенционално изолирање на вирус во клеточна култура со последователна имунохемиска или молекуларна идентификација на вирус;

(б) откривање на вирусот со *RT-qPCR*;

(в) други дијагностички техники со докажана слична ефикасност, на пример индиректно тестирање со флуоресцентни антитела (*IFAT*), ензимски-поврзана имуносорбентна анализа (*ELISA*), *RT-PCR* и имунохистохемија (*IHC*);

2) присуството на ВХС се смета за потврдено, ако еден или повеќе од овие дијагностички методи се позитивни за ВХС. Присуството на ИХН се смета за потврдено, ако еден или повеќе од овие дијагностички методи се

позитивни за ИХН. Потврдувањето на првиот случај на ВХС или ИХН во одгледувалишта лоцирани во држава, зона или оддел кои претходно не биле заразени, е врз основа на конвенционално изолирање на вирусот во клеточната култура или *RT-qPCR*;

3) сомнеж за ВХС или ИХН или и двете болести може да се исклучи, ако при одгледување на клетки или при тестирања со *RT-qPCR* не се откриени други докази за присуство на ВХС или за ИХН или и двете болести.

Дел II:

II.1. Општи мерки за сузбивање и искоренување на КХВ

Држава, зона или оддел кои имаат здравствен статус од категорија V во однос на КХВ, може да добијат здравствен статус од категорија I, доколку во сите одгледувалишта во кои се одгледуваат приемчиви видови на риба, во рамки таа држава, зона или оддел се спроведува програма за искоренување на болести во согласност со точките од 1) до 6):

1) Минималните контролни мерки утврдени во член 14 и 15 од овој правилник се применуваат ефективно, и формирани се заштитна зона и зона под надзор во повеќето од одгледувалиштата кои се официјално потврдени за заразени одгледувалишта во однос на КХВ.

Областа каде треба да се спроведат мерки за сузбивање се определува според локацијата на заразеното одгледувалиште, земајќи ги предвид факторите кои влијаат на ризиците од ширење на болеста помеѓу риби кои се одгледуваат на одгледувалишта и дивите риби, како што се: бројот, стапката и ширењето на смртни случаи меѓу рибите во одгледувалиштата заразени со КХВ; растојанието и густината до соседните одгледувалишта; близината до кланици; контактни одгледувалишта; видови на риби присутни во одгледувалиштето; начинот на одгледување на рибата во заразените одгледувалишта и во соседните одгледувалишта; хидродинамичните услови и други епидемиолошки фактори.

2) Заштитната зона и зоната под надзор се воспоставуваат во зависност од географските карактеристики на подрачјето и тоа:

(а) заштитната зона се воспоставува во непосредна близина на одгледувалиштето, кое е официјално прогласено за заражено со КХВ, и ја опфаќа целата област на водниот слив на одгледувалиштето кое е официјално прогласено за заражено со КХВ. Официјалниот ветеринар може да го ограничи опсегот на зоната до делови од областа на водниот слив или површината на одгледувалиштето, под услов да не е загрозувано спречувањето на ширењето на КХВ;

(б) зона под надзор се воспоставува од страна на официјалниот ветеринар надвор од заштитната зона и одговара на проширена област надвор од утврдената заштитна зона.

3) Во сите одгледувалишта кои се лоцирани во границите на заштитната зона и во кои се одгледуваат приемливи видови на риба, а кои не се официјално прогласени за заразени со КХВ, се спроведува официјална контрола при што:

(а) се собираат примероци за лабораториско тестирање од 10 риби, кога во одгледувалиштето се забележани клинички знаци или посмртни промени кои одговараат на знаците за инфекција со КХВ, или од минимум 30 риби, кога во одгледувалиштето не се забележани клинички или посмртни промени;

(б) официјалните ветеринари, во одгледувалиштата каде тестовите наведени во став (а) од оваа точка даде негативни резултати, треба да спроведат здравствена контрола еднаш месечно во текот на периодот кога температурата на водата е веројатно да постигне над 15°C, додека заштитната зона не биде повлечена во согласност со точка 4) од II.1 од овој прилог;

4) Сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени со КХВ, треба да се испразнат, исчистат, дезинфицираат и ставаат вон употреба. Времетраењето на периодот вон употреба на одгледувалиштето е најмалку шест недели. Во сите одгледувалишта официјално прогласени за заразени во рамки на иста заштитна зона откако ќе се испразнат, се спроведува синхронизиран период на неактивност од најмалку 3 недели. Овој став се применува и во однос на нови одгледувалишта, официјално прогласени за заразени во текот на извршувањето на програмата за искоренување.

Додека трае периодот на неактивност на официјално прогласените заразени одгледувалишта, заштитната зона преминува во зона под надзор.

Официјалниот ветеринар може да побара празнење, чистење, дезинфекција и ставање вон употреба и на други одгледувалишта кои се наоѓаат во заштитната зона и зоната под надзор. Времетраењето на периодот на неактивност за оние одгледувалишта се утврдува од страна на официјалниот ветеринар врз основа на проценката на ризикот за секој случај поединечно.

5) Сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени со КХВ како и сите други неактивни одгледувалишта, лоцирани во рамките на заштитните и зоните под надзор, како што е наведено во точка 4) од овој дел, повторно се населуваат со риба со потекло од држава, зони или оддел со здравствен статус од Категорија I, слободни од болест во однос на КХВ.

Повторно населување со риба се врши само кога сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени биле испразнети, исчистени, дезинфицирани и неактивни во согласност со точка 4) од дел II.1 од овој прилог.

б) Од сите одгледувалишта во кои се одгледуваат приемчиви видови на риба, во рамки на држава, зона или оддел во кои се спроведува со програма за искоренување на болест, кога се спроведува надзор на диви популации, изборот на точките за земање примероци како и спроведувањето на надзорот се врши во согласност со Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

II.2. Критериуми за враќање на статус слободна од болест за копнени оддели кои вклучуваат единствено одгледувалиште, кое претходно било прогласено за слободно од КХВ

Копнен оддел кој вклучува единствено одгледувалиште, кое претходно било категоризирано со здравствен статус од категорија I во однос на КХВ чиј здравствен статус во однос на КХВ не зависи од околните природни води во согласност со точка 3 од Дел II од Прилог 5 Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура и чиј здравствен статус категорија I е повлечен во согласност со член 16-д од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура, може да го поврати здравствениот статус од категорија I во однос на КХВ веднаш откако официјалниот ветеринар потврди дека се исполнети следниве услови:

- (а) одгледувалиштето е празно, чисто, дезинфицирано и ставено вон употреба; периодот на неактивност мора да трае најмалку шест недели;
- (б) одгледувалиштето се порибува со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија I или оддели каде се спроведува програма за надзор на КХВ односно одгледувалиштето има здравствен статус од категорија II.

II.3. Критериуми за престанување на мерките утврдени во член 15 од овој правилник заради преминување на држава, оддел или зона од здравствен статус од категорија V кон здравствен статус од категорија III во однос на КХВ

Држава, зона или оддел кои имаат здравствен статус од категорија V во однос на КХВ можат да добијат здравствен статус од категорија III доколку:

- (а) барањата утврдени во ставовите 1), 2), 3) и 4) од точки II.2. од овој дел се исполнети. Ако поради технички причини не е можно да се одржи неактивност на одгледувалиштата, во тие одгледувалишта треба да се спроведат други алтернативна методи кои даваат иста гаранција за искоренување на КХВ од одгледувалиштето;

(б) во сите одгледувалишта кои се официјално прогласени за заразени, како и во сите други одгледувалишта во кои се спровело обработување во согласност со точка (а) од оваа точка, а кои се лоцирани во рамки на утврдените заштитни и зони под надзор треба да бидат порибени со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија I во однос на КХВ;

Може да се одобри и порибување со риба со потекло од одгледувалишта од држава, оддел или зона со здравствен статус од категорија II или III во однос на КХВ доколку со лабораториска дијагностика се потврди отсуство на болеста кај рибата со која се порибува.

(в) порибувањето со риба се врши откако сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени биле испразнети, исчистени, дезинфицирани и неактивни или било постапено во согласност со став (а) од оваа точка.

II.4. Земање на примероци и дијагностички и методи за да се потврди или отфрли присуство на КХВ

- 1) Примероци за лабораториска дијагностика се земаат од делови од жабри и бубрези. Парчиња од органите на максимум две риби се групираат во еден заеднички примерок.
- 2) По пријава на сомнеж на КХВ на одгледувалиште, истиот може да се потврди или отфрли во согласност со член 5 од овој правилник. Официјалниот ветеринар спроведува контрола на одгледувалиштето со земање примероци за испитување од 10 риби, кај кои се забележани клинички знаци или посмртни промени, кои одговараат на знаците за инфекција со КХВ. Доколку на одгледувалиштето не се забележани клинички знаци или посмртни промени примероци се земаат од 30 риби.

Примероците се испитуваат, со употреба на дијагностичкиот метод утврден во прилог 7 од овој правилник;

- 3) Присуство на инфекција со КХВ се смета за потврдено ако КХВ се открие преку полимеразна верижна реакција (*PCR*); сомнежот за КХВ може да се отфрли ако наведените тестови не откријат друг доказ за присуство на КХВ.

Дел III:

III.1. Општи мерки за сузбивање и искоренување на ИСА

Држава, зона или оддел кои имаат здравствен статус од категорија V во однос на ИСА, можат да добијат здравствен статус од категорија I во однос на наведената болест, доколку во сите одгледувалишта во кои се одгледуваат приемчиви видови на риба, во држава, зона или оддел се спроведувала програма за искоренување која е во согласност со точките од 1) до 5):

1) минималните контролни мерки утврдени во член 9, 10, 11, 12 и 13 од овој правилник се применуваат ефективно, и формирани се зона под ограничување, заштитна зона и зона под надзор во повеќето одгледувалишта официјално прогласени за заразени со ИСА.

Областа каде треба да се спроведат мерки за сузбивање се определува според локацијата на заразеното одгледувалиште, земајќи ги предвид факторите кои влијаат на ризиците од ширење на болеста помеѓу риби кои се одгледуваат на одгледувалиштето и дивите популации на риби, како што се: бројот, стапката и ширењето на смртни случаи меѓу рибите во одгледувалиштата заразени со ИСА; растојанието и густината до соседните одгледувалишта; близината до кланици; контактни одгледувалишта; видови на риби присутни во одгледувалиштето; начинот на одгледување на рибата во заразените одгледувалишта и во соседните одгледувалишта; хидродинамичните услови и други епидемиолошки фактори.

2) Заштитна зона и зона под надзор се воспоставува во зависност од географската карактеристики на тие зони и тоа:

(а) заштитната зона се воспоставува во непосредна близина на одгледувалиштето кое е официјално прогласено за заразено со ИСА и ја опфаќа целата област на водниот слив на одгледувалиштето кое е официјално прогласено за заразено со ИСА. Официјалниот ветеринар може да го ограничи опсегот на зоната до делови од областа на водниот слив или површината на одгледувалиштето, под услов да не е загрозувано спречувањето на ширењето на ИСА;

(б) зоната под надзор се воспоставува од страна на официјалниот ветеринар надвор од заштитната зона и одговара на проширена област надвор од утврдената заштитна зона;

3) Во сите одгледувалишта кои се лоцирани во заштитната зона и во кои се одгледуваат приемливи видови на риби, а кои не се официјално прогласени за заразени со ИСА, се спроведува официјална контрола при што:

(а) се собираат примероци за лабораториско испитување од 10 риби, кога во одгледувалиштето се забележани клинички знаци или посмртни промени кои одговараат на знаците за инфекција со ИСА, или од минимум 30 риби, во случај кога во одгледувалиштето не се забележани клинички или посмртни знаци;

(б) во одгледувалиштата каде тестовите наведени во став (а) од оваа точка дале негативни резултати, официјалните ветеринари треба да спроведат здравствена контрола еднаш месечно се додека заштитната зона не биде повлечена во согласност со точка 4);

4) сите одгледувалишта официјално прогласени за заразени со вирус на ИСА со отстранет генотип *HPR* или потврдена ИСА, се празнат, чистат, дезинфицираат и ставаат надвор од употреба за период од најмалку три месеци. Заштитната зона и зоната под надзор престануваат да важат откако сите одгледувалишта во заштитната зона се празни, чисти, дезинфицирани и вон употреба во синхронизиран период од најмалку шест недели.

Додека трае периодот на неактивност на официјално прогласените заразени одгледувалишта, заштитните зони стануваат зони под надзор.

Официјалниот ветеринар може да одлучи да побара празнење, чистење, дезинфекција и ставање вон употреба и на други одгледувалишта кои се наоѓаат во заштитната зона и зоната под надзор. Времетраењето на периодот на неактивност за оние одгледувалишта се утврдува од страна на официјалниот ветеринар врз основа на проценката на ризикот за секој поединечен случај;

5) сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени со вирус на ИСА со отстранет генотип *HPR* или потврдена ИСА, како и сите други обработени одгледувалишта во рамките на заштитната зона и зоната под надзор може да бидат порибени со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од Категорија I во однос на ИСА.

Порибување се врши само кога сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени биле испразнети, исчистени, дезинфицирани и неактивни во согласност со точка 4) од дел III.1. од овој прилог.

6) во сите одгледувалишта во кои се одгледуваат приемчиви видови на риба во рамките на држава, зона или оддел во кои се спроведува програма за искоренување на болест кога се спроведува надзор на диви популации, изборот на точките за земање примероци како и спроведувањето на надзорот треба да се врши во согласност со Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

III.2. Критериуми за враќање на статус слободна од болест за копнени оддели кои вклучуваат единствено одгледувалиште, кое претходно било прогласено за одгледувалиште со здравствен статус Категорија I во однос на ИСА

Копнениот оддел кој вклучува единствено одгледувалиште кое претходно било прогласено за слободно од ИСА, чиј здравствен статус во однос на оваа болест не зависи од околните природни води во согласност со точка 3 од Дел II од Прилог 5 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура и чиј здравствен статус од категорија I е повлечен во согласност со член 16-д од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура, може да го поврати здравствениот статус од категорија I веднаш откако официјалниот ветеринар потврдил дека се исполнети следниве услови:

(а) одгледувалиштето официјално прогласено за заразено со ИСА се празни, чисти, дезинфицира и става вон употреба; а времетраењето на периодот на неактивност е најмалку шест недели;

(б) одгледувалиштето официјално потврдено за заразено со ИСА се порибува со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија I во однос на ИСА.

III 3. Критериуми за престанување на мерките утврдени во член 15 од овој правилник заради преминување на држава, оддел или зона од здравствен статус од категорија V кон здравствен статус од категорија III во однос на ИСА

Одгледувалишта во држава, зона или оддел кои имаат здравствен статус од категорија V во однос на ИСА можат да добијат здравствен статус од категорија III, доколку:

(а) барањата утврдени во ставовите 1), 2), 3) и 4) од точка III.1 на овој дел се исполнети. Ако поради технички причини не е можно да се спроведе ставање на одгледувалиштата вон употреба, во тие одгледувалишта треба да се спроведат други алтернативни мерки кои даваат иста гаранција за искоренување на ИСА од одгледувалиштето;

(б) во сите одгледувалишта кои се официјално прогласени за заразени, како и сите други одгледувалишта во кои се спровело обработување во согласност со став (а) од оваа точка, а кои се лоцирани во рамки на утврдените заштитни зони под надзор, треба да бидат порибени со риба со потекло од држава, зона или оддел со здравствен статус од категорија I, II или III во однос на ИСА;

(в) порибувањето со риба се врши откако сите одгледувалишта, официјално прогласени за заразени се испразнети, исчистени, дезинфицирани и вон употреба или било постапено во согласност со став (а) од оваа точка;

(г) во одгледувалиштата нема потврда за вирус на ИСА со отстранет генотип *HPR* за период од две години по завршувањето на мерките наведени во точки (а), (б) и (в), а сомнежите во овој период биле одбиени во согласност со постапките утврдени во точка III.4. од овој прилог.

III.4. Земање примероци и дијагностички методи за да се потврди или отфрли присуството на ИСА

При пријава на сомнеж на ИСА на одгледувалиште, истиот треба да биде потврден или отфрлен во согласност со член 5 од овој правилник.

Официјалниот ветеринар спроведува контрола на одгледувалиштето со земање примероци и лабораториска дијагностика и тоа:

1) во одгледувалиштето во кое е пријавен сомнеж официјалниот ветеринар спроведува барем една здравствена контрола со земање примероци за испитување од 10 риби, кај кои се забележани клинички знаци или посмртни промени, кои одговараат на знаците за инфекција со ИСА. Доколку во одгледувалиштето не се забележани клинички знаци или посмртни промени примероци се земаат од минимум 30 риби. Примероците се испитуваат со употреба на еден или повеќе дијагностички методи, утврдени во точки (а) и (б) во согласност со деталните дијагностички методи и постапки утврдени во Прилог 7 од овој правилник.

2) во случај на позитивен резултат на *RT-qPCR* за вирус на ИСА со отстранет генотип *HPR*, се тестираат уште примероци пред спроведувањето на првичните контролни мерки предвидени во член 5 од овој правилник. При сомнеж за инфекција со ИСА тоа се потврдува во согласност со следниве критериуми користејќи ги деталните методи и постапки утврдени во Прилог 7 од овој правилник:

(а) Откривање на ИСА со *RT-qPCR*, вклучувајќи секвенционирање на *HE*-ген за потврдување на отстранет генотип *HPR* и откривање на ИСА во текот на подготовка на ткива со помош на специјални антители против ИСА (*IHC* за фиксни оддели или *IFAT* на ткивни отпечатоци)

или

(б) откривање на ИСА со *RT-qPCR*, вклучувајќи секвенционирање на *HE*-ген за потврдување на отстранет генотип *HPR*, и

изолација и идентификација на ИСА во клеточна култура од барем еден примерок од која и да било риба во одгледувалиштето;

(в) кога се присутни клинички промени, општи патолошки промени или хистопатолошки наоди, кои одговараат на знаци за ИСА, наодите мора да бидат потврдени со откривање на вирусот на два дијагностички метода со независни принципи на откривање, како што се *RT-qPCR* и *IHC*, во согласност со Прилог 7 од овој правилник.

3) Сомнежот за ИСА може да се отфрли, откако тестовите и контролите спроведени во текот на период од 12 месеци од датумот кога е пријавен сомнежот не потврдуваат никаков доказ за присуство на ИСА.

Прилог 5

**ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕТОДИ И ПОСТАПКИ ЗА ОТКРИВАЊЕ И ПОТВРДА НА
ВИРУСНА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИКЕМИЈА (ВХС) И ИНФЕКТИВНА
ХЕМАТОПОЕТСКА НЕКРОЗА (ИХН) КАЈ ПАСТРМКИТЕ**

**Дел I: Дијагностички методи при спроведување на надзор за вирусна хеморагична
септикемија (ВХС) и инфективна хематопоетска некроза (ИХН)**

1. Подготвување и испорака на примероци од риба за вирусолошко испитување - материјал од риба за вирусолошко испитување на култура на клетки и испитување со метод на обратна транскрипција - полимераза на верижна реакција (*RT-PCR* или *RT-qPCR*)

При земањето примероци и лабораториското испитување со цел добивање или одржување на статусот слободно од болести во однос на ВХС или ИХН или и двете, како што е утврдено во Правилникот за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура, се применуваат детални дијагностички методи и постапки утврдени во Дел I од овој прилог.

Пред испораката или трансферот во лабораторија, деловите од органи од риба кои треба да се испитаат треба да бидат отстранети од рибата со стерилни инструменти за секцирање и пренесени во стерилни пластични епрувети кои содржат транспортен медиум.

Количината на материјал од риба погоден за вирусолошко испитување на култура на клетки и со метод *RT-qPCR* зависи од големината на рибата.

Доколку примерокот на риба се состои од цели риби со должина на телото под 4 cm, прво се отстранува задниот дел од телото зад аналниот отвор а потоа рибите цели се сецкаат со стерилни ножици или скалпел.

Ако примероците опфаќаат риби со должина на телото помеѓу 4 cm и 6 cm се земаат внатрешните органи и бубрег, а доколку примероците опфаќаат риби со должина на телото поголема од 6 cm, се земаат делови од бубрег, слезина, срце и/или мозок.

Оваријална или семена течност или делови од органи од најмногу 10 риби може да бидат собрани во една стерилна епрувета која содржи најмалку 4 ml транспортен медиум и да претставува еден групен примерок. Ткивото во секој примерок тежи најмалку 0,5 гр.

Вирусолошко испитување на култура на клетки треба да започне што е можно поскоро и не подоцна од 48 часа по собирањето на примероците. Во исклучителни околности, вирусолошко испитување може да започне најдоцна во рок од 72 часа по собирањето на материјалот, под услов материјалот кој треба да се испитува да биде заштитен со транспортен медиум и да се гарантира исполнетост на барањата во однос на температурата во текот на транспортот.

Во случај на примероци за анализа со обратна транскрипција - *RT-PCR* или *RT-qPCR* ако е количината на инокулумот мала, можно е да се употреби ткиво од најмалку пет риби. Алтернативно, примероците може да обединат во реагенси за стабилизација на RNA (0,2 гр. ткиво/ml реагенс), во согласност со препораката на производителите, иако секоја риба се обработува одделно и може да не се обединат примероците поради малата количина на материјали кои се употребуваат за екстракција.

Зависно од потребата можно е да се испрати цела риба во лабораторија за лабораториска дијагностика.

Кога е одобрено од страна на дијагностичката лабораторија, за дополнителни испитувања може да се собираат и подготвуваат други ткива од риба.

2. Испраќање на примероци од риба

Епруветите кои содржат ткиво од риба во транспортен медиум за испитување на култура на клетки или *RT-PCR/RT-qPCR* анализа, се ставаат во изолирани контејнери, како што се кутии од стиропор со дебели ѕидови, заедно со доволно мраз или друг алтернативен медиум за ладење со сличен ефект на ладење за да се обезбеди ладење на примероците во текот на транспортот до лабораторијата. Треба да се избегне замрзнување на примероци. Температурата на примерокот во текот на транзитот не смее да биде поголема од 10°C и при неговиот прием мразот мора да биде присутен во транспортната кутија или еден или повеќе замрзнати блокови мора да бидат делумно или целосно замрзнати.

Во лабораторијата може да се испрати цела риба под услов да се исполнат барањата кои се однесуваат на температурата во текот на превозот наведени во првиот став. Цела риба треба да биде завиткана во хартија со апсорбирачки капацитет и потоа да биде испратена во пластична кеса.

3. Подготовка на примероци за испитување на културите на клетки и *RT-qPCR*

3.1. Замрзнување во исклучителни случаи

Кога поради практични тешкотии не е возможно да се обработат примероците во рок од 48 часа по собирањето на ткивата на риби, примероците од ткива може да се замрзнат во транспортниот медиум на температура од 20°C или на пониска и да се *спроведе* вирусолошко испитување во рок од 14 дена. Ткивото на риба може да се замрзне и одмрзне само еднаш пред испитувањето. Во овој случај потребно е да се чуваат записи со детали за причината за секое замрзнување на примерокот на ткиво од риба.

3.2. Хомогенизација на органи

Во лабораторија, ткивото на риба од епрувета потполно се хомогенизира во хомогенизатор *Stomacher*, блендер или аван и толчник со стерилен песок и потоа се суспендира во оригиналниот транспортен медиум.

Ако примерокот се состои од риби со големина пократки од 4 см, се ситнат со стерилни ножици или скалпел по отстранување на страничниот дел од телото зад цревниот отвор. Ако примерокот се состои од риба со должина на телото од 4 до 6 см, се собираат внатрешните органи, вклучувајќи ги бубрезите. Ако примерокот се состои од риба подолга од 6 см, се собираат промероци од ткива како што е опишано во точка 1, дел I.1 од оваа глава. Примероците од ткива се ситнат со стерилни ножици или скалпел и хомогенизираат како што е опишано во првиот став од оваа точка и се суспендираат во транспортниот медиум.

Конечниот сооднос меѓу ткивото и транспортниот медиум се поставува во лабораторија од 1:10.

3.3. Центрифугирање на хомогенат

Хомогенатот се центрифугира на брзина од 2 000 до 4 000 $\times g$ во траење од 15 минути во центрифуга изладена на температура од 2°C до 5°C; супернатантот се собира и може да се третира со антибиотици четири часа на 15°C или преку ноќ на 4 до 8°C. Ако примерокот е испратен во транспортен медиум, може да се изостави третманот на супернатантот со антибиотици.

Кога поради практични тешкотии, како што е дефект на инкубаторот или проблеми со клеточни култури, невозможно е да се инокулираат клетките во рок од 48 часа по собирањето на примероците на ткива од риба, супернатантот може да се замрзне на температура од 80°C и вирусолошкото испитување може да се изврши во рок од 14 дена.

Ако собраниот супернатант се чува на температура од 80°C во рок од 48 часа по земање примероци, може да се употреби само еднаш за вирусолошко испитување.

Пред инокулација на клетките, супернатантот се меша со еднакви делови на соодветната разредена група на антисерум за локални серотипови на вирусот на Инфективна некроза кај панкреас (ИПН) и се инкубираат најмалку еден час на температура од 15°C или максимум од 18 часа на температура од 4°C. Титарот на антисерумот изнесува најмалку 1/2 000 во 50% од плак тестот за неутрализација.

Третманот на сите инокулати со антисерум за вирусот ИПН има за цел спречување на цитопатогениот ефект (ЦПЕ), како резултат на присуството на ИПН вирусот. Овој третман го скратува времетраењето на вирусолошките испитувања како и бројот на случаи во кои појавата на цито-патоген ефект (ЦПЕ) треба да се смета за потенцијален знак на присуство на ВХС или ИХН.

Кога примероците доаѓаат од одгледувалишта, кои се сметаат ослободени од ИПН, може да се изостави третманот на инокулатот со ИПН антисерум .

3.4. Подготовка на примерокот земен во рамките на програма за надзор кои се базираат на *RT-PCR* и *RT-qPCR* методи

Ако примероците се собрани во транспортен медиум, треба да се извршат постапките утврдени во точките 3.2 и 3.3 од овој дел. По центрифугирање, се собира супернатант и екстрахира RNA. Ако не е потребно спроведување на дополнително испитување непосредно по центрифугирање, примероците веднаш се замрзнуваат на температура од -20°C или пониска.

За анализа на ткива од риба сочувани во реагенс за стабилизација на RNA се спроведуваат дејствија наведени во продолжение во временската рамка за примероците зачувани на различна температура:

- примероци чувани на температура од 37°C: 1 ден;
- примероци чувани на температура од 25°C: 1 недела;
- примероци чувани на температура од 4°C: 1 месец;
- примероци чувани на температура од -20°C: неодредено време.

Со групата на примероци во реагенс за стабилизација на RNA се постапува како со поединечни примероци во реагенс за стабилизација на RNA. За примероците обединети во реагенс за стабилизација на RNA, количината на примероци не смее да биде поголема од онаа

препорачана од производителот за екстракција со *RNA* комплети, како што е *RNeasy Mini kits (Qiagen)* или сличен. Ако поголеми примероци се групираат во групна мостра, китовите за екстракција или методите кои се спроведуваат треба да го одразуваат групниот примерок.

Примероци собрани во реагенси за стабилизација на *RNA* не смее да се употребуваат за култивација на клетки.

3.5. Формирање на групна мошта за *RT-qPCR*

Протоколите за *RT-qPCR* се слични или повеќе осетливи во споредба со методите за култивација на клетки, според тоа може да биде прифатливо да се употреби супернатант од хомогенизиран материјал на ткиво од риба групирано од најмногу 10 риби во медиум на култура на клетки за *PCR*. Меѓутоа, поради многу помалиот инокулум употребен за *PCR* во споредба со култивација на клетки, сите ткива на риби внимателно се хомогенизираат пред собирање на материјалот за екстракција.

Исто начело се применува ако примероците се собираат во реагенс за стабилизација на *RNA*. Меѓутоа, во тој случај честопати тешко се собира репрезентативен материјал од највеќе 10 риби во една епрувета, и бројот на риби по група се намалува на 2 од 5.

4. Вирусолошко испитување на клеточна култура

4.1. Култура на клетки и медиум

Културите на клетки (*BF-2*, *RTG-2*, *EPC* или *FHM*) се размножуваат на температура од 20°C до 30°C во соодветен медиум, поточно *Eagle's* Минимален есенцијален медиум (MEM) или неговите модификации, збогатени со 10% фетален говедски серум и антибиотици во стандардни концентрации.

Кога клетките се одгледуваат во затворени ампули, медиумот се ублажува со бикарбонат. Медиумот кој се користи за култивација на клетки во отворени единици може да се ублажи со трис(хидроксиметил) аминетан-*HCl* (*Tris-HCl*) (23 mM) и натриум бикарбонат (6 mM). Водородниот показател pH мора да биде $7,6 \pm 0,2$.

Клеточни култури кои треба да се употребуваат за инокулација со материјалот на ткива од риби треба да бидат млади, еднослојни, вообичаено еден ден стари клеточните култури доколку е можно; меѓутоа, може да бидат прифатливи и култури со старост од 4 до 48 часа. Клетките мора активно да растат при инокулација.

4.2. Инокулација на клеточни култури

Суспензијата на органи збогатена со антибиотик се инокулира во клеточни култури во два раствори, односно во основен раствор и, покрај тоа со негов раствор 1:10, што доведува до конечен раствор на материјал од ткиво во култура на клетки 1:100 односно 1:1000 со цел да се спречи хомологна интерференција. Најмалку две клеточни култури се инокулираат како што е наведено во точка I.5.1. Односот помеѓу големината на инокумулот и волументот на медиумот на клеточната култура ќе биде околу 1:10.

За секој раствор и секоја клеточна линија, се употребува најмалку околу 2cm² од површината на клетката, што одговара на едно клеточно гнездо од плочка за култура на клетки со 24 гнезда. Плочки за култура на клетки се употребуваат кога е тоа можно.

4.3. Инкубација на клеточни култури

Инокулирани клеточни култури се инкубираат на температура од 15°C за седум до десет дена. Ако бојата на медиумот за култура на клетки се промени од црвена во жолта, што укажува на закиселување на медиумот, рН се прилагодува со помош на стерилен раствор на бикарбонат или еквивалентна супстанција за да се обезбеди чувствителност на клетките на вирусна инфекција.

Најмалку секои шест месеци или доколку постои сомнеж за намалена чувствителност на клетките се врши титрација на замрзнатите резерви на вирусот ВХС и ИХН со цел да се провери чувствителноста на клеточните култури на инфекција. Доколку е можно, се употребува постапката утврдена во дел III од овој прилог.

4.4. Микроскопија

Инокулираните клеточни култури редовно се прегледуваат, најмалку три пати неделно, за појавата на цито-патоген ефект (ЦПЕ) при зголемување од 40 до 150 пати. Ако очигледно е забележана појава на цито-патоген ефект (ЦПЕ), веднаш се започнува постапката за идентификација на вирусот во согласност со точка 5 од овој дел.

4.5. Субкултивација

Ако не се развие цито-патоген ефект (ЦПЕ) по примарната инкубација од 7 до 10 дена, субкултивација се спроведува со свежи клеточни култури со користење на слични површини на примарната култура.

Аликвоти на медиум (супернатант) од сите култури или клеточни гнезда кои ја сочинуваат примарната култура се обединуваат во

согласност со клеточната култура 7 до 10 дена по инокулацијата. Така добиени групи се инокулираат во хомогени клеточни култури, неразредени и разредени 1:10 (што резултира во конечен раствор на супернатантот во сооднос од 1:10 односно 1:100) како што е опишано во точка 4.2. од овој дел Алтернативно, аликвоти од 10% на медиумот кои што ја преставуваат клеточната култура се инокулираат директно во клеточно гнездо со свежа култура на клетки (поточно, субкултивирање од гнездо во гнездо). Инокулацијата може да претходи на прединкубација на раствор со антисерум за вирусот ИПН во соодветен раствор како што е опишано во точка 3.3. од овој дел.

Инокулирани култури потоа се инкубираат од 7 до 10 дена на температура од 15°C и се испитуваат во согласност со точка 4.4. од овој дел.

Ако во текот на првите 3 дена на инкубација се појави токсичен цито-патоген ефект (ЦПЕ), во таа фаза може да се изврши субкултивирање, но при тоа клетките мора да се инкубираат за 7 дена и повторно субкултивираат со дополнителни 7 дена на инкубација. Кога токсичен цито-патоген ефект (ЦПЕ) ќе се развие по 3 дена, клетките еднаш ќе се донесат и инкубираат за да се достигнат вкупно 14 дена од првата инокулација. Во последните 7 дена на инкубација не смее да се појават знаци на токсичност.

Ако се појави бактериска контаминација и покрај третманот со антибиотици, субкултивацијата ќе биде проследена со центрифугирање на 2000 до 4000 x g за 15 до 30 минути на температура од 2 до 5°C, или филтрирање на супернатантот низ филтер од 0,45 µm или двете (мембрана со ниска способност на врзување на протеин). Понатаму, во субкултивација се следат исти постапки како оние опишани за токсичен цито-патоген ефект (ЦПЕ) во четвртиот став од оваа точка.

Ако не се развие цито-патоген ефект (ЦПЕ), тестот може да се прогласи за негативен.

5. Идентификација на вирусот

Ако се забележи присуство на цито-патоген ефект (ЦПЕ) во клеточна култура, медиумот (супернатантот) се собира и прегледува со еден или повеќе од следните техники: Ензимски имуно тест (ЕЛИСА), Имунофлуоресценција (IF), неутрализација, *RT-PCR* или *RT-qPCR*. Ако со овие тестови не може со сигурност да се идентификува вирусот во рок од 1 недела, супернатантот се проследува во националната референтна лабораторија или во референтна лабораторија на ЕУ за болести на риби за брза идентификација на вирусот.

5.1. ЕЛИСА

Сендвич ЕЛИСА со двојни антитела се спроведува за идентификација на изолати на вирусот. Микроплочки треба да бидат обложени со 50 μ l/клеточно гнездо (0,9 pg) на прочистен имуноглобин (Ig) на протеин-А со докажан квалитет од антисерум на зајак против вирусот ИХН или ВХС разреден во карбонат пуфер (рН 9,6) кој содржи 15 mM натриум азид и инкубиран од 18 часа до 2 недели на температура од 4°C.

На плоча за разредување, секој примерок кој содржи 1% Тритон X-100 и позитивни контроли се разредува со пуфер раствор (поточно, солено – фосфатен пуфер (*PBS*)-*T*-*BSA*, 1% *BSA*) во раствор 4 пати разреден: неразреден, 1:4, 1:16, 1:64. Плочите ЕЛИСА треба да се мијат во *PBS* кој содржи 0,05% Твин-20 (*PBS*-*T*) и 50 μ l од секој раствор се пренесува од плочата за разредување на испрана или премачкана плоча за ЕЛИСА.

Потоа ЕЛИСА плочите треба да се инкубираат 30 минути на температура од 37°C. Потоа плочите се мијат и инкубираат 30 минути на температура од 37°C со специфични моноклонални антитела (поточно, за идентификација на вирусот ВХС *MAb IP5B11* и за вирусот ИХН односно Нуб 136-3.). На плочата за ЕЛИСА се префрлаат 50 μ l анти глувчешки /заечки антитела, конјугирани со рен-пероксидаза (*HRP*) разредени во сооднос 1:1 000 во *PBS*-*T*-*BSA*.

Конечно, по повторното миење, реакциите се развиваат со додавање 50 μ l/клеточно гнездо одорто-фенилендиамин (OPD). Плочите за ЕЛИСА се инкубираат за 20 минути на собна температура во темница и реакцијата ќе се запре со додавање на 100 μ l/клеточно гнездо 0,5 M H₂SO₄.

Апсорпцијата ќе се следи на бранова должина од 492 и 620 nm во еден ЕЛИСА читач. Примероците се назначуваат како позитивни или негативни по споредувањето на резултатите од испитувањата со вредностите на апсорпција за позитивни и негативни контроли. Општо, примероците со комбинирана апсорпција (*A*) < 0,5 за неразреден материјал се сметаат за негативни, примероците со вредност *A* помеѓу 0,5 и 1,0 се сметаат за сомнителни, а примероците со вредност *A* > 1,0 се сметаат позитивни.

Други верзии на ЕЛИСА со докажана слична ефикасност може да се употребат наместо оние кои се наведени во оваа точка.

5.2. Имунофлуоресценција - IF

Идентификација на вируси на ВХС и ИХН се врши со инфицирање на клетките во плочките со 96-клеточни гнезда, „Black“, конвенционални

плочки со 24 клеточни гнезда или покривни стакла во 24 клеточни гнезда. Кога вирусот ИХН или ВХС или двете болести се идентификуваат со инфекција на клетките на покривни стакла, се применува следниот протокол:

- (а) покривните стакла се засадени со клетки во густина која доведува во приближно 60% до 90% конфлуенција по 24 часа на култивација. ЕРС клетки треба да се користат каде што е можно за оваа намена поради нивното силно приближување на стаклените површини, но може да се употребуваат и други клеточни култури како што се BF-2, RTG-2 или FHM. 150 μ l клеточни култури на супернатантот во два различни раствори (1:10 and 1:1 000) може да се инокулираат двојно на еднакви слоеви стари еден ден и инкубираат 24 часа на температура од 15°C;
- (б) последователно, медиум на култивирање на клетките се отстранува, и заразените еднослојни клетки се фиксираат со 0,5 ml ледено воден раствор на ацетон (80% vol:vol). Фиксација се спроведува во лабораториски камин за 15 минути на собна температура, потоа растворот на ацетон треба да се отстрани и покривните стакла треба да се сушат на воздух најмалку 30 минути. Во таа фаза, плочките треба да се обработат веднаш или складираат на температура од 20°C за понатамошна употреба;
- (в) специфични моноклонални антитела (поточно за идентификација на ВХС, МАb IP5B11 односно за ИХН, Нуб 136-3) се разредуваат во 0,01 M PBST, pH 7,2 во раствор кој е препорачан од добавувачот на MAbs; 50 до 100 μ l/клеточно гнездо се додава во фиксиран еднослој и плочките се инкубираат еден час на температура од 37°C во влажна комора;
- (г) покривните стакла се мијат нежно три пати со PBS кој содржи 0,05 Т Твин-20 (PBS-T), и пуферот се отстранува целосно по последното плакнење. Клетките последователно се инкубираат еден час на температура од 37°C со антитела конјугирани со флуоресцеин изотиоцијанат (FITC) - или тетраметилродамин-5-(и-6-) изотиоцијанат (TRITC)-анти глувчешки имуноглобулин употребен како примарно антитело, растворени во согласност со упатствата на добавувачот, повторно измиени во PBS-T, и исушени. Обоени култури се нанесуваат на стаклени плочки со употреба на солан раствор со додавање глицерол и се испитуваат под ултравиолетово светло (UV). Употребата на окулар со зголемување од 10 или 12 пати и објективи со зголемување од 25 или 40 пати, со нумерички отвори $> 0,7$ односно $> 1,3$.

Наместо тоа, можно е да се користат и други методи на имунофлуоресценција, со оглед на клеточни култури, фиксација и антитела на референтен квалитет докажани со слична ефикасност.

5.3. Неутрализација

Клетките од собраниот супернатант треба да се отстранат со центрифугирање (2 000 to 4 000 $\times$ g) или мембранска филтрација (0,45 μ m) со ниска апсорбција на протеини, а супернатантот се разредува во однос 1:100 и 1:10 000 во медиум за клеточна култура.

Аликвоти на најмалку два супернатант раствори треба да се мешаат и да се инкубираат за 60 минути на температура од 15°C со еднакви делови на следните реагенси:

- (а) серум кој содржи група спечифични антитела за вирусот ВХС во раствор 1:50 (vol:vol);
- (б) серум кој содржи група спечифични антитела за вирусот ИХН во раствор 1:50 (vol:vol);
- (в) група примероци на антисерум за локални серотипови на вирусот ИПН во раствор 1:50 (vol:vol);
- (г) самиот медиум (позитивна контрола).

За секоја мешавина на супернатант и серум најмалку две клеточни култури се инокулираат секоја со 50 μ l и потоа се инкубираат на температура од 15°C. Развојот на цито-патоген ефект (ЦПЕ) се проверува како што е опишано во точка 4.4. од овој дел.

Видови на вирусот ВХС и изолати кои не реагираат во неутрализациски тестови се идентификуваат со IF или ЕЛИСА.

Може да се употребуваат и други неутрализациски тестови со докажана слична ефикасност.

5.4. *RT-PCR/RT-qPCR*

5.4.1. Подготовка на вирусна *RNA*

Сите дејствија со *RNA* треба да се изведуваат на мраз, со употреба на ракавици.

RNA се екстрахира со употреба на фенол-хлороформ метод или афинитет на колона за прочистување *RNA*, во согласност со упатствата на производителот. Може да се употребуваат комерцијално достапни комплекти за екстракција на *RNA* со кои се добива *RNA* со висок квалитет погодна за употреба во протоколи за *RT-PCR* опишани во продолжение.

RNA се ресуспендира во дестилирана вода слободна од RNA (поточно во вода третирана со 0,1 % диетилен пирокрабонат) или соодветен пуфер за елуација.

5.4.2. RT-PCR

Следниве прајмери се употребуваат за откривање на ИХН:

Предна почетница 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3';

Задна почетница 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Се употребуваат следниве циклуси (RT-PCR во еден чекор): 1 циклус: 50 °C во период од 30 минути; 1 циклус: 95 °C во период од 2 минути; 30 циклуси: 95 °C во период од 30 секунди, 50 °C во период од 30 секунди, 72 °C во период од 60 секунди; 1 циклус: 72 °C во период од 7 минути и натопување на температура од 4 °C.

Следниве прајмери се употребуваат за откривање на ВХС:

Преден VN 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3';

Заден VN 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3'.

Се употребуваат следниве циклуси (RT-PCR во еден чекор): 50 °C во период од 30 минути, 95°C во период од 15 минути, 35 циклуси на температура од 94°C во период од 30 секунди, 55°C во период од 30 секунди, и 68°C во период од 60 секунди. Дополнително, реакцијата се одржува на температура од 68°C за 7 минути.

Квалитетот и специфичноста на реакцијата RT-PCR се оценува со гел електрореза во агарозен гел од 1,5% со етидиум бромид и се разгледува со употреба на UV трансилуминација. Може да се забележи ампликон PCR од 693 bp за вирусот ИХН. За вирусот ВХС величината е 505 bp.

Резултатите од PCR може да варираат зависно од условите во кои се спроведува, поточно од термалните протоколи за кои може да биде потребна оптимизација, зависно од уредот за PCR (*thermal cycler*) кој се употребува. Понатаму, може да се појават лажни позитивни резултати поради лажното спојување на почетниците или лабораториска контаминација. Затоа за да се избегнат какви било сомневања се вклучуваат соодветни позитивни и негативни контроли и секвенции на ампликони. Кај почетниците на ВХС вирусот, посебно внимание треба да се даде на употребата на клетки BF-2, бидејќи почетниците може да реагираат со клеточната линија DNA/RNA,

произведувајќи лажни позитивни резултати со слична големина. При испитување на супернатантот од клетка *BF-2*, се секвенционираат сите амплифицирани *PCR* фаргменти.

5.4.3. *RT-qPCR* за вирусот на ВХС

За вирусот ВХС, помножувањето се спроведува со употреба на следниве прајмери и сонди:

Преден прајмер: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3';

Заден прајмер: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3';

и сонда: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

RT-qPCR во еден чекор:

Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Услови за циклусите: 50°C во период од 30 минути, 95°C во период од 15 минути, 40 циклуси на температура од 94°C во период од 15 секунди, 60°C во период од 40 секунди, и 72°C во период од 20 секунди; прилагодување доколку е потребно. Може да се употребуваат и други верзии на методот *RT-PCR* или *RT-qPCR* со докажана слична ефикасност.

5.4.4. *RT-qPCR* за вирусот на ИХН

За вирусот ИХН, амплификација се спроведува со употреба на следниве прајмер и сонди:

Преден прајмер: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3';

Заден прајмер: 5'-TTCTTTGCGGCTTGGTTGA-3';

и сонда: 5'-6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

RT-qPCR во два чекори:

Бидејќи следниот тест зависи од помножувањето во два чекори, потребно е да се даде посебно внимание при ракувањето со епрувети при преминот од една реакција на друга со цел да се спречи контаминација.

Услови за циклусите (после *RT*-чекор): 50°C во период од 2 минути, 95°C во период од 10 минути, по што следат 40 циклуси на температура од 95°C во период од 15 секунди и 60°C во период од 1 минута; доколку е потребно да се направи прилагодување.

Може да се употребуваат и други верзии на методот *RT-PCR* или *RT-qPCR* со докажана слична ефикасност.

Дел II: Дијагностички методи за потврдување или отфрлање на сомнеж за вирусна хеморагична септикемија (ВХС) и инфективна хематопоемска некроза (ИХН)

(1) Кога се потребни лабораториски испитувања со цел потврдување на присуството на ВХС или ИХН или и на двете болести во согласност со член 22 од овој правилник со користење на дијагностички методи наведени во точка (4) од овој дел, се применуваат следните детални дијагностички методи и постапки:

(а) конвенционална изолација на вирусот после што следи идентификација на со серо-неутрализациски тест, имунохемиски тест или молекуларна идентификација на вирусот;

(б) откривање на вирусот со методот *RT-PCR* или *RT-qPCR*;

(в) други дијагностички методи како што се *IFAT*, *ЕЛИСА*, *RT-PCR*, *IHC*.

(2). Конвенционална изолација на вирусот после што следи идентификација на вирусот

2.1. Избор на примероци

За испитување се земаат најмалку 10 риби кои покажуваат типични знаци на ВХС или ИХН.

2.2. Подготовка и испорака на примероци од риба

За подготовка и испраќање за потребите на вообичаената изолација на вирусот се следат методи и постапки утврдени во точка 2 на дел I од овој прилог.

2.3. Собирање на дополнителни дијагностички материјали

За собирање дополнителни дијагностички материјали за потребите на вообичаената изолација на вирусот се следат методи и постапки утврдени во последен параграф на точка 1 од дел I на овој прилог.

2.4. Подготовка на примероци за испитување на културите на клетки

За подготовка и испраќање на примероците за испитување на културите на клетки за потребите на вообичаената изолација на вирусот се следат методи и постапки утврдени во точка 3 од дел I на овој прилог.

2.5. Вирусолошко испитување на култура на клетки

За вирусолошко испитување за целите на конвенционална изолација на вирусот се следат методи и постапки утврдени во точка 4. од дел I на овој прилог.

2.6. Идентификација на вирусот

За идентификацијата на вирусот за целите на конвенционална изолација на вирусот се следат методи и постапки утврдени во точка 5. од дел I на овој прилог.

(3) Откривање на вирусот со методот *RT-qPCR*

3.1. Избор на примероци

За избирање на примероците за целите за откривање на вирусот со методот *RT-qPCR* се следат методи и постапки утврдени во точка 1 од дел I на овој прилог.

3.2. Подготовка и испорака на примероци од риба

За подготовка и испраќање за целите на откривање на вирусот со методот *RT-qPCR* се следат методи и постапки утврдени во точка 2 на дел I од овој прилог.

3.3. Собирање на дополнителни материјали за дијагностичко испитување

За собирање на дополнителни материјали дијагностичко испитување за целите за откривање на вирусот со методот *RT-qPCR* се следат методи и постапки утврдени во последен параграф на точка 1 од дел I на овој прилог.

3.4. Подготовка на примерокот за методот *RT-qPCR*

За подготовка на примерокот за целите на откривање на вирусот со методот *RT-qPCR* се следат методи и постапки утврдени во точка 5.4.1. од овој Прилог.

3.5. *RT-qPCR*

За откривање на вирусот со методот *RT-qPCR* се следат методи и постапки утврдени во точките 5.4.1, 5.4.3 и 5.4.4. од овој Прилог

(4) Други дијагностички техники

Супернатантот подготвен како што е опишано во точка 3.3 од дел I на овој прилог може да биде подложен на ЕЛИСА, индиректен тест на

флуоресцентни антитела (*IFAT*) или *RT-PCR* во согласност со точка 5.1, точка 5.2 односно точка 5.4. од дел I на овој прилог. Материјалот на ткивото може да подлежи на други дијагностички методи, како што се *IFAT* на замрзнати делови, имунохистохемија на ткиво фиксирано на формалин. Овие брзи методи треба да се дополнат со вирусолошко испитување во согласност со точка (1)(а) или (б) од овој дел во рок од 48 часа по земање примероци, ако се добие:

(а) негативен резултат или

(б) позитивен резултат од материјал кој претставува прв случај на ИХН или ВХС.

Дел III: Постапки на титрација за проверка на чувствителноста на клеточните култури на инфекција

Кога се спроведува титрација за да се провери осетливоста на клеточните култури на инфекција како што е наведено во точка 4.3, од дел I на овој прилог се следат постапките утврдени во ставовите во продолжение.

Треба да се употребуваат најмалку два изолати на вирусот на ВХС и еден изолат на вирусот на ИХН. Изолатите претставуваат главна група на вирусот во рамките на Европската унија, поточно, за вирусот ВХС треба да се одбере еден патоген изолат кој потекнува од калифорниската пастрмка од слатки води и еден изолат кои е патоген за калкан (*turbot*) од морски води, а за вирусот на ИХН треба да се одбере вид кој е патоген за калифорниската пастрмка од Европската унија.. Серии на вирус во клеточните култури со низок пасаж се одгледуваат во садови со клеточни култури на клетките *BF-2* или *RTG-2* за вирусот на ВХС и на клетките *EPC* или *FHM* за вирусот ИХН. Се употребува медиум за култура на клетки со најмалку 10% серум. За инокулација се употребува низок *MOI* (<1).

При целосен цито-патоген ефект (ЦПЕ), вирусот се собира со центрифугирање на супернатантот на култура на клетки на $2\,000 \times g$ за 15 минути, се стерилизира со филтрирање низ мембрански филтер од $0,45\ \mu m$ и распределува во назначени крио-епрувети. Вирусот се чува на температура од $-80^{\circ}C$.

Една недела по замрзнувањето, под ладна вода се топат по три епрувети од секој вирус и се титрираат на соодветни клеточни линии. Секој изолат на вирусот се одмрзнува и титрира најмалку на секои 6 месеци или ако постои сомневање дека е намалена осетливоста на клеточната линија.

Постапките за титрација мора детално да се опишат и секој пат мора да се применува иста постапка.

Титрација со разредување до крајна точка вклучува најмалку шест повторувања во секоја фаза на разредувањето. Титрите се споредуваат со претходно добиените титри. Ако титар од кој било три изолати падне за фактор од 2 логови или повеќе во однос на почетниот титар, клеточната линија не треба повеќе да се употребува за целите на следењето.

Ако во лабораторија се чуваат различни клеточни култури, секоја линија се испитува одделно.

Евиденцијата се чува најмалку 10 години.

Прилог 6

**ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕТОДИ И ПОСТАПКИ ЗА ОТКРИВАЊЕ И ПОТВРДА НА
КОИ ХЕРПЕС ВИРУС КАЈ КРАП (КХВ)**

Дел I. Дијагностички методи за потврдување или отфрлање на сомнеж на КХВ

Кога се потребни лабораториски испитувања со цел потврдување на присуството или отфрлање на сомнеж на КХВ во согласност со член 22 од овој правилник со користење на дијагностички методи, со користење на дијагностички методи утврдени во Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура, се применуваат дијагностички методи и постапки наведени во точките 1 и 3 од овој дел.

1. Подготовка на примероци од риба

За дијагностички цели, рибата (испратена жива или умртвена и спакувана одделно во затворен стерилен контејнери) или пак замрзнати органи или делови од ограни сочувани во 80 % или целосно чист етанол од или транспортен медиум за вируси (за обработка во рок од 48 часа од собирањето) може да се употреби за испитување со вообичаени методи базирани на *PCR* или *qPCR*.

За откривање на КХВ се собираат жабри и бубрези. Дополнително во одделен примерок може да се вклучи и слезина, мозок и црева. Во акутни случаи, може да се обединат материјали на ткиво од најмногу пет риби.

Примероци поради кои не е потребно да се умртви рибата, крв, брис на жабри, биопсија на жабри, брис на слезина, може да се употребуваат во одредени случаи (поточно, во случај на сомневање на присутност на КХВ кај многу вредна риба).

2. *DNA* екстракција

DNA се екстрахира во согласност со стандардните постапки.

Може да се употребуваат комерцијално достапни комплекти за екстракција *DNA* со кои се добива *DNA* со висок квалитет погоден за употреба во протоколи за *PCR* наведени во точка 3 од овој дел.

3. Откривање и идентификација на примерокот со методи кои се базираат на полимеразата верижна реакција (*PCR*)

3.1. *qPCR* за откривање на КХВ

За откривање на КХВ со методот *qPCR* се употребува следниот тест:

Преден прајмер(КХВ-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3';

Заден прајмер(КХВ-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTGTCTTGTGTT -3';

и проба (КХВ-109p): 5'-FAM- CTTCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Услови за циклусите: еден циклус на температура од 95°C во период од 15 минути, по што следат 40 циклуси на температура од 94°C во период од 15 секунди и 60°C во период од 60 секунди. Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Може да се употребуваат и други верзии на методот *qPCR* со докажана слична ефикасност.

3.2. Конвенционален метод на *PCR* за откривање на КХВ

Се употребува тест опишан во оваа точка кој е насочен на генот тимидин киназа (ТК) на КХВ. Меѓутоа, може да се употребат и други *PCR* тестови со осетливост и специфичности кои се докажано слични на опишаниот тест.

Преден прајмер (КХВ-ТКf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3';

Заден прајмер (КХВ-ТКr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Услови за циклусите: еден циклус на температура од 95°C во период од 5 минути, по што следат 35 циклуси на температура од 95°C во период од 30 секунди, 52°C во период од 30 секунди, 72°C во период од една минута и еден циклус на температура од 72°C во период од 10 минути. Големината на производот треба да изнесува 409 bp.

Резултатите од *PCR* може да варираат зависно од условите во кои се спроведува, поточно од термалните протоколи за кои може да биде потребна оптимизација, зависно од уредот за *PCR* (*thermal cycler*) кој се употребува. Понатаму, може да се појават лажни позитивни резултати поради лажното спојување на почетници или контаминација. Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Меѓутоа, може да се употребуваат и други верзии на методот *PCR* со докажана слична ефикасност.

Првото откривање во одредено подрачје мора да се потврди со секвенционирање или да се испрати во националната референтна лабораторија или референтната лабораторија на ЕУ за болести на

риби за брзо идентификување на вирусот.

Дел II: Дијагностички методи при спроведување на надзор на КХВ

При земањето примероци и лабораториското испитување со цел добивање или одржување на одреден здравствен статус во поглед на КХВ како што е утврдено во Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура, се применуваат дијагностички методи и постапки утврдени во точките од 1 и 2 од овој дел.

1. Подготовка на примероци од риба

Примероци се земаат од риби кои се чуваат подолго време на различни температури кои се повољни за вирусот (поточно, 2 до 3 недели на температура од 15°C до 26°C). Ако е можно, примероците се собираат до 24 часа, а најдолго до 72 часа, по спроведувањето на активности (манипулирање со риба) поради кои може да дојде до реактивирање на вирусот во риба која има статус носител, како што е ставање во мрежа или превоз, за подобрување на можностите за откривање на КХВ.

За потребите на надзор на КХВ, риба може да биде испратена жива или умртвена и спакувана одделно во затворен стерилен контејнери или пак, алтернативно, замрзнати органи или делови од органи сочувани во алкохол од 80% или 100% или транспортен медиум за вируси (за обработка во рок од 48 часа од собирањето) може да се употреби за испитување со вообичаени методи базирани на *PCR*. За надгледување на КХВ, се собираат ткива од жабри и бубрези.

За целите на надгледување на КХВ, потребно е обединување секогаш кога тоа е можно. Ако обединувањето е потребно, може да се обедини материјал на ткиво од најмногу две риби. Поголемите примероци потребно е да се хомогенизираат во аван и толчник или *stomacher*, и подпримероците да се земат поради *DNA* екстракција пред бистрење. Алтернативно, подпримероците може да се соберат од сите ткива вклучени во примерокот и да се стават во „лиза-цевки“.

2. *DNA* екстракција

DNA се екстрахира во согласност со стандардните постапки. Може да се употребуваат комерцијално достапни комплекти за екстракција *DNA* со кои се добива *DNA* со висок квалитет погоден за употреба во протоколи за *PCR* наведени во точка 3 од овој дел.

Прифатлив однос на ткиво и медиум е 1:9w/v. Во испитувањето се

вклучува 20 до 25 материјали на ткиво.

3. Надзор на КХВ со методи кои се темелат на *PCR*

За надзор на КХВ, се употребува методот *qPCR*. Ако позитивни примероци се појават во подрачјето кое претходно не е потврдено како позитивно, резултатите од испитувањето се потврдуваат со:

(а) секвенционирање на производ *PCR* или вклопениот *PCR* од примероците.

Добиената чиста низа се судира (најмалку 98 %) со тие референтни низи.

(б) или алтернативно, примероците може да се испратат во националната референтна лабораторија за потврдување.

3.1. *qPCR* за откривање на КХВ

Се употребува методот *qPCR* опишан понатаму:

Предна почетница (КХВ-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3';

Задна почетница (КХВ-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTGTCCCTTGTT -3';

и проба (КХВ-109p): 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Услови за циклусите: еден циклус на температура од 95°C во период од 15 минути, по што следат 50 циклуси на температура од 94°C во период од 15 секунди и 60°C во период од 60 секунди.

Резултатите од *PCR* може да варираат зависно од условите во кои се спроведува, поточно од термалните протоколи за кои може да биде потребна оптимизација, зависно од уредот за *PCR* (*thermal cycler*) кој се употребува. Понатаму, може да се појават лажни позитивни резултати поради лажното спојување на почетници или лабораториска контаминација. Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Може да се употребуваат и други верзии на методот *qPCR* со докажана слична ефикасност.

3.2. Конвенционален метод на *PCR* за потврда на откривање на КХВ

За потврдување на присуството на зараза со КХВ, се употребува генерично вклопување *PCR* опишано во табела.1 во продолжение, и после него се спроведува секвенционирање на амплифицираниот производ.

Табела 1

Прајмери и услови за испитување на вклопениот PCR наменет за сите
ципринидни херпес вируси (CyHV-1, CyHV-2 и CyHV-3)

Име на почетница	Низа	Услови за циклуси	Големина на производот
CyHVpol-предна	5'- CCAGCAACATGTGCGACG G-3'	Прв круг на PCR 1 циклус: 95 °C во период од 2 минути	362 bp
CyHVpol-задна	5'- CCGTARTGAGAGTTGGCG CA-3'	40 циклуси: 95 °C во период од 30 секунди 55 °C во период од 30 секунди 72 °C во период од 45 секунди 1 циклус: 72 °C во период од 10 минути	

Име на почетница	Низа	Услови за циклуси	Големина на производот
СуHVpol-внатрешна предна	5'-CGACGGVGGYATCAGCC-3'	Втор круг на PCR 1 циклус: 95 °C во период од 2 минути, 40 циклуси: 95 °C во период од 30 секунди 55 °C во период од 30 секунди 72 °C во период од 45 секунди 1 циклус: 72 °C во период од 10 минути	339 bp
СуHVpol-внатрешна задна	5'-GAGTTGGCGCAYACYTT CATC-3'		

Резултатите од *PCR* може да варираат зависно од условите во кои се спроведува, поточно од термалните протоколи за кои може да биде потребна оптимизација, зависно од уредот за *PCR* (*thermal cycler*) кој се употребува. Понатаму, може да се појават лажни позитивни резултати поради лажното спојување на почетници или лабораториска контаминација. Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Меѓутоа, може да се употребуваат и други верзии на методот *PCR* со докажана слична ефикасност.

Секвенционирањето може да се спроведува во лабораторија или во надворешни друштва кои се специјализирани за секвенционирање. Резултатите од секвенцирањето може да се анализираат со усогласување на низите на познати референтни низи на KXB (броеви за пристап *Gen Bank* AP008984, DQ657948 и DQ177346). Добиената чиста низа се судира најмалку 98 % со тие референтни низи.

ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕТОДИ И ПОСТАПКИ ЗА ОТКРИВАЊЕ И ПОТВРДА НА ИНФЕКТИВНА САЛМОНИДНА АНЕМИЈА (ИСА)

Дел I. Дијагностички методи за надзор и контрола на ИСА

Кога земање примероци и лабораториски испитувања се спроведуваат за целите на програмите за надзор и искоренување на болеста утврдени во Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура или за потврдување на присуството или отфрлање на сомнеж на ИСА во согласност со член 22 од овој правилник, се применуваат дијагностички методи и постапки утврдени во точките 1, 2 и 3 од овој дел.

1. Подготовка на примероци од риба

За потребите на лабораториско испитување на присуството на ИСА, примероци од риби не смее да се обединуваат, доколку е тоа можно. Меѓутоа, за потребите на надзор на ИСА, прифатливо е обединување на 2 до 5 риби.

Примероци за анализа со обратна транскрипција - полимераза на верижна реакција (*RT-PCR* или *RT-qPCR*) се земаат од сите риби кои се вклучени во надзорот. Со употреба на стерилен инструмент од риба се вади парче од среден бубрег и се пренесува во епрувета на микроцентрифуга која содржи 1 ml раствор за конзервирање на *RNA* со докажана ефикасност. Ткиво земено од најмногу пет риби може да се собере во една епрувета со транспортен раствор и може да претставува еден збиен примерок. Тежината на ткивото во еден примерок изнесува 0,5 g. Кога е рибата премногу мала за да се добие примерок со потребна тежина, се земаат парчиња од бубрег, срце, слезина, црн дроб или пилорусни продолжетоци, во наведениот редослед, додека не се постигне тежина од 0,5 g.

Ткивата за хистолошко испитување се земаат само од свежо угинати риби со вообичаен состав кој покажува клинички знаци или посмртни знаци кои одговараат на присуство на ИСА. Од сите надворешни или внатрешни лезии треба да се земат примероци и во секој случај примероци од среден бубрег, срце, црн дроб, панкреас, утроба, жабри и слезина се вадат од риби со помош на скалпер и се пренесуваат во 8 % до 10 % (vol:vol) формал пуфер. Односот на фиксатор на ткиво треба да биде најмалку 20:1 за да се обезбеди задоволително зачувување на ткива. За имунохистохемија (*IHC*) се земаат примероци од среден бубрег и срце.

Ткива за вирусолошко испитување на култура на клетки се земаат од сите риби од кои веќе се земени примероци. Делови од црн дроб, преден и среден бубрег, срце и слезина се вадат од риби со помош на стерилен инструмент и

се пренесуваат во пластична епрувета која содржи 9 ml од транспортниот медиум. Ткиво земено од најмногу пет риби може да се групира во една збирна мостра со транспортен раствор и може да претставува еден збирен примерок. Тежината на ткивото во еден примерок изнесува $1,0 \pm 0,5$ g.

2. Испраќање на примероци од риба

Во лабораторијата може да се испрати цела риба под услов да се исполнат барањата кои се однесуваат на температурата во текот на превозот како што е наведено во став 3 од оваа точка. Цела риба се завиткува во абсорбентна хартија и се испраќа во пластична кеса разладена како што е опишано во овој став.

Може да се испрати и жива риба, доколку се исполнети дополнителните критериуми во поглед на ладен режим на транспорт, дезинфекција и биосигурност при превозот на живи риби.

Примероците од крв и епрувети кои содржат ткиво од риба наменето за вирусолошки испитувања или *RT-PCR* се ставаат во изолирани садови како што се кутии од стиропор со дебели ѕидови, заедно со доволно количина на мраз или разладени блокови со цел да се обезбеди разладување на примерокот во текот на превозот до лабораторија. Се избегнува замрзнување, а по добивање на пратката во кутиите за превоз сè уште треба да има мраз или еден или повеќе разладени блокови сè уште треба да бидат делумно или потполно замрзнати. Во исклучителни околности примероците за анализа *RT-PCR* и примероците за вирусолошко испитување може веднаш да се замрзнат и транспортираат во лабораторија на температура од -20°C или пониска.

За *RT-PCR* на ткива сочувани во *RNA later*) се спроведува екстракција *RNA* во следнава временска рамка зависно од температурата на која се чуваат примероците:

примероци чувани на температура од 37°C : 1 ден;

примероци чувани на температура од 25°C : 1 недела;

примероци чувани на температура од 4°C : 1 месец;

примероци чувани на температура од -20°C : неодредено време.

Ако ткиво на риба се превезува во фиксатор заради хистолошко испитување, се превезуваат во епрувети кои спречуваат истекување и садови отпорни на удар. Треба да се избегне замрзнување на примероци.

Вирусолошко испитување на култура на клетки треба да започне што е можно поскоро и не подоцна од 48 часа по собирањето на примероците. Во исклучителни околности, вирусолошко испитување може да започне најдоцна во рок од 72 часа по собирањето на материјалот, под услов

материјалот кој треба да се испитува да биде заштитен со транспортен медиум и да може да се исполнат барањата во однос на температурата во текот на транспортот.

3. Собирање на дополнителни дијагностички материјали

Подложно на одобрение на дијагностичка лабораторија, ткива на риба освен оние наведени во точка 1 од овој дел може да се соберат и подготват за дополнително испитување.

Дел II. Дијагностички методи за потврдување или отфрлање на сомнеж на ИСА

Кога земање примероци и лабораториски испитувања се спроведуваат за целите на програмите за надзор и искоренување на болеста утврдени во Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура или за потврдување на присуството или отфрлање на сомнеж на ИСА во согласност со член 22 од овој правилник, се применуваат дијагностички методи и постапки утврдени во точките 1 до 5 на овој дел.

1. Испитување на примероци со помош на *RT-PCR*

Дијагностички метод, кој се користи за проверка за вирусот на ИСА е *RT-qPCR*. Бидејќи резултатите од *RT-qPCR* можат да се менуваат во зависност од условите во кои се добиваат, за да се избегнат сомневања се вклучуваат соодветните позитивни и негативни контроли и ампликони.

1.1. Екстракција на вкупната *RNA*

Сите дејствија со *RNA* треба да се изведуваат на мраз, со употреба на ракавици.

Вкупната *RNA* се екстрахира со употреба на фенол-хлороформ метод или афинитетна колона за прочистување *RNA*, во согласност со упатставта на производителот.

Прочистената *RNA* се ресуспендира во дестилирана вода слободна *RNA* (поточно во вода третирана со 0,1% диетил пирокрабонат.

Концентрацијата и чистотата на екстрахираната *RNA* се оценува со мерење на оптичката густина на 260nm и 280nm. Друга можност може да биде вклучувањето на внатрешните контроли, насочени против вирусниот геном, како што е наведено во точка 1.3 од овој дел.

1.2. *RT-PCR* за откривање на вирусот ИСА

Неколку *RT-PCR* методи може да се користат за амплификација на геномот на вирусот на ИСА. *RT-PCR* во два чекори може да се спроведува ако реакциите *RT* и *PCR* се одвиваат во две одделни епрувети. Сепак, може да се спроведува и реакција во еден чекор, при што двете реакции се извршуваат со една епрувета. Метод од еден чекор се употребува секогаш кога тоа е можно, бидејќи со тестот во една епрувета се намалува ризикот од вкрстена контаминација, бидејќи не е потребно пренос на содржината, а се смета еднакво чувствителен како методот од два чекори.

Се употребуваат почетниците и анализите опишани во оваа точка, поточно две почетници *ILA1* или *ILA2* кои се насочени на сегмент 8 и докажано е дека се погодни за откривање на ИСА во случај на појава и кај рибите носители. Задната почетница *ILA2* не одговара на изолатите од Северна Америка и во тие случаи се употребуваат други низи на почетници.

Преден прајмер (*ILA1*): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3';

Заден прајмер (*ILA2*): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Услови за циклусите: еден циклус на температура од 50°C во период од 30 минути, 1 циклус на температура од 94°C во период од 15 минути, 40 циклуси на температура од 94°C во период од 30 секунди, 55°C во период од 30 секунди, 72°C во период од 60 секунди; еден циклус на температура од 72°C во период од 5 минути. Големина на производот изнесува 155 bp.

Резултатите од *PCR* може да варираат зависно од условите во кои се спроведува, поточно од термалните протоколи за кои може да биде потребна оптимизација, зависно од уредот за *PCR* (*thermal cycler*) кој се употребува. Понатаму, може да се појават лажни позитивни резултати поради лажното спојување на почетници или лабораториска контаминација. Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Меѓутоа, може да се употребуваат и други верзии на методот *RT-PCR* со докажана слична ефикасност.

1.3. *RT-qPCR* за откривање на вирусот ИСА

Употребата на *RT-qPCR* може да ја зголеми специфичноста, а веројатно и сензитивноста. Методот може да се изведе побрзо, бидејќи не се бара фаза со гел електрофореза и се намалува ризикот од крос контаминацијата, бидејќи е можно да се направи проценка на количината на вирусна геномска RNA во епруветата со примерокот. Недостаток на анализата со *RT-qPCR* е тој што често не е можно секвенционирање на амплифицираните продукти. Ако сепак има сомневање за специфичноста на амплифицираниот продукт, треба да се изврши друга специфична анализа на вирусот на ИСА, за да се провери резултатот.

Се користи анализата опишана во оваа точка, која е насочена кон сегмент 8. Каде што е можно, се користи метод од еден чекор, бидејќи анализите со една епрувета го минимизира ризикот од крос контаминацијата.

Преден прајмер 5'- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3';

Заден прајмер: 5'- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3';

и проба: 5'-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – MGBNFQ-3".

Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Услови за циклусите: еден циклус на температура од 50°C во период од 30 минути, еден циклус на температура од 95°C во период од 15 минути, 40 циклуси на температура од 94°C во период од 15 секунди, 60°C во период од 30 секунди; се прилагодува по потреба. Може да се употребуваат и други верзии на методот *RT-PCR* или *RT-qPCR* со докажана слична ефикасност.

1.4. Секвенционирање на амплифицирани *PCR* производи

Преден прајмер (*ILAs6-3F*): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3';

Заден прајмер (*ILAs6-2R*): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3".

Негативни контроли со матрица и позитивни контроли се вклучуваат во секој циклус на плочки. Услови за циклусите (*RT-PCR* од еден чекор): еден циклус на температура од 50°C во период од 30 минути, еден циклус на температура од 94°C во период од 15 минути, 40 циклуси на температура од 94°C во период од 30 секунди, 55°C во период од 30 секунди, 72°C во период од 60 секунди; еден циклус на температура од 72°C во период од 5 минути; се прилагодува по потреба. Може да се употребуваат и други верзии на методот *RT-PCR* или *RT-qPCR* со докажана слична ефикасност.

Алтернативно може да се употребува методот на секвенционирање *HPR* во сегмент 6 наведен во продолжение:

Преден прајмер: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3';

Заден прајмер: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3";

Големина на производот: 304 nt ако е *HPR0*.

Исто така може да бидат употребени анализи *RT-PCR* со слична сензитивност и специфичност како на анализите наведени во оваа точка.

Чистотата на амплифицираниот *RT-PCR* производ се проверува преку гел електрофореза пред секвенционирање. Ако се појави само еден чист фрагмент, тој се прочистува директно од реакцијата *PCR*. Ако се присутни бројни амплифицирани фрагменти, фрагмент кој е од интерес се прочистува преку гел електрофореза. Чистењето на *PCR* фрагменти од раствори или агарозни гелови се прави, со користење на спин пумпи за извлекување со *PCR* фрагменти во согласност со упатствата на производителот.

Секвенционирањето со почетници за амплифицирање може да се

спроведува во надворешни друштва кои се специјализирани за секвенционирање. Резултатите се анализираат преку алатката за пребарување *BLAST*, и секвенците треба да се споредуваат со други познати секвенци во нуклеотидната база на податоци на Националниот центар за биотехнолошки информации (*NCBI*) во САД.

Секвенционирање треба да ги отстрани сите сомневања за специфичноста на амплифицираниот *RT-PCR* производ.

2. Изолирање на вирусот на ИСА во клеточни култури

2.1. Подготовка на примероци

Ткивата можат да бидат складирани на температура од - 80°C. Ткивата се замрзнуваат и одмрзнуваат само еднаш пред нивното испитување. За целите на надгледување и контролата испитувањето се врши што е можно побрзо.

Секој примерок (мешавина од ткива во транспортен раствор) се хомогенизира целосно со помош на одобрен хомогенизатор, и се центрифугира при 2 000 до 4 000 × g во период од 15 минути на температура од 0 до 6°C, а супернатантот се филтрира (0,45 µm) и инкубира со волумен еднаков на избрана мешавина, разредена со антисеруми против локалните серотипови на вирусот на ИПН. Титар на антисерум треба да биде најмалку 1: 2 000 од 50% во неутрализациски тест за талог. Мешавината треба да се инкубира во текот на еден час на температура од 15°C. Тоа претставува инокулум.

Третманот на сите инокулуми со антисерум за инфективна панкреатична некроза (вирус, кој во некои делови во Европа е присутен во 50% од примероците од риби) има за цел да се спречи појавата на инокулирани клеточни култури на цитопатичен ефект (ЦПЕ) поради вирусот на ИПН. Тој третман може да се спроведе за да се скрати времетраењето на вирусолошките испитувања, како и бројот на случаи во кои појавата на цитопатоген ефект (ЦПЕ) треба да се смета за потенцијален знак на присуство на ИСА. Кога примероците доаѓаат од одгледувалишта кои се сметаат слободни од ИПН, може да се изостави третманот на инокулумот со антисерумот за вирусот на ИПН.

2.2. Инокулација на клеточни култури

Клетки од бубрег на атлантски лосос (*ASK*) се користат за почетно изолирање на вирусот на ИСА. Можат да се користат и други клеточни линии со докажана ефикасност и чувствителност за изолирање на вирусот на ИСА, со оглед на важноста на варијабилноста на видовите и способноста на различни видови да се репродуцираат во различни клеточни линии. Клетките од *ASK* го поддржуваат изолирањето и растот на до сега познатите изолати на вирусот, додека се користи ниско ниво на пасажа. Во клетките на *ASK* може да се појави поизразен цитопатоген ефект (ЦПЕ) отколку во

другите чувствителни клеточни линии како на пример *SHK-1*.

Клетките на *ASK* (пасажа 65 или пониско) се култивираат во медиум L-15, кој содржи 10% серум од говедски фетус, 2% (vol:vol) 200 mM на L-глутамин и 0,08% (vol:vol) 50 mM 2-меркаптоетанол со 50 mM врз плочи со бројни клеточни гнезда. Суспензија на орган третиран со антисерум се инокулира во млади клеточни култури кои активно растат поради крајно разредување на ткиво материјал во медиум на култура на клетки со однос 1: 1 000. За секој орган се додава суспензија 40 μ L инокулум кон клеточно гнездо што содржи 2 ml од медиум на клеточна култура. За да се намали ризикот од крос контаминацијата, се користат посебни плочи со 12 или 24 целуларни гнезда за примероците со потекло од различни одгледувалишта на риби.

Една плоча останува неинокулирана за да служи како негативна контрола. Посебна плоча се инокулира со референтен изолат од вирусот на ИСА, за да служи како позитивна контрола, како што следува. Сто μ l од основниот препарат од вирусот ИСА (минимален титар 10^7 инфективна доза на културата на ткиво од 50% на завршната точка (*TCID₅₀ ml⁻¹*)) се инокулира во првото клеточно гнездо и се меша. Количина од овој материјал се пренесува од првото клеточно гнездо во второто, за да се добие разредување 1:10, и се меша. Тоа се повторува по целата плоча, за да се добијат шест разредувања 1:10. Стандардни вирус ИСА може да се чува на температура од -80°C најмалку две години, но што еднаш се одмрзне мора да се употреби во рок од три дена. Треба да се внимава да се спречи вкрстено загадување на плочката за тестот со позитивен контролен материјал. За да се избегне оваа опасност, плочите за позитивни контрола се воспоставуваат и обработуваат одделно од плочата за тестот. Испитувањето на секои шест месеци на чувствителноста на клетките од бубрег на атлантски лосос кон изолати на вирусот на ИСА може да ја замени употребата на вклучувањето на позитивна контрола на секоја инокулација.

Примероците се инкубираат на температура $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ за максимум 15 дена. Клеточните култури се испитуваат два пати под микроскоп за цитопатоген ефект, меѓу 5 и 7 дена и помеѓу 12 и 14 дена по инокулација. Ако некој обединет примерок од клетки покажува цитопатичен ефект, веднаш се пристапува кон постапки за идентификација на вирусот во согласност со точка 2.4. од овој дел. Ако не се забележи цитопатоген ефект до 14 дена, се прави индиректен имунофлуоресцентен тест (*IFAT*), хемадсорпција или *RT-PCR*.

2.3. Субкултивација

Субкултивација се врши помеѓу 13 и 15 дена. Супернатант од културата се додава на клеточните гнезда кои содржат клетки во активна фаза на раст во соодветното разредување (1/10) на плочката со бројни клеточни гнезда, а потоа се оставаат да инкубираат на температура од $14 \pm 2^{\circ}\text{C}$ за максимум 18

дена. Клеточните култури се истражуваат два пати под микроскоп за цитопатоген ефект, меѓу 5 и 7 дена и помеѓу 14 и 18 дена по инокулација. Ако некој обединет примерок од клетки покажува цитопатоген ефект, веднаш се пристапува кон постапки за идентификација на вирусот во согласност со точка 2.4. од овој дел. Ако не се забележува цитопатоген ефект помеѓу 14-тиот и 18-тиот ден, се прави хемадсорбционен тест или *RT-PCR*.

Ако во текот на првите 7 дена на инкубација се појави цитотоксичност, во таа фаза може да се изврши субкултивирање, но при тоа клетките мора да се инкубираат за 14 до 18 дена и повторно субкултивираат со дополнителни 14 до 18 дена на инкубација. Ако се набљудува цитотоксичност по 7 дена, се пристапува кон субкултивирање и клетките се оставаат да инкубираат, за да се достигне период од вкупно 28 до 36 дена инкубација од денот на примарната инокулација.

Во случај на бактериска инфекција во примарната култура тестот се обновува, со користење на хомогенати од ткива, зачувани на температура -80°C . Пред инокулација хомогенатот од ткива се центрифугира при $4\,000 \times g$ за период од 15 до 30 минути на температура од 0 до 6°C и супернатантот се филтрира при $0,22\ \mu\text{m}$. Ако настане бактериска инфекција за време на фазата на субкултивирањето, супернатантот се филтрира при $0,22\ \mu\text{m}$, инокулиран на млади клетки и инкубира за уште 14 до 18 дена.

2.4. Тестови за дентификација на вирусот

Ако во која било фаза се забележи цито-патоген ефект (ЦПЕ), или ако хемадсорбциониот тест е позитивен, се спроведува идентификација на вирусот. Методите кои можат да бидат избрани за идентификација на вирусот на ИСА се *RT-PCR* во согласност со точка 1 и имунофлуоресценција (IF) во согласност со точка 2.6. од овој дел. Ако се смета дека е можно присуство на други вируси, се извршуваат дополнителни тестови за идентификација на вирусот. Ако овие тестови не доведат до конечна идентификација на вирусот во рок од една недела, супернатантот се испраќа за итна идентификација до:

- (а) референтната лабораторија за ИСА во Светската организација за здравје на животните (OIE) или;
- (б) национална референтна лабораторија или референтната лабораторија на ЕУ за болести кај рибите.

2.5. Хемадсорбција

Бидејќи размножувањето на вирусот на ИСА во култури на клетки не секогаш води до цитопатоген ефект, секое клеточно гнездо се подложува на *RT-PCR* тест или хемадсорбционен тест во согласност со оваа точка, или *IF* тест во согласност со точка 2.6 од овој дел.

Медиум на клеточната култура се одзема од секое клеточно гнездо, вклучувајќи од оние за позитивна и негативна контрола, и се става во стерилни етикетирани епрувети. Кон секое клеточно гнездо се додаваат 500 μl од суспензија 0,2% (vol:vol) од измиени еритроцити од зајак или коњ или од суспензија со 0,05% (vol:vol) со измиени еритроцити од пастрмка или атлантски лосос и се оставаат да инкубираат на собна температура во текот на 45 минути. Еритроцитите се отстрануваат и секое клеточно гнездо се мие два пати со медиум L-15. Секое клеточно гнездо се испитува со микроскоп.

Присуството на група од еритроцити прикачени на површината на ASK клетките е знак за веројатна зараза со ортомиксовирус. Ако хемадсорбциониот тест е позитивен, веднаш се пристапува кон постапки за идентификација на вирусот во согласност со точка 2.4. од овој дел

2.6. Имунофлуоресценција (IF)

Клетките на ASK (пасаж 65 или пониско) се култивираат во медиум L-15, кој содржи 10% серум од говедски фетус, 2% (vol:vol) 200 mM на L-глутамин и 0,08% (vol:vol) 50 mM 2-меркаптоетанол со 50 mM врз плочи со бројни клеточни гнезда и се употребуваат при конфлуенција поголема од 50 %. Исто така, може да се користат други клеточни линии или медиуми на култура со докажана ефикасност. 225 μl од супернатантот на култура која се смета евентуално инфицирана од вирусот се додава во секое од двете клеточни гнезда, меша и 225 μl се префрла во други две клеточни гнезда, при разредување од 1: 5. Две други клеточни гнезда се оставаат неинкулирани, за да служат како контролни. Примероците од различни одгледувалишта на риби се обработуваат на одделни плочи, како и контролните примероци за вирусот. Контрола за вирусот се воспоставува со користење на референтен изолат на вирусот ИСА.

Плочките се инкубираат на температура 14 ± 2 °C и испитуваат под микроскоп за максимум 7 дена. Кога се забележува преран цито-патоген ефект (ЦПЕ) или во рок од седум дена воопшто не се забележува цито-патоген ефект (ЦПЕ), следен чекор е фиксација. За таа цел клеточните гнезда се мијат со пуфер раствор со фосфат (PBS) и се фиксираат преку инкубација со 80% ацетон во период од 20 минути на собна температура. Плочите се оставаат да се исушат на воздух и се исфарбаат веднаш или се чуваат на температура од 0 до 6 °C не повеќе од 24 часа пред боене.

Дуплираните клеточните гнезда се бојат со моноклонални антитела (MAb) 3H6F8 и 10C9F5 против вирусот на ИСА, или со друг MAb со докажана ефикасност и специфичност, се разредуваат во PBS и се инкубираат на температура 37 ± 4 °C за 30 минути. MAb се отстранува и плочката се мие три пати со раствор 0,05% во 20 Твин во PBS. Конјугат на флуоресцентен изотиоцианат (FITC) од анти глувчешки имуноглобулин, разреден во PBS, се додава во секое клеточно гнездо и инкубира на температура од 37 ± 4 °C за 30 минути. Растворите од различни серии MAb и конјугат со FITC се оптимизираат во секоја лабораторија. Антитело се отстранува и плочата се мие три пати со раствор 0,05% во 20 Твин во PBS.

Клеточните гнезда се истражуваат веднаш под инвертен микроскоп опремен за флуоресценција со адаптиран филтер за екстракција на *FITC*. Даден тест се смета за позитивен ако се набљудуваат флуоресцентни клетки. За да биде валиден тестот, позитивните контролни плочи треба да дадат позитивен резултат, а негативните контролни плочи - негативен.

3. Испитување на други ткива

Техниката наведена во точка 2.6 од овој дел, може да се применува за други ткива од риби, како што се црниот дроб, слезината и срцето, под услов доволно количество од ендотелиалните клетки, леукоцити или лимфоцитите да можат да бидат депонирани на плочата. Постапката за означување е еднаква за сите ткива, иако за некои ткива е подобро да се отстрани боја со пропидиев јодид и да се потпира на осветлувањето во фаза за да се идентификуваат типовите клетки кои се присутни во примерокот.

4. Хистологија

Деловите препарирани со парафин се сечат на 5 μm и се бојат со хематоксилин и еозин. Хистолошки промени во клинички болести кај атлантски лосос се различни, но може да го вклучуваат следново:

- (а) голем број на еритроцити во централниот венски синус и ламелните капилари на жабрите, каде што исто така можат да се формираат еритроцитни тромби;
- (б) мултифокални и конфлуентни петехии или некроза на хепатоцитите, или и двете на одредено растојание од поголеми садови во црниот дроб; мултифокално акумулирање на еритроцити во проширените хепаталните синусоиди;
- (в) акумулирање на еритроцити во крвните садови на цревната ламина проприја и евентуално крварење во ламина проприја;
- (г) стромата на слезината да е проширена од акумулирање на еритроцити;
- (д) слабо мултифокално до екстензивно дифузно интерстицијално крварење со тубуларна некроза во областите со крварење, акумулирање на еритроцити во гломерулите на бубрегот;
- (ѓ) еритрофагоцитоза во слезината и секундарни хеморагии во црниот дроб и бубрезите.

5. Имунохистохемија (*IHC*)

Поиклонални антитела со нуклеопротеини против вирусот на ИАС се користат во парафин делови на ткива со фиксиран формалин. Органи кои треба да се истражуваат, се средишниот дел на бубрегот и срцето (преодна зона, вклучувајќи ги и сите три комори и вентили). Сомнителните случаи

поради патолошки знаци се проверуваат со позитивна имуноцитохемија (*IHC*). Хистолошки делови се подготвуваат во согласност со стандардните методи.

5.1 Подготовка на деловите на ткива

Ткивата се фиксираат во неутрален пуфер раствор со фосфат со 10% формалин за најмалку еден ден, дехидрираат во степенувана серија етанол, исчистени се во ксилен и се ставаат во парафин во согласност со стандардните протоколи. Делови со дебелина околу 5 μm (за примероци со *IHC* на предметни стакла, покриени со поли-L-лизин) се загреваат до температура од 56 °C до 58 °C (максимум 60 °C) во период од 20 минути, депарафинирани во ксилен, рехидратирани преку степенувана серија етанол и обоени со хематоксилин и еозин за патоморфологија и *IHC* во согласност со точка 2).

5.2. Постапка за бојење при *IHC*

Сите инкубации се вршат во собна температура врз лулка платформа, освен ако во оваа одлука не е поинаку предвидено:

- (а) извлекување на антигенот се прави преку вриење на местата во 0,1 М цитратен пуфер раствор pH 6,0 во текот на 2×6 минути, проследено со блокирање со 5% обезмастено млеко и 2% козји серум во 50 mM *TBS* (*TBS*; *Tris* / *HCl* 50 mM, *NaCl* 150 mM, pH 7,6) во текот на 20 минути;
- (б) деловите се инкубираат за една ноќ со примарни антитела (моноспецифични зајачки антитела со нуклеопротеини против вирусот на ИСА), растворени во *TBS* со 1% обезмастено млеко, проследено со три испирања во раствор *TBS* со 0,1% раствор Твин 20;
- (в) за откривање на поврзани антитела деловите се инкубираат со конјугирани со алкална фосфатаза антитела против *IgG* на зајак во текот на 60 минути. По последното миење се додава Фаст Ред (1 mg ml⁻¹) и нафтол *AS-MX* фосфат (0,2 mg ml⁻¹) со 1 mM Левамисол во 0,1 М *TBS* (pH 8,2), за да се развиваат во период од 20 минути. Потоа деловите се мијат со вода од чешма пред контрастно бојење со Харис хематоксилин и поставуваат во водна средина. Ткивни делови, кои се со позитивен резултат за вирусот на ИСА и со негативен резултат за вирусот на ИСА, се вклучуваат како контролни примероци во секој препарат.

5.3 Толкување на резултатите од *IHC*

Толкувањето на резултатите од испитувањето на *IHC* се врши како што е наведено во точките а) и б):

- (а) контролните делови се сметаат за позитивни, кога се забележи дека контролните секции имаат јасно видлива цитоплазмата и

интрануклеарно црвено (црвеникаво) бојење на ендотелиалните клетки во крвните садови на ендокардот. Дел од тест примерок се смета за позитивен само ако се констатира такво јасно интрануклеарно црвено обојување на ендотелиалните клетки;

(б) контролните делови се сметаат за негативни, ако не добиле значајна обоена реакција.

Бидејќи интрануклеарната локализација е карактеристична за нуклеопротеин на ортомиксовируси за време на фазата на размножување на вирусот, но често доминантно е паралелното цитоплазмично бојење, цитоплазмата и други видови бојење без интрануклеарна локализација се сметаат за некарактеристични или неубедливи.

Најсилните позитивни реакции на бојење обично се добиваат во ендотелиалните клетки на срцето и бубрезите. Реакциите на ендотелиално бојење во големи хеморагични лезии може да се слаби или да недостасуваат, веројатно поради лиза на заразените ендотелиални клетки.

„(*1)“ Со овој правилникот се врши усогласување со Директивата на Советот 2006/88/EЗ од 24 октомври 2006 за здравствените барања за аквакултурата и производи од аквакултура, и за спречување и контрола на одредени болести кај водни животни, (CELEX бр. 32006L0088); со последната измена со Директива на Комисијата 2008/53/EЗ, (CELEX бр. 32008L0053) и Регулативата на Комисијата (ЕЗ) бр. 1251/2008 од 12 декември 2008 за имплементирање на Директивата на Советот 2006/88/EЗ во врска со условите и барањата за сертификација за ставање во промет и увоз во Заедницата на животни од аквакултура и производи од аквакултура и за утврдување на листа на векторски видови, (CELEX бр. 32008R1251).