

REAL DECRETO 1488/1994, DE 1 DE JULIO, POR EL QUE SE ESTABLECEN MEDIDAS MINIMAS DE LUCHA CONTRA DETERMINADAS ENFERMEDADES DE LOS PECES.

Con el fin de garantizar el desarrollo regional del sector de la acuicultura, contribuyendo a la protección de la sanidad de los peces, es preciso establecer a escala comunitaria las medidas de lucha a adoptar en caso de aparición de una enfermedad.

Las enfermedades a tener en cuenta a la hora de establecer medidas de lucha contra las mismas, son las contempladas en el anexo A de la Directiva 91/67/CEE, del Consejo, de 28 de enero, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y productos de la acuicultura, modificada por la Directiva 93/54/CEE, del Consejo, de 24 de junio, e incluidas en el presente Real Decreto.

Dichas enfermedades pueden adquirir rápidamente proporciones epizooticas, provocando elevados índices de mortalidad, con la consecuente merma en la rentabilidad de la producción acuícola. Por lo tanto, han de adoptarse medidas de lucha en el momento en que se produzca la sospecha de presencia de una enfermedad, de modo que se emprenda una acción inmediata eficaz. Las medidas de lucha que permitan prevenir la propagación de enfermedades pasan por el control riguroso del movimiento de peces y productos, la realización de investigaciones epizootiológicas y la armonización del diagnóstico.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, mediante el presente Real Decreto, que se dicta al amparo de la competencia atribuida al Estado en materia de bases y coordinación general de la sanidad por el artículo 149.1.16. de la Constitución, se transpone al ordenamiento jurídico interno la Directiva 93/53/CEE del Consejo, que establece las medidas mínimas de lucha contra determinadas enfermedades de los peces y se incorpora la Decisión de la Comisión 92/532/CEE que establece los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de determinadas enfermedades de los peces.

Por otra parte, ha sido sometido a consulta el sector afectado por la presente disposición, de acuerdo con la normativa vigente.

En su virtud, a propuesta del Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros, en su sesión del día 1 de julio de 1994,

**D I S P O N G O :**

**CAPITULO I**

Disposiciones generales

Artículo 1.

El presente Real Decreto establece las medidas comunitarias mínimas de lucha contra las enfermedades de los peces recogidas en las listas I y II del anexo A del presente Real Decreto.

Artículo 2.

A efectos del presente Real Decreto, se aplicarán las definiciones siguientes:

- 1) Peces de acuicultura: Los peces vivos procedentes de una explotación, incluidos los de origen salvaje destinados a una explotación.
- 2) Peces: Cualquier pez, cualquiera que sea su estado de desarrollo.
- 3) Productos de los peces de acuicultura: Los productos derivados de los peces de acuicultura, tanto si están destinados a la cría como los huevos y gametos, como si están destinados al consumo humano.
- 4) Explotación: El establecimiento o, de manera general, toda instalación geográficamente delimitada en la que se críen peces de la acuicultura.
- 5) Explotación autorizada: La explotación que haya sido autorizada por la Comisión Europea.
- 6) Zona autorizada: La zona que haya sido autorizada por la Comisión Europea.
- 7) Puesta en el mercado: La posesión o exposición para la venta, la puesta a la venta, la entrega, el desplazamiento o cualquier otra forma de puesta en el mercado de la Unión Europea, excepto la venta al por menor.
- 8) Enfermedad de la lista I: Enfermedad de los peces mencionada en la lista I del anexo A.
- 9) Enfermedad de la lista II: Enfermedad de los peces mencionada en la lista II del anexo A.

- 10) Peces presuntamente infectados: Peces que presenten signos clínicos o lesiones <post mortem> o reacciones dudosas en las pruebas de laboratorio que permitan suponer con motivo la existencia de alguna enfermedad de la lista I o de la lista II.
- 11) Peces infectados: Peces en los que se confirme oficialmente la presencia de alguna enfermedad de la lista I o de la lista II como consecuencia de los exámenes de laboratorio, o, en el caso de la anemia infecciosa del salmón, tras un examen clínico y un examen <post mortem>.
- 12) Explotación presuntamente infectada: Explotación que contenga peces presuntamente infectados.
- 13) Explotación infectada: Explotación que contenga peces infectados, así como las explotaciones que se han vaciado y todavía no se han desinfectado.
- 14) Servicio oficial: El servicio veterinario o cualquier otro servicio de nivel equivalente, designado por la autoridad competente de las Comunidades Autónomas, responsables de la ejecución de los controles previstos en el presente Real Decreto.

#### Artículo 3.

Las Comunidades Autónomas adoptarán las medidas para que todas las explotaciones dedicadas a la cría o mantenimiento de peces que puedan contraer con facilidad las enfermedades de la lista I o de la lista II:

- 1) Sean registradas por el servicio oficial; este registro será actualizado continuamente.
- 2) Lleven un registro:
  - a) De las entradas en la explotación de peces vivos, huevos y gametos, con todos los datos sobre la entrega, el número o peso, el origen, la fuente de suministro y la talla de los peces.
  - b) De las salidas de la explotación de peces vivos, huevos y gametos, con todos los datos sobre la expedición, el número o peso, el destino y la talla de los peces.
  - c) De la mortalidad observada.

Este registro podrá ser examinado en cualquier momento, a petición del servicio oficial.

Deberá actualizarse regularmente y se mantendrá durante cuatro años.

#### Artículo 4.

Las Comunidades Autónomas establecerán las medidas oportunas para que la sospecha de la existencia de una de las enfermedades de la lista I o de la lista II se notifique obligatoriamente y con la mayor brevedad posible al servicio oficial.

### CAPITULO II

Medidas para combatir las enfermedades de la lista I

#### Artículo 5.

1. Cuando en una explotación haya peces de los que se sospeche que pueden estar infectados por una de las enfermedades mencionadas en la lista I, las Comunidades Autónomas adoptarán las medidas para que el servicio oficial aplique inmediatamente los medios de investigación oficial para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad, y especialmente el examen clínico; en particular, efectuará o hará que se efectúen las tomas de muestras adecuadas para los exámenes de laboratorio.
2. En cuanto se le notifique la sospecha de la presencia de la enfermedad, el servicio oficial pondrá la explotación bajo vigilancia oficial y ordenará, en particular, que:
  - a) Se elabore un censo oficial de todas las especies y categorías de peces y que, con respecto a cada una de ellas, se haga constar el número de peces muertos, infectados o presuntamente infectados o contaminados. El propietario o poseedor deberá mantener actualizado el censo a fin de que refleje el incremento de la población o los nuevos casos de mortalidad durante el período de presunta existencia de la enfermedad. La información contenida en el censo habrá de presentarse cuando así se solicite y podrá verificarse en cada inspección.
  - b) No puedan entrar ni salir de la explotación peces vivos o muertos ni huevos o gametos sin la autorización del servicio oficial.
  - c) La eliminación de los peces muertos o de sus despojos sea supervisada por el servicio oficial.
  - d) Las entradas o salidas de piensos, utensilios, objetos u otras sustancias, como los desechos, que puedan transmitir la enfermedad, queden sujetas, en caso necesario, a la autorización del

servicio oficial, que establecerá las condiciones necesarias para evitar la propagación del agente patógeno.

e) Las entradas o salidas de personas de la explotación queden sujetas a la autorización del servicio oficial.

f) Las entradas o salidas de vehículos de la explotación queden sujetas a la autorización del servicio oficial, que establecerá las condiciones necesarias para evitar la propagación del agente patógeno.

g) Se utilicen medios de desinfección adecuados en los lugares de entrada y salida de la explotación.

h) Se lleve a cabo una investigación epizootológica de conformidad con lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 8.

i) Todas las explotaciones situadas en la misma cuenca hidrográfica o zona costera queden sometidas a vigilancia oficial, y ningún pez, huevo o gameto salga de estas explotaciones sin la autorización del servicio oficial. En el caso de las cuencas hidrográficas o de las zonas costeras extensas, el servicio oficial podrá decidir que la aplicación de esta medida se limite a una superficie menos extensa cercana a la explotación presuntamente infectada, siempre y cuando dicha superficie ofrezca las máximas garantías para prevenir la propagación de la enfermedad.

En todo caso, deberá comunicarse la sospecha a los servicios oficiales de las Comunidades Autónomas vecinas e igualmente, en caso necesario, al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación quien comunicará la sospecha a los servicios oficiales de los Estados miembros vecinos o terceros países vecinos; en tal caso, los servicios oficiales de los Estados miembros afectados harán lo necesario para aplicar las medidas establecidas en el presente artículo.

3. Hasta que entren en vigor las medidas oficiales contempladas en el apartado 2, el propietario o el poseedor de peces de los que se sospeche que están infectados por la enfermedad adoptará todas las medidas necesarias para garantizar el cumplimiento de las disposiciones contempladas en el apartado 2, con exclusión de los párrafos h) e i).

4. Las medidas contempladas en el apartado 2 dejarán de aplicarse únicamente cuando se descarte oficialmente la sospecha de la presencia de la enfermedad.

Artículo 6.

En cuanto se confirme oficialmente la presencia de una de las enfermedades de la lista I, las Comunidades Autónomas lo comunicarán a la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria y adoptarán las medidas para que el servicio oficial, además de las medidas mencionadas en el apartado 2 del artículo 5, ordene la aplicación de las siguientes medidas:

a) En la explotación infectada:

1. Deberán retirarse inmediatamente todos los animales.

2. En el caso de explotaciones terrestres deberá evacuarse el agua de todos los estanques para limpiarlos y desinfectarlos.

3. Todos los huevos y gametos, los peces muertos y los peces que presenten signos clínicos de enfermedad serán considerados materiales de alto riesgo y deberán destruirse bajo control del servicio oficial, con arreglo a las disposiciones del Real Decreto 2224/1993, de 17 de diciembre, sobre normas sanitarias de eliminación y transformación de animales muertos y desperdicios de origen animal y protección frente a agentes patógenos en piensos de origen animal.

4. Se matarán y destruirán todos los peces vivos, bajo control del servicio oficial y con arreglo a las disposiciones del Real Decreto 2224/1993, de 17 de diciembre, o bien, aquellos peces que hayan alcanzado la talla comercial y no presenten signo clínico alguno de enfermedad, serán sacrificados bajo control del servicio oficial para su comercialización o transformación con vistas a la alimentación humana.

En este último caso, el servicio oficial adoptará las medidas para que se sacrifiquen dichos peces y se extraigan inmediatamente sus vísceras; para que tales operaciones se efectúen en condiciones de prevención de la propagación de los agentes patógenos; para que los desechos y despojos de los peces sean considerados materiales de alto riesgo y se sometan a un tratamiento de destrucción de los agentes patógenos, con arreglo al Real Decreto 2224/1993,

de 17 de diciembre; y para que las aguas utilizadas se sometan a un tratamiento que inactive los agentes patógenos que pudieran contener.

5. Tras la retirada de los peces, huevos y gametos, se procederá a limpiar y desinfectar lo antes posible los estanques, equipos y todo el material que pueda haberse contaminado, de conformidad con las instrucciones establecidas por el servicio oficial, de modo que se elimine cualquier riesgo de propagación o de supervivencia del agente causante de la enfermedad. Los procedimientos de limpieza y desinfección de una explotación infectada se determinarán de conformidad con el procedimiento comunitario.

6. Todas las sustancias mencionadas en el párrafo d) del apartado 2, del artículo 5 que puedan estar contaminadas serán destruidas o tratadas de tal forma que se elimine todo agente patógeno presente.

7. Se efectuará una investigación epizootiológica con arreglo a lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 8 y se aplicarán las disposiciones del apartado 4 del mismo artículo. Tal investigación incluirá la toma de muestras para su análisis en laboratorio.

b) Se efectuarán inspecciones sanitarias de todas las explotaciones situadas en la misma cuenca hidrográfica o zona costera en que se halle la explotación infectada. Si en tales inspecciones se detectan casos positivos, se aplicarán las medidas establecidas en el párrafo a) del presente artículo.

c) El servicio oficial autorizará la repoblación de la explotación una vez se haya efectuado la inspección de las operaciones de limpieza y desinfección y después de que haya transcurrido un período que el servicio oficial considere adecuado para garantizar la completa eliminación del agente patógeno y la erradicación de otras posibles infecciones en la misma cuenca hidrográfica.

d) En caso de que las medidas establecidas en los párrafos a), b), c) y d) del apartado 2 del artículo 5 requieran la cooperación de los servicios oficiales de otros Estados miembros, los servicios oficiales de las Comunidades Autónomas afectadas colaborarán a fin de garantizar la observancia de las medidas establecidas en el presente artículo.

#### Artículo 7.

Cuando peces de origen salvaje que no pertenezcan a una explotación, así como los peces de lagos, estanques u otras instalaciones destinadas a practicar la pesca de recreo o en las que hubiera peces de ornamentación, estén infectados o presuntamente infectados, las Comunidades Autónomas velarán por que se apliquen medidas adecuadas. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación informará a la Comisión Europea a través del cauce correspondiente y a los demás Estados miembros, de las medidas que hayan adoptado.

#### Artículo 8.

1. La investigación epizootiológica se centrará en los siguientes extremos:

a) El período probable durante el cual la enfermedad haya podido afectar a la explotación antes de haberse sospechado o declarado su existencia.

b) El posible origen de la enfermedad en la explotación y la determinación de otras explotaciones donde haya huevos y gametos, así como peces de especies vulnerables que hayan podido resultar infectados.

c) Los desplazamientos de peces, huevos o gametos, de vehículos o sustancias y de personas que puedan haber propagado el agente de la enfermedad a las explotaciones en cuestión o desde ellas.

d) La posible existencia de portadores de la enfermedad y su distribución.

2. En caso de que la investigación epizootiológica indique que la enfermedad puede haber sido introducida desde otra cuenca hidrográfica u otra zona costera o haber sido propagada a otra cuenca u otra zona costera como consecuencia del contacto producido por desplazamientos de peces, huevos o gametos, de animales, de vehículos o de personas o por cualquier otro medio, las explotaciones situadas en esas cuencas y zonas costeras se considerarán sospechosas y se aplicarán las medidas que se establecen en el artículo 5. En caso de confirmarse la existencia de la enfermedad, se aplicarán las medidas contempladas en el artículo 6.

3. En caso de que la investigación epizootiológica ponga de manifiesto la necesidad de cooperar con los servicios oficiales de otros Estados miembros, los servicios oficiales de las

Comunidades Autónomas afectadas adoptarán todas las medidas necesarias para garantizar la observancia de las disposiciones del presente Real Decreto.

4. A fin de coordinar todas las medidas necesarias para garantizar la erradicación de la enfermedad lo antes posible y con objeto de realizar la investigación epizootiológica, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en colaboración con las Comunidades Autónomas, creará un centro de crisis.

Por el Consejo de la Unión Europea, a propuesta de la Comisión, se aprobarán las disposiciones generales relativa a los centros nacionales de crisis y al centro de crisis comunitario.

### CAPITULO III

Medidas para combatir las enfermedades de la lista II

#### Artículo 9.

1. En caso de que se sospeche o se confirme la existencia de una de las enfermedades de la lista II en una zona autorizada o en una explotación autorizada ubicada en una zona no autorizada, se efectuará una investigación epizootiológica con arreglo al artículo 8.

2. En caso de que la investigación epizootiológica indique que la enfermedad puede haber sido introducida desde una zona autorizada u otra explotación autorizada o haber sido propagada a otra explotación autorizada como consecuencia de los desplazamientos de peces, de huevos o gametos, vehículos o personas o por cualquier otro medio, esas zonas o explotaciones se considerarán sospechosas y se les aplicarán las medidas pertinentes.

3. No obstante, el servicio oficial podrá autorizar el engorde de los peces que deban sacrificarse hasta que hayan alcanzado la talla comercial.

#### Artículo 10.

1. Cuando en una explotación no autorizada situada en una zona no autorizada haya peces presuntamente infectados con una enfermedad de la lista II, las Comunidades Autónomas adoptarán las medidas para que el servicio oficial:

a) Inicie inmediatamente una investigación oficial para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad que, en caso necesario, incluirá la toma de muestras para su análisis en un laboratorio autorizado.

b) Realice o mande realizar un censo oficial de las explotaciones infectadas, censo que se actualizará regularmente.

c) Ponga o mande poner las explotaciones afectadas bajo control oficial para asegurarse de que únicamente se autoricen los desplazamientos de huevos, gametos o de peces vivos procedentes de las explotaciones infectadas, destinados a otras explotaciones infectadas por la misma enfermedad o a su sacrificio para el consumo humano.

2. Durante un período determinado, las Comunidades Autónomas podrán crear bajo el control del servicio oficial, un programa facultativo u obligatorio de erradicación de las enfermedades de la lista II en explotaciones no autorizadas o en zonas no autorizadas. Durante ese período, estará prohibido introducir peces vivos, huevos o gametos procedentes de explotaciones infectadas o de explotaciones cuyo estatuto sanitario se desconozca, en una zona o una explotación sujeta a dicho programa.

Estos programas se remitirán a la Dirección General de Sanidad de la Producción Animal del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación que, a su vez, los presentarán a la Comisión Europea, a través del cauce correspondiente, para su estudio, aprobación y, en caso necesario, modificación.

Tras el período contemplado en el párrafo primero, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación informará a la Comisión y a los demás Estados miembros, de los resultados obtenidos.

### CAPITULO IV

Disposiciones finales

#### Artículo 11.

1. La toma de muestras y los análisis de laboratorio para detectar las enfermedades de las listas I y II se llevarán a cabo según los métodos establecidos por la Comisión Europea.

En el caso de las necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) y la septicemia hemorrágica viral (SHV), la toma de muestras y los análisis de laboratorio para su detección y confirmación, serán los que figuran en el anexo F de este Real Decreto.

2. Las pruebas para detectar la presencia de enfermedades o de agentes patógenos serán efectuadas por un laboratorio autorizado por el servicio oficial. En caso necesario, y especialmente cuando una enfermedad aparezca por primera vez, dichas pruebas de laboratorio indicarán el tipo, el subtipo o la variante del agente patógeno, que deberán ser confirmados por el laboratorio nacional de referencia y que, en caso necesario, podrán ser confirmados, previa comunicación al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el laboratorio comunitario de referencia.

Artículo 12.

1. El laboratorio nacional de referencia para las enfermedades de los peces será el Laboratorio de Sanidad y Producción Animal del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de Algete (Madrid). El laboratorio nacional de referencia dispondrá de instalaciones y personal especializado para detectar en cualquier momento, y sobre todo en las primeras manifestaciones de una enfermedad, el tipo, subtipo y variante de agente patógeno de que se trate y confirmar los resultados obtenidos por otro laboratorio de diagnóstico autorizado.

2. El laboratorio nacional de referencia para las enfermedades en cuestión se encargará de coordinar las normas y los métodos de diagnóstico, así como el uso de reactivos.

3. El laboratorio nacional de referencia designado para las enfermedades en cuestión se encargará de coordinar las normas y los métodos de diagnóstico establecidos para cada laboratorio de diagnóstico de las enfermedades. A tal fin:

a) Podrá proporcionar a los laboratorios autorizados reactivos para el diagnóstico.

b) Controlará la calidad de todos los reactivos de diagnóstico utilizados.

c) Organizará periódicamente pruebas comparativas.

d) Mantendrá aislados agentes patógenos de la enfermedad recogidos de casos confirmados.

e) Velará por confirmar los resultados positivos obtenidos en los laboratorios de diagnóstico autorizados.

4. La lista de los laboratorios nacionales de referencia de los Estados miembros para las enfermedades de los peces figura en el anexo B.

5. El laboratorio nacional de referencia para dichas enfermedades cooperará con el laboratorio comunitario de referencia.

Artículo 13.

1. El laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces se indica en el anexo C.

2. Sin perjuicio de lo dispuesto en la Decisión del Consejo 90/424/CEE, de 26 de junio, relativa a gastos en el sector veterinario, y, en particular, en su artículo 28, las competencias y funciones del laboratorio contemplado en el apartado 1 del presente artículo serán las que figuran en el anexo D.

Artículo 14.

1. Se prohibirá la vacunación contra las enfermedades de la lista II en las zonas autorizadas o en explotaciones autorizadas situadas en zonas no autorizadas y en zonas o explotaciones que ya hayan iniciado los procedimientos para obtener la autorización y contra las enfermedades de la lista I.

Artículo 15.

1. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en colaboración con las Comunidades Autónomas, elaborará un plan de intervención de urgencia en el que se especificará el método de aplicación a nivel nacional de las medidas establecidas en el presente Real Decreto, en caso de que se declare una de las enfermedades de la lista I. Este plan se presentará a través del cauce correspondiente a la Comisión de la Comunidad Europea y deberá permitir el acceso a las instalaciones, a los equipos, al personal y a cualquier otra estructura adecuada que sea necesaria para la erradicación rápida y eficaz de la enfermedad.

2. Los criterios generales para la elaboración de los planes se mencionan en el anexo E.

3. Los planes elaborados con arreglo a los criterios establecidos en el anexo E se presentarán a la Comisión de la Comunidad Europea, para su aprobación, pudiendo introducir las

modificaciones necesarias, especialmente para asegurar su compatibilidad con los planes de otros Estados miembros.

#### Artículo 16.

En el supuesto de que expertos veterinarios de la Comisión de la Comunidad Europea, en la medida que sea necesario para garantizar la aplicación uniforme del presente Real Decreto, realicen controles sobre el terreno, por la autoridad competente y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en el ámbito de sus competencias se les facilitará la asistencia necesaria para el desempeño de sus funciones.

Para ello, podrán verificar mediante la inspección de un porcentaje representativo de explotaciones si la autoridad competente controla que en éstas se respeta lo establecido en el presente Real Decreto.

#### Artículo 17.

Las condiciones de participación financiera de la Comunidad en las acciones relacionadas con la aplicación del presente Real Decreto están definidas en la Decisión 90/424/CEE.

Disposición adicional única.

La presente disposición se dicta al amparo del artículo 149.1.16. de la Constitución, en materia de bases y coordinación general de la sanidad.

Disposición final primera.

Se faculta al Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación para dictar, en el ámbito de sus competencias, las disposiciones necesarias para el desarrollo de lo dispuesto en el presente Real Decreto.

Disposición final segunda.

El presente Real Decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el <Boletín Oficial del Estado>.

Dado en Madrid a 1 de julio de 1994.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Agricultura, Pesca  
y Alimentación,

LUIS MARIA ATIENZA SERNA

#### ANEXO A

Lista de enfermedades sobre las que se establecen medidas mínimas comunitarias de lucha  
Lista I.

Anemia infecciosa del salmón (AIS).

Lista II.

Septicemia hemorrágica viral (SHV).

Necrosis hematopoyética infecciosa (NHI).

#### ANEXO B

Laboratorios nacionales de referencia para las enfermedades de los peces

Bélgica:

Institut National de Recherches Vétérinaires.

Groeselenberg, 99.

1180 Bruxelles.

Dinamarca:

Statens Veterinære Serumlaboratorium.

Landbrugsministeriet.

Hangovej 2.

8200 Aarhus N.

Alemania:

Bundesforschungsanstalt.

für Viruskrankheiten der Tiere.

Anstalt Insel Riems.

D-O-221 Insel Riems.

Grecia:

(DIRECCION OMITIDA)

España:

Laboratorio de Sanidad y Producción Animal.  
Ctra. Algete, km. 5,400.  
28110 Algete (Madrid).

Francia:

Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires.  
Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires.  
22, rue Pierre Curie.  
BP 67 94703 Maisons-Alfort CEDEX.

Irlanda:

Fisheries Research Centre.  
Abbotstown.  
Castleknock.  
Dublin 15.

Italia:

Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.  
Sezione Diagnostica di Basaldella di Campoformido.  
Via della Roggia 92.  
33030 Basaldella di Campoformido (Udine).

Luxemburgo:

Institut National de Recherches Vétérinaires.  
Groeselenberg, 99.  
1180 Bruxelles.

Países Bajos:

Centraal Diergeneeskundig Instituut.  
Hoofdgebouw.  
Edelhertweg 15.  
8219 PH Lelystad.  
Postbus 65.  
8200 AB Lelystad.  
Centraal Diergeneeskundig Instituut.  
Vestiging Virologie.  
Houtribweg 39.  
8221 RA Lelystad.  
Postbus 365.  
8200 AL Lelystad.

Portugal:

Laboratorio Nacional de Investigação Veterinária.  
Estrada de Benfica 701.  
1150 Lisboa.

Reino Unido:

Fish Disease Laboratory.  
14 Albany Road.  
Granby Industrial Site.  
Weymouth.  
Dorset DT 4 9TU.  
The Marine Laboratory.  
PO Box 101.  
Victoria Road.  
Aberdeen AB9 8DB.

ANEXO C

Laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces  
Statens Veterinære Serumlaboratorium.  
Landbrugsministeriet.  
Hangovej 2.  
8200 Aarhus N.

Dinamarca.

#### ANEXO D

Competencias y funciones del laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces

Las competencias y funciones del laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de las listas I y II son las siguientes:

- 1) Coordinar, previa consulta a la Comisión Europea, los métodos de diagnóstico de la enfermedad en cuestión en los Estados miembros, especialmente mediante:
  - a) La especificación, conservación y entrega de cepas del agente patógeno de la enfermedad en cuestión para someterlas a las pruebas serológicas y preparar el antisuero.
  - b) La entrega de sueros de referencia y de otros reactivos de referencia a los laboratorios nacionales de referencia para armonizar las pruebas y los reactivos empleados en cada Estado miembro.
  - c) La creación y conservación de una colección de cepas y de materia aislada del agente patógeno de la enfermedad en cuestión.
  - d) La organización periódica de pruebas comparativas comunitarias de los procedimientos de diagnóstico.
  - e) La recogida y selección de datos y todo tipo de información sobre los métodos de diagnóstico utilizados y los resultados de las pruebas efectuadas en la Comunidad.
  - f) La caracterización de la materia aislada del agente patógeno de la enfermedad en cuestión, mediante los métodos más avanzados y adecuados para lograr una mejor comprensión de la epizootiología de la enfermedad.
  - g) El seguimiento de la evolución de la situación, en todo el mundo, del control, epizootiología y prevención de la enfermedad en cuestión.
  - h) La realización de exámenes técnicos sobre el agente patógeno de la enfermedad en cuestión y otros agentes patógenos relacionados con éste para poder hacer un diagnóstico diferencial rápido.
  - i) El conocimiento a fondo de la preparación y utilización de los productos de medicina veterinaria inmunológica empleados para la erradicación y control de la enfermedad en cuestión.
- 2) Contribuir activamente a la identificación de los focos de enfermedad de que se trate en los Estados miembros, estudiando la materia aislada del agente patógeno enviada para confirmar el diagnóstico, proceder a su caracterización y a los estudios epizootiológicos.
- 3) Facilitar la formación o readaptación profesional de los expertos en diagnósticos de laboratorio para armonizar las técnicas de diagnóstico en toda la Comunidad.
- 4) Colaborar, en el sector de los métodos de diagnóstico de las enfermedades de la lista I, con los laboratorios competentes en los terceros países donde dichas enfermedades hacen estragos.

#### ANEXO E

Criterios mínimos aplicables a los planes de intervención

Los planes de intervención deberán incluir, por lo menos:

- 1) La creación, a nivel nacional, de un centro de crisis destinado a coordinar todas las medidas de urgencia.
- 2) Una lista de los centros locales de urgencia dotados del equipo adecuado para coordinar las medidas de control a escala local.
- 3) Informaciones detalladas sobre el personal encargado de las medidas de urgencia, sus cualificaciones y responsabilidades.
- 4) La posibilidad, para cualquier centro local de urgencia, de establecer contacto rápidamente con las personas u organismos directa o indirectamente afectados por una infestación.
- 5) La disponibilidad de los equipos y materiales necesarios para ejecutar de forma apropiada las medidas de urgencia.
- 6) Las instrucciones precisas relativas a las acciones que deban adoptarse cuando se sospechen y confirmen casos de infección o de contaminación.
- 7) Programas de formación para actualizar y desarrollar los conocimientos relativos a los procedimientos sobre el terreno y a los procedimientos administrativos.

8) Para los laboratorios de diagnóstico, en caso necesario, un servicio de examen <post mortem>, la capacidad necesaria para los exámenes serológicos, histológicos, etc., y la actualización de las técnicas de diagnóstico rápido (a estos efectos procede establecer disposiciones relativas al transporte rápido de muestras).

9) Disposiciones reglamentarias para la aplicación de los planes de intervención.

## ANEXO F

### PRIMERA PARTE

Procedimientos de muestreo y de análisis para el control de la septicemia hemorrágica viral (SHV) y la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI)

#### I. Muestreo

##### 1. Calendario de muestreo.

Las explotaciones se someterán a inspecciones clínicas al menos dos veces al año durante el período comprendido entre octubre y junio, o siempre que la temperatura del agua sea inferior a 14 Grad. C. Los intervalos entre inspecciones deberán ser de cuatro meses como mínimo. Se inspeccionarán todas las unidades de producción (estanques, tanques, acuarios, jaulas de red, etc.) para comprobar si hay peces muertos, de poco peso o que actúen de manera anormal. Deberá prestarse especial atención a la zona de desagüe (si es posible), donde los peces de poco peso tienden a acumularse debido a la corriente de agua.

##### 2. Selección y recogida de muestras.

Para realizar los análisis que requieran las inspecciones, se recogerán entre 30 y 150 peces y/o muestras de fluido ovárico, tal como figura en el cuadro 1 A. Si hubiese truchas arco iris, toda la muestra estará compuesta de peces de esa especie; en caso contrario, la muestra deberá incluir peces de todas las especies presentes siempre que sean propensas a la SHV o a la NHI, de conformidad con el anexo A. Las especies estarán representadas en la muestra por igual.

Durante los cuatro años de control inicial previos a la obtención de la autorización, la muestra debe componerse de 150 ejemplares para garantizar que la detección de los portadores del virus se realiza con un margen de aproximación del 95 por 100, estando afectados un 2 por 100 de los animales. En años posteriores (mantenimiento de la autorización), el tamaño de la muestra puede reducirse a 30 a fin de asegurar la detección de los virus con un margen de aproximación del 95 por 100, estando afectados un 10 por 100 de los animales (cuadro 1B). Tratándose de explotaciones que puedan probar documentalmente que siempre han estado libres de SHV y de NHI (gracias a la aplicación regular de un programa oficial de inspección sanitaria), la muestra reducida también podrá utilizarse durante el período de control inicial. Si se emplea más de una fuente de agua para la producción de peces, la muestra compuesta de 150 ó 30 ejemplares podrá incluir peces que representen todos los tipos de fuentes. Los peces de poco peso, que actúen de manera anormal o muertos recientemente (sin descomponer), serán los primeros que se incluyan en la muestra. En caso de que no los haya, ésta deberá estar compuesta de peces sanos de apariencia normal, que hayan sido recogidos de tal modo que estén representadas todas las partes de la explotación y clases de edad.

##### 3. Preparación y envío de muestras de peces.

Antes de su envío o traslado al laboratorio, se extraerán de los peces partes de los órganos que deban examinarse, con tijeras y pinzas estériles, y se introducirán en tubos de plástico que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con un 10 por 100 de suero de ternera y antibióticos. Puede recomendarse la combinación de 200 UI de penicilina, 200 microg. de estreptomycin y 200 microg.

de kanamicina por ml. aunque podrán utilizarse asimismo otros antibióticos de eficacia probada. Los tejidos que se examinarán serán el bazo, la parte anterior del riñón, el encéfalo y en algunas ocasiones fluido ovárico (cuadros 1A y 1B).

Podrán recogerse en un solo tubo y constituir una muestra conjunta partes de órganos de 5 a 10 peces (cuadros 1A y 1B). El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 1 g como mínimo, y será tal que la dilución final sea de 1:10.

Los tubos se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo, cajas de poliestireno de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo o de bloques congelados para garantizar la refrigeración de las muestras a una temperatura comprendida entre 0 y 5 Grad. C durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación.

El examen virológico se iniciará lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido cuarenta y ocho horas desde la recogida de las muestras. Si la longitud de los peces que deban examinarse fuere inferior a 6 cm. podrán enviarse peces enteros al laboratorio en bolsas de plástico refrigeradas como se ha indicado anteriormente.

#### 4. Recogida de material suplementario para diagnóstico.

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

### II. Preparación de las muestras para el examen virológico

#### 1. Homogeneización de los órganos.

Una vez en el laboratorio, se homogeneizará completamente el tejido de los tubos (con un triturador, mezclador o mortero) y a continuación se suspenderá el homogeneizado en el medio de transporte original. Si la muestra está formada por peces enteros, es decir, peces de menos de 6 cm. de longitud, éstos se desmenuzarán con tijeras estériles tras haber eliminado la parte del cuerpo posterior a la cloaca, se homogeneizarán según el procedimiento descrito y se suspenderán en el medio de transporte en la proporción 1:10.

#### 2. Centrifugación del homogeneizado.

El homogeneizado se centrifugará a una aceleración de entre 2.000 y 4.000 xg durante quince minutos en una centrífuga refrigerada a una temperatura comprendida entre 2 y 5 Grad. C, y el sobrenadante se recogerá para su examen.

Si la muestra ha sido enviada en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos), no será necesario aplicar otro tratamiento de antibióticos al sobrenadante.

Si la muestra estaba formada por peces enteros, después de la centrifugación el homogeneizado será expuesto a los antibióticos en el medio de transporte utilizado para la resuspensión, bien durante cuatro horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 Grad. C.

El tratamiento con antibióticos tiene por fin controlar la contaminación bacteriana de las muestras y hace innecesaria la filtración con filtros de membrana.

Inmediatamente después de la centrifugación un volumen del sobrenadante se mezclará a partes iguales con un antisuero divalente anti-virus de NPI (cepas de referencia Sp y Ab), diluido en la proporción adecuada, y se incubará conjuntamente durante una hora como mínimo a una temperatura de 15 Grad. C y dieciocho horas como máximo a una temperatura de 4 Grad. C. El título del antisuero deberá ser como mínimo 1:2.000 en una prueba de neutralización en placa del 50 por 100.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero anti-virus de NPI (virus que en algunas partes de Europa está presente en el 50 por 100 de las muestras de peces) tiene por objeto evitar el desarrollo en los cultivos celulares inoculados de efectos citopatogénicos (ECP) debidos al virus de NPI. Con ello se logra reducir la duración de los exámenes virológicos, así como el número de casos en que la presencia de ECP debe considerarse como un indicador potencial de SHV o NHI.

Cuando las muestras procedan de unidades de producción consideradas exentas de NPI, podrá omitirse el tratamiento de los inóculos con antisuero anti-virus de NPI.

### III. Exámenes virológicos

#### 1. Cultivos y medios celulares.

Se cultivarán las células BF-2 y EPC o FHM a una temperatura comprendida entre 20 y 25 Grad. C en el medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle (o sus modificaciones) con adición de un 10 por 100 de suero vacuno fetal y antibióticos en concentraciones normales. Si las células se cultivan en frascos cerrados, el medio se amortiguará con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas deberá amortiguarse con Tris-HCl (23 mM) y bicarbonato sódico (6 mM) con un pH lo más próximo posible a 7,6, el más idóneo para la multiplicación de virus.

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

#### 2. Inoculación de los cultivos celulares.

La suspensión del órgano tratada con antibióticos se inoculará en cultivos celulares en dos diluciones, es decir, la dilución original y, además, una dilución 1:100 de ésta (a fin de evitar interferencias homólogas). Deberán inocularse, como mínimo, dos líneas celulares (véase el apartado III.1). La relación entre el tamaño del inóculo y el volumen del medio de cultivo celular será aproximadamente de 1:10.

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

### 3. Incubación de los cultivos celulares.

Los cultivos celulares inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 Grad. C. Si el color del medio de cultivo pasa de rojo a amarillo, lo que indica la acidificación del medio, se llevará a cabo el ajuste del pH con una solución estéril de bicarbonato, o con una sustancia equivalente, para garantizar la propensión celular a la infección vital.

Cada seis meses se efectuará la titulación del material congelado de virus de SHV y NHI para comprobar la propensión de los cultivos celulares a la infección.

### 4. Microscopia.

Se observarán diariamente, a unos 40 aumentos, los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si hay signos evidentes de ECP, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus, de conformidad con el apartado IV.

Al mismo tiempo, se adoptarán las medidas oportunas para suspender la autorización de la unidad de producción de donde proceda la muestra que haya dado resultados positivos, así como la de todas las unidades de producción que manejen material procedente de aquélla.

La suspensión de la autorización se mantendrá hasta que las pruebas de laboratorio hayan demostrado que el virus en cuestión no es el de la SHV ni el de la NHI. Se concederá un plazo máximo de cuatro semanas para la identificación del virus, incluido el tiempo necesario para la realización de análisis en los laboratorios de referencia.

### 5. Subcultivos.

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

Se reunirán alícuotas del medio de todos los cultivos/pocillos pertenecientes al cultivo inicial por líneas celulares a continuación de un ciclo de congelación y descongelación de cultivos, y se mezclarán 0,5 ml. del medio con una parte igual del antisuero anti-NPI descrito en el punto II.2; la mezcla se incubará durante sesenta minutos a una temperatura de 15 C. A continuación, se inoculará en cultivos celulares homólogos en diluciones de 1:1 y 1:100, como se describe en el punto III.2. La inoculación podrá ir precedida de la preincubación de las diluciones con el antisuero divalente anti-NPI con una dilución adecuada.

Los cultivos inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 Grad. C, según se indica en el punto III.4.

## IV. Identificación del virus

### 1. Neutralización.

Si se observa la existencia de ECP en un cultivo celular, se eliminarán las células mediante centrifugación a baja velocidad o por filtración con membrana (0,45 µm) y se diluirá el medio a 1:100 y 1:10.000 en un medio de cultivo celular.

Se mezclarán alícuotas de las diluciones con partes iguales de los siguientes reactivos, por separado, y se incubarán durante sesenta minutos a una temperatura de 15 Grad. C:

- Anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la SHV (virus Egtved) 1:50.
- Anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (virus de NHI) 1:50.
- Antisuero divalente específico anti-virus de la necrosis pancreática infecciosa (virus de NPI) (cepas de referencia Sp y Ab) 1:50.
- Medio 1:1.

o del modo indicado por el laboratorio de referencia en lo que respecta a la posible citotoxicidad de los antisueros.

Los reactivos utilizados serán de calidad de referencia en lo que respecta al título y a la especificidad.

De cada mezcla de suero y virus, se inocularán al menos dos cultivos celulares con 50 UI cada uno, y se incubarán a 15 Grad. C. Se comprobará la aparición de ECP, según se indica en el apartado III.4.

Si la prueba no ha permitido identificar con certeza el virus en el plazo de una semana, deberá adoptarse una de las siguientes medidas:

a) Trasladar el virus al laboratorio nacional de referencia para virus de peces para su identificación inmediata.

b) Aplicar la prueba de adsorción por inmunofluorescencia (IFAT) (apartado IV.2), la prueba ELISA (apartado IV.3) u otras técnicas de identificación de virus, utilizando reactivos de calidad de referencia.

## 2. Inmunofluorescencia (IFAT).

Para cada aislado vírico que se desee identificar, se sembrarán con células EPC al menos ocho cubres o sus equivalentes a una densidad que permita alcanzar una confluencia del 60 al 90 por 100 aproximadamente después de veinticuatro horas de cultivo. Se preferirán las células EPC por su fuerte adherencia a las superficies de cristal.

Cuando las células hayan sedimentado en la superficie del cristal (aproximadamente una hora después de la siembra) o cuando los cultivos hayan sido incubados durante un máximo de veinticuatro horas, se inoculará el virus que se desee identificar. Se inocularán cuatro cultivos en la proporción de 1:10 en volumen y otros cuatro en la proporción de 1:100.

Cuando hayan transcurrido entre veinte y treinta horas después de la inoculación, los cultivos se aclararán dos veces en medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle sin suero, se fijarán con acetona y se teñirán con ayuda de la inmunofluorescencia de doble capa. La primera capa de reactivo está formada por un antisuero aprobado (como se indica en el apartado IV.1). La segunda capa de reactivo está formada por un antisuero conjugado con isotiocianato de fluoresceína con afinidad por la inmunoglobulina utilizada en la primera capa. Para cada uno de los antisueros analizados, se efectuará como mínimo la tinción de un cultivo inoculados con una dosis elevada y de otro inoculado con una dosis baja. La prueba incluirá controles positivos y negativos apropiados.

Los cultivos teñidos se prepararán utilizando solución salina de glicerol y se examinarán con luz ultravioleta incidente, utilizando oculares de 10 x o 12 x y objetivos de 25 x o 40 x con aperturas numéricas  $>0,7$  y  $>1,3$ , respectivamente. Las diluciones del antisuero inicial y de la inmunoglobulina conjugada con isotiocianato de fluoresceína dependerán de la disposición del microscopio escogido o disponible.

Algunas cepas del virus de Egtved presentan una fuerte reacción con el antisuero anticepa de referencia F1 en la prueba de inmunofluorescencia, aunque no presenten reacción alguna en las pruebas de neutralización.

## 3. Ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA).

Los pocillos de las placas de microtitulación (por ejemplo, inmunoplasacas-Nunc, Maxisorp, Nunc, Dinamarca) se recubrirán durante una noche con las diluciones recomendadas de fracciones inmunoglobulínicas purificadas de proteína A de los antisueros mencionados en el apartado IV.1.

Tras aclarar los pocillos con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se incorporará a los pocillos el virus que se desee identificar en fases de dilución dobles o cuádruples y se dejará reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento durante sesenta minutos a 37 Grad. C. Tras el aclarado con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se añadirán anticuerpos con biotil de la especificidad correspondiente a la de los anticuerpos de recubrimiento y se dejará reaccionar durante sesenta minutos a 20 Grad. C. Después de efectuar otro aclarado como el anterior, se añadirá estrepta vidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y se dejará reaccionar durante una hora a 20 Grad. C. Tras efectuar un último aclarado, se visualizará la enzimalidad a utilizando sustratos ELISA adecuados (OPD, TMB u otros).

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

#### Cuadro 1 A

##### Obtención de la autorización

Número de inspecciones clínicas anuales / Número de peces utilizados para el análisis de órganos / Número de peces utilizados para el análisis de fluido ovárico

##### Zonas continentales

a) Explotaciones con reproductores. / 2 / 120 (primera serie). / 30 (primera serie). / 150 (segunda serie). / 0

b) Explotaciones con reproductores únicamente. / 2 / 0 / 150 (primera y segunda serie).

c) Explotaciones sin reproductores. / 2 / 150 (primera y segunda serie). / 0

##### Zonas costeras

a) Explotaciones sin reproductores. / 2 / 30 (primera y segunda serie). / 0

b) Explotaciones con reproductores. / 2 / 120 (primera serie). / 30 (primera serie). / 150 (segunda serie). / 0

Número máximo de peces por muestra conjunta: 5.

#### Cuadro 1 B

##### Mantenimiento de la autorización

Número de inspecciones clínicas anuales / Número de peces utilizados para el análisis de órganos / Número de peces utilizados para el análisis de fluido ovárico

##### Zonas continentales

a) Explotaciones con reproductores. / 2 / 15 (primera o segunda serie). / 15 (primera o segunda serie).

b) Explotaciones con reproductores únicamente. / 2 / 0 / 30 (primera o segunda serie).

c) Explotaciones sin reproductores. / 2 / 30 (primera y segunda serie). / 0

##### Zonas costeras

a) Explotaciones sin reproductores. / 1 / 30 (1) (primera o segunda serie). / 0

b) Explotaciones con reproductores. / 2 / 0 / 30 (primera o segunda serie).

Número máximo de peces por muestra conjunta: 10.

(1) Las muestras deberán haberse recogido entre dos y seis meses después de haber trasladado los peces de agua dulce a agua salada.

#### SEGUNDA PARTE

Procedimientos de diagnóstico para la confirmación de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) y de la septicemia hemorrágica viral (SHV), en caso de brotes sospechosos

El diagnóstico de la NHI y de la SHV se podrá realizar mediante alguna de las siguientes técnicas:

A. Aislamiento convencional del virus y posterior identificación serológica del mismo.

B. Aislamiento e identificación serológica simultánea del virus.

C. Técnicas rápidas de diagnóstico (IFAT, ELISA).

En las explotaciones de las zonas autorizadas, el primer diagnóstico de la NHI y de la SHV no deberá basarse sólo en la técnica C, deberá utilizarse también el método A o el B.

Es posible que en algunos casos los tejidos destinados al examen virológico tengan que ir acompañados de material suplementario para exámenes bacteriológicos, parasitológicos, histológicos o de otro tipo que permitan un diagnóstico diferencial. Este material se recogerá de acuerdo con los procedimientos establecidos por la OIE.

A. Aislamiento convencional del virus y posterior identificación serológica del mismo

A.I.1 Selección de muestras. Para el análisis se seleccionarán como mínimo diez peces que muestren los síntomas típicos de la NHI o de la SHV.

A.I.2 Preparación y envío de muestras de peces.

Antes de su envío o traslado al laboratorio, se extraerán de los peces partes de los órganos que deban examinarse, con tijeras y pinzas estériles, y se introducirán en tubos de plástico que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con un 10 por 100 de suero de ternera y antibióticos. Puede recomendarse la combinación de 200 UI de penicilina, 200 microg. de estreptomina y 200 microg.

de kanamicina por ml, aunque podrán utilizarse asimismo, otros antibióticos de eficacia probada. Los órganos que deberán examinarse son el bazo, la parte anterior del riñón y en encéfalo.

Podrán recogerse en un solo tubo y constituir una muestra conjunta partes de órganos de 5 a 10 peces. El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 1 g como mínimo, y será tal que la dilución final esté alrededor de 1:10.

Los tubos se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo, cajas de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo en <bloques congelados> para garantizar la refrigeración de las muestras a una temperatura comprendida entre 0 y 5 Grad. C. durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación.

El examen virológico se iniciará lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido cuarenta y ocho horas desde la recogida de las muestras. Si la longitud de los peces que van a examinarse es inferior a 6 cm., podrán enviarse peces enteros al laboratorio en bolsas de plástico refrigeradas como se ha indicado anteriormente.

#### A.I.3 Recogida de material suplementario para diagnóstico.

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

#### A.II.1 Homogeneización de los órganos.

Una vez en el laboratorio, se homogeneizará completamente el tejido de los tubos (con un triturador, mezclador o mortero) y a continuación se suspenderá el homogeneizado en el medio de transporte original. Si la muestra está formada por peces enteros, es decir, peces de menos de 6 cm. de longitud, se desmenuzará con tijeras estériles, tras haber eliminado la parte del cuerpo posterior a la cloaca, se homogeneizarán según el procedimiento descrito y se suspenderán en el medio de transporte en la proporción de 1:10.

#### A.II.2 Centrifugación del homogeneizado.

El homogeneizado se centrifugará a una aceleración de entre 2.000 y 4.000 xg durante quince minutos en una centrífuga refrigerada a una temperatura comprendida entre 2 y 5 Grad. C, y el sobrenadante se recogerá para su examen.

Si la muestra ha sido enviada en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos), no es necesario aplicar otro tratamiento de antibióticos al sobrenadante.

Si la muestra estaba formada por peces enteros, después de la centrifugación el homogeneizado será expuesto a los antibióticos en el medio de transporte utilizado para la resuspensión, bien durante cuatro horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 Grad. C.

El tratamiento con antibióticos tiene por fin controlar la contaminación bacteriana de las muestras y hace innecesaria la filtración con filtros de membrana. Inmediatamente después de la centrifugación, se mezclará un volumen del sobrenadante a partes iguales con un antisuero divalente anti-virus de NPI (cepas de referencia Sp y Ab), diluido en la proporción adecuada, y se incubará conjuntamente durante una hora como mínimo a una temperatura de 15 Grad. C o dieciocho horas como máximo a una temperatura de 4 Grad. C. El título del antisuero deberá ser como mínimo 1:2.000 en una prueba de neutralización en placa del 50 por 100.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero anti-virus de NPI (virus que en algunas partes de Europa está presente en el 50 por 100 de las muestras de peces) tiene por objeto evitar el desarrollo en los cultivos celulares inoculados de efectos citopatogénicos (ECP) debidos al virus de NPI. Con ellos se logra reducir la duración de los exámenes virológicos, así como el número de casos en que la presencia de ECP puede considerarse como un indicador potencias de SHV o NHI.

Cuando las muestras procedan de unidades de producción consideradas exentas de NPI, podrá omitirse el tratamiento de los inóculos con antisuero anti-virus de NPI.

#### A.III.1 Cultivos y medios celulares.

Se cultivarán las células BF-2 y o bien EPC o bien FHM a una temperatura comprendida entre 20 y 25 C en el medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle (o sus modificaciones) con adición de un 10 por 100 de suero vacuno fetal y antibióticos en concentraciones normales. Si las células se cultivan en frascos cerrados, el medio se amortiguará con bicarbonatos. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas deberá amortiguarse con Tris-

HCl (23 Mm) y bicarbonato sódico (6 Mm) con un pH lo más próximo posible a 7,6, el más idóneo para la multiplicación de virus.

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

#### A.III.2 Inoculación de los cultivos celulares.

La suspensión del órgano tratada con antibióticos se inoculará en cultivos celulares en dos diluciones, es decir, la dilución original y, además, una dilución 1:100 de ésta (a fin de evitar interferencias homólogas). Deberán inocularse, como mínimo, dos líneas celulares (véase apartado A.III.1).

La relación entre el tamaño del inóculo y el volumen del medio de cultivo celular será aproximadamente de 1:10.

Para cada dilución y cada línea celular se empleará al menos un área celular de 2 cm<sup>2</sup> aproximadamente, correspondiente a un pocillo de una placa de cultivo celular, aunque también son aceptables otras unidades con áreas de cultivo similares o mayores.

#### A.III.3 Incubación de los cultivos celulares.

Los cultivos celulares inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 Grad. C. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, lo que indica la acidificación del medio, se llevará a cabo el ajuste del Ph con una solución estéril de bicarbonato o con una sustancia equivalente, para garantizar la propensión celular a la infección viral.

Cada seis meses se efectuará la titulación de material congelado de virus de SHV y NHI para comprobar la propensión de los cultivos celulares a la infección.

#### A.III.4 Microscopia.

Se observarán diariamente a unos 40 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si hay signos evidentes de ECP se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus de conformidad con el apartado A.IV.

Al mismo tiempo, se adoptarán las medidas necesarias para suspender la autorización de la unidad de producción de donde proceda la muestra que haya dado resultados positivos, así como la de todas las unidades de producción que manejen material procedente de aquélla.

La suspensión de la autorización se mantendrá hasta que las pruebas de laboratorio hayan demostrado que el virus en cuestión no es el de la SHV ni el de la NHI.

Se concederá un plazo máximo de cuatro semanas para la identificación del virus, incluido el tiempo necesario para la realización de análisis de los laboratorios de referencia.

#### A.III.5 Subcultivos.

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

Se reunirán, según la línea celular, alícuotas del medio de todos los cultivos/pocillos pertenecientes al cultivo inicial, a continuación de un ciclo de congelación y descongelación de cultivos, y se mezclarán 0,5 ml de medio a partes iguales con el antisero anti-NPI descrito en el apartado A.II.2; la mezcla se incubará durante sesenta minutos a una temperatura de 15 Grad. C. A continuación, se inoculará en cultivos celulares en diluciones de 1:1 y 1:100, como se describe en el apartado A.II.2. La inoculación podrá ir precedida de la preincubación de las diluciones con el antisero divalente antiviral de NPI, con una dilución adecuada.

Los cultivos inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 Grad. C, según se indica en el apartado A.III.4.

#### A.IV.1 Neutralización.

Si se observase la existencia de ECP en un cultivo celular se eliminarán las células mediante centrifugación a baja velocidad o por filtración con membrana (0,45 microm.) y se diluirá en medio a 1:100 y 1:10.000 en un medio de cultivo celular.

Se mezclarán alícuotas de las diluciones con partes iguales de los siguientes reactivos, por separado, y se incubarán durante sesenta minutos a una temperatura de 15 Grad. C:

a) Anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de SHV (virus Egtved) 1:50.

b) Anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (virus NPI) 1:50.

c) Antisuero divalente específico anti-virus de la necrosis pancreática infecciosa (virus de NPI) (cepas de referencia Sp y Ab) 1:50.

d) Medio 1:1.

o del modo indicado por el laboratorio de referencia en lo que respecta a la posible citotoxicidad de los antisueros.

De cada mezcla de suero y virus, se inocularán al menos dos cultivos celulares con 50 ul cada uno, y se incubarán a 15 Grad. C. Se comprobará la aparición de ECP, según se indica en el apartado A.III.4.

Si la prueba no ha permitido identificar con certeza el virus en el plazo de una semana, deberá adoptarse una de las siguientes medidas:

a) Trasladar el virus a un laboratorio nacional de referencia para virus de peces para su identificación inmediata.

b) Aplicar la prueba de adsorción por inmunofluorescencia (IFAT) (apartado A.IV.2), la prueba ELISA (apartado A.IV.3) u otras técnicas de identificación de virus, utilizando reactivos de calidad de referencia.

A.IV.2 Inmunofluorescencia (IFAT).

Para cada aislado vírico que se desee identificar, se sembrarán con células EPC al menos ocho cubres o sus equivalentes a una densidad que permita alcanzar una confluencia del 60 a 90 por 100, aproximadamente, después de veinticuatro horas de cultivo. Se preferirán las células EPC por su fuerte adherencia a las superficies de cristal.

Cuando las células hayan sedimentado en la superficie de cristal (aproximadamente una hora después de la siembra), o cuando los cultivos hayan sido incubados durante un máximo de veinticuatro horas, se inoculará el virus que se desee identificar. Se inocularán cuatro cultivos en la proporción de 1:10 en volumen y otros cuatro en la proporción de 1:100.

Cuando hayan transcurrido entre veinte y treinta horas después de la inoculación, los cultivos se aclararán dos veces en medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle sin suero, se fijarán con acetona y se teñirán con ayuda de la inmunofluorescencia de doble capa. La primera capa de reactivo está formada por un antisuero aprobado (como se indica en el apartado IV.1). La segunda capa de reactivo está formada por un antisuero conjugado con isotiocianato de fluoresceína con afinidad por la inmunoglobulina utilizada en la primera capa. Para cada uno de los antisueros analizados se efectuará como mínimo la tinción de un cultivo inoculado con una dosis elevada y de otro inoculado con una dosis baja. La prueba incluirá controles positivos y negativos apropiados.

Los cultivos teñidos se prepararán utilizando solución salina de gliceros y se examinarán con luz ultravioleta incidente, utilizando oculares de 10 x o 12 x y objetivos de 25 x o 40 x con aperturas numéricas >0,7 y >1,3, respectivamente. Las diluciones del antisuero inicial y de inmunoglobulina conjugada con isotiocianato de fluoresceína dependerán de la disposición del microscopio elegido o disponible.

Algunas cepas del virus Egtved presentan una fuerte reacción con el antisuero anticepa de referencia F1 en la prueba de inmunofluorescencia, aunque no presenten reacción alguna en las pruebas de neutralización.

A.IV.3 Ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA).

Los pocillos de las placas de microtitulación (por ejemplo, inmunoplasacas-Nunc, Maxisorp, Nunc, Dinamarca) se recubrirán durante una noche con las diluciones recomendadas de fracciones inmunoglobulínicas purificadas de proteína A de los antisueros mencionados en el apartado A.IV.1.

Tras aclarar los pocillos con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se incorporará a los pocillos el virus que se desee identificar en fases de dilución dobles o cuádruples y se dejará reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento durante sesenta minutos a 37 Grad. C. Tras el aclarado con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se añadirán anticuerpos con biotín de la especificidad correspondiente a la de los anticuerpos de recubrimiento y se dejará reaccionar durante sesenta minutos a 20 Grad. C. Después de efectuar otro aclarado con el anterior, se añadirá estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y se dejará

reaccionar durante una hora a 20 Grad. C. Tras efectuar un último aclarado, se visualizará la enzima ligada utilizando sustratos ELISA adecuados (OPD, TMB u otros). Esta versión de ELISA basada en el empleo de biotina y avidina se ofrece a modo de ejemplo. En su lugar podrán utilizarse otras versiones de eficacia probada.

#### B. Aislamiento e identificación serológica simultánea del virus

##### B.I.1 Selección de muestras.

Procédase del modo indicado en el apartado A.I.1.

##### B.I.2 Preparación y envío de muestras de peces.

Procédase del modo indicado en el apartado A.I.2.

##### B.II.1 Homogeneización de los órganos.

Procédase del modo indicado en el apartado A.II.1.

##### B.II.2 Centrifugación del homogeneizado.

Procédase del modo indicado en el apartado A.II.2.

##### B.II.3 Tratamiento del sobrenadante con antisueros para diagnóstico.

La suspensión del órgano tratada con antibióticos y antisuero antiviral de NPI se diluirá a 1:10 y 1:10.000 en un medio de cultivo celular; las alícuotas se mezclarán a partes iguales con los reactivos enumerados en el apartado A.IV.1 y se incubarán durante sesenta minutos a 15 Grad. C.

##### B.III.1 Cultivos y medio celulares.

Procédase del modo indicado en el apartado A.III.1.

##### B.III.2 Inoculación de los cultivos celulares.

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

##### B.III.3 Inoculación de los cultivos celulares.

Procédase del modo indicado en el apartado A.III.3.

##### B.III.4 Microscopia.

Se observarán diariamente a unos 40 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si se ha logrado evitar la aparición de ECP gracias a alguno de los antisueros utilizados, el virus podrá considerarse identificado. En caso contrario, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus de conformidad con el apartado A.IV.

##### B.III.5 Subcultivos.

Si no se han observado ECP después de siete días, se realizarán subcultivos a partir de los cultivos inoculados con sobrenadante y medio (B.II.3). C. Técnicas rápidas de diagnóstico (IFAT, ELISA)

Las técnicas IFAT o ELISA descritas en los apartados A.IV.2 y A.IV.3, respectivamente, se aplicarán al sobrenadante, que se habrá preparado del modo indicado en el apartado A.II.2.

Estas técnicas rápidas se completarán con un examen virológico con arreglo a los apartados A o B antes de que hayan transcurrido cuarenta y ocho horas desde la toma de la muestra, si

a) Se obtuviese una reacción negativa, o

b) Se obtuviese una reacción positiva con material que constituya el primer caso de NHI o SHV en una zona autorizada.