

REAL DECRETO 138/1997, DE 31 DE ENERO, POR EL QUE SE MODIFICA PARTE DE
LOS ANEXOS DEL REAL DECRETO 1488/1994, DE 1 DE JULIO, POR EL QUE SE
ESTABLECEN MEDIDAS MINIMAS DE LUCHA CONTRA DETERMINADAS
ENFERMEDADES DE LOS PECES.

El Real Decreto 1488/1994, de 1 de julio, por el que se establecen medidas mínimas de lucha contra determinadas enfermedades de los peces, transpone al ordenamiento jurídico interno la Directiva 93/53/CEE, del Consejo, e incorpora en su anexo F la Decisión 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.

Después de la adopción de la citada Decisión, se han producido nuevos avances prácticos y científicos que requieren una actualización de los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico. Dicha actualización afecta al tamaño de las muestras, las muestras que han de tomarse, el transporte de las mismas y el método de aislamiento de los virus que puedan presentarse en ellas.

Teniendo en cuenta la necesidad de proceder a realizar la citada actualización, se adoptó la Decisión 96/240/CE, de la Comisión, de 5 de febrero, que modifica la Decisión 92/532/CEE, por la que se establecen los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de determinadas enfermedades de los peces, habiendo consultado para ello al Comité científico veterinario y ajustándose al dictamen del Comité veterinario permanente. Por ello, la presente disposición se dicta para modificar el anexo F del Real Decreto 1488/1994, de 1 de julio, en el que se recogía lo dispuesto en la Decisión 92/532/CEE, modificada por la Decisión 96/240/CE.

El presente Real Decreto se dicta de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 149.1.16.^a de la Constitución, por el que se atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación general de la sanidad.

En su virtud, a propuesta de la Ministra de Agricultura, Pesca y Alimentación, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 31 de enero de 1997,

D I S P O N G O :

Artículo único.

El anexo F del Real Decreto 1488/1994, de 1 de julio, por el que se establecen las medidas mínimas de lucha contra determinadas enfermedades de los peces, se sustituirá por el anexo del presente Real Decreto.

Disposición adicional única.

La disposición final primera del Real Decreto 1488/1994, de 1 de julio, se sustituye por la siguiente:

«Disposición final primera.

Se faculta a la Ministra de Agricultura, Pesca y Alimentación para dictar, en el ámbito de sus competencias, las disposiciones necesarias para el desarrollo del presente Real Decreto y, en particular, para efectuar las adaptaciones de los anexos a las modificaciones que introduzca la normativa comunitaria.»

Disposición final única.

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

Dado en Madrid a 31 de enero de 1997.

JUAN CARLOS R.

La Ministra de Agricultura, Pesca
y Alimentación,

LOYOLA DE PALACIO DEL VALLE-LERSUNDI

ANEXO

PRIMERA PARTE

Procedimientos de muestreo y de análisis
para el control de la SHV y la 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 °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. 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 de la Directiva 91/67/CEE, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura. Las especies estarán representadas en la muestra proporcionalmente. Durante los dos primeros años del período inicial de control de cuatro años previo a la obtención de la autorización, la muestra deberá 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, excepto en las explotaciones de salmónidos sin reproductores en zonas costeras, donde la muestra se compondrá de 30 ejemplares.

Durante los últimos dos años del período de control, 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. En años posteriores (mantenimiento de la autorización), el tamaño de la muestra puede reducirse asimismo a 30.

Tratándose de explotaciones que pueden probar documentalmente que han estado libres durante al menos cuatro años de SHV y de NHI (gracias a la aplicación regular de un programa oficial de inspección sanitaria), la muestra reducida también podrá utilizarse durante todo el período de control inicial de cuatro años.

Si se emplea más de una fuente de agua para la producción de peces, la muestra compuesta de 150 ó 30 ejemplares deberá 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 proporcionalmente todas las partes de 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, a 200 lg de estreptomycinina y 200 lg 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 y/o bien el corazón o el encéfalo. En algunas ocasiones, deberá examinarse fluido ovárico (cuadro I).

En fluido ovárico o las partes de órganos de 10 peces podrán ser recogidos en un solo tubo de plástico de 10 ml que contenga 4 ml de medio de transporte y constituir una muestra conjunta. El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 0,5 g como mínimo.

Los tubos se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo, cajas de poliestireno de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo o de «bloques congelados» para garantizar la refrigeración de las muestras a una temperatura comprendida entre 0 y 5 °C durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación. La temperatura de las muestras durante el transporte nunca deberá exceder de 10 °C y en el momento de la recepción todavía deberá haber hielo en el recipiente de transporte.

El examen virológico deberá iniciarse lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido cuarenta y ocho horas desde la recogida de las muestras o, en casos excepcionales, nunca después de que hayan transcurrido setenta y dos desde el momento en

que el material esté protegido por el medio de transporte y puedan cumplirse los requisitos de temperatura durante el transporte (véase el párrafo tercero).

Si pueden cumplirse los requisitos de temperatura durante el transporte, podrán enviarse peces enteros al laboratorio. Los peces enteros podrán ser envueltos en papel absorbente y deberán enviarse en bolsas de plástico refrigeradas según se indica. También podrán enviarse peces vivos.

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

viroológico

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

2. Centrifugación del homogeneizado.-El homogeneizado se centrifugará a una aceleración de entre 2000 y 4000 x g durante quince minutos, en una centrifugadora refrigerada a una temperatura comprendida entre 2 y 5 °C, y el sobrenadante se recogerá para su examen y se tratará durante cuatro horas a 15 °C o durante toda la noche a 4 °C con antibióticos. En esa etapa podrá ser útil la gentamicina 1 mg/ml.

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

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

Si el sobrenadante recogido se almacena a -80 °C en las cuarenta y ocho horas siguientes a la toma de muestras, podrá ser descongelado y reutilizado una vez para el examen virológico.

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

Antes de la inoculación de las células, el sobrenadante se mezclará a partes iguales con un conjunto de antiseros de los serotipos autóctonos anti-virus de NPI diluido en la proporción adecuada, y se incubará conjuntamente durante una hora como mínimo a una temperatura de 15 °C y dieciocho horas como máximo a una temperatura de 4 °C. El título del antisuero deberá ser como mínimo 1:2000 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 bien células BF-2 o RTG-2 y células EPC o FHM a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C en un medio adecuado, por ejemplo, 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, es recomendable amortiguar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas podrá amortiguarse con Tris-HCl (23 mM) y bicarbonato sódico (6 mM). El pH deberá ser lo más próximo posible a 7,6.

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 1:10 de la misma, que darán lugar a diluciones finales de tejidos en el medio de cultivo celular de 1:100 y 1:1000, respectivamente (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 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 entre siete y diez días a una temperatura de 15 °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 viral.

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. Microscopía.-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.

5. Subcultivos.-Si después de la incubación inicial de siete o diez 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 (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos pertenecientes al cultivo inicial por líneas celulares siete o diez días después de la inoculación. El resultado se inoculará en cultivos celulares homólogos sin diluir y en una dilución de 1:10 (que darán lugar a diluciones de 1:10 y 1:100, respectivamente, del sobrenadante) como se describe en el apartado 2. La inoculación podrá ir precedida de la preincubación de las diluciones con el antisero anti-NPI con una dilución adecuada como se describe en el apartado I.II.2.

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

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

IV. Identificación del virus

1. Pruebas de identificación del virus.-Si se observare la existencia de ECP en un cultivo celular, se recogerá medio (sobrenadante) y se someterá a una o varias de las pruebas siguientes: neutralización, inmunofluorescencia (IF) o prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

Si las pruebas no permiten identificar el virus con seguridad en una semana, el virus deberá ser trasladado a un laboratorio nacional de referencia para las enfermedades de los peces o al laboratorio comunitario de referencia para las enfermedades de los peces para su inmediata identificación.

El uso de inmunorreactivos para la identificación del virus requerirá la aprobación, con respecto al título y a la especificidad, del laboratorio nacional de referencia para las enfermedades de los peces, y los inmunorreactivos deberán ser de calidad de referencia.

2. Neutralización.-Se eliminarán las células del medio recogido mediante centrifugación (20004000 x g) o por filtración con filtros de membrana (0,45 lm) y se diluirá el medio a 1:100 y 1:10000 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 °C:

- anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la SHV (virus Egtved) 1:50 (1),
- anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (virus de NHI) 1:50 (1),
- conjunto de antisueros de los serotipos autóctonos anti-virus de la necrosis pancreática infecciosa (virus de NPI) (cepas de referencia Sp, Ab o VR 299) 1:50 (1),
- medio 1:1.

De cada mezcla de suero y virus, se inocularán al menos dos cultivos celulares con 50 ll cada uno, y se incubarán a 15 °C.

Podrán usarse alternativamente otras pruebas de neutralización de probada eficacia.

3. Inmunofluorescencia (IF).-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 consistirá en anticuerpos policlonales o monoclonales de calidad de referencia. 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 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 T 0,7 y T 1,3 respectivamente.

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

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

4. Prueba de inmunoabsorción enzimática (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 anticuerpos de calidad de referencia.

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

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

(1) O del modo indicado por el laboratorio de referencia en lo que respecta a la posible citotoxicidad de los antisueros.

CUADRO 1 A

Obtención de la autorización

Número

de inspecciones

clínicas anuales:

años 1 y 2 / Peces en crecimiento:

número de peces utilizados

para el análisis

de órganos: años 1 y 2 / Reproductores: Número

de peces utilizados

para el análisis de fluido

ovárico: años 1 y 2

Zonas continentales:

a) Explotaciones con reproductores / 2 / 120 (1.^a inspección) (*) / 30 (1.^a inspección)

150 (2.^a inspección) / 150

b) Explotaciones con reproductores únicamente / 2 / 120 / 150 (1.^a ó 2.^a inspección)

c) Explotaciones sin reproductores / 2 / 150 (1.^a y 2.^a inspección) / 150

Zonas costeras:

a) Explotaciones de salmónidos sin reproductores. / 2 / 130 (1.^a y 2.^a inspección) / 150

b) Explotaciones de no salmónidos sin reproductores. / 2 / 150 (1.^a y 2.^a inspección) / 150

c) Explotaciones con reproductores / 2 / 120 (1.^a inspección) / 530 (1.^a inspección)

150 (2.^a inspección) / 150

Número

de inspecciones

clínicas anuales:

años 3 y 4 / Número de peces utilizados

para el análisis de órganos:

años 3 y 4 / Reproductores: Número

de peces utilizados

para el análisis de fluido

ovárico: años 3 y 4

Zonas continentales:

a) Explotaciones con reproductores / 2 / 120 (1.^a ó 2.^a inspección) / 10 (1.^a ó 2.^a inspección)

b) Explotaciones con reproductores únicamente / 2 / 120 / 30 (1.^a ó 2.^a inspección)

c) Explotaciones sin reproductores / 2 / 130 (1.^a ó 2.^a inspección) / 150

Zonas costeras:

a) Explotaciones sin reproductores / 2 / 130 (1.^a ó 2.^a inspección) / 150

b) Explotaciones con reproductores / 2 / 120 (1.^a ó 2.^a inspección) / 510 (1.^a ó 2.^a inspección)

Número máximo de peces por muestra conjunta: 10.

(*) Inspecciones clínicas.

CUADRO 1 B

Mantenimiento de la autorización

Peces en crecimiento:

número de peces utilizados

para el análisis

de órganos (1) / Número

de inspecciones

clínicas anuales / Reproductores: Número

de peces utilizados

para el análisis de fluido

ovárico (1)

Zonas continentales:

a) Explotaciones con reproductores / 2 / 20 (1.^a ó 2.^a inspección) / 10 (1.^a ó 2.^a inspección) (2)

b) Explotaciones con reproductores únicamente / 2 / 20 / 30 (1.^a ó 2.^a inspección) (2)

c) Explotaciones sin reproductores / 2 / 30 (1.^a y 2.^a inspección) / 50

Zonas costeras:

a) Explotaciones sin reproductores / 1 / 30 (3) / 50

b) Explotaciones con reproductores / 2 / 20 (1.^a ó 2.^a inspección) / 10 (1.^a ó 2.^a inspección) (2)

Número máximo de peces por muestra conjunta: 10.

(1) Las muestras sólo deberán ser recogidas rotativamente en un 50 por 100 cada año de las explotaciones piscícolas de la zona.

(2) En circunstancias excepcionales, si es imposible obtener fluido ovárico, se deberá tomar muestras de los órganos.

(3) Las muestras deberán haberse recogido a más tardar tres semanas después de haber trasladado los peces de agua dulce a agua salada.

SEGUNDA PARTE

Procedimientos de diagnóstico para la confirmación de la NHI y de la 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. Otras técnicas 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 el método 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.

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

II.A.I.1 Selección de muestras.-Para el análisis se seleccionarán como mínimo 10 peces que muestren los síntomas típicos de la NHI o de la SHV.

II.A.I.2 Preparación y envío de muestras de peces.-Procédase del modo indicado en el apartado I.I.3.

II.A.I.3 Recogida de material suplementario para diagnóstico.-Procédase del modo indicado en el apartado I.I.4.

II.A.II Preparación de las muestras para el examen virológico.-Procédase del modo indicado en el apartado I.II.

II.A.III Examen virológico.-Procédase del modo indicado en el apartado I.III, salvo que podrán usarse bien células BF-2 o RTG-2 y células EPC o FHM para la inoculación con tejidos.

II.A.IV Identificación del virus.-Procédase del modo indicado en el apartado I.I.IV.

II.B Aislamiento e identificación serológica simultánea del virus

II.B.I.1 Selección de muestras.-Procédase del modo indicado en el apartado II.A.I.1.

II.B.I.2 Preparación y envío de muestras de peces.-Procédase del modo indicado en el apartado I.I.3.

II.B.I.3 Recogida de material suplementario para diagnóstico.-Procédase del modo indicado en el apartado I.I.4.

II.B.II.1 Homogeneización de los órganos.-Procédase del modo indicado en el apartado I.II.1.

II.B.II.2 Centrifugación del homogeneizado.-Procédase del modo indicado en el apartado I.II.2.

II.B.II.3 Tratamiento del sobrenadante con antiseros para diagnóstico.-La suspensión del órgano tratada con antibióticos y antisuero anti-virus de NPI se diluirá a 1:10 y 1:10000 en un medio de cultivo celular, las alícuotas se mezclarán a partes iguales con los reactivos enumerados en el apartado I.IV.2 y se incubarán durante sesenta minutos a 15 °C.

II.B.III.1 Cultivos y medios celulares.-Se cultivarán las células BF-2 o RTG-2 y EPC o FHM a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C en un medio adecuado, por ejemplo, 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, es recomendable amortiguar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas podrá amortiguarse con Tris-HCl (23 mM) y bicarbonato sódico (6 mM). El pH deberá ser lo más próximo posible a 7,6.

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.

II.B.III.2 Inoculación de los cultivos celulares.-De cada mezcla de suero y virus (preparada del modo indicado en el apartado II.B.II.3), se inocularán al menos dos cultivos celulares por línea celular con 50 μ l cada uno.

II.B.III.3 Inoculación de los cultivos celulares.-Procédase del modo indicado en el apartado I.III.3.

II.B.III.4 Microscopía.-Se observarán diariamente a unos 40 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han reproducido ECP. Si se han logrado evitar la aparición de ECP gracias a alguno de los antisueños utilizados, el virus podrá considerarse identificado. En caso contrario, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus de conformidad con el apartado I.IV.

II.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 (II.B.II.3) con arreglo al apartado I.III.5.

II.C Otras técnicas de diagnóstico

Las técnicas IFAT o ELISA descritas en los apartados II.A.IV.3 y II.A.IV.4, respectivamente, se aplicarán al sobrenadante, que se habrá preparado del modo indicado en el apartado II.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.

Los tejidos podrán ser sometidos a otras técnicas de diagnóstico como IF realizada con cortes congelados o inmunohistoquímica realizada con material fijado con formol. Estas técnicas deberán completarse siempre con la inoculación en cultivos celulares de tejidos no fijados.

ABREVIATURAS

BF-2

= / fibroblasto de «Leponis macrochirus» (línea celular).

ECP

= / efectos citopatogénicos.

ELISA

= / prueba de inmunoabsorción enzimática.

EPC

= / «Epithelioma papulosum cyprini» (línea celular).

FHM

= / «Pimephales promelas» (línea celular).

FITC

= / isotiocianato de fluoresceína.

HRP

= / peroxidasa de rábano.

IF

= / inmunofluorescencia.

IFAT

= / prueba de fluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos.

MEM

= / medio mínimo fundamental.

NHI

= / necrosis hematopoyética infecciosa.

NPI

= / necrosis pancreática infecciosa.

OPD

= / orto-fenilendiamina.

PBS

= / solución salina amortiguadora fosfatada.

RTG-2

= / gónadas de trucha arco iris (línea celular).

SHV

= / septicemia hemorrágica viral.

Tris HCl

= / Tris (hidroximetil) aminometano-HCl.