საქართველოს მთავრობის

დადგენილება №636

2016 წლის 30 დეკემბერი

ქ. თბილისი

ტექნიკური რეგლამენტის – თევზის ვირუსული ჰემორაგიული სეპტიცემიისა (VHS) და სისხლმბადი ქსოვილის ინფექციური ნეკროზის (IHN) გამოვლენისა და დადასტურებისთვის ნიმუშის აღების გეგმებისა და დიაგნოსტიკის მეთოდების დამტკიცების შესახებ

მუხლი 1

პროდუქტის უსაფრთხოებისა და თავისუფალი მიმოქცევის კოდექსის 56-ე მუხლის პირველი ნაწილის, 58-ე მუხლის მე-2 ნაწილისა და სურსათის/ცხოველის საკვების უვნებლობის, ვეტერინარიისა და მცენარეთა დაცვის კოდექსის 75-ე მუხლის მე-2 ნაწილის საფუძველზე, დამტკიცდეს თანდართული ტექნიკური რეგლამენტი – „თევზის ვირუსული ჰემორაგიული სეპტიცემიისა (VHS) და სისხლმბადი ქსოვილის ინფექციური ნეკროზის (IHN) გამოვლენისა და დადასტურებისთვის ნიმუშის აღების გეგმები და დიაგნოსტიკის მეთოდები“.

მუხლი 2

დადგენილება ამოქმედდეს 2018 წლის 1 იანვრიდან.

პრემიერ-მინისტრი **გიორგი კვირიკაშვილი**

ტექნიკური რეგლამენტი – თევზის ვირუსული ჰემორაგიული სეპტიცემიის (VHS) და სისხლმბადი ქსოვილის ინფექციური ნეკროზის (IHN) გამოვლენისა და დადასტურებისთვის ნიმუშის აღების გეგმები და დიაგნოსტიკის მეთოდები

თავი I
ზოგადი დებულებები

მუხლი1. მიზანი და რეგულირების სფერო

1. ტექნიკური რეგლამენტის – თევზის ვირუსული ჰემორაგიული სეპტიცემიის (VHS) და სისხლმბადი ქსოვილის ინფექციური ნეკროზის (IHN) გამოვლენისა და დადასტურებისთვის ნიმუშის აღების გეგმები და დიაგნოსტიკის მეთოდების დამტკიცების შესახებ (შემდგომში – ტექნიკური რეგლამენტი) ადგენს:

ა) თევზის ვირუსული ჰემორაგიული სეპტიცემიის (შემდგომში – VHS) და სისხლმბადი ქსოვილის ინფექციური ნეკროზის (შემდგომში – IHN) გამოვლენისა და დადასტურებისთვის ნიმუშის აღების გეგმებისა და დიაგნოსტიკის მეთოდების შესახებ მითითებებსა და მინიმალურ მოთხოვნებს;

ბ) ზონის სტატუსისა და აუღიარებელი ზონის ფერმის აღიარებისა და ამ აღიარების შენარჩუნების მოთხოვნებს;

გ) VHS-სა და IHN-ს სათანადო დიაგნოსტიკას, ზონისა და აუღიარებელი ზონის ფერმის სტატუსის მინიჭებასთან (მიჩნევასთან) დაკავშირებულ მოთხოვნებს.

2. ეს ტექნიკური რეგლამენტი განკუთვნილია VHS-ისა და IHN-ის კონტროლზე პასუხისმგებელი უწყებისათვის – საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს სახელმწიფო კონტროლს დაქვემდებარებული საჯარო სამართლის იურიდიული პირი - სურსათის ეროვნული სააგენტოს (შემდგომში – სააგენტო) და VHS-ისა და IHN-ის დიაგნოსტიკაზე მომუშავე ლაბორატორიისათვის.

3. საჭიროების შემთხვევაში, ლაბორატორიას შეუძლია შეიტანოს შესწორებები ამ ტექნიკურ

რეგლამენტში აღწერილ ტესტებში ან გამოიყენოს სხვა ტესტები, იმ პირობით, რომ დაცული იქნება თანაბარი მგრძნობელობა და სპეციფიურობა.

მუხლი 2. ტერმინთა განმარტებები

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მიზნებისთვის მასში გამოყენებულ ტერმინებს აქვს შემდეგი მნიშვნელობა:

ა) BF-2 – bluegill fry-2 (უჯრედის ხაზი);

ბ) CPE – ციტოპათოგენური ეფექტი;

გ) ELISA – ენზიმ შემაკავშირებელი იმუნო-ფერმენტული ანალიზი;

დ) EPC – Epithelioma papulosum cyprini (უჯრედის ხაზი);

ე) FHM – Fathead minnow (უჯრედის ხაზი);

ვ) FITC – ფლუორესცენტული იზოთიოციანატი;

ზ) Hepes N-2 – ჰიდროქსიეთილიპიპერაზინ -N-2-თან სულფონმჟავა;

თ) HRP – პირშუშხას პეროქსიდაზა;

ი) IF – იმუნოფლუორესცენცია;

კ) IFAT – არაპირდაპირი ფლუორესცენტული ანტისხეულების ტესტი;

ლ) IHNV – სისხლმბადი ქსოვილის ინფექციური ნეკროზის გამომწვევი ვირუსი;

მ) IPNV – პანკრეასის ინფექციური ნეკროზის გამომწვევი ვირუსი;

ნ) MEM – მინიმალური აუცილებელი საკვები არე;

ო) MOI – მრავლობითი ინფექცია (თანაფარდობა დამატებული ვირუსული ნაწილაკების რაოდენობასა და უჯრედულ კულტურაში უჯრედების რაოდენობას შორის);

პ) OPD – ორთო-ფენილენდიამინი;

ჟ) PBS – ფოსფატბუფერული ხსნარი;

რ) RTG 2 – Rainbow trout gonad (უჯრედის ხაზი);

ს) RT-PCR – რევერსული ტრანსკრიპტაზას პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია;

ტ) Tris-HCl – ტრის(ჰიდროქსიმეთილ) ამინომეთან მარილმჟავა (ტრიზოლი);

უ) TRITC – ტეტრამეთილროდამინ-იზოთიოციანატი;

ფ) VHSV – ვირუსული ჰემორაგიული სეპტიცემიის გამომწვევი ვირუსი;

ქ) IHN – სისხლმბადი ქსოვილის ინფექციური ნეკროზი;

ღ) ზონის ან აუღიარებელი ზონის ფერმის VHS-ზე ან/და IHN-ზე აღიარებული სტატუსი – სტატუსი, რომელიც ენიჭება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3 მუხლის მე-2 პუნქტით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

2. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მიზნებისათვის ასევე გამოიყენება ,,სურსათის/ცხოველის საკვების

უვნებლობის, ვეტერინარიისა და მცენარეთა დაცვის კოდექსით“ განსაზღვრული ტერმინები, თუ ამ ტექნიკური რეგლამენტით სხვაგვარად არ არის დადგენილი.

თავი II

ნიმუშის აღების გეგმები და დიაგნოსტიკის მეთოდები VHS-ისა და IHN-ის ზედამხედველობისთვის ზონისა და აუღიარებელი ზონის ფერმის აღიარებისა და ამ აღიარების შენარჩუნებისათვის

მუხლი 3. შემოწმება და ნიმუშის აღება

1. ზოგადი მოთხოვნებია:

ა) ზონაში ან აუღიარებელი ზონის ფერმაში, თევზის ქსოვილის და/ან საკვერცხის სითხის კლინიკური შემოწმებისა და ნიმუშის აღების განხორციელება VHS-ს ან/და IHN-თან დაკავშირებით სტატუსის მიღების ან შენარჩუნების მიზნით დანართის N1 „VHS-სა ან/და IHN-ზე აღიარებული სტატუსის მიღწევისათვის ზონისა და აუღიარებილი ზონის ფერმაში ორწლიანი კონტროლის - შემოწმებისა და ნიმუშის აღების – სქემა“, დანართის N2 „VHS-სა ან/და IHN-ს აღიარებული სტატუსის მიღწევისათვის შემოწმების და ნიმუშის აღების სქემა ორწლიანი კონტროლის პერიოდის განმავლობაში, რომელიც წინ უსწრებს ამ დაავადებების არარსებობის შესახებ ოფიციალურად დოკუმენტირებული ისტორიის მქონე ზონებსა და აუღიარებელი ზონის ფერმებში“ და დანართის N3 „VHS-სა ან/და IHN-ს აღიარებული სტატუსის შენარჩუნების მიზნით შემოწმების და ნიმუშის აღების სქემა ზონისთვის და აუღიარებელი ზონის ფერმისთვის“ შესაბამისად. დანართით N1 და დანართით N2 დადგენილი მოთხოვნები არ ვრცელდება ახალ ფერმასა და ფერმაზე, რომლებიც იწყებს საქმიანობას თევზით, ქვირითით და გამეტებით აღიარებული ზონიდან ან აუღიარებელი ზონის აღიარებული ფერმიდან, იმ პირობით, რომ ისინი შეესაბამება საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილ სხვა მოთხოვნებს;

ბ) კლინიკური შემოწმების განხორციელება ოქტომბრიდან ივნისამდე, ან როცა წყლის ტემპერატურა 14^0C-ზე ნაკლებია. ფერმის წელიწადში ორჯერ კლინიკურად შემოწმებისას, შემოწმებებს შორის ინტერვალი უნდა იქნეს არანაკლებ ოთხი თვე. ყველა საწარმოო ერთეული (წყალსატევები, ავზები, ბადისებრი გალიები და ა.შ.) უნდა შემოწმდეს მკვდარი, სუსტი ან ანომალური ქცევის თევზის გამოსავლენად. განსაკუთრებული ყურადღება უნდა მიექცეს წყალსაგდების (გამშვების) ტერიტორიას, სადაც გროვდება სუსტი თევზი წყლის დინების გამო;

გ) ნიმუშის ასაღებად თევზის შერჩევა შემდეგი წესების დაცვით:

გ.ა) ცისარტყელა კალმახის არსებობისას, მხოლოდ ამ სახეობის თევზი უნდა შეირჩეს ნიმუშის აღებისათვის. ცისარტყელა კალმახის არარსებობისას, ნიმუში უნდა იქნეს აღებული ყველა სხვა სახეობის თევზისგან, როდესაც ეს სახეობები მგრძნობიარეა VHSV-ის ან/და IHNV-ის მიმართ. ნიმუშში სახეობები წარმოდგენილი უნდა იქნეს პროპორციულად;

გ.ბ) თუ თევზის საწარმოებლად გამოყენებულია ერთზე მეტი წყლის წყარო, თევზის ნიმუში აიღება იმ ადგილიდან, სადაც თავს იყრის ყველა წყლის წყარო;

გ.გ) პირველ რიგში უნდა შეირჩეს დასუსტებული, ანომალური ქცევის ან ახლად მკვდარი (გაუხრწნელი) თევზი, ასეთის არსებობისას. ასეთი თევზის არარსებობისას, ნიმუში აღებულ უნდა იქნეს ჩვეულებრივი, ჯანმრთელი თევზიდან, რომელიც შეგროვებულია პროპორციულად ფერმის ყველა ნაწილიდან და ყველა ასაკობრივი ჯგუფიდან.

2. სპეციფიკური მოთხოვნებია:

ა) ზონისთვის ან აუღიარებელი ზონის ფერმისთვის, რომელიც ექვემდებარება სახელმწიფო კონტროლს (ზედამხედველობას),VHS-ზე ან/და IHN-ზე აღიარებული სტატუსის მინიჭება, შეიძლება მიენიჭოს შემდეგ შემთხვევებში:

ა. ა) მოდელი A - ორწლიანი საზედამხედველო პროგრამა -VHS-ის ან/და IHN-ის ნებისმიერი კლინიკური ან სხვა ნიშნის არანაკლებ ორი წლის განმავლობაში არარსებობის შემთხვევაში, ყველა

ფერმა ზონაში ან ნებისმიერი ფერმა აუღიარებელ ზონაში, რომელიც ექვემდებარება აღიარებას, უნდა იქნეს შემოწმებული ჯანმრთელობაზე წელიწადში ორჯერ ორი წლის განმავლობაში. ამ ორწლიანი კონტროლის პერიოდში, რომელიც წინ უსწრებს აღიარების სტატუსის მოპოვებას, VHS-ის ან/და IHN-ის კლინიკური ან სხვა ნიშნები არ უნდა გამოვლინდეს და ნიმუშები უნდა შეგროვდეს შესამოწმებლად დანართის N1 შესაბამისად. გარდა ამისა, ნიმუშები შერჩეული უნდა იქნეს, მომზადდეს და შემოწმდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3-მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად და ლაბორატორიულმა გამოკვლევებმა უნდა უჩვენოს VHS-ზე ან/და IHN-ზე უარყოფითი შედეგები;

ა.ბ) მოდელი B – ორწლიანი საზედამხედველო პროგრამა შემცირებული რაოდენობის ნიმუშებით – ჯანმრთელობის შემოწმების პროგრამის განხორციელების შემდეგ, რომელშიც დოკუმენტურად არის ასახული VHS-ის ან/და IHN-ის არარსებობა არანაკლებ ოთხი წლის განმავლობაში, ყველა ფერმა ზონაში ან ნებისმიერი ფერმა აუღიარებელ ზონაში, რომელიც უნდა იქნეს აღიარებული, ექვემდებარება შემოწმებას ჯანმრთელობაზე წელიწადში ორჯერ ორი წლის განმავლობაში. ამ ორწლიანი კონტროლის პერიოდში, რომელიც წინ უსწრებს აღიარების სტატუსის მოპოვებას, VHS-ის ან/და IHN-ის კლინიკური ან სხვა ნიშნები არ უნდა გამოვლინდეს და ნიმუშები უნდა შეგროვდეს შესამოწმებლად დანართის N2 შესაბამისად. გარდა ამისა, ნიმუშები შეირჩევა, მზადდება და მოწმდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3-მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად და ლაბორატორიულმა გამოკვლევებმა უნდა უჩვენოს VHS-ზე ან/და IHN-ზე უარყოფითი შედეგები; იმისათვის, რომ ჯანმრთელობის შემოწმების პროგრამის ფარგლებში სააგენტოს მიერ მიჩნეული იქნეს VHS-ისა ან/და IHN-ის არარსებობა, ის უნდა აკმაყოფილებდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 24-ე მუხლით დადგენილ კრიტერიუმებსა და სახელმძღვანელო პრინციპებს.

მუხლი 4. სპეციფიკური მოთხოვნები ახალი ფერმისა და იმ ფერმების აღიარებისათვის, რომლებიც იწყებენ თავიანთ საქმიანობას თევზით, ქვირითით და გამეტით აღიარებული ზონიდან ან აუღიარებელი ზონის აღიარებული ფერმიდან

ახალ ფერმას და ფერმას, რომლებიც იწყებენ თავიანთ საქმიანობას თევზით, ქვირითით და გამეტით აღიარებული ზონიდან ან აუღიარებელი ზონის აღიარებული ფერმიდან, შეუძლიათ მიიღონ სტატუსი საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად. ამ ფერმების მიმართ არ უნდა იქნეს გამოყენებული ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3 მუხლის მე-2 პუნქტით დადგენილი ნიმუშის აღებასთან დაკავშირებული მოთხოვნები.

მუხლი 5. ზედამხედველობის პროგრამა VHS-ს ან/და IHN-ს აღიარების სტატუსის შენარჩუნებისთვის

VHS-სთან ან/და IHN-სთან დაკავშირებით ზონის ან აუღიარებელი ზონის ფერმის აღიარების სტატუსის შენარჩუნების მიზნით, უნდა ჩატარდეს შემოწმებები და ნიმუშის აღება დანართი N3-ის შესაბამისად. ნიმუშები უნდა შეირჩეს, მომზადდეს და შემოწმდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3-მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად და ლაბორატორიული გამოკვლევები უნდა იქნეს უარყოფითი VHS-ის ან/და IHN-ის გამომწვევზე.

მუხლი 6. თევზისგან ნიმუშის მომზადება და გადაგზავნა

1. ლაბორატორიაში ნიმუშის გადაგზავნამდე, საჭიროა თევზიდან გამოსაკვლევი ორგანოების ამოკვეთა სტერილური გასაკვეთი იარაღების გამოყენებით და მოთავსება სატრანსპორტო ნიადაგის (უჯრედოვანი კულტურის საკვები არე 10% ხბოს შრატითა და ანტიბიოტიკებით) შემცველ სტერილურ პოლიეთილენის სინჯარაში. რეკომენდებულია 200 iu (ერლიხის ერთეული) პენიცილინის, 200 მკგ სტრეპტომიცინის და 200 მკგ კანამიცინის კომბინირება მილილიტრში (მლ). შეიძლება ასევე, გამოყენებული იქნეს აღიარებული ეფექტურობის სხვა ანტიბიოტიკები. გამოსაკვლევი ქსოვილის მასალა არის ელენთა, თირკმელი და დამატებით, გული ან თავის ტვინი. დანართით N1, N2, N3 დადგენილ ზოგიერთ შემთხვევაში უნდა შემოწმდეს საკვერცხის სითხეც .

2. დანართით N1, N2, N3 დადგენილი შემთხვევის გათვალისწინებით არაუმეტეს 10 თევზის საკვერცხის სითხე ან ორგანოს ნაწილი) შეიძლება შეგროვებულ იქნეს ერთ სტერილურ სინჯარაში, რომელიც შეიცავს არანაკლებ 4 მლ სატრანსპორტო ნიადაგს და წარმოადგენს ერთ შერეულ ნიმუშს. ქსოვილი თითოეულ ნიმუშში უნდა იწონიდეს არანაკლებ 0,5 გრამს.

3. ლაბორატორიაში ტრანსპორტირების დროს, ნიმუშების გაცივების უზრუნველსაყოფად, სინჯარები

უნდა განთავსდეს იზოლირებულ კონტეინერებში (მაგალითად, სქელკედლიანი პოლისტიროლის ყუთები) საკმარისი რაოდენობის ყინულთან ან „ყინულის ბლოკებთან“ ერთად. თავიდან უნდა იქნეს აცილებული გაყინვა. ნიმუშის ტემპერატურა ტრანსპორტირების დროს არ უნდა აღემატებოდეს 10°C და მიღებისას ყინული კვლავ უნდა იქნეს გადასატან ყუთში ან ერთი ან მეტი ყინულის ბლოკი – ნაწილობრივ ან მთლიანად გაყინული.

4. ვირუსოლოგიური გამოკვლევა უნდა იქნეს დაწყებული, შესაძლებლობისამებრ მოკლე ხანში, მაგრამ ნიმუშის აღებიდან არა უგვიანეს 48 საათისა.

5. ამ მუხლის მე-4 პუნქტით განსაზღვრული მოთხოვნის შესრულების შეუძლებლობისას, კერძოდ, როდესაც თევზის შეგროვება ხდება მოშორებულ ადგილებში და შეუძლებელია შეგროვების დღეს გადაგზავნა, ვირუსოლოგიური გამოკვლევა შეიძლება დაწყებულ იქნეს მასალის შეგროვებიდან არა უგვიანეს 72 საათისა, იმ პირობით, რომ შესამოწმებელი მასალა დაცული იქნება სატრანსპორტო ნიადაგით და შესაძლებელი იქნება ტრანსპორტირების დროს ტემპერატურასთან დაკავშირებული ამ მუხლის მე-3 პუნქტით დადგენილი მოთხოვნების დაცვა.

6. მთლიანი თევზი შეიძლება გაიგზავნოს ლაბორატორიაში, თუ ტრანსპორტირების დროს შესაძლებელი იქნება ტემპერატურასთან დაკავშირებული მოთხოვნების დაცვა. მთლიანი თევზი შეიძლება შეხვეულ იქნეს შეწოვის უნარის მქონე ქაღალდში და საბოლოოდ უნდა გაიგზავნოს პოლიეთილენის პარკით, გაცივებულ მდგომარეობაში ამ მუხლის მე-3 პუნქტით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად. შეიძლება გაიგზავნოს ცოცხალი თევზიც.

7. შეფუთვა და მარკირება უნდა შესრულდეს საქართველოს კანონმდებლობითა და საჭიროების შემთხვევაში, საერთაშორისო კანონმდებლობით დადგენილი წესით.

მუხლი 7. დამატებითი სადიაგნოსტიკო მასალის შეგროვება

VHS-ზე და IHN-ის დიაგნოსტიკაზე მომუშავე ლაბორატორიასთან შეთანხმებით, ასევე შესაძლოა შეგროვდეს თევზის სხვა ქსოვილები და მომზადდეს დამატებითი გამოკვლევებისთვის.

თავი III

ნიმუშების მომზადება ვირუსოლოგიური გამოკვლევისთვის

მუხლი 8. გაყინვა გამონაკლის შემთხვევებში

1. ქსოვილის ნიმუშების შეგროვებიდან 48 საათის განმავლობაში, უჯრედების ინოკულაციის შეუძლებლობისას (მაგ.: უამინდობა, უქმე დღეები, ლაბორატორიული პრობლემები და ა.შ.), დასაშვებია ქსოვილის ნიმუშის გაყინვა უჯრედოვანი კულტურების საკვებ არეში -20°C ან ნაკლებ ტეპერატურაზე და ვირუსოლოგიური გამოკვლევის განხორციელება 14 დღის განმავლობაში. ქსოვილი უნდა გაიყინოს და გალღვეს მხოლოდ ერთხელ, შემოწმების წინ.

2. შენახული უნდა იქნეს ჩანაწერები, რომელშიც მიეთითება დეტალები თითოეული ქსოვილის ნიმუშების გაყინვის შესახებ (როგორიცაა მკვდარი უჯრედოვანი ხაზები და ა.შ.).

მუხლი 9. ორგანოების ჰომოგენიზაცია

1. ლაბორატორიაში, ქსოვილი სინჯარებში უნდა იქნეს სრულიად ჰომოგენიზირებული (სტომახერით (stomacher) ან ბლენდერით ან ქვიჯათი და ფილთაქვით სტერილურ ქვიშასთან ერთად) და შემდგომში დაყოვნებულ იქნეს თავდაპირველ სატრანსპორტო ნიადაგში.

2. თუ ნიმუში შედგება 4 სმ-ზე ნაკლები სიგრძის მთლიანი თევზისგან, ანუსიდან სხეულის ბოლო ნაწილის მოშორების შემდეგ, ის უნდა დაქუცმაცდეს სტერილური მაკრატლით ან სკალპელით. თუ ნიმუში შედგება 4 - 6 სმ სიგრძის მთლიანი თევზისგან, მაშინ შინაგანი ორგანოები, მათ შორის თირკმელი, უნდა შეგროვდეს. თუ ნიმუში შედგება 6 სმ-ზე მეტი სიგრძის მთლიანი თევზისგან, ქსოვილის ნიმუშები უნდა შეგროვდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად. ქსოვილის ნიმუშები უნდა დაქუცმაცდეს სტერილური მაკრატლით ან სკალპელით, მოხდეს მისი ჰომოგენიზაცია ამ მუხლის პირველ პუნქტში მითითებული მოთხოვნების

შესაბამისად და დაყოვნდეს სატრანსპორტო ნიადაგში.

3. საბოლოო თანაფარდობა ქსოვილის მასალასა და სატრანსპორტო ნიადაგს შორის უნდა დარეგულირდეს ლაბორატორიაში 1:10-მდე.

მუხლი 10. ჰომოგენატის ცენტრიფუგირება

1. ჰომოგენატის ცენტრიფუგირება ხდება მაცივრიან ცენტრიფუგაში 2°C -5°C ტემპერატურაზე 2 000-4000 ბრ/წთ 15 წუთის განმავლობაში და სუპერნატანტი უნდა შეგროვდეს და დამუშავდეს ოთხი საათის განმავლობაში 15°C ტემპერატურაზე ან მთელი ღამის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე ანტიბიოტიკებთან ერთად. (მაგ.: ამ ეტაპზე - 1 მგ/მლ გენტამიცინი).

2. სუპერნატანტის დამუშავება ანტიბიოტიკებით შეიძლება იქნეს გამოტოვებული, თუ ნიმუშის გადატანა ხდება სატრანსპორტო ნიადაგით.

3. სუპერნატანტის ანტიბიოტიკით დამუშავების მიზანია ნიმუშებში ბაქტერიული დაბინძურების გაკონტროლება და ფილტრაცია მემბრანული ფილტრის გამოყენებით აღარ არის საჭირო.

4. თუ შეგროვებული სუპერნატანტი ნიმუშის აღების შემდეგ ინახება -80°C ტემპერატურაზე 48 საათის განმავლობაში, ის შეიძლება იქნეს ხელახლა გამოყენებული მხოლოდ ერთხელ ვირუსოლოგიური გამოკვლევისთვის.

5. ქსოვილის ნიმუშების შეგროვებიდან 48 საათის განმავლობაში უჯრედის ინოკულაციის შეუძლებლობისას, სუპერნატანტი შეიძლება გაიყინოს -80°C ტემპერატურაზე და განახორციელდეს ვირუსოლოგიური გამოკვლევა 14 დღის განმავლობაში.

6. უჯრედების ინოკულაციამდე ხდება სუპერნატანტის შერევა IPN ვირუსის ადგილობრივი სეროტიპისა და ანტიშრატის თავსებადი განზავების თანაბარ მოცულობასთან და ხდება ინკუბაცია არანაკლებ ერთი საათის განმავლობაში 15°C ტემპერატურაზე ან არაუმეტეს 18 საათის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე. ანტიშრატის ტიტრი უნდა იქნეს არანაკლებ 1/2000, 50%-იანი ,,plaque“ ნეიტრალიზაციის ტესტში.

7. ანტიშრატით IPNV-ის მიმართ ყველა ინოკულატის დამუშავების მიზანია IPNV-ის გამო დასნებოვნებული უჯრედების კულტურებში CPE-ის განვითარების თავიდან აცილება, რაც ამცირებს ვირუსოლოგიური გამოკვლევების ხანგრძლივობას და აგრეთვე, იმ შემთხვევების რაოდენობას, როდესაც CPE-ის წარმოქმნა უნდა ჩაითვალოს VHSV-ს ან IHNV-ს პოტენციურ მაჩვენებლად.

8. ინოკულატის დამუშავება ანტიშრატით IPNV-ის მიმართ შეიძლება იქნეს გამოტოვებული, როდესაც ნიმუშები მიღებულია IPNV-ზე თავისუფალი საწარმოო ერთეულებიდან.

თავი IV

ვირუსოლოგიური გამოკვლევა

მუხლი 11. უჯრედოვანი კულტურები და საკვები არეები

1. BF-2 ან RTG-2 და EPC ან FHM უჯრდები იზრდება 20%-ით შესაბამის საკვებ არეზე 30°C ტემპერატურაზე, მაგ. Eagle's MEM (ან მისი მოდიფიკაცია) მსხვილფეხა საქონლის ემბრიონის შრატის 10%-იანი და ანტიბიოტიკების სტანდარტული კონცენტრაციის დამატებით.

2. როდესაც უჯრედები კულტივირებულია დახურულ სინჯარებში, მიზანშეწონილია საკვები არის ბიკარბონატით ბუფერირება. უჯრედების კულტივირებისთვის გამოყენებული საკვები არე ღია ერთეულებში შეიძლება ბუფერირებულ იქნეს Tris-HCl-სა (23 მმ) და Na-ბიკარბონატთან (6 მმ) ერთად. PH უნდა იქნეს 7,6 ± 0,2.

3. ქსოვილოვანი მასალასთან ერთად, ინოკულაციისათვის გამოსაყენებელი უჯრედოვანი კულტურები ინოკულაციისას უნდა იქნეს ახალგაზრდა (4-სთ-დან 48-სთ-მდე) და აქტიურად მზარდი

(არა შერწყმადი).

მუხლი 12. უჯრედოვანი კულტურების ინოკულაცია

1. ანტიბიოტიკით დამუშავებული ორგანოს სუსპენზია ინოკულირებულია უჯრედულ კულტურებში ორი განზავებით, როგორიცაა პირველადი განზავება და გარდა ამისა, განზავება 1:10-ით, რაც იწვევს ქსოვილოვანი მასალის საბოლოო განზავებას 1:100 და 1:1000 უჯრედოვანი კულტურის საკვებ არეზე. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-11 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების თანახმად, არანაკლებ ორი უჯრედის ხაზი უნდა იქნეს ინოკულირებული. თანაფარდობა ინოკულატის ზომასა და უჯრედოვანი კულტურის საკვები არის მოცულობას შორის უნდა იქნეს დაახლოებით 1:10.

2. თითოეული განზავებისთვის და თითოეულ უჯრედის ხაზისთვის გამოყენებული უნდა იქნეს დაახლოებით სულ მცირე 2 სმ^2 უჯრედული არე, რომელიც შეესაბამება ერთ ფოსოს, 24 ფოსოიან უჯრედოვანი კულტურის პლანშეტს. რეკომენდებულია უჯრედოვანი კულტურის პლანშეტის გამოყენება, აგრეთვე, დასაშვებია მსგავსი ან უფრო დიდი ზრდის სხვა ერთეულების გამოყენება.

მუხლი 13. უჯრედოვანი კულტურების ინკუბაცია

1. ინოკულირებული უჯრედოვანი კულტურების ინკუბაცია ხდება 15°C ტემპერატურაზე 7-დან 10 დღემდე. უჯრედოვანი კულტურის საკვები არის ფერის ცვლილება წითლიდან ყვითელზე მიუთითებს საკვები არის მჟავიანობაზე და უნდა დარეგულირდეს pH სტერილური ბიკარბონატის ხსნრით ან ეკვივალენტი ნივთიერებებით, ვირუსული ინფექციის მიმართ უჯრედის ამთვისებლობის უზრუნველსაყოფად.

2. არანაკლებ ყოველ ექვს თვეში ან უჯრედის შემცირებული ამთვისებლობის ეჭვის შემთხვევაში, VHSV-ისა და IHNV-ის გაყინული მარაგის ტიტრაცია ხორციელდება უჯრედოვანი კულტურების ინფექციის მიმართ ამთვისებლობის გადამოწმების მიზნით ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის შესაბამისად.

მუხლი 14. მიკროსკოპია

CPE-ის წარმოქმნაზე ინოკულირებული უჯრედოვანი კულტურები უნდა შემოწმდეს რეგულარულად არანაკლებ კვირაში სამჯერ, 40-დან 150-მდე გადიდებით. თუ CPE აშკარაა, ვირუსის იდენტიფიცირების პროცედურა ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-16-მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად უნდა იქნეს დაუყოვნებლივ ინიცირებული.

მუხლი 15. სუბკულტივაცია

1. თუ პირველადი ინკუბაციის შემდეგ 7-10 დღის განმავლობაში CPE არ იქნება განვითარებული, სუბკულტივაცია განხორციელდება ახალ უჯრედულ კულტურებში პირველადი კულტურის მსგავსი უჯრედული არის გამოყენებით.

2. საკვები არის ალიკვოტი ყველა კულტურიდან/ფოსოდან, რომელიც წარმოადგენს პირველად კულტურას, ერევა უჯრედის ხაზის მიხედვით ინოკულაციის შემდეგ 7-10 დღის განმავლობაში. შემდეგ ხდება შეგროვილი მასის ინოკულირება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-12 მუხლში მითითებული მოთხოვნების თანახმად, განუზავებელ და 1:10 განზავებულ (რის შედეგადაც სუპერნატანტის საბოლოო განზავებაა, შესაბამისად, 1:10 და 1:100) ჰომოლოგიურ უჯრედულ კულტურებში. გარდა ამისა, იმ საკვები არის ალიკვოტის 10%, რომელიც შეადგენს პირველად კულტურას, ინოკულირდება პირდაპირ ფოსოში, ახალ უჯრედოვან კულტურასთან ერთად (სუბკულტივაცია). ინოკულაციას შეიძლება წინ უძღოდეს IPNV-ის ანტიშრატთან განზავებით პრეინკუბაცია, ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-10 მუხლით დადგენილი განზავებით. შემდეგ ხდება ინოკულირებული კულტურების ინკუბაცია 7-დან 10 დღემდე 15^{0}C ტემპერატურაზე დაკვირვებით ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-14 მუხლში მითითებული მოთხოვნების შესაბამისად.

3. თუ ტოქსიკური CPE წარმოიქმნება ინკუბაციიდან პირველი სამი დღის განმავლობაში, სუბკულტივაცია შეიძლება შესრულდეს ამ ეტაპზე, მაგრამ უჯრედები უნდა იქნეს შემდეგ ინკუბირებული შვიდი დღის განმავლობაში და კვლავ სუბკულტივირებული შემდგომი შვიდდღიანი

ინკუბაციით. როდესაც ტოქსიკური CPE განვითარდება სამი დღის შემდეგ, უჯრედები შეიძლება პასაჟირებულ იქნეს ერთხელ და ინკუბირებული, რათა მიღწეულ იქნეს 14 დღე თავდაპირველი ინოკულაციიდან. ინკუბაციის ბოლო შვიდ დღეში არ უნდა გამოვლინდეს ტოქსიკურობა.

4. ანტიბიოტიკებით დამუშავების მიუხედავად, თუ წარმოიქმნება ბაქტერიული დაბინძურება, სუბკულტივაციას უნდა უძღოდეს ცენტრიფუგირება 2 000-4 000 ბრ/წთ 15-დან 30 წთ-ის განმავლობაში 2^0C -5^0C ტემპარატურაზე, ან/და სუპერნატანტის ფილტრაცია 0,45 მკმ ფილტრის (დაბალი ცილოვანი გარსის დამჭერი მემბრანა) მეშვეობით. გარდა ამისა, სუბკულტივაციის პროცედურები იგივეა, რაც ტოქსიკური CPE-თვის.

თავი V

ვირუსის იდენტიფიკაცია

მუხლი 16. ვირუსის იდენტიფიკაციის ტესტები

თუ CPE-ს მტკიცებულება შეინიშნება უჯრედულ კულტურაში, საკვები არის (სუპერნატანტის) შეგროვება და შემოწმება ხორციელდება ერთი-ერთი შემდეგი მეთოდით: ნეიტრალიზაცია, IF, ELISA. თუ ეს ტესტები არ იძლევა ვირუსის საბოლოო იდენტიფიკაციას ერთი კვირის განმავლობაში, სუპერნატანტი დაუყოვნებელი იდენტიფიკაციისათვის უნდა გადაიგზავნოს თევზის დაავადებებზე მომუშავე რეფერენს ლაბორატორიაში.

მუხლი 17. ნეიტრალიზაცია

1. შეგროვებული სუპერნატანტიდან უჯრედები უნდა მოსცილდეს ცენტრიფუგირებით (2 000–დან 4 000-მდე ბრ/წთ) ან მემბრანული ფილტრაციით (0,45 მკმ) დაბალი ცილოვანი გარსის დამჭერი მემბრანით და განზავდეს სუპერნატანტი 1:100 და 1:10 000 უჯრედოვანი კულტურის საკვებ არეში.

2. ამ მუხლის პირველი პუნქტით განსაზღვრული პროცედურის შემდეგ, ორი განზავების სუპერნატანტების ალიკვოტები შეერევა და ინკუბირდება 15^0C ტემპერატურაზე 60 წთ-ის განმავლობაში, ქვემოთ ჩამოთვლილი თითოეული რეაგენტის თანაბარი ნაწილით:

ა) შრატი, განსაზღვრული ჯგუფის შემცველი ანტისხეულებით VHSV-ს წინააღმდეგ 1:50-ზე (მოცულობა/მოცულობაზე) განზავებისას ან როგორც განსაზღვრულია რეფერენს ლაბორატორიის მიერ ანტიშრატის შესაძლო ციტოტოქსიკურობასთან დაკავშირებით;

ბ) შრატი, განსაზღვრული ჯგუფის შემცველი ანტისხეულებით IHNV-ს წინააღმდეგ 1:50-ზე (მოცულობა/მოცულობაზე) განზავებისას ან როგორც განსაზღვრულია რეფერენს ლაბორატორიის მიერ ანტიშრატის შესაძლო ციტოტოქსიურობასთან დაკავშირებით;

გ) IPNV-ის, ადგილობრივი სეროტიპების საწინააღმდეგო ანტიშრატის 1:50-ზე (მოცულობა/მოცულობაზე) განზავებისას ან როგორც განსაზღვრულია რეფერენს ლაბორატორიის მიერ ანტიშრატის შესაძლო ციტოტოქსიურობასთან დაკავშირებით;

დ) მხოლოდ საკვები არე (პოზიტიური კონტროლი).

3. თითოეული ვირუსის სუპერნატანტ-შრატის ნარევისგან, არანაკლებ ორი უჯრედოვანი კულტურა ინოკულირდება 50 მკლ-ით და შემდეგ ინკუბირდება 15^0C ტემპარატურაზე. CPE–ის განვითარება მოწმდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-14 მუხლში მითითებული მოთხოვნების თანახმად.

4. ზოგიერთი VHSV შტამი არ რეაგირებს ნეიტრალიზაციის ტესტებზე. ასეთი იზოლატები უნდა განისაზღვროს IF-თი ან ELISA-თი.

5. შეიძლება ალტერნატივის სახით გამოყენებულ იქნეს ნეიტრალიზაციის სხვა ტესტები, რომელთა ეფექტურობა აღიარებულია.

მუხლი 18. იმუნოფლუორესცენცია

1. თითოეული ვირუსის იზოლატის იდენტიფიკაციისათვის, არანაკლებ რვა მინასაფარი ან ექვივალენტი ითესება უჯრედების ისეთი სიხშირით, რომელიც იწვევს დაახლოებით 60%- 90% დაფარვას 24 საათიანი კულტივირების შემდეგ. ამ მიზნით რეკომენდებულია EPC უჯრედები მინის ზედაპირების მიმართ ძლიერი შეერთების გამო, თუმცა შეიძლება გამოყენებული იქნეს სხვა უჯრედის ხაზებიც, როგორიცაა BF-2, RTG-2 ან FHM.

2. როდესაც უჯრედები ილექება მინის ზედაპირზე დათესვიდან დაახლოებით ერთი საათის შემდეგ, ან როდესაც კულტურები უკვე ინკუბირებულია 24 სთ-მდე, საიდენტიფიკაციო ვირუსი უნდა იქნეს ინოკულირებული. ოთხი კულტურა ინოკულირებულია 1:10 მოცულობის თანაფარდობით და ოთხი კულტურა 1: 1 000 თანაფარდობით. შემდეგ ისინი ინკუბირდება 15^0C ტემპერატურაზე, 20-30 საათის განმავლობაში.

3. ინკუბაციის შემდეგ, კულტურები ირეცხება ორჯერ Eagle's MEM-ში შრატის გარეშე, შემდეგ ფიქსირდება 80%-იან ყინულივით ცივ აცეტონში და იღებება ორფენიანი IFAT-ის საშუალებით. პირველი რეაგენტის ფენა შედგება ეტალონური ხარისხის პოლიკლონური ან მონოკლონური ანტისხეულებისგან, მეორე რეაგენტის ფენა არის ფლუოროქრომ-კონიუგირებული ანტიშრატი გამოყენებული იმუნოგლობულინების პირველ ფენაში. თითოეული ტესტირებული ანტიშრატისთვის არანაკლებ ერთი დიდი დოზის და ერთი პატარა დოზის ინოკულირებული კულტურები უნდა შეიღებოს. ტესტი უნდა მოიცავდეს შესაბამის დადებით და უარყოფით კონტროლს. რეკომენდებულია ისეთი ფლუოროქრომები, როგორიცაა FITC ან TRITC.

4. მიკროსკოპული კვლევისათვის შეღებილ კულტურებს ემატება გლიცერინის ხსნარი და მოწმდება ულტრაიისფერ (UV) სინათლეზე. გამოიყენება 10 ან 12 გადიდების ოკულარი და 25 ან 40 გადიდების ობიექტივის ლინზა რიცხვობრივი აპერტურით > 0,7 და > 1,3 შესაბამისად.

5. ამ მუხლით განსაზღვრული IF მეთოდის გარდა, შეიძლება გამოყენებულ იქნეს სხვა აღიარებული ეფექტური IF მეთოდები ეტალონური ხარისხის უჯრედულ კულტურებთან, ფიქსაციასთან და ანტისხეულებთან დაკავშირებით.

მუხლი 19. ენზიმ შემაკავშირებელი იმუნო-ფერმენტული ანალიზი

1. ELISA-ს გამოყენებისას, ფოსოები მიკროტიტრაციულ პლანშეტში მთელი ღამის განმავლობაში იფარება ეტალონური ხარისხის ანტისხეულების გაწმენდილი იმუნოგლობულინის ფრაქციების რეკომენდებული კონცენტრაციებით.

2. ფოსოების PBS-Tween-20-ის ბუფერით გარეცხვის შემდეგ, საიდენტიფიკაციო ვირუსი ემატება ფოსოებს ორჯერადი ან ოთხჯერადი განზავების ეტაპებით და რეაქციაში შედის საფარის ანტისხეულთან 37^0C ტემპერატურაზე 60 წუთის განმავლობაში. PBS–Tween-20-ის ბუფერით გარეცხვის შემდეგ, ემატება სპეციფიკური ბიოტინირებული ანტისხეულები, რომელიც შეესაბამება საფარის ანტისხეულებს და რეაქციაში შედის საფარის ანტისხეულთან 20^0C ტემპერატურაზე 60 წუთის განმავლობაში. ამ პუნქტის შესაბამისად კიდევ ერთი გარეცხვის შემდეგ, HRP-კონიუგირებული სტრეპტავიდინი ემატება და შედის რეაქციაში 20^0C ტემპერატურაზე ერთი საათით. ბოლო გარეცხვის შემდეგ, ბმული ფერმენტი გამოისახება შესაბამისი ELISA სუბსტრატების გამოყენებით (OPD და სხვ.)

3. ამ მუხლით განსაზღვრული ბიოტინ-ავიდინზე დაფუძნებული ELISA-ს ნაცვლად შეიძლება გამოყენებულ იქნეს აღიარებული ეფექტურობის ELISA-ს სხვა ვერსიები.

თავი VI

VHS-ისა და IHN-ის საეჭვო აფეთქების შემთხვევაში დადასტურებისათვის დიაგნოსტიკის პროცედურები

მუხლი 20. ზოგადი დებულებები

1. VHS-სა და IHN-ის დიაგნოსტიკისათვის გამოყენებულ უნდა იქნეს ამ პუნქტით განსაზღვრული ერთი ან მეტი მეთოდი:

ა) ვირუსის გამოყოფა ჩვეულებრივი მეთოდით შემდგომში ვირუსის სეროლოგიური იდენტიფიკაციით;

ბ) ვირუსის გამოყოფა სეროლოგიურ იდენტიფიკაციასთან ერთდროულად;

გ) დიაგნოსტიკის სხვა მეთოდები (IFAT, ELISA).

2. აღიარებული ზონის ფერმაში VHS-ის ან/და IHN-ის პირველი შემთხვევის დადასტურებისათვის, არ უნდა იქნეს გამოყენებული მხოლოდ ამ მუხლის პირველი პუნქტის ,,გ" ქვეპუნქტში განსაზღვრული მეთოდები.

3. აღიარებული ზონის ფერმაში VHS-ის ან/და IHN-ის პირველი შემთხვევის დადასტურებისათვის, ამ მუხლის პირველი პუნქტის ,,გ" ქვეპუნქტში განსაზღვრულ მეთოდებთან ერთად გამოყენებული უნდა იქნეს ამ მუხლის პირველი პუნქტის ,,ა" ან ,,ბ" ქვეპუნქტში მითითებული მეთოდებიც.

4. ვირუსოლოგიური გამოკვლევისთვის განკუთვნილ ქსოვილის მასალას, ზოგიერთ შემთხვევაში, უნდა ახლდეს დამხმარე მასალა ბაქტერიოლოგიური, პარაზიტოლოგიური, ჰისტოლოგიური ან სხვა გამოკვლევებისთვის, რომელიც იძლევა დიფერენციული დიაგნოზის დასმის საშუალებას.

მუხლი 21. ვირუსის გამოყოფა ჩვეულებრივი მეთოდით, შემდგომში ვირუსის სეროლოგიური იდენტიფიკაციით

1. სეროლოგიურ იდენტიფიკაციამდე ვირუსის გამოსაყოფად, გამოსაკვლევი ნიმუშისთვის შეირჩევა IHN-ის ან VHS-ისთვის დამახასიათებელი კლინიკური ნიშნების მქონე არანაკლებ 10 თევზი.

2. თევზისგან აღებული ნიმუშების მომზადება და გადაგზავნა ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

3. დამატებითი სადიაგნოსტიკო მასალის შეგროვება ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

4. ნიმუშების მომზადება ვირუსოლოგიური გამოკვლევისთვის ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-8-მე-10 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

5. ვირუსოლოგიური გამოკვლევა ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-11-მე-15 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

6. ვირუსის იდენტიფიკაცია ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-16-მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

მუხლი 22. ვირუსის გამოყოფა სეროლოგიურ იდენტიფიკაციასთან ერთდროულად

1. ერთდროულად ვირუსის გამოყოფისა და სეროლოგიური იდენტიფიკაციისათვის, გამოსაკვლევი ნიმუშების შერჩევა ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის 21-ე მუხლის პირველი პუნქტით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

2. თევზიდან აღებული ნიმუშების მომზადება და გადაგზავნა ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

3. დამატებითი სადიაგნოსტიკო მასალის შეგროვება ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

4. ორგანოების ჰომოგენიზაცია ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-9 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

5. ჰომოგენატი ცენტრიფუგირდება გაგრილებულ/გაციებულ ცენტრიფუგაში 2°C-5°C ტემპერატურაზე 2 000-დან 4 000-მდე ბრ/წთ 15 წუთის განმავლობაში და სუპერნატანტი იკრიბება და მუშავდება ოთხი

საათის განმავლობაში 15°C ტემპერატურაზე ანტიბიოტიკებით, მაგალითად, გენტამიცინი 1 მგ/მლ, ან იფილტრება (0,45 მკმ) დაბალი ცილოვანი გარსის დამჭერი მემბრანით.

6. სუპერნატანტის დამუშავება სადიაგნოსტიკო ანტიშრატით ხორციელდება ანტიბიოტიკით დამუშავებული ან მემბრანულ ფილტრზე გაფილტრული ორგანოს სუსპენზიით, რომელიც განზავებულია 1:10 და 1: 1 000 უჯრედოვანი კულტურის საკვებ არეში და ალიკვოტი შერეულია და ინკუბირებულია 60 წუთის განმავლობაში 15°C ტემპარატურაზე ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-17 მუხლში მითითებული რეაგენტების თანაბარი ნაწილებით.

7. უჯრედოვანი კულტურები და საკვები არე გამოიყენება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-11 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

8. უჯრედოვანი კულტურების ინოკულაციის დროს თითოეული ვირუს-შრატის ნარევისგან, რომელიც მომზადებულია ამ მუხლის მე-6 პუნქტით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად, არანაკლებ ორი უჯრედოვანი კულტურა თითოეულ უჯრედულ ხაზში ინოკულირდება 50 მკლ-ით.

9. უჯრედოვანი კულტურების ინკუბაცია ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-11 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

10. მიკროსკოპიის დროს ინოკულირებული უჯრედოვანი კულტურები მოწმდება ყოველდღიურად CPE-ის არსებობაზე 40-დან 150 გადიდებით. თუ CPE თავიდან იქნება აცილებული ერთ-ერთი გამოიყენებული ანტიშრატით, შესაბამისად ვირუსი შეიძლება ჩაითვალოს იდენტიფიცირებულად.

11. თუ CPE არ იქნება თავიდან აცილებული ნებისმიერი ანტიშრატით, უნდა შესრულდეს ვირუსის იდენტიფიცირების პროცედურა ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-16-მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

12. თუ CPE არ წარმოიქმნება 7-დან 10 დღის განმავლობაში, ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-15 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად, სუბკულტივაცია უნდა შესრულდეს კულტურებიდან, რომელიც ინოკულირებულია სუპერნატანტს დამატებული საკვები არეთი ამ მუხლის მე-6 პუნქტით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

მუხლი 23. დიაგნოსტიკის სხვა მეთოდები

1. სუპერნატანტი, რომელიც მომზადებულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-9 მუხლით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად, შეიძლება გამოკვლეულ იქნეს IFAT-ის ან ELISA-ს ტესტით ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-18 ან მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად. ეს სწრაფი მეთოდები უნდა იქნეს შევსებული ვირუსოლოგიური გამოკვლევით ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-20 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ან „ბ“ ქვეპუნქტებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად, 48 საათის განმავლობაში, ნიმუშის აღების შემდეგ, თუ მიღებულია უარყოფითი შედეგი ან მიღებულია დადებითი შედეგი მასალით, რომელიც წარმოადგენს IHN-ის ან VHS-ის პირველ შემთხვევას აღიარებულ ზონაში.

2. ქსოვილის მასალა შეიძლება დაექვემდებაროს დიაგნოსტიკის სხვა მოთოდს, როგორიცაა RT-PCR, IF გაყინული სექციაზე იმუნოჰისტოქიმია ფორმალინით ფიქსირებული ქსოვილის მასალაზე. ამ მეთოდს ყოველთვის თან უნდა ახლდეს არაფიქსირებული ქსოვილის მასალის ინოკულაცია უჯრედოვან კულტურებზე.

თავი VII

VHS-ის ან/და IHN-ის არარსებობის დოკუმენტირებული ისტორია ზონაში და აუღიარებელი ზონის ფერმაში

მუხლი 24. სახელმძღვანელო მითითებები და კრიტერიუმები ჯანმრთელობის შემოწმების პროგრამასთან დაკავშირებით

1. ჯანმრთელობის შემოწმების პროგრამა შესაძლოა ინიცირებულ იქნეს მხოლოდ ქვემოთ ჩამოთვლილ ერთ-ერთ შემთხვევაში:

ა) VHSV-თან ან/და IHNV-თან დაკავშირებით აღმოფხვრის პროგრამის ოფიციალურად მიჩნევის შემდეგ (მათ შორის ფერმიდან ყველა თევზის გატანის, გაწმენდის, დეზინფექციისა და ორთქლით დამუშავების შემდეგ), აღიარებული ფერმიდან თევზის მარაგის შევსებამდე;

ბ) VHSV-ს ან/და IHNV-ს ინფექციის ისტორიის არარსებობისას თევზის ფერმაში.

2. ჯანმრთელობის შემოწმების პროგრამა უნდა ეფუძნებოდეს როგორც კლინიკურ შემოწმებებს, ისე ლაბორატორიული გამოკვლევებს.

3. ორი წლის განმავლობაში პროგრამა უნდა შეიცავდეს კლინიკური ჯანმრთელობის შემოწმებას ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3-მე-19 მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

4. სულ მცირე ერთი შემოწმებისას, რომელიც ტარდება ყოველ წელს, 30 თევზის ქსოვილი და/ან საკვერცხის სითხის ნიმუშები უნდა შეგროვდეს თითოეული ფერმიდან. ნიმუშები უნდა შეირჩეს, მომზადდეს და დაექვემდებაროს ლაბორატორიულ გამოკვლევას ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3-23-ე და 25-ე მუხლებით დადგენილი მოთხოვნების შესაბამისად.

5. ჯანმრთელობის შემოწმების პროგრამა უნდა განხორციელდეს არანაკლებ ოთხი წლის განმავლობაში ზონის ყველა ფერმაში ან აუღიარებელი ზონის ფერმაში აღიარების მიზნით.

6. ჯანმრთელობის შემოწმების პროგრამა მიიჩნევა ოფიციალურად, როდესაც VHS-ის ან IHN-ის არც ერთი შემთხვევას არ ჰქონია ადგილი კერძოდ, არ გამოვლენილა კლინიკური ინფექცია ან არ მომხდარა ვირუსის გამოყოფა.

თავი VIII

ტიტრაციის პროცედურა უჯრედოვანი კულტურის ინფექციის მიმართ ამთვისებლობის გადამოწმების მიზნით

მუხლი 25. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-13 მუხლის მე-2 პუნქტში მითითებული ტიტრაციის რეკომენდებული პროცედურა

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-13 მუხლის მე-2 პუნქტში მითითებული ტიტრაციის რეკომენდებული პროცედურა მოიცავს:

ა) VHSV-ის არანაკლებ ორი იზოლატისა და IHNV-ის ერთი იზოლატის გამოყენებას. იზოლატები უნდა წარმოადგენდნენ ვირუსების ძირითად ჯგუფს (მაგ. VHSV-თვის ერთი პათოგენური იზოლატი ცისარტყელა კალმახისგან მტკნარ წყალში და ერთი ზღვის იზოლატი, რომელიც პათოგენურია ჰატუსისთვის და IHNV-თვის ერთი ცისარტყელა კალმახის პათოგენური შტამი ევროპიდან). იზოლატები ხელმისაწვდომია თევზის დაავადებებზე მომუშავე რეფერენს ლაბორატორიიდან;

ბ) უჯრედოვან კულტურაში რამდენჯერმე პასაჟირებული ვირუსების გამრავლებას, რომელიც ხდება უჯრედოვანი კულტურის კოლბებში BF-2 ან RTG-2 უჯრედებზე VHSV-ის შემთხვევაში და IHNV-ის შემთხვევაში კი - EPC ან FHM უჯრედებზე. გამოყენებული უნდა იქნეს უჯრედოვანი კულტურის საკვები არე არანაკლებ 10%-იანი შრატით და დაბალი MOI ინოკულაციისთვის (<1);

გ) სრული CPE-ის არსებობისას, ვირუსის მიღებას უჯრედოვანი კულტურის ზედაპირული სითხის (სუპერნატანტის) ცენტრიფუგირებით 2 000 ბრ/წთ 15 წუთის განმავლობაში, სტერილურად გაფილტვრას 0,45 მკმ მემბრანულ ფილტრზე და განაწილებას ეტიკეტირებულ კრიოსინჯარებში. ვირუსი ინახება -80°C ტემპერატურაზე;

დ) გაყინვიდან ერთი კვირის შემდეგ, თითოეულ ვირუსიანი სამი რეპლიკატი სინჯარის გალღობას ცივ წყალში და ტიტრირებას შესაბამის უჯრედის ხაზებში. არანაკლებ ყოველ ექვს თვეში, ან თუ არსებობს ეჭვი, რომ შემცირდა უჯრედის ხაზის მგრძნობელობა, უნდა მოხდეს თითოეული ვირუსის იზოლატის გალღობა და ტიტრირება.

2. ტიტრაციის პროცედურები უნდა იქნეს დეტალურად აღწერილი და იგივე პროცედურა დაცული ყოველ ჯერზე.

3. ტიტრაცია, ბოლო წერტილის განზავებით, უნდა შეიცავდეს არანაკლებ ექვს რეპლიკატს ყოველი განზავების ეტაპზე. ტიტრები დარდება ადრე მიღებულ ტიტრებთან. იმ შემთხვევაში, თუ ნებისმიერი სამი ვირუსის იზოლატის ტიტრი ეცემა 2 ლოგარითმით ან მეტი ფაქტორით, თავდაპირველ ტირტთან შედარებით, უჯრედის ხაზი აღარ უნდა იქნეს გამოყენებული ზედამხედველობის მიზნებისათვის.

4. თუ სხვადასხვა უჯრედის ხაზები ინახება ლაბორატორიაში, თითოეული ხაზი უნდა შემოწმდეს ცალ-ცალკე.

5. ჩანაწერები იწარმოება არანაკლებ 10 წლის განმავლობაში.

დანართი N1

VHS-სა ან/და IHN-ზე აღიარებული სტატუსის მიღწევისათვის ზონისა და აუღიარებილი ზონის ფერმაში ორწლიანი კონტროლის - შემოწმებისა და ნიმუშის აღების - სქემა

	კლინიკური გამოკვლევების რაოდენობა წელიწადში (ორი წელი)	ლაბორატორიული გამოკვლევების რაოდენობა წელიწადში (ორი წელი)	ლაბორატორიული გამოკვლევები ვირუსის არსებობაზე (1)	
			მზარდი თევზის რაოდენობა (ორგანული მასალა)	მწარმოებელი თევზის რაოდენობა (საკვერცხის სითხე)
კონტინენტური ზონები და ფერმები				
ა) ფერმები მწარმოებლებით	2	2	120 (პირველი გამოკვლევა (2) 150 (მეორე გამოკვლევა)	30 (პირველი გამოკვლევა (3) 0 (მეორე გამოკვლევა)
ბ) ფერმები მხოლოდ მწარმოებლებით	2	1	0	150 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა) (3)
გ) ფერმები მწარმოებლის გარეშე	2	2	150 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა)	0
სანაპირო ზონები და ფერმები				
ა) ფერმები მწარმოებლებით	2	2	120 (პირველი გამოკვლევა 150 (მეორე გამოკვლევა)	30 (პირველი გამოკვლევა (3) 0 (მეორე გამოკვლევა)

ბ) ორაგულისებრთა ფერმები მწარმოებლების გარეშე	2	2	30 (პირველი და მეორე გამოკვლევა (4)	0
გ) არა-ორაგულისებრთა ფერმები მწარმოებლების გარეშე	2	2	150 (პირველი და მეორე გამოკვლევა	0

შენიშვნა: თევზის მაქსიმალური რაოდენობა თითო აუზში/ტბორში/წყალსატევში -10.

(1) შეიძლება ასევე გამოყენებულ იქნეს შემცირებული რაოდენობის ნიმუშები, როგორც ეს მითითებულია დანართ N2-ში, თუ მოთხოვნები, რომელიც აღწერილია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-3 მუხლის მე-2 პუნქტის ,,ა.ბ“ ქვეპუნქტში, მე-9 და 24-ე მუხლებში იქნება დაკმაყოფილებული.

(2) კლინიკური გამოკვლევები.

(3) გამონაკლის შემთხვევებში, თუ შეუძლებელია საკვერცხის სითხის მიღება, ნიმუშები შეიძლება აღებული იქნეს ორგანოებიდან.

(4) ნიმუშები უნდა შეგროვდეს თევზის სუფთა წყლიდან მინირელიზირებულ წყალში გადაყვანის შემდეგ არა უადრეს სამი კვირის განმავლობაში.

დანართი N2

შემოწმებისა და ნიმუშის აღების სქემა ორწლიანი კონტროლისთვის, რომელიც წინ უსწრებს VHS-სა ან/და IHN-ს აღიარებული სტატუსის მოპოვებას ზონასა და აუღიარებელი ზონის ფერმაში, სადაც ამ დაავადებების არარსებობას ადასტურებს დოკუმენტირებული ისტორია

			ლაბორატორიული გამოკვლევები ვირუსის არსებობაზე	
	კლინიკური გამოკვლევების რაოდენობა წელიწადში (ორი წელი)	ლაბორატორიული გამოკვლევების რაოდენობა წელიწადში (ორი წელი)	მზარდი თევზის რაოდენობა (ორგანული მასალა)	მწარმოებელი თევზის რაოდენობა (საკვერცხის სითხე)
კონტინენტური ზონა და ფერმები				
ა) ფერმები მწარმოებლებით	2	2	0 (პირველი გამოკვლევა (1) 30 (მეორე გამოკვლევა)	30 (პირველი გამოკვლევა (2) 0 (მეორე გამოკვლევა)
ბ)შერეული				

ფერმები (reine Brutanlagen) (მწარმოებლებით და დასხვადასხვა ასაკობრივი ჯგუფის თევზები)	2	1	0	30 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა) (2)
გ) ფერმები მწარმოებლის გარეშე	2	2	30 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა)	0
სანაპირო ზონა და ფერმები				
ა) ფერმები მწარმოებლებით	2	2	0 (პირველი გამოკვლევა 30 (მეორე გამოკვლევა)	30 (პირველი გამოკვლევა (2) 0 (მეორე გამოკვლევა)
ბ) ორაგულისებრის ფერმები მწარმოებლების გარეშე	2	2	30 (პირველი და მეორე გამოკვლევა (3)	0
გ)არა-ორაგულისებრთა ფერმები მწარმოებლების გარეშე	2	2	30 (პირველი და მეორე გამოკვლევა	0

შენიშვნა: თევზის მაქსიმალური რაოდენობა თითო აუზში/ტბორში/წყალსატევში- 10.

(1) კლინიკური გამოკვლევები.

(2) გამონაკლის შემთხვევებში, თუ შეუძლებელია საკვერცხის სითხის მიღება, ნიმუშები შეიძლება არებული იქნეს ორგანოებიდან.

(3) ნიმუშები უნდა შეგროვდეს თევზის სუფთა წყლიდან მინირელიზირებულ წყალში გადაყვანის შემდეგ არა უადრეს სამი კვირისა.

დანართი N3

VHS-სა ან / და IHN-ს აღიარებული სტატუსის შენარჩუნების მიზნით შემოწმების და ნიმუშის აღების სქემა ზონისთვის და აუღიარებელი ზონის ფერმისთვის

	კლინიკური გამოკვლევების რაოდენობა წელიწადში	ლაბორატორიული გამოკვლევისათვის აღებულ ნიმუშში თევზის რაოდენობა (1)	
		მზარდი თევზის რაოდენობა (ორგანული მასალა)	მწარმოებელი თევზის რაოდენობა (საკვერცხის სითხე)
კონტინენტური			

ზონა და ფერმები			
ა) ფერმები მწარმოებლებით	2	20 (პირველი გამოკვლევა ან მეორე გამოკვლევა)	10 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა) (2)
ბ) ფერმები მხოლოდ მწარმოებლებით	2	0	30 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა) (2)
გ) ფერმები მწარმოებლების გარეშე	2	30	0
სანაპირო ზონა და ფერმები			
ა) ფერმები მწარმოებლებით	2	20 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა)	10 (პირველი ან მეორე გამოკვლევა) (2)
ბ) ფერმები მწარმოებლების გარეშე	1	30 (3)	0

შენიშვნა: თევზის მაქსიმალური რაოდენობა თითო აუზში/ტბორში/წყალსატევში -10.

(1) აღიარებულ ზონაში ნიმუშები ყოველწლიურად უნდა შეგროვდეს მხოლოდ როტაციით თევზის ფერმების 50%-ში. აუღიარებელი ზონის აღიარებულ ფერმაში ნიმუშები გროვდება ყოველწლიურად.

(2) გამონაკლის შემთხვევებში, თუ შეუძლებელია საკვერცხის სითხის მიღება, ნიმუშები შეიძლება აღებული იქნეს ორგანოებიდან.

(3) ნიმუშები უნდა შეგროვდეს თევზის სუფთა წყლიდან მინირელიზირებულ წყალში გადაყვანის შემდეგ არა უადრეს სამი კვირისა.