KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUT

av den 13 juni 2003

om kriterier för zonindelning och officiell övervakning vid misstanke om eller bekräftelse av förekomst av infektiös laxanemi (ISA)

[delgivet med nr K(2003) 1831]

(Text av betydelse för EES)

(2003/466/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 91/67/EEG av den 28 januari 1991 om djurhälsovillkor för utsläppande på marknaden av djur och produkter från vattenbruk [1], senast ändrat genom förordning (EG) nr 806/2003 [2], särskilt artikel 15 i detta,

med beaktande av rådets direktiv 93/53/EEG av den 24 juni 1993 om gemenskapens minimiåtgärder för bekämpning av vissa fisksjukdomar [3], senast ändrat genom kommissionens beslut 2001/288/EG [4], särskilt artikel 5.2 och artikel 6 i detta, och

av följande skäl:

(1) I direktiv 93/53/EEG fastställs att provtagning och laboratorietester avseende sjukdomar som finns på förteckningarna I och II, och som finns i bilaga A till direktiv 91/67/EEG, skall genomföras enligt de metoder som avses i artikel 15 i direktiv 91/67/EEG.

(2) Provtagningsplaner och diagnostiska metoder för påvisande och bekräftelse av fisksjukdomar i förteckning II, viral hemorragisk septikemi (VHS) och infektiös hematopoetisk nekros (IHN) fastställs i kommissionens beslut 2001/183/EG [5].

(3) Enligt artikel 5.2 och artikel 6 i direktiv 93/53/EEG skall alla anläggningar som är belägna inom samma avrinningsområde eller kustområde ställas under offentlig kontroll om det finns misstanke om eller bekräftelse av virussmitta med infektiös laxanemi (ISA). Det bör fastställas kriterier för zonindelning och officiell övervakning.

(4) För att fastställa provtagningsplaner och diagnostiska metoder för påvisande och bekräftelse av ISA eller för att upprätta kriterier för zonindelning och officiell övervakning efter misstanke om eller bekräftelse av ISA har experter på fiskhälsa och laboratoriearbete konsulterats. Dessutom måste riktlinjerna för diagnostisering av ISA beaktas. Dessa återfinns i gällande utgåva av *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases* från Internationella byrån för epizootiska sjukdomar (OIE).

(5) Det bör fastställas en tillräcklig tidsfrist för genomförandet av dessa krav.

(6) De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från Ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Provtagningsplanerna och de diagnostiska metoderna för påvisande och bekräftelse av infektiös laxanemi (ISA) samt kriterierna för zonindelning och officiell övervakning vid misstanke om eller bekräftelse av ISA, fastställs i bilagan till det här beslutet.

Artikel 2

Detta beslut skall tillämpas från och med den 23 oktober 2003.

[1] EGT L 46, 19.2.1991, s. 1.
[2] EUT L 122, 16.5.2003, s. 1.
[3] EGT L 175, 19.7.1993, s. 23.
[4] EGT L 99, 10.4.2001, s. 11.
[5] EGT L 67, 9.3.2001, s. 65.

Artikel 3

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 13 juni 2003.

På kommissionens vägnar
David BYRNE
Ledamot av kommissionen

BILAGA

Provtagningsplaner och diagnostiska metoder för påvisande och bekräftelse av infektiös laxanemi (ISA) och kriterier för zonindelning och officiell övervakning vid misstanke om eller bekräftelse av ISA

INLEDNING OCH DEFINITIONER

Denna bilaga

a) fastställer riktlinjer och minimikrav för provtagningsplaner och diagnostiska metoder för påvisande och bekräftelse av infektiös laxanemi (ISA),

b) integrerar bestämmelser och definitioner från direktiven 91/67/EEG och 93/53/EEG,

c) fastställer bestämmelser som syftar till att genomföra korrekta diagnoser, kontroll och övervakning av ISA vid misstanke om eller bekräftelse av ISA,

d) riktar sig både till de myndigheter som ansvarar för kontrollen av ISA och den laboratoriepersonal som utför testerna för denna sjukdom. Texten är inriktad på provtagningsförfaranden, principer för och tillämpning av laboratorietester och utvärdering av testresultaten samt på detaljerade beskrivningar av laboratoriemetoder. Vid behov får laboratorierna dock anpassa de test som beskrivs i denna bilaga eller använda andra test, förutsatt att det kan visas att testens känslighet och specificitet är lika god eller bättre. Dessutom fastställs kriterier för inrättandet av zoner och officiell övervakning vid misstanke om eller bekräftelse av ISA.

I denna bilaga avses med

avrinningsområde: hela avrinningsområdet från vattendragens källor till flodmynningen, eller en del av ett avrinningsområde från vattendragens källor till en naturlig eller konstgjord barriär som hindrar fisk att ta sig nedströms om denna barriär.

kustnära zon: en zon som består av en del av kusten eller havet eller en flodmynning med en exakt geografisk avgränsning som utgör ett homogent hydrodynamiskt system eller serier av sådana system.

I del I fastställs de allmänna principerna och kriterier för diagnos och bekräftelse av ISA och kriterier för den zonindelning och den offentliga övervakning som skall genomföras efter misstanke om eller bekräftelse av ISA.

I del II fastställs vilka inspektioner och provtagningar som skall genomföras för att påvisa förekomsten av ISA.

I del III fastställs de metoder som skall användas vid virologiska undersökningar.

I del IV beskrivs förfarandet för undersökning av prover genom RT-PCR för påvisande av ISA.

I del V beskrivs det protokoll som skall användas för undersökning av njurimprint genom IFAT när det gäller ISA.

I del VI återfinns metoder för histologi.

I del VII återfinns de akronymer och förkortningar som används.

I. Kriterier för diagnos av isa och för upprättandet av zoner, vissa kontrollåtgärder och officiell övervakning

I.1 *Allmänna principer för diagnos av ISA*

Rimliga orsaker till misstanke om att fisk är smittad med ISA-virus anges i del I.2 till den här bilagan. Medlemsstaterna skall, vid misstanke om att fisk på en odling är smittad med ISA-virus, se till att en officiell undersökning genomförs så snart som möjligt för att bekräfta eller utesluta förekomst av sjukdomen med hjälp av inspektioner och kliniska undersökningar, samt insamling och urval av de prover och metoder för laboratorieundersökning som fastställs i del III–VI i den här bilagan. För att officiellt bekräfta förekomsten av ISA skall endera av de tre grupper kriterier som fastställs i del I.3 i den här bilagan uppfyllas.

I.2 *Misstanke om ISA-smitta*

I.2.1 Förekomst av ISA skall misstänkas om minst ett av följande kriterier är uppfyllt:

a) Tecken vid inspektion efter slakt överensstämmer med symtom på ISA, med eller utan kliniska tecken på sjukdomen. Tecken vid inspektion efter slakt och kliniska sjukdomstecken skall överensstämma med de som fastställs i den gällande utgåvan av OIE:s *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*.

b) Isolering och identifiering av ISA-virus i cellodling från ett prov från en fisk på odlingen i enlighet med del III.

c) Rimliga bevis på förekomst av ISA-virus från två oberoende laboratorietest som RT-PCR (del IV) och IFAT (del V).

d) Överföring av levande fisk till en odling där det finns rimliga skäl att misstänka att ISA förekom vid överföringen.

e) En undersökning har påvisat andra viktiga epidemiologiska kopplingar till anläggningar där ISA misstänks eller har bekräftats förekomma.

I.2.2 Misstanke om ISA kan uteslutas om fortgående undersökningar med minst en klinisk inspektion per månad under sex månader inte visar ytterligare betydande tecken på att ISA förekommer.

I.3 *Bekräftad ISA-smitta*

Förekomst av ISA skall anses bekräftad om kriterierna i a, b eller c är uppfyllda.

a) Kliniska tecken och tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på ISA enligt gällande utgåva av OIE:s *Manual for Aquatic Animal Diseases*, även döda och försvagade fiskar eller fiskar som beter sig onormalt, tecken på anemi, andra tecken vid inspektion efter slakt och patologiska förändringar kan iakttas och ISA-virus påvisas genom en eller flera av följande metoder:

i) Isolering och identifiering av ISA-virus i cellodling från minst ett prov från en fisk på odlingen i enlighet med del III.

ii) Påvisande av ISA-virus genom RT-PCR med hjälp av de metoder som beskrivs i del IV.

iii) Påvisande av ISA-virus i vävnader eller vävnadsberedning genom särskilda antikroppar mot ISA-virus (t.ex. IFAT på njurimprint enligt beskrivningen i del V).

b) Isolering och identifiering av ISA-virus i två prover från en eller flera fiskar på anläggningen som undersökts vid två tillfällen med den metod som beskrivs i del III.

c) Isolering och identifiering av ISA-virus från minst ett prov från en fisk på anläggningen med den metod som beskrivs i del III med bekräftande bevis på ISA-virus i vävnadsberedningar från en fisk på anläggningen med hjälp av antingen RT-PCR (del IV) eller IFAT (del V).

I.4 *Kriterier för upprättande och avförande av zoner för kontroll och officiell övervakning vid misstanke och bekräftelse av ISA*

I.4.1 Vid inrättandet av ett riskbaserat officiellt övervakningsprogram skall medlemsstaterna, i närheten av en anläggning där ISA-smitta officiellt misstänks eller har bekräftats, upprätta lämpliga kontroll- och övervakningszoner.

I.4.2 De zoner som skall inrättas skall definieras på grundval av en analys från fall till fall av riskerna för att sjukdomen sprids vidare. I enlighet med den epizootiologiska situationen skall det berörda avrinningsområdet eller den berörda kustnära zonen

— definieras som en kontrollzon, eller

— i omfattande avrinningsområden eller kustnära zoner delas upp i en kontrollzon och en övervakningszon om detta inte gör det svårare att förhindra spridning av ISA.

Ytterligare övervakningszoner får vid behov upprättas utanför avrinningsområdet eller den kustnära zonen.

I.4.3 De viktigaste aspekter som skall beaktas när zonerna upprättas är de som påverkar risken att sjukdomen sprids till odlad och vild fisk, såsom antal, andel och fördelning av fiskdödlighet på den anläggning som misstänks eller har bekräftats vara smittad med ISA-virus, orsaken till dödligheten, avstånd till närliggande anläggningar och deras täthet, kontaktanläggningar, arter på anläggningarna, förvaltning på drabbade och intilliggande anläggningar, hydrodynamiska villkor och andra faktorer av epidemiologisk betydelse som identifierats inom ramen för den epizootiologiska undersökning som genomförts i enlighet med artikel 5.2 och artikel 8 i direktiv 93/53/EEG.

I.4.4 Följande minimikriterier skall gälla för inrättandet av zoner:

I.4.4.1 En kontrollzon skall inrättas av medlemsstaten runt omkring en anläggning där förekomst av ISA-virus har bekräftats. Detta skall ske på följande sätt:

— I kustnära områden: området inom en cirkel med en radie som minst motsvarar tidvattnets förflyttning eller som är minst 5 km, med centrum på anläggningen med bekräftad ISA-virus-smitta, eller ett motsvarande område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

— I inlandet: hela avrinningsområdet runt den anläggning som bekräftats vara drabbad av ISA-virus. Medlemsstaten får för stora avrinningsområden begränsa zonens omfattning till delar av avrinningsområdet förutsett att ISA inte riskerar att spridas.

I.4.4.2 En tillfällig kontrollzon skall upprättas vid misstanke om förekomst av ISA. Samma kriterier skall ligga till grund för den tillfälliga kontrollzonen som för kontrollzonen.

I.4.4.3 Om så krävs skall medlemsstaten upprätta en övervakningszon utanför kontrollzonen i områden där det räcker med en mindre intensiv övervakning. Följande gäller för zonen:

— I kustnära områden: en zon runtom kontrollzonen, där områdena för tidvattnets förflyttning i de båda zonerna överlappar varandra, eller ett område runtom kontrollzonen som ingår i en radie på 10 km från centrum i kontrollzonen, eller ett område av motsvarande storlek som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

— I inlandet: vid behov, ett utvidgat område utanför den upprättade kontrollzonen.

I.5 *Driftuppehåll och avförande av upprättade områden*

I.5.1 Medlemsstatens behöriga myndighet skall se till att alla anläggningar i kontrollzonen tas ur drift under en period efter det att de har tömts på fisk och desinfekterats på det sätt som krävs. De anläggningar som bekräftats vara drabbade av ISA skall tas ur drift i minst sex månader. Den behöriga myndigheten skall efter en riskvärdering från fall till fall avgöra hur länge andra anläggningar i kontrollzonen skall tas ur drift. När alla anläggningar i kontrollzonen har tömts skall de vara ur drift samtidigt i minst sex veckor.

Den behöriga myndigheten får besluta om driftuppehåll på anläggningar i upprättade övervakningszoner.

I.5.2 Upprättade kontrollzoner får inte avföras och fyllas på innan alla anläggningar i zonerna har tömts på fisk, genomgått nödvändig desinfektion och tagits ur drift enligt I.5.1. När zonerna fylls igen skall kontrollzonerna övergå till övervakningszoner enligt I.4.4.3.

I.5.3 Tillfälliga kontrollzoner får inte avföras innan misstanken om ISA kan avfärdas enligt del I.2.2. Om ISA bekräftas enligt del I.3 skall den tillfälliga kontrollzonen övergå till kontrollzon.

I.5.4 Övervakningszonerna får inte avföras förrän efter två år efter det att kontrollzonen avförts.

I.6 *Officiell övervakning vid misstanke om eller bekräftelse av ISA*

I.6.1 Med hänvisning till artikel 5.2 och artikel 6 i direktiv 93/53/EEG och för att fastställa sjukdomens spridning och utveckling vid misstanke om eller bekräftelse av ISA på en anläggning måste ett riskbaserat övervakningsprogram genomföras av den behöriga myndigheten, eller av en kvalificerad fiskhälsoavdelning i samråd med och under övervakning av den behöriga myndigheten, på alla anläggningar i de upprättade zonerna.

I.6.2 För att tillämpa ett sådant officiellt övervakningsprogram måste den behöriga myndigheten, om så krävs genom besök på plats, identifiera alla anläggningar i de upprättade zonerna och göra en officiell räkning av fiskarna på anläggningarna uppdelat på arter, kategorier och antal, inbegripet dödlighetstal.

I.6.3 Efter den första officiella räkningen skall de anläggningar i de tillfälliga kontrollzonerna som har lax (*Salmo salar*) – eller någon annan art som anges i den senaste utgåvan av OIE:s *Aquatic Animal Health Code* som mottaglig för eller potentiell bärare av ISA – var fjortonde dag rapportera till den behöriga myndigheten om dödligheten. Om dödligheten ökar skall detta rapporteras per dag och per kasse. Den behöriga myndigheten skall genomföra en undersökning om dödligheten ökar på en anläggning.

Om misstanken bekräftas skall alla anläggningar i kontrollzonen rapportera varje vecka om dödlighet, per kasse och per dag, till den behöriga myndigheten.

Anläggningar i övervakningszoner skall rapportera om dödligheten var fjortonde dag till den behöriga myndigheten

Inspektionerna skall genomföras regelbundet året ut i de upprättade zonerna, enligt det schema som finns i tabell 1. Om klimatförhållandena gör det omöjligt att genomföra inspektionerna under en del av året får medlemsstaterna göra upp ett annat schema för inspektion i beredskapsplanen.

Tabell 1

Officiellt övervakningsprogram

Anläggningens placering	Minsta antal inspektioner per år	Minsta antal inspektioner per år efter det att kontrollzonen har avförts
Kontrollzon	12	
Övervakningszon	6	6
Tillfällig kontrollzon	6	

Övervakningsprogrammet skall genomföras till dess zonerna har avförts.

I.6.4 Inspektionerna samt urvalet, insamlingen, förberedelserna och transporten av proverna skall genomföras enligt del II.1–II.4. Proverna skall undersökas enligt del III–VI.

II. **Inspektioner och provtagning**

II.1. *Inspektion, urval och insamling av prover på en anläggning där det finns misstanke om ISA*

II.1.1 Vid de regelbundna inspektioner som genomförs inom ramen för det officiella övervakningsprogrammet enligt del I.6, och på alla anläggningar som misstänks vara smittade med ISA, skall alla delar av anläggningen (kassar, tråg eller dammar) inspekteras med avseende på förekomsten av döda och försvagade fiskar eller fiskar som beter sig onormalt. Om det är möjligt skall nyligen döda (ej ruttnande) och försvagade fiskar samt fiskar med onormalt beteende undersökas med avseende på kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på ISA enligt gällande utgåva av OIE:s *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*.

II.1.2 Om färska kliniska tecken på ISA upptäcks eller om en inspektör eller en veterinär har annan anledning att misstänka att fisken kan vara smittad skall prover tas på minst tio fiskar. Provet skall om möjligt utgöras av nyligen döda exemplar, försvagade fiskar eller fiskar med onormalt beteende. Om det inte finns tillräckligt många kliniskt påverkade fiskar skall provet kompletteras med friska fiskar som valts ut från de kassar, tråg eller dammar som har det högsta antalet döda fiskar eller fiskar med onormalt beteende.

II.1.3 Om det förekommer dödlighet, försvagade fiskar och onormalt beteende bland fiskar, men inte några kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med ISA är provtagning inte obligatoriskt, även om sådana prover som kan komma att krävas för att ställa en annan diagnos kan komma att tas enligt inspektörens eller veterinärens val.

II.1.4 Om fisk som lever vilt misstänks vara smittad med ISA skall medlemsstaterna se till att lämpliga prover tas och undersöks med lämpliga kliniska metoder och laboratoriemetoder enligt delarna II och III–VI för att utesluta eller bekräfta ISA och för en bedömning av om sjukdomsutbrottet utgör ett betydande hot mot odlad fisk.

II.2 *Beredning av fiskprover*

II.2.1 Prover för histologisk undersökning skall endast tas från nyligen dödad fisk som visar kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med sjukdomssymtomen. Eventuella yttre eller inre skador skall samlas in och i alla fall skall prover från lever, njurens mellersta del, hjärta och mjälte avlägsnas från enskilda fiskar med skalpell och läggas i 8–10 % (volym) buffrad formalinlösning. Förhållandet fixativ/lösning skall vara minst 20:1 för att vävnaderna skall bevaras på ett tillfredsställande sätt.

II.2.2 Vävnader för virologisk undersökning skall tas från alla fiskprover. Dubbla prover skall tas för att kunna göra bekräftelser. Delar av lever, främre delen av njuren, hjärta och mjälte skall avlägsnas från fisken med ett sterilt instrument och läggas i plaströr med 9 ml transportlösning, dvs. cellkulturmedium med antibiotika. En kombination av 12,5 µg/ml fungizon, 200 IU/ml polymixin B och 200 µg/ml kanamycin är lämplig, men andra kombinationer med dokumenterad effektivitet kan användas. Vävnader från upp till fem fiskar får samlas i ett rör med transportlösning och utgöra ett samlat prov. Vävnadens vikt i ett rör skall vara 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3 Njurimprint skall tas för IFAT-undersökning inom två timmar efter fiskens död. En bit av njurens mellersta del avlägsnas från fisken med hjälp av sterila instrument. Vävnaden torkas mot absorberande papper för att avlägsna blod och sedan upprepade gånger tryckas mot objektglas bestruket med poly-L-lysin. De enskilda avtrycken skall ligga intill varandra, men inte överlappa, för att ge ett enda kontinuerligt skikt av celler. Blod och vävnadsvätskor behöver inte användas i det här testet. Njurprovet bör inte lämnas att torka ut på det absorberande papperet eftersom detta kan leda till att blodet levrar sig med stora mängder serumproteiner som följd som fastnar på objektglaset. Imprinten skall lufttorka och sedan hållas svala och torra om de inte omedelbart skall fixeras. Imprinten skall fixeras inom 72 timmar efter provtagningen. Imprinten kan också frysas efter lufttorkning och lagras i upp till en månad vid – 20 °C före fixeringen.

II.2.4 Fisk som visar tecken på anemi får bedövas och hepariniserade blodprover tas omedelbart för hematologisk undersökning, som mätning av hematokrit.

II.2.5 Vävnad från analys enligt RT-PCR skall tas från alla fiskprover. En bit av den främre eller mellersta delen av njuren avlägsnas från fisken med hjälp av ett sterilt instrument och läggs i ett mikrofugrör med 1 ml RNA-bevarande lösning med dokumenterad effektivitet. Vävnad från upp till fem fiskar får samlas i ett rör med konserverande lösning och utgöra ett samlat prov. Vävnadens vikt i ett prov skall vara cirka 0,5 g. När fisken är för liten för att man skall kunna ta ett prov som väger så mycket får delar av njure, hjärta, mjälte, lever eller pylorusbihang tas, i den ordningen, så att provet kommer upp i 0,5 g.

II.3 *Transport av fiskprover*

II.3.1 Blodprover och rör med fiskvävnad för virologisk undersökning eller analys enligt RT-PCR skall placeras i isolerade behållare (t.ex. tjockväggiga polystyrenlådor) med så mycket is eller frysklampar att proverna hålls kylda under transporten till laboratoriet. Proverna får inte frysa och det skall finnas is kvar i transportbehållaren vid ankomsten, och om frysklampar används skall en eller flera av dessa vara delvis eller helt frusna. Vid exceptionella omständigheter får RT-PCR-prov och prover för virologisk undersökning snabbfrysas och transporteras till laboratoriet vid högst – 20 °C.

II.3.2 Objektglas för IFAT skall transporteras i hållare med tillräckligt mycket torkmedel för att hålla imprinten torra och kylda enligt ovan.

II.3.3 Om fiskvävnad transporteras i fixativ för histologisk undersökning skall de förvaras i läckagesäkra rör i stöttåliga behållare, t.ex. tjockväggiga polystyrenlådor.

II.3.4 Den virologiska undersökningen måste inledas så snart som möjligt inom 72 timmar efter insamling av proverna, om proverna inte har frusits. Provet för jämförande analys skall förvaras vid högst – 20 °C efter ankomst till laboratoriet.

II.3.5 Hel fisk får transporteras till laboratoriet om temperaturkraven under transporten kan uppfyllas, enligt II.3.1. Hel fisk kan förpackas i absorberande papper och transporteras i plastpåse, kyld enligt ovan.

II.3.6 Levande fisk får också transporteras, men endast under överinseende av det officiella organet.

II.3.7 För RT-PCR-analys av vävnader som bevarats i RNA-lösning (RNAlater) måste RNA-extraktion utföras inom en viss tid för prover som förvarats vid olika temperaturer. Tiderna framgår av tabellen nedan.

— 37 °C en dag.

— 25 °C en vecka.

— 4 °C en månad.

— – 20 °C utan tidsgräns.

II.3.8 All packning och etikettering måste följa nationella och internationella transportbestämmelser.

II.4 *Insamling av kompletterande diagnostiskt material*

Efter överenskommelse med det berörda diagnostiklaboratoriet får även andra fiskvävnader samlas in och beredas för kompletterande undersökning.

III. **Virologisk undersökning**

III.1 *Beredning av prov*

III.1.1 Om praktiska svårigheter uppstår som gör det omöjligt att ympa in celler inom 72 timmar efter insamling av vävnadsproverna får vävnaden frysas till – 80 °C i upp till 28 dagar. Vävnaderna får frysas och tinas endast en gång före undersökning.

III.1.2 Varje prov (samlat vävnadsprov i transportlösning) skall vara fullständigt homogeniserat med hjälp av en stomacher, blender eller mortel och mortelstöt, centrifugeras vid 2 000 till 4 000 × g i 15 minuter vid 0–6 °C, och supernatanten filtreras (0,45 µm) och inkuberas med en lika volym lämpligt utspädd pool av antiserum till de inhemska serotyperna av IPN-virus. Antiserumets koncentration måste vara minst 1:2 000 i ett 50 % plackneutralisationstest. Blandningen skall inkuberas i 1 timme vid minst 15 °C. Detta utgör ett inokulat.

Syftet med att behandla alla inokulat med antiserum mot IPN-viruset (ett virus som i vissa delar av Europa finns i 50 % av alla fiskprover) är att förhindra att CPE orsakad av IPN-virus utvecklas i inokulerade cellkulturer. Detta förkortar tiden för de virologiska undersökningarna och ger färre fall där förekomst av CPE skulle kunna uppfattas som en potentiell indikation på ISA-virus.

När prover kommer från produktionsenheter, som anses fria från IPN, kan behandling av inokulat med antiserum mot IPN utelämnas.

III.2 *Inokulering av cellkulturer*

III.2.1 SHK-1 celler (passage 80 eller lägre) eller TO-celler skall odlas i L-15-medium med 5 % fetalt bovinserum, 2 % (volym) 200 mM L-glutamin och 0,08 % (volym) 50 mM 2-merkaptoetanol i plattor med 12 eller 24 brunnar. Andra cellinjer med bevisad effektivitet och sensitivitet för isolering av ISA-virus får användas, med hänsyn till stamvariationer och olika stammars möjlighet att replikera i olika cellinjer. Organsuspension som behandlats med antiserum skall ympas in i unga aktivt växande cellodlingar så att den slutliga spädningen av vävnadsmaterialet i odlingsmediet blir 1:1 000. För varje organsuspension skall 40 µl inokulat läggas till en brunn med 2 ml odlingsmedium. För att minimera risken med korskontamination rekommenderas att separata plattor med 12 eller 24 brunnar används för prover från olika fiskodlingar.

III.2.2 En platta skall inte ympas utan användas som negativ kontroll. En separat platta skall ympas med ett referensisolat med ISA-virus som en positiv kontroll enligt nedanstående. 100 µl av en stamberedning av ISA-virus (minsta koncentration 10^7 $TCID50/ml^{-1}$) skall ympas i den första brunnen och blandas noga. En volym av detta material skall föras över från den första brunnen till den andra för att göra en utspädning på 1:10 och noga blandas. Detta skall upprepas över hela plattan för att göra sex tiofaldiga utspädningar. Stammar av ISA-virus kan förvaras vid – 80 °C i minst två år, men om de tinas måste de användas inom tre dagar. *Anm*: Korskontaminering av testplattorna med positivt kontrollmaterial måste undvikas. För att undvika detta skall positiva kontroller genomföras och hanteras separat från testplattorna.

III.2.3 Proven skall inkuberas vid 14 ± 2 °C i upp till 15 dagar.

III.3 *Mikroskopering*

Cellodlingarna skall undersökas med mikroskop avseende CPE, 5–7 och 12–14 dagar efter ympning. Om en pool uppvisar CPE skall förfaranden för virusidentifiering omedelbart inledas. Om ingen CPE iakttas senast dag 14 skall ett hemadsorptionstest (III.4) genomföras.

III.4 *Hemadsorption*

Replikation av ISA-virus i cellodlingar leder inte alltid till CPE. Därför skall varje brunn genomgå hemadsorptionstest enligt beskrivningen nedan eller så skall varje brunn genomgå IF-test enligt beskrivningen i III.6.1.

III.4.1 Cellodlingsmedium skall avlägsnas från varje brunn, även de med positiva och negativa kontroller, samt placeras i märkta sterila rör. 500 µl av en 0,2 % (volym) suspension av tvättade röda blodkroppar från kanin eller häst eller en 0,05 % (volym) suspension av tvättade röda blodkroppar från regnbågsforell eller lax skall tillsättas varje brunn och inkuberas i rumstemperatur under 45 minuter. De röda blodkropparna skall avlägsnas och varje brunn sköljas två gånger med L-15-medium. Varje brunn skall undersökas med mikroskop.

III.4.2 Förekomst av kluster med röda blodkroppar som är fästa vid ytan med SHK-1 eller TO-celler visar på trolig infektion med ortomyxovirus. Om ett hemadsorptionstest är positivt skall ett virusidentifieringstest omedelbart genomföras (III.6).

III.5 *Odling av sekundärkulturer eller passage*

III.5.1 Prov för sekundärkulturer tas dag 13–15. 225 µl supernatant tillsätts brunnar med färska aktivt växande SHK-1-celler i plattor med 12 brunnar och inkuberas vid 14 ± 2 °C i upp till 18 dagar. Cellodlingarna skall undersökas med mikroskop avseende CPE, 5–7 och 14–18 dagar efter ympning. Om en pool uppvisar CPE skall förfaranden för virusidentifiering omedelbart inledas. Om ingen CPE iakttas senast dag 14–18 skall ett hemadsorptionstest (III.4) genomföras.

III.5.2 Om cytotoxicitet uppträder inom inkubationens sju första dagar görs en sekundärkultur på detta stadium, och cellerna måste då inkuberas i 14–18 dagar varefter en ny sekundärkultur görs med ytterligare 14–18 dagars inkubation. Om cytotoxicitet uppträder efter sju dagar görs en enda sekundärkultur och cellerna inkuberas för att uppnå 28–36 dagars inkubation från den första ympningen.

III.5.3 Om primärkulturen kontamineras med bakterier måste testet genomföras på nytt med det vävnadshomogenat som förvarats vid – 80 °C. Före ympningen skall vävnadshomogenatet centrifugeras vid 4 000 × g under 30 minuter vid 0–6 °C och supernatanten filtreras vid 0,22 µm. Om bakteriell kontaminering sker när sekundärkulturen tas skall supernatanten filtreras vid 0,22 µm, ympas in i färska celler och inkuberas i ytterligare 14–18 dagar.

III.6 *Prover för identifiering av virus*

Om tecken på CPE kan observeras vid något stadium eller om hemadsorptionstestet är positivt skall virusidentifiering genomföras. Urvalsmetoderna för identifiering av ISA-virus är IF (III.6.1) och RT-PCR (del IV). Om det bedöms att andra virus kan förekomma rekommenderas att kompletterande virusidentifiering genomförs. Om dessa test inte har lett till en säker identifiering av viruset inom en vecka, skall supernatanten överföras till ett nationellt referenslaboratorium för fisksjukdomar eller till gemenskapens referenslaboratorium för fisksjukdomar för omedelbar identifiering.

III.6.1 IF (Immunofluorescens)

III.6.1.1 SHK-1 celler (passage 80 eller lägre) eller TO-celler skall odlas i L-15-medium med 5 % fetalt bovinserum, 2 % (volym) 200 mM L-glutamin och 0,08 % (volym) 50 mM 2-merkaptoetanol i plattor med 24 eller 96 brunnar och användas med 50 % konfluens. Andra cellinjer eller odlingsmedier med dokumenterad effektivitet kan också användas. 225 µl av förmodat virusinfekterad supernatant från odling skall tillsättas två brunnar, blandas och 225 µl överföras till två ytterligare brunnar, dvs. en spädning på 1:5. Två brunnar används för kontroll och skall följaktligen inte ympas. Prover från varje fiskodling hanteras på separata plattor, liksom viruskontrollen. En viruskontroll upprättas med ett referensisolat av ISA-virus.

III.6.1.2 Plattorna inkuberas vid 14 ± 2 °C och undersöks i mikroskop under upp till 7 dagar. När en tidig CPE iakttas eller om ingen CPE iakttas inom sju dagar är nästa steg fixering. Brunnarna sköljs då med PBS och fixeras genom inkubering med 80 % aceton under 20 minuter vid rumstemperatur. Plattorna lufttorkas och färgas omedelbart eller förvaras vid 0–6 °C i högst 24 timmar före färgningen.

III.6.1.3 Replikatbrunnar färgas med monoklonal antikropp 3H6F8 mot ISA-virus (eller annan antikropp med bevisad specificitet och effektivitet), späds i PBS och inkuberas vid 37 ± 4 °C i 30 minuter. Överskott av monoklonala antikroppar avlägsnas genom att plattorna sköljs tre gånger med 0,05 Tween 20 i PBS. Antimus IgG FITC-konjugat utspätt i PBS tillsätts varje brunn och inkuberas vid 37 ± 4 °C i 30 minuter. *Anm.*: Spädningarna av olika satser med monoklonala FITC-konjugerade antikroppar skall optimeras i varje laboratorium. Överskott av antikroppar avlägsnas genom att plattorna sköljs tre gånger med 0,05 Tween 20 i PBS.

III.6.1.4 Brunnarna skall omedelbart undersökas med ett inverterat fluorescensmikroskop med lämpligt filter för excitation av FITC. Ett test skall anses positivt om fluorescerande celler kan iakttas. För att ett test skall anses giltigt måste de positiva kontrollerna ge positivt resultat och de negativa kontrollerna ge negativa resultat.

IV. **Undersökning av prover genom RT-PCR**

IV.1 *I detta avsnitt beskrivs de förfaranden som krävs för PCR-amplifiering av en del av segment 8 av ISA-virusgenomet som får genomföras på fiskvävnader eller ISA-virus i odling*

IV.1.1 RNA-extraktion

a) RNAlater avlägsnas från varje prov. 1 ml DEPC-behandlad dH_2O tillsätts varje rör och rören centrifugeras vid 13 000 rpm i 5 minuter vid 0–6 °C.

b) Supernatanten avlägsnas från varje prov och 800 µl TRIzol (Invitrogen) eller annan reagent som är lika effektiv eller effektivare tillsätts varje prov och ett kontrollrör med lämpligt kontrollmaterial (400 µl dH_2O eller njurhomogenat från specificerad patogenfri fisk). Vid behov skall vävnaderna upplösas genom upprepad pipettering. Rören inkuberas vid rumstemperatur under fem minuter. 160 µl kloroform tillsätts varje rör och rören skakas kraftigt i tre minuter, därefter centrifugeras de vid 13 000 rpm i 15 minuter vid 0–6 °C.

c) Det övre vattenskiktet flyttas till ett märkt mikrofugrör på 1,5 ml med 500 µl isopropanol och rören inkuberas i 10 minuter vid rumstemperatur, sedan centrifugeras de vid 6 500 rpm i 15 minuter vid 0–6 °C.

d) Supernatanten avlägsnas och 1 ml 75-procentig etanol tillsätts RNA-pelleten. Rören centrifugeras sedan vid 6 500 rpm i 5 minuter vid 0–6 °C.

e) Supernatanten avlägsnas och rören lämnas öppna under cirka tre minuter så att den återstående etanolen avdunstar. 15 µl DEPC-behandlad dH2O tillsätts för att resuspendera pelletten, vortexa lätt vid behov.

f) En spektrometer används för att beräkna RNA-koncentrationen och provens renhet. Optisk täthet mäts vid 260 och 280 nm.

g) RNA som skall användas omedelbart (samma dag) kan tillfälligt förvaras vid 0–6 °C. RNA som inte skall användas omedelbart förvaras vid – 80 °C.

IV.1.2 RT (Omvänt transkriptas)

a) 2 µg RNA späds ut i DEPC-behandlad dH2O i 1,5 ml mikrofugrör. Om RNA-koncentrationen i ett prov är för låg för att man skall kunna använda 2 µg i RT-reaktionen skall en maximal mängd RNA användas. Utspädd RNA inkuberas vid 55–60 °C i tio minuter.

b) Rör som innehåller RNA placeras sedan på is och RT-reagenter tillsätts för att ge de slutliga koncentrationerna på 1 × buffert, 1mM dNTPs, 100 ng slumpmässigt utvalda hexamer, 20U RNase inhibitor och 200 U MMLV-RT i en total volym på 20 µl.

c) Rören inkuberas vid 37 °C i en timme.

d) DNA förvaras vid 0–6 °C tills det behövs och skall användas i PCR så snart som möjligt.

IV.1.3 PCR (Polymeras-kedjerreaktion)

a) 5 µl cDNA tillsättas i 45 µl PCR-blandning för att ge slutliga koncentrationer på 1 × buffert, 1,5mM $MgCl_2$, 0,2 mM vardera dNTP, 25 pmol för varje primer och 1U Taq polymeras. Primer är ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (forward primer) och ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (reverse primer). Negativa kontroller för extraktion, RT- och PCR-stegen skall ingå.

b) Rören placeras i en termocykler programmerad till 94 °C i fem minuter och därefter 35 cykler på 94 °C i en minut, 55 °C i en minut och 72 °C i 1 minut med slutlig inkubering vid 72 °C i fem minuter.

c) Resultaten av PCR bedöms efter elektrofores med en agarosgel på 2 % färgad med etidiumbromid och storleksmarkörer utmed proven och de negativa kontrollerna från RT- och PCR-etapperna. En enda PCR-produkt på 155bp skall anses påvisa förekomsten av RNA från ISA-virus. Prov som uppvisar ännu en produkt, på 310bp, skall också anses innehålla RNA från ISA-virus. Prov som ger flera PCR-produkter, även ett på cirka 155bp kan innehålla RNA av ISA-virus. Detta kan ytterligare undersökas med hjälp av DNA-prober eller nukleotidsekvensering.

IV.1.4 PCR-bekräftelse av isolering av ISA-virus i vävnadsodling

Om fullständig CPE har inträffat under virologisk undersökning av vävnadsprover i SHK-1 celler, skall 400 µl supernatant avlägsnas från brunnen och placeras i ett sterilt rör på 1,5 ml. RNA extraheras från detta prov som iIII.1 och RT-PCR genomförs. Om odlingar utan fullständig CPE används skall supernatanten avlägsnas, cellerna skrapas från brunnsytan eller flaskytan och placeras i ett sterilt rör på 1,5 ml för RNA-extraktion och RT-PCR.

IV.1.5 Bekräftelse av DNA-prob i PCR-produkter

a) Specificiteten för en 155bp PCR-product kan bedömas genom probning med en oligonukleotid som hybridiserar till en region av PCR-produkten, i primerna. PCR-produkterna skall genomgå elektrofores i agarosgel på 1 % vid sidan av storleksmarkörerna samt en positiv kontroll och de negativa kontrollerna från RT- och PCR-etapperna.

b) DNA skall genomgå metoden Southern blot och därigenom överföras på ett membran och den märkta oligonukleotiden (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') skall inkuberas med membranet efter lämplig prehybridisering.

c) Icke bunden prob och ospecifikt bunden prob skall tvättas från membranet och bunden prob visualiseras.

d) Prob bunden till ett fragment på 155bp (och 310 bp om sådan finns) utgör bevis på PCR:ets specificitet och anger att RNA från ISA-virus fanns i provet.

IV.1.6 Nukleotidsekvensering av PCR-produkter

PCR:ets specificitet kan bedömas genom undersökning av nukleotidsekvensen i 155 bp PCR-produkten.

a) PCR-produkten skall renas från agarosgel eller -lösning.

b) Fragmentet skall sekvenseras med samma primer som användas i PCR eller vektorprimer om kloning skett till en vektor före sekvenseringen.

c) Nukleotidsekvensen jämförs med ISA-virus segment 8 som finns i EMBL:s databas för nukleotidsekvenser (nummer Y10404, AJ012285, AJ242016).

d) Om en sekvens som motsvarar ISA-virus segment 8 finns utgör detta bevis för att provet innehöll RNA av ISA-virus.

V. **Undersökning av njurimprint med IFAT-test**

V.1 *Följande protokoll har upprättats för undersökning av njurimprint med IFAT-test*

V.2 *Preparering och färgning av imprint*

V.2.1 Objektglasen skall fixeras i aceton eller metanol/aceton (1:1) under tre minuter och lufttorkas. Före infärgningen skall varje objektglas undersökas och lämpliga områden på objektglaset inringas med ImmEdge™-penna, eller liknande markör, och sedan lufttorkas. Objektglaset placeras sedan i fixeringslösning (6 % skummjölk i PBS med 0,2 % Tween-20) och inkuberas under försiktig skakning i 30 minuter i rumstemperatur. Varje objektglas torkas och placeras horisontellt i en objektglaskassett innehållande vått mjukpapper för en fuktig atmosfär.

V.2.2 Varje objektglas täcks med en lösning av monoklonal antikropp 3H6F8 mot ISA-virus (eller annan antikropp med bevisad specificitet och effektivitet) och objektglaskassetten skall stängas och inkuberas på skak under 60 minuter i rumstemperatur. Antikroppen skall vanligtvis spädas mellan 1:10 och 1:100 i 1 % skummjölk, och den exakta spädningen måste fastställas för varje sats. Objektglasen sköljs tre gånger i trå minuter i PBS med 0,1 % Tween-20. Varje objektglas täcks med en lösning innehållande FITC get-anti-mus-konjugat i spädning 1:1 000 i 1 % skummjölk och inkuberas i fuktig miljö under 60 minuter i rumstemperatur. Objektglasen sköljs tre gånger i tre minuter i PBS med 0,1 % Tween-20. Varje objektglas täcks med CITIFLUOR™ -lösning (500 µl CITIFLUOR™ blandad med 1,5 ml 0,1 % (volym) Tween-20 i PBS) eller annat lämpligt odlingsmedium i tio minuter. Objektglasen sköljs tre gånger i PBS med 0,1 % Tween-20. Om motfärgning krävs kan varje objektglas täckas med propidiumjodid (0,01 mg/ml) i PBS med 0,1 % Tween-20 och inkuberas under tre minuter i rumstemperatur. Objektglasen sköljs tre gånger i tre minuter i PBS med 0,1 % Tween-20. Objektglasen torkas och prepareras med CITIFLUOR™ eller annat lämpligt odlingsmedium. Objektglasen förvaras i mörker vid 4 °C före mikroskopundersökning.

V.3 *Undersökning med fluorescensmikroskopi*

Varje objektglas undersöks med ett mikroskop för epi-fluorescensbelysning med lämpligt filter som exciterar FITC och får det att avge sin karakteristiska gröna fluorescens. Alla fält inom de områden som inringats med ImmEdge™-penna undersöks med 10× och 20× objektiv, och misstänkta områden (de som uppvisar grön fluorescens) undersöks ytterligare med 40× objektiv och faskontrast/fluorescensbelysning för säkerställande av att den fluorescerande färgningen är cellanknuten. Koordinaterna för de misstänkta områdena skall registreras för att fluorescensens art senare skall kunna bekräftas av en andra person. Efter undersökning utförd av en första person skall objektglas som är positiva eller misstänkta undersökas av en andra person och resultaten bekräftas.

V.4 *Kontroller*

V.4.1 Tre typer av kontroller måste göras för varje omgång objektglas som färgats för IFAT-test:

— Njurimprint från icke smittad atlantlax (negativ kontroll).

— Icke infekterad SHK-1-cellkultur eller annan mottaglig cellkultur (negativ kontroll).

— SHK-1-cellkultur eller annan mottaglig cellkultur infekterad med ISA-virus (positiv kontroll).

V.4.2 Som kompletterande positiv kontroll rekommenderas ett njurimprint från en atlantlax smittad med ISA-virus, om ett sådant finns tillgängligt.

V.4.3 Om positivt resultat erhålls med negativt kontrollprov skall testet betraktas som ogiltigt för alla objektglas i den omgången. Om alla objektglas i en omgång, inklusive positiv kontroll, är negativa skall testet betraktas som ogiltigt för alla objektglas i den omgången. I fall där misslyckade kontroller gör att en omgång objektglas blir ogiltig, skall objektglasen förstöras och reservimprintet användas.

V.5 *Undersökning av andra vävnader*

Denna teknik kan tillämpas på andra fiskvävnader som lever, mjälte och hjärta under förutsättning att en rimlig mängd endotelceller, leukocyter eller lymfocyter kan placeras på objektglaset. Färgningsförfarandet skall vara samma för varje vävnad, även om det för vissa vävnader kan vara lämpligare att utelämna färgningen med propidiumjodid och i stället använda faskontrastbelysning för att identifiera de celltyper som förekommer i njurimprintet.

VI. **Histologi**

Paraffininbäddade preparat snittas i 5 μm tjocklek och färgas med hematoxylin och eosin. Histologiska förändringar som är förknippade med ISA beskrivs i den aktuella utgåvan av OIE:s *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*.

VII. **Förkortningar**

cDNA	komplementärt DNA
CPE	cytopatisk verkan
DEPC	dietylpyrokarbonat
dNTP	deoxinukleotidtrifosfat
FITC	fluoresceinisotiocyanat
IF	immunofluorescens
IFAT	indirekt fluorescerande antikroppstest
OIE	Internationella byrån för epizootiska sjukdomar
IPN(V)	smittsam pankreatisk nekros (Infectious pancreatic necrosis) (virus)
ISA(V)	infektiös laxanemi (Infectious salmon anaemia) (virus)
PBS	fosfatbuffrad saltlösning
RNA	ribonukleinsyra
RT-(PCR)	polymeras-kedjereaktion med omvänt transkriptas (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
SHK-1	njurceller av lax (salmon head kidney cells)
$TCID_{50}$	vävnadskultur smittsam dos 50 %