

KOMISSION PÄÄTÖS,
tehty 26 päivänä toukokuuta 2003,
afrikkalaisen sikaruton taudinmäärityskäsikirjan hyväksymisestä

(tiedoksiannettu numerolla K(2003) 1696)

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

(2003/422/EY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon erityissäännöksistä afrikkalaisen sikaruton torjumiseksi ja direktiivin 92/119/ETY muuttamisesta Teschenin taudin ja afrikkalaisen sikaruton osalta 27 päivänä kesäkuuta 2002 annetun neuvoston direktiivin 2002/60/EY⁽¹⁾ ja erityisesti sen 18 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Direktiivin 2002/60/EY mukaan on tarpeen säätää yhtenäisistä diagnostisista menettelyistä, näytteenottomenetelmistä ja laboratoriotestien tulosten arviointiperusteista afrikkalaisen sikaruton toteamiseksi.
- (2) Kyseisen direktiivin mukaan yhteisön afrikkalaisen sikaruton vertailulaboratorion tehtävänä on yhteistyössä komission kanssa yhteensovittaa jäsenvaltioissa käytettäviä menetelmiä tämän taudin diagnosoinnissa muun muassa järjestämällä säännöllisesti vertailukokeita ja toimittamalla standardireagensseja yhteisön tasolla.
- (3) Afrikkalaisen sikaruton ei katsota vaarantavan ihmisten terveyttä.
- (4) On kehitetty laboratoriotestejä, joilla varmistetaan afrikkalaisen sikaruton nopea diagnoosi.
- (5) Afrikkalaisen sikaruton valvonnasta viime vuosina saadun kokemuksen ansiosta on voitu määritellä sopivimmat näytteenottomenetelmät ja laboratoriotestien tulosten arviointiperusteet tämän taudin oikean diagnoosin tekemiseksi eri tilanteissa.
- (6) On aiheellista hyväksyä kyseiset menetelmät ja arviointiperusteet sisältävä käsikirja.
- (7) Kansallisten diagnostisten laboratorioden olisi saatava tehdä muutoksia hyväksytyihin laboratoriotesteihin tai käyttää muita testejä, edellyttäen että voidaan osoittaa vastaava herkkyys ja spesifisyys.
- (8) Tässä päätöksessä säädetyt toimenpiteet ovat elintarvikeketjua ja eläinten terveyttä käsittelevän pysyvän komitean lausunnon mukaiset,

ON TEHNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

1. Hyväksytään afrikkalaisen sikaruton taudinmäärityskäsikirja.
2. Jäsenvaltioiden on varmistettava, että afrikkalaisen sikaruton toteaminen tapahtuu käsikirjassa määrättyjä diagnostisia menettelyjä, näytteenottomenetelmiä ja laboratoriotestien tulosten arviointiperusteita noudattaen ja perustuu:
 - a) taudin kliinisten oireiden ja kuolemanjälkeisten muutosten osoittamiseen,
 - b) viruksen, antigeenin tai genomien osoittamiseen sian kudosten-, veri- tai ulostenäytteistä,
 - c) spesifisen antigeenivasteen osoittamiseen verinäytteessä.

3. Poiketen siitä, mitä 2 kohdassa säädetään, direktiivin 2002/60/EY liitteessä IV mainitut kansalliset diagnostiset laboratoriot voivat tehdä muutoksia käsikirjassa tarkoitettuihin laboratoriotesteihin tai käyttää muita testejä edellyttäen, että voidaan osoittaa vastaava herkkyys ja spesifisyys.

Jos käytetään muutettuja testejä tai muita testejä, afrikkalaisesta sikarutosta vastaavan yhteisön vertailulaboratorion on arvioitava näiden muutettujen tai muiden testien herkkyys ja spesifisyys säännöllisin vertailukokein.

2 artikla

Tätä päätöstä sovelletaan 1 päivästä heinäkuuta 2003.

3 artikla

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 26 päivänä toukokuuta 2003.

Komission puolesta

David BYRNE

Komission jäsen

⁽¹⁾ EYVL L 192, 20.7.2002, s. 27.

LIITE

AFRIKKALAISEN SIKARUTON TAUDINMÄÄRITYSKÄSIKIRJA

I luku

Johdanto, tavoitteet ja määritelmät

1. Afrikkalaisen sikaruton (jäljempänä 'ASF') diagnosointimenettelyjen yhdenmukaisuuden varmistamiseksi tässä käsikirjassa:
 - a) annetaan ohjeet ja vähimmäisvaatimukset ASF:n oikean diagnosoinnin edellyttämistä diagnostisista menettelyistä, näytteenottomenetelmistä sekä perusteista, joilla arvioidaan kliinisiä tutkimuksia ja *post mortem* -tutkimuksia sekä laboratoriotestejä⁽¹⁾;
 - b) vahvistetaan bioturvallisuuden vähimmäisvaatimukset ja laatustandardit, joita on noudatettava ASF:n diagnosoinnista vastaavissa laboratorioissa ja näytteiden kuljetuksessa;
 - c) määritellään ASF:n diagnosoinnissa käytettävät laboratoriotestit ja ASF:n virusisolaattien geneettisessä tyyppityksessä käytettävät laboratoriotekniikat.
2. Tämä käsikirja on tarkoitettu ensisijaisesti afrikkalaisen sikaruton torjunnasta vastaavien viranomaisten käyttöön. Tämän vuoksi pääpaino on laboratoriotestien periaatteissa ja soveltamisessa sekä koetulosten arvioinnissa eikä yksityiskohtaisissa laboratoriomenetelmäohjeissa.
3. Tässä käsikirjassa käytetään direktiivin 2002/60/EY 2 artiklassa tarkoitettujen määritelmien lisäksi seuraavia määritelmiä:
 - a) 'epäilyllä tilalla' tarkoitetaan mitä tahansa sikatilaa, jonka yhden tai useamman sian epäillään saaneen ASF-virustartunnan, tai direktiivin 2002/60/EY 2 artiklan k alakohdassa määriteltyä kontaktitilaa;
 - b) 'epidemiologisella alayksiköllä' tai 'alayksiköllä' tarkoitetaan rakennusta, paikkaa tai läheistä maa-aluetta, jossa tilan sikaryhmiä pidetään siten, että ne ovat säännöllisesti suorassa tai epäsuorassa kosketuksessa toisiinsa, mutta samalla eristettyinä muista saman tilan sioista;
 - c) 'kontaktisioilla' tarkoitetaan sikoja, jotka ovat olleet tilalla viimeisten 21 vuorokauden aikana suorassa kosketuksessa sellaisen yhden tai useamman sian kanssa, jonka epäillään saaneen ASF-virustartunnan.

II luku

ASF:n kuvaus ja erotusdiagnoosiikka taudinmäärittelyssä

A. JOHDANTO

1. ASF:n aiheuttaa vaipallinen DNA-virus, joka kuuluu *Asfarviridae*-heimon *Asfivirus*-sukuun. ASF:n viruskantojen virulenssi vaihtelee, vaikka eri serotyyppejä ei ole löydetty.
2. ASF-virus on hyvin kestävä tartunnan saaneiden sikojen ulosteissa, sikojen ruhoissa ja tuoreessa sianlihassa sekä joissakin sianlihatuotteissa. Sen inaktivoimiseksi ympäristöstä on käytettävä asianmukaisia desinfiointiaineita.
3. Euroopassa tauti tarttuu yleensä nenän ja suun kautta eläinten joutuessa suoraan tai epäsuoraan kosketukseen tartunnan saaneisiin sikoihin tai viruksen saastuttaman rehun välityksellä. Kuitenkin alueilla, joilla esiintyy vektoreita⁽²⁾, näiden vektorien kautta tarttumisella on suuri merkitys viruksen kestävyteen ja leviämiseen. ASF voi levitä myös saastuneen aineksen epäsuoran kosketuksen kautta sekä ASF-virusta mekaanisesti kuljettavien purevien hyönteisten välittämänä. Tauti saattaa levitä myös tartunnan saaneiden karjujen siemennesteen välityksellä.
4. Itämisaika on yksittäisissä eläimissä 5—15 vuorokautta. Käytännön olosuhteissa kliiniset oireet saattavat kuitenkin ilmetä tilalla vasta useita viikkoja viruksen tarttumisen jälkeen tai vielä tätä myöhemminkin, jos kyseinen viruskanta on lievä.

⁽¹⁾ Määriteltäessä laboratoriotestejä varten otettavien näytteiden määrää on otettava huomioon myös käytettävien testien herkkyys. Niiden eläinten määrän, joista näytteitä otetaan, on oltava suurempi kuin tässä käsikirjassa ilmoitettu määrä, mikäli käytettävä testi ei ole kovin herkkä.

⁽²⁾ Direktiivin 2002/60/EY 2 artiklan r alakohdan mukaisesti määriteltynä.

5. ASF voi esiintyä akuutissa, subakuutissa ja kroonisessa muodossa, jotka eroavat toisistaan lähinnä viruksen virulenssin suhteen.
6. Tartunnasta kliinisesti toipuneiden sikojen viremia jatkuu vielä 40—60 vuorokautta, ja tällaisista sioista tulee viruksen kantajia. ASF-virus on voitu eristää kantajasiasta jopa kuuden kuukauden päästä tartunnasta.

B. AKUUTTI MUOTO

1. Taudin kliinisenä ensioireena on yleensä korkea kuume (yli 40 °C), johon liittyy apatia, ruokahaluttomuus, nopea ja vaikeutunut hengitys sekä silmä- ja sierainvuoto. Sioilla on liikkeen inkoördinaatiota ja ne painautuvat toisiaan vasten. Oireena voi myös olla tiineyden varhaisessa vaiheessa tapahtuvat luomiset. Joillakin sioilla voi esiintyä oksentelua ja ummetusta, toisilla taas veristä ripulia. Eläimellä on ihonalaista turvotusta tai verenpurkauksia erityisesti kehon ääreisosissa ja korvissa. Eläin saattaa vaipua koomaan ennen kuolemaa, joka seuraa 1—7 vuorokauden kuluessa kliinisten oireiden ilmenemisestä. Tilan sairastuvuus- ja kuolleisuusaste voi olla 100 prosenttia.

Kuolemanjälkeiset muutokset ovat tyypillisiä yleistyneelle verenvuodolle: yleistynyt verentungos koko ruhossa, verensekainen neste rinta- ja vatsaontelossa, suurentunut tumma perna, verihyytymän kaltaisia verenvuotoja imusolmukkeissa, erityisesti munuaisten, maksan ja mahalaukun imusolmukkeissa, petekkiaaliset (pistemäiset) verenvuodot munuaiskuoressa, medullan papilloissa ja munuaisaltaassa, vatsaontelon herakalvoissa, vatsalaukun ja suoliston limakalvoissa sekä sydämessä, sydämen ulko- ja sisäkalvossa, hydrotooraksi sekä petekkiaaliset verenvuodot keuhkopussissa.

2. Yleensä akuutti klassinen sikarutto muistuttaa kliinisesti ja patologisesti hyvin paljon akuuttia afrikkalaista sikaruttoa. Kun eläimen iholla ja korvissa on selvästi havaittavia verenpurkauksia, on syytä epäillä akuuttia klassista sikaruttoa tai afrikkalaista sikaruttoa. Samanlaisia muutoksia aiheuttavat vain harvat muut sairaudet.

Akuuttia afrikkalaista sikaruttoa on epäiltävä myös silloin, kun epäillään sikaruusua, sikojen lisääntymis- ja hengitysoireyhtymää, kumariinimyrkytystä, *purpura haemorrhagica* -oireita, PMWS-syndroomaa, PDNS-syndroomaa, salmonella- tai pasteurella-tartuntaa tai mitä tahansa kuumeista suolisto- tai hengityselinsairautta, johon antibiootitohoitteita ei tehoa.

C. SUBAKUUTTI MUOTO

Subakuutti muoto on tyypillinen taudin endeemisillä alueilla. Subakuutille tartunnan oireita ovat vaihteleva kuume, apatia ja keuhkokuume. Sydämen vajaatoiminta voi johtaa kuolemaan. Subakuutissa muodossa muutokset ovat samanlaiset kuin akuutissa muodossa mutta lievemmat. Tyypillisiä muutoksia ovat laajat verenpurkaukset imusolmukkeissa, munuaisissa ja pernassa, hengityselinten verentungos ja turvotus (ödeema) ja joissakin tapauksissa interstiellinen keuhkotulehdus.

D. KROONINEN MUOTO

Taudin kroonista muotoa esiintyy harvoin. Kroonisessa muodossa voidaan havaita sekundaarisia bakteeri-infektioita. Koska ASF:n kroonisen muodon kliiniset oireet ovat melko epämääräisiä, erotusdiagnosissa on otettava huomioon monien muiden sairauksien mahdollisuus. Kaikkien eläinten ruumiinlämpö ei välttämättä nouse, mutta ainakin joillakin tartunnan saaneen tilan sioilla voidaan todeta kuumetta.

Kroonisen AFS:n kliinisiä oireita voivat olla hengitysvaikeudet, luomiset, artriitti, ihon krooniset haavaumat tai nekroosi, jotka eivät vastaa ASF-virustartuntojen tyypillistä kliinistä kuvaa. Muutokset saattavat olla hyvin vähäisiä tai niitä ei ole ollenkaan. Tyypillisiä histopatologisia löydöksiä ovat laajentuneet imusolmukkeet ja perna, keuhkopussintulehdus, fibrininen sydänpussitulehdus sekä infiltoiva keuhkotulehdus. Paikallista juustoutunutta kuoliota ja keuhkon mineralisoitumista on myös havaittu.

III luku

Ohjeet tärkeimmistä huomioon otettavista kriteereistä tutkittaessa, onko tilalla syytä epäillä ASF-tartuntaa

1. Päätös siitä, epäilläänkö tilalla ASF-tartuntaa, tehdään seuraavien löydösten, kriteerien ja perusteiden pohjalta:
 - a) kliiniset ja patologiset löydökset sioista. Tärkeimmät huomioon otettavat kliiniset ja patologiset löydökset ovat seuraavat:
 - kuume, johon liittyy kaikenikäisten sikojen sairastuvuutta ja kuolleisuutta,
 - kuume, johon liittyy verenvuotoa, petekkiaalisia (pistemäisiä) verenvuotoja ja mustelmia, erityisesti imusolmukkeissa, munuaisissa, pernassa (joka on erityisesti taudin akuutissa muodossa suurentunut ja tumma) ja virtsarakossa sekä haavaumia sappirakossa;

- b) epidemiologiset löydökset. Tärkeimmät huomioon otettavat epidemiologiset löydökset ovat seuraavat:
- siat ovat olleet suorassa tai epäsuorassa kosketuksessa sikatilaan, jolla todistetusti esiintyy ASF-virusta,
 - tila on myynyt sikoja, joiden on myöhemmin todettu saaneen ASF-tartunnan,
 - emakoita on keinosiemennetty epäillystä toimituslähteestä peräisin olevalla siemennesteellä,
 - siat ovat olleet epäsuorassa tai suorassa kosketuksessa sellaisen luonnonvaraisen sikakannan kanssa, jossa esiintyy ASF-virusta,
 - sikoja pidetään ulkona alueella, jonka luonnonvaraisissa sioissa esiintyy ASF-virusta,
 - sioille on syötetty ruokajätettä, jota ei ehkä ole käsitelty asianmukaisesti ASF-viruksen tuhoamiseksi,
 - tila on saattanut altistua tartunnalle, esimerkiksi tilalle tartuntaepäilyltä tilalta tai tartuntatilalta tulevien henkilöiden tai kuljetusten kautta jne.
 - vektorien esiintyminen tilan alueella.
2. Tilaa on pidettävä epäiltynä tilana, jos kliinisten tai patologisten löydösten perusteella tilalla epäillään esiintyvän ASF:ää, mutta kliinisillä, epidemiologisilla ja laboratoriotutkimuksilla ei ole voitu vahvistaa kyseistä tautia eikä tunnista muuta tautilähdettä tai taudinaiheuttajaa kyseisellä tilalla.

IV luku

Tarkastus- ja näytteenottomenettelyt

A. OHJEET JA MENETTELYT EPÄILTYJEN TILOJEN SIKOJEN KLIINISTÄ TUTKIMUSTA JA NÄYTTEENOTTOA VARTEN

1. Jäsenvaltioiden on varmistettava, että epäilyillä tiloilla suoritetaan asianmukaiset kliiniset tarkastukset, näytteidenotto ja laboratoriotutkimukset ASF:n esiintymisen varmistamiseksi tai poissulkemiseksi 2—6 alakohdassa annettujen ohjeiden ja menettelyjen mukaisesti.

Riippumatta siitä, onko kyseisellä tilalla toteutettu direktiivin 2002/60/EY 4 artiklan 2 kohdassa tarkoitettujen toimenpiteiden, näitä ohjeita ja menettelyjä on sovellettava myös aina kun ASF on yhtenä osana erotusdiagnoosia. Tämä koskee myös tilanteita, joissa ASF:n esiintymisen todennäköisyys on havaittujen kliinisten oireiden ja taudin epidemiologisen kulun perusteella hyvin pieni.

Kaikissa muissa tapauksissa, joissa yhden tai useamman sian epäillään saaneen ASF-tartunnan, direktiivin 2002/60/EY 4 artiklan 2 kohdassa tarkoitettujen toimenpiteiden on toteutettava kyseisellä epäilyllä tilalla.

Jos ASF:ää epäillään teurastamossa tai kuljetusvälineessä olevissa sioissa, 2—6 alakohdassa annettuja ohjeita ja menettelyjä on myös sovellettava soveltuvin osin.

2. Kun virkaeläinlääkäri käy epäilyllä tilalla ASF:n esiintymisen varmistamiseksi tai poissulkemiseksi

- tilan tuotanto- ja terveystiedot on tarkistettava, jos nämä tiedot ovat käytettävissä; tilan kaikki alayksiköt on tarkastettava kliinisesti tutkittavien sikojen valitsemiseksi.

Kliiniseen tutkimukseen on sisällyttävä ruumiinlämmön mittausta, jonka ensisijaisina kohteina ovat seuraavanlaiset siat tai sikaryhmät:

- sairaat tai ruokahaluttomat siat,
- siat, jotka on äskettäin tuotu tilalle paikoista, joissa taudinpurkaus on varmistettu, tai joiden lähtöpaikka on muutoin epäilyksen alainen,
- sellaisissa tilan alayksiköissä pidetyt siat, joissa on äskettäin käynyt ulkopuolisia vierailijoita, jotka ovat puolestaan olleet äskettäin läheisessä kosketuksessa ASF:ään sairastuneisiin tai mahdollisesti sairastuneisiin sikoihin, tai joilla on ollut muita erityisen riskialttiita yhteyksiä mahdolliseen ASF-viruksen tautilähteeseen,
- siat, joista on jo otettu näytteet ja jotka on tutkittu serologisesti ASF:n varalta, mikäli näiden testien perusteella ei voida sulkea pois ASF:ää, sekä kontaktisiat,
- hiljattain taudista toipuneet siat.

Rajoittamatta direktiivissä 2002/60/EY säädettyjä muita toimenpiteitä kyseisellä tilalla, jos epäillyn tilan tarkastuksessa ei löydy edellä mainitussa alakohdassa tarkoitettuja sikoja tai sikaryhmiä, toimivaltaisen viranomaisen on epidemiologinen tilanne huomioon ottaen toimittava seuraavasti:

- suoritettava kyseisellä tilalla jatkotutkimuksia jäljempänä olevan 3 alakohdan mukaisesti, tai
 - varmistettava, että kyseisen tilan sioista otetaan verinäytteitä laboratoriokokeita varten. Tällaisessa tapauksessa sovelletaan 5 alakohdassa ja F kohdan 2 alakohdassa määriteltyjä näytteenottomenettelyjä, tai
 - sovellettava tai toteutettava edelleen direktiivin 2002/60/EY 4 artiklan 2 kohdassa säädettyjä toimenpiteitä, kunnes kyseisen tilan jatkotutkimukset on suoritettu, tai
 - suljettava pois ASF:n epäily.
3. Tähän kohtaan viitattaessa kliininen tutkimus on tehtävä sattumanvaraisesti valituille sioille kyseisen tilan niissä alayksiköissä, joiden on todettu tai epäillään olleen alttiina ASF-viruksen tartunnalle.

Tutkittavien sikojen vähimmäismäärän näissä alayksiköissä on oltava sellainen, että kuumeen 10 prosentin esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella.

4. Jos epäillyltä tilalta löydetään kuolleita tai kuolevia sikoja, on suoritettava *post mortem* -tutkimus mieluiten vähintään viidelle näistä sioista, ja erityisesti sioille
- joilla on ollut ennen kuolemaa taudin selviä oireita,
 - joilla on korkea kuume,
 - jotka ovat kuolleet äskettäin.

Jos näissä tutkimuksissa ei ole ilmennyt ASF:ään viittaavia muutoksia, mutta lisätutkimukset katsotaan epidemiologisen tilanteen vuoksi tarpeellisiksi, on otettava huomioon seuraavat seikat:

- siinä tilan alayksikössä, jossa kuolleita tai kuolevia sikoja pidettiin, on suoritettava 3 alakohdan mukainen kliininen tutkimus ja otettava 5 alakohdan mukaiset verinäytteet, ja
- *post mortem* -tutkimus voidaan suorittaa 3—4 kontaktisialle, erityisesti jos näissä sioissa havaitaan kliinisiä oireita.

Riippumatta siitä, onko AFS:ään viittaavia muutoksia havaittu, niiltä sioilta, joille on tehty *post mortem* -tutkimus, on otettava elin- tai kudospäätteitä virologisia testejä varten V luvun B kohdan 1 alakohdan mukaisesti. Nämä näytteet on otettava mieluiten äskettäin kuolleista sioista.

Post mortem -tutkimuksia suoritettaessa toimivaltaisen viranomaisen on varmistettava, että

- taudin leviämisen ehkäisemiseksi toteutetaan tarvittavat varo- ja hygieniatoimenpiteet, ja
 - kuolevat siat lopetetaan eläinsuojelullisesti hyväksyttävällä tavalla eläinten suojelusta teurastus- tai lopettamishetkellä 22 päivänä joulukuuta 1993 annetun neuvoston direktiivin 93/119/ETY⁽¹⁾ sellaisena kuin se on muutettuna asetuksella (EY) N:o 806/2003⁽²⁾ säännösten mukaisesti.
5. Jos epäillyllä tilalla havaitaan muita ASF:ään viittaavia kliinisiä oireita tai muutoksia, mutta toimivaltainen viranomainen katsoo, että nämä löydökset eivät ole riittäviä ASF:n esiintymisen varmistamiseksi ja että laboratoriotestit ovat tämän vuoksi tarpeen, epäilyistä sioista ja muista sioista jokaisessa alayksikössä, joissa epäiltyjä sikoja pidetään, on otettava verinäytteet laboratoriotestejä varten jäljempänä esitettyjen menettelyjen mukaisesti:
- a) serologisia testejä varten otettavien näytteiden vähimmäismäärän on oltava sellainen, että taudin 10 prosentin serologinen esiintyvyys voidaan havaita 95 prosentin varmuudella kyseisessä alayksikössä;
 - b) virologisia testejä varten otettavien näytteiden määrän on oltava toimivaltaisen viranomaisen ohjeiden mukainen. Viranomainen ottaa huomioon niiden testien valikoiman, jotka voidaan toteuttaa, käytettävien laboratoriotestien herkkyden ja epidemiologisen tilanteen.

⁽¹⁾ EYVL L 340, 31.12.1993, s. 21.

⁽²⁾ EUVL L 122, 16.5.2003, s. 1.

6. Jos epäillyn tilan sioissa ei havaita tutkimuksessa ASF:ään viittaavia kliinisiä oireita tai muutoksia, mutta toimivaltainen viranomainen pitää useampia laboratoriotestejä tarpeellisina ASF:n poissulkemiseksi, edellä 5 alakohdassa määriteltyjä näytteenottomenettelyjä käytetään ohjeistuksena.

B. NÄYTTEENOTTOMENETTELYT TILALLA, JONKA SIAT LOPETETAAN, KUN TAUTI ON TODETTU

1. Kun tilan sikoja lopetetaan taudinpurkauksen toteamisen jälkeen direktiivin 2002/60/EY 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti, niistä on otettava pistokokeina verinäytteitä serologisia testejä varten, jotta voidaan määrittää ASF-viruksen kulkeutumistapa tartuntatilalle sekä sen kulkeutumisesta kulunut aika.
2. Tutkittavien sikojen vähimmäismäärä tilan jokaisessa alayksikössä on oltava sellainen, että 10 prosentin seropositiivisuuden esiintyminen voidaan havaita 95 prosentin varmuudella ⁽¹⁾.

Virologisia testejä varten on otettava näytteitä myös noudattamalla toimivaltaisen viranomaisen ohjeita. Viranomainen ottaa huomioon niiden testien valikoiman, jotka voidaan toteuttaa, käytettävien laboratoriotestien herkkyyden ja epidemiologisen tilanteen.

Alueilla, joilla on aikaisemmin todettu ASF-virustartunnan saaneita vektoreita, on myös kerättävä asianmukaisia kokoelmia pehmeistä puutiaisista virologisia testejä varten toimivaltaisen viranomaisen ja direktiivin 2002/60/EY liitteen III ohjeiden mukaisesti.

3. Sekundaaritaudinpurkauksissa toimivaltainen viranomainen voi kuitenkin päättää poiketa 1 ja 2 alakohdan säännöksistä ja käyttää muita näytteenottomenettelyjä ottaen huomioon jo käytettävissä olevat epidemiologiset tiedot viruksen lähteestä ja kulkeutumistavasta tilalle sekä taudin mahdollisesta leviämisestä tilan ulkopuolelle.

C. NÄYTTEENOTTOMENETTELYT TEURASTETTAESSA EPÄILLYN TILAN SIKOJA ENNALTA EHKÄISEVÄNÄ TOIMENPITEENÄ

1. Kun epäillyn tilan sikoja lopetetaan ennalta ehkäisevänä toimenpiteenä direktiivin 2002/60/EY 4 artiklan 3 kohdan a alakohdan tai 7 artiklan 2 kohdan mukaisesti, on otettava verinäytteitä serologisia ja virologisia testejä varten 2 kohdassa mainitun menettelyn mukaisesti ASF:n esiintymisen varmistamiseksi tai poissulkemiseksi tai epidemiologisten lisätietojen keräämiseksi.

2. Näytteitä on otettava ensisijaisesti

- sioista, joiden oireet tai kuolemanjälkeiset muutokset viittaavat ASF:ään, sekä näiden kanssa kontaktissa olleista sioista,
- muista sioista, joilla on saattanut olla altistavia kontakteja tartunnan saaneisiin tai tartunnan saaneiksi epäiltyihin sikoihin, tai joiden epäillään saaneen ASF-viruksen. Näistä sioista on otettava näytteet toimivaltaisen viranomaisen ohjeiden mukaisesti. Viranomainen ottaa epidemiologisen tilanteen huomioon.

Lisäksi tilan kunkin alayksikön sioista on otettava näytteitä pistokokeina ⁽²⁾. Tällaisessa tapauksessa serologisia testejä varten otettavien näytteiden vähimmäismäärän on oltava sellainen, että kyseisessä alayksikössä voidaan todeta 10 prosentin seropositiivisuuden esiintyminen 95 prosentin varmuudella.

Virologisia testejä varten otettavien näytteiden tyyppin ja käytettävän testin on oltava toimivaltaisen viranomaisen ohjeiden mukaisia. Viranomainen ottaa huomioon niiden testien valikoiman, jotka voidaan toteuttaa, näiden testien herkkyyden ja epidemiologisen tilanteen.

⁽¹⁾ Jos direktiivin 2002/60/EY 6 artiklan 1 kohdan poikkeusta on sovellettu, näytteet on otettava sen tilan alayksikön sioista, jonka sikoja on lopetettu, rajoittamatta kuitenkaan tilan jäljellä oleville sioille suoritettavia lisätarkastuksia ja näytteenottoa, jotka suoritetaan toimivaltaisen viranomaisen ohjeiden mukaisesti.

⁽²⁾ Jos toimivaltainen viranomainen on kuitenkin rajoittanut ennalta ehkäisevän lopettamisen direktiivin 2002/60/EY 4 artiklan 3 kohdan a alakohdan mukaisesti vain tilan siihen osaan, jonka sikojen epäillään saaneen ASF-viruksen, näytteitä on otettava tilan sen alayksikön sioista, jossa tätä toimenpidettä on sovellettu, sanotun kuitenkaan rajoittamatta tilan muille sioille suoritettavia lisätutkimuksia ja näytteenottoa, jotka suoritetaan toimivaltaisen viranomaisen ohjeiden mukaisesti.

D. TARKASTUS- JA NÄYTTEENOTTOMENETTELYT ENNEN KUIN VOIDAAN MYÖNTÄÄ LUPA SIIRTÄÄ SIKOJA POIS SUOJA- TAI VALVONTAVYÖHYKKEILLÄ OLEVILTA TILOILTA JA SILLOIN, KUN NÄMÄ SIAT TEURASTETAAN TAI LOPETETAAN (DIREKTIIVIN 2002/60/EY 10 JA 11 ARTIKLA)

1. Rajoittamatta direktiivin 2002/60/EY 11 artiklan 1 kohdan f alakohdan toisen luetelmakohdan säännöksiä, jotta voidaan myöntää lupa sikojen siirtämiselle pois suoja- ja valvontavyöhykkeiltä mainitun direktiivin 10 artiklan 3 kohdan mukaisesti, virkelaäinlääkärin suorittama kliininen tutkimus

- on suoritettava sikojen siirtoa edeltävien 24 tunnin aikana,
- on suoritettava A kohdan 2 alakohdan säännösten mukaisesti.

2. Jos sikoja siirretään toiselle tilalle, sioille on suoritettava edellä mainitun 1 alakohdan mukaisten tutkimusten lisäksi kliininen tutkimus, johon sisältyy ruumiinlämmön mittaaminen osalta sioista, tilan jokaisessa alayksikössä, jossa siirrettäviä sikoja pidetään.

Tutkittavien sikojen vähimmäismäärän näissä alayksiköissä on oltava sellainen, että voidaan todeta kuumeen 10 prosentin esiintyvyys 95 prosentin varmuudella.

3. Jos sikoja siirretään teurastamoon, prosessointilaitokseen tai muuhun paikkaan teurastettaviksi tai lopetettaviksi, sioille on suoritettava edellä mainitun 1 alakohdan mukaisten tutkimusten lisäksi kliininen tutkimus jokaisessa alayksikössä, jossa siirrettäviä sikoja pidetään. Jos siat ovat yli kolmen—neljän kuukauden ikäisiä, osalta sioista on myös mitattava ruumiinlämpö tutkimuksen yhteydessä.

Tutkittavien sikojen vähimmäismäärän kyseisessä alayksikössä on oltava sellainen, että voidaan todeta kuumeen 20 prosentin esiintyvyys 95 prosentin varmuudella.

4. Kun 3 alakohdassa tarkoitettut siat teurastetaan tai lopetetaan, jokaisen alayksikön, josta sikoja on siirretty, sioista on otettava verinäytteitä serologisia testejä varten tai veri- tai elinnäytteitä (esimerkiksi tonsillat, perna tai imusolmukkeet) virologisia testejä varten.

Otettavien näytteiden vähimmäismäärän jokaisessa alayksikössä on oltava sellainen, että 10 prosentin seropositivisuuden tai viruksen esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella.

Otettavien näytteiden tyyppin ja käytettävän testin on oltava toimivaltaisen viranomaisen ohjeiden mukaisia. Viranomainen ottaa huomioon niiden testien valikoiman, jotka voidaan toteuttaa, näiden testien herkkyyden ja epidemiologisen tilanteen.

5. Jos sikojen teurastuksen tai lopetuksen yhteydessä kuitenkin havaitaan ASF:ään viittaavia kliinisiä oireita tai kuolemanjälkeisiä muutoksia, C kohdassa annettuja näytteenottoa koskevia säännöksiä sovelletaan 4 alakohdasta poiketen.

6. Direktiivin 2002/60/EY 10 artiklan 5 kohdassa ja 11 artiklan 4 kohdassa säädetty poikkeus voidaan myöntää, jos toimivaltaiset viranomaiset varmistavat, että tehokasta näytteenotto- ja testausohjelmaa sovelletaan myös 2, 3 ja 4 alakohdassa tarkoitettuihin sikaryhmiin, jotka on tarkastettava tai joista on otettava näytteitä. Tässä ohjelmassa verinäytteiden vähimmäismäärän on oltava sellainen, että kyseisessä sikaryhmässä voidaan todeta 5 prosentin seropositivisuuden esiintyminen 95 prosentin varmuudella.

E. TARKASTUS- JA NÄYTTEENOTTOMENETTELYT TILAN SIKAKANTAA UUSITTAESSA

1. Kun tilalle tuodaan uusia sikoja direktiivin 2002/60/EY 13 artiklan 3 kohdan mukaisesti, on noudatettava seuraavia näytteenottomenettelyjä:

- verinäytteet on otettava aikaisintaan 45 vuorokauden kuluttua sikojen tuonnista,
- jos tilalle tuodaan sentinellisikoja, tilan jokaisessa alayksikössä on otettava verinäytteitä pistokokeina serologisia testejä varten sellaisesta sikamäärästä, että 10 prosentin seropositivisuuden esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella,
- jos tilan koko sikakanta uusitaan, tilan jokaisessa alayksikössä on otettava pistokokeina verinäytteitä serologisia testejä varten sellaisesta sikamäärästä, että 20 prosentin seropositivisuuden esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella.

2. Kun tilalle tuodaan uusia sikoja direktiivin 2002/60/EY 13 artiklan 4 kohdan mukaisesti, on noudatettava seuraavia näytteenottomenettelyjä:

- verinäytteet on otettava aikaisintaan 45 vuorokauden kuluttua sikojen tuonnista,
- jos tilalle tuodaan sentinellisikoja, tilan jokaisessa alayksikössä on otettava verinäytteitä pistokokeina serologisia testejä varten sellaisesta sikamäärästä, että 5 prosentin seropositiivisuuden esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella,
- jos tilan koko sikakanta uusitaan, tilan jokaisessa alayksikössä on otettava pistokokeina verinäytteitä serologisia testejä varten sellaisesta sikamäärästä, että 10 prosentin seropositiivisuuden esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella.

Tällöin kolmannessa luetelmakohdassa määritelty menettely on toistettava aikaisintaan 60 vuorokauden kuluttua koko sikakannan uusimisesta.

3. Kun tilalle on tuotu uusia eläimiä, toimivaltaisen viranomaisen on varmistettava, että tilan sikojen sairastuessa tai kuollessa tuntemattomasta syystä kyseiset siat tutkitaan välittömästi ASF:n varalta.

Näitä säännöksiä sovelletaan siihen asti, kun direktiivin 2002/60/EY 13 artiklan 3 kohdan a ja b alakohdassa ja 4 kohdassa tarkoitettuja sikojen siirtämistä koskevia rajoituksia lakataan soveltamasta kyseisen tilan osalta.

F. NÄYTTEENOTTOMENETTELYT SUOJAVYÖHYKKEELLÄ OLEVILLA TILOILLA ENNEN RAJOITUSTEN POISTAMISTA

1. Jotta direktiivin 2002/60/EY 10 artiklassa tarkoitettuja toimenpiteitä voitaisiin lakata soveltamasta suojavyöhykkeellä, kaikilla vyöhykkeen tiloilla on:

- suoritettava kliininen tarkastus A kohdan 2 ja 3 alakohdassa annettujen menettelyjen mukaisesti,
- otettava verinäytteitä serologisia testejä varten jäljempänä olevan 2 alakohdan mukaisesti.

2. Otettujen verinäytteiden vähimmäismäärän tilan jokaisessa alayksikössä on oltava sellainen, että 10 prosentin seropositiivisuuden esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella.

Kuitenkin direktiivin 2002/60/EY 10 artiklan 5 kohdassa ja 11 artiklan 4 kohdassa säädetty poikkeus voidaan myöntää vain, jos toimivaltainen viranomainen varmistaa, että verinäytteiden määrän perusteella pystytään 5 prosentin seropositiivisuuden esiintyvyys toteamaan 95 prosentin varmuudella tilan kussakin alayksikössä.

G. NÄYTTEENOTTOMENETTELYT VALVONTAVYÖHYKKEELLÄ OLEVILLA TILOILLA ENNEN RAJOITUSTEN POISTAMISTA

1. Jotta direktiivin 2002/60/EY 11 artiklassa tarkoitetut rajoitukset voidaan poistaa valvontavyöhykkeellä, vyöhykkeen kaikilla tiloilla on suoritettava A kohdan 2 alakohdan mukainen kliininen tarkastus.

Lisäksi on otettava verinäytteitä serologisia testejä varten sioista

- muilla tiloilla, joilla toimivaltainen viranomainen katsoo näytteenoton tarpeelliseksi,
- kaikilla keinosiemennysasemilla.

2. Kun verinäytteitä otetaan serologisia testejä varten valvontavyöhykkeellä sijaitsevilla tiloilla, otettavien verinäytteiden määrän on oltava F kohdan 2 alakohdan ensimmäisen virkkeen mukainen.

Kuitenkin direktiivin 2002/60/EY 10 artiklan 5 kohdassa ja 11 artiklan 4 kohdassa säädetty poikkeus voidaan myöntää vain, jos toimivaltainen viranomainen varmistaa, että kullakin valvontavyöhykkeen tilalla otetaan verinäytteitä serologisia testejä varten. Otettujen verinäytteiden vähimmäismäärän tilan jokaisessa alayksikössä on oltava sellainen, että 5 prosentin seropositiivisuuden esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella.

H. SEROLOGINEN VALVONTA JA NÄYTTEENOTTOMENETTELYT ALUEILLA, JOIDEN LUONNONVARAISISSA SIOISSA EPÄILLÄÄN ASF:ÄÄ TAI JOIDEN LUONNONVARAISISSA SIOISSA TAUTI ON TODETTU

1. Kun luonnonvaraisten sikojen serologista seuranta tehdään sellaisilla alueilla, joilla ASF on vahvistettu tai sitä epäillään, näytteenoton kohdepopulaation koko ja kohdealue olisi määriteltävä ennalta tarvittavan näytemäärän selvittämiseksi. Näytteiden määrä on laskettava arvioidun elävien eläinten määrän, eikä ammuttujen eläinten määrän perusteella.
2. Jos populaation tiheys- ja kokotiedot eivät ole käytettävissä, maantieteellistä näytteenottoaluetta määritettäessä selvitetään alueella jatkuvasti oleskelevien luonnonvaraisten sikojen määrä sekä ne luonnolliset tai keinotekoiset esteet, jotka estävät tehokkaasti eläinten laajamittaista ja jatkuvaa liikkumista. Jos tällaisia esteitä ei ole, tai kun kyseessä on suuri alue, näytteenottoalueiksi on suositeltavaa määritellä noin 200 neliökilometrin suuruisia alueita, joilla elää yleensä 400—1 000 luonnonvaraista sikaa.
3. Niiden sikojen vähimmäismäärän, joista otetaan näytteitä määritellyllä näytteenottoalueella, on oltava sellainen, että 5 prosentin seropositivisuuden esiintyvyys voidaan todeta 95 prosentin varmuudella, sanotun kuitenkin rajoittamatta direktiivin 2002/60/EY 15 artiklan 2 kohdan c alakohdan säännösten soveltamista. Tästä syystä kullakin määritellyllä alueella on otettava näytteet vähintään 56 eläimestä.
4. Ammutuista tai kuolleina löydettyistä luonnonvaraisista sioista on otettava virologisia testejä varten V luvun B kohdan 1 alakohdan mukaiset näytteet.

Kun ammuttujen luonnonvaraisten sikojen virologinen valvonta katsotaan tarpeelliseksi, se on kohdistettava ensisijaisesti alle vuoden ikäisiin eläimiin.

5. Kaikkien laboratorioon lähetettävien näytteiden mukaan on liitettävä direktiivin 2002/60/EY 16 artiklan 3 kohdan h alakohdassa tarkoitettu kyselylomake.

V luku

Yleiset menettelyt ja arviointiperusteet näytteenottoa ja näytteiden kuljetusta varten

A. YLEISET MENETTELYT JA ARVIOINTIPERUSTEET

1. Ennen saastuneeksi epäillyllä tilalla tehtävää näytteenottoa on laadittava kartta tilasta ja määriteltävä tilan epidemiologiset alayksiköt.
2. Aina, kun katsotaan, että uusintänäytteiden ottaminen saattaa tulla tarpeelliseksi, kaikki siat, joista näytteitä otetaan, on merkittävä yksilöllisesti siten, että niistä on helppo ottaa uusintänäytteet.
3. Kaikkiin laboratorioon lähetettäviin näytteisiin on liitettävä asianmukaiset lomakkeet toimivaltaisen viranomaisen määrittelemien vaatimusten mukaisesti. Näissä lomakkeissa on yksityiskohtaisia taustatietoja niistä sioista, joista näytteitä on otettu, sekä havaituista kliinisistä oireista tai kuolemanjälkeisistä muutoksista.

Kun kyseessä ovat tiloilla pidetyistä sioista otetut näytteet, on annettava selkeät tiedot sikojen iästä, luokasta ja alkuperätilasta. On suositeltavaa kirjata muistiin jokaisen sian, josta näyte on otettu, sijainti tilalla sekä yksilöllinen tunnistemerkki.

B. VIROLOGISIA TESTEJÄ VARTEN TARVITTAVIEN NÄYTTEIDEN KERÄÄMINEN

1. Tonsilla-, imusolmuke-, (maksan ja mahalaukun, munuaisten imusolmukkeet, *submandibulaari-* ja *retropharyngeaali-imusolmukkeet*) perna-, munuais- ja keuhkokudoksista otettavat näytteet soveltuvat parhaiten ASF-viruksen, sen antigeenin tai genomien osoittamiseen kuolleista tai lopetetuista sioista⁽¹⁾. Jos ruho on autolysoitunut, suositeltava näyte on kokonainen pitkä luu tai rintalasta.
2. Kuumeisista tai taudin muita oireita osoittavista sioista on otettava hyytymättömiä ja/tai hyytyneitä verinäytteitä toimivaltaisen viranomaisen ohjeiden mukaisesti.

⁽¹⁾ On suositeltavaa kerätä myös sykkyräsuolinäytteitä, koska ne voivat olla hyödyllisiä klassisen sikaruton diagnosointiin.

C. NÄYTTEIDEN KULJETUS

1. On suositeltavaa, että kaikki näytteet
 - merkitään asianmukaisella tunnisteella,
 - kuljetetaan ja säilytetään tiiviissä säiliöissä,
 - säilytetään viileässä jääkaappilämpötilassa; kuitenkin jos on todennäköistä, että näytteiden toimittaminen laboratorioon kestää yli 48 tuntia, laboratorioilta olisi pyydettävä ohjeita sopivasta lämpötilasta kuljetuksen aikana,
 - toimitetaan laboratorioon mahdollisimman pian,
 - säilytetään jäähdytyspussien tai kuivajään avulla viileinä pidettävissä pakkauksissa,
 - kudoksista tai elimistä suljetaan erillisiin suljettuihin muovipakkauksiin ja merkitään asianmukaisesti. Tämän jälkeen näytteet on sijoitettava suurempiin säiliöihin ja ne on pakattava riittävän imuukykyiseen pakkaukseen vaurioiden ja vuotojen estämiseksi,
 - mahdollisuuksien mukaan kuljetetaan pätevän henkilön valvonnassa suoraan laboratorioon nopean ja luotettavan kuljetuksen varmistamiseksi.
2. Pakkauksen päälle on merkittävä näkyvästi vastaanottavan laboratorion osoite ja seuraava teksti:

Patologisia näytteitä. Helposti pilaantuvaa. Helposti särkyvää. Saa avata vain ASF:n tutkimuslaboratoriossa.
3. Vastaanottavan laboratorion vastuuhenkilölle on ilmoitettava hyvissä ajoin näytteiden saapumisajankohdasta.
4. Kun näytteitä kuljetetaan lentoteitse yhteisön ASF:n vertailulaboratorioon⁽¹⁾, pakkaukseen on tehtävä IATA:n (Kansainvälinen ilmakuljetusliitto) määräysten mukaiset merkinnät.

VI luku

Virologisten testien periaatteet ja käyttö sekä tulosten arviointi

A. VIRUKSEN ANTIGENIEN OSOITTAMINEN

1. Suora immunofluoresenssitesti (DIFT)

Kokeen periaatteena on mikroskooppinen virusantigeeniosoitus sellaisten sikojen, joiden epäillään saaneen ASF-viruksen, elinten sivelynäytteistä tai jääleikkeistä. Solunsisäiset antigeenit osoitetaan käyttäen FITC⁽²⁾-konjugoituja vasta-aineita. Virus ilmenee infektoituneiden solujen sytoplasmassa rakeina.

Sopivia elimiä ovat munuaiset, perna ja eri imusolmukkeet. Jos kyseessä on luonnonvarainen sika, voidaan käyttää myös sivelynäytettä luuydinsoluista, jos mainittuja elimiä ei ole käytettävissä tai ne ovat ehtineet autolysoitua.

Testi voidaan suorittaa kahdessa tunnissa. Koska elinnäytteitä voidaan ottaa vain kuolleista eläimistä, niiden käyttö seulonnassa on rajoitettua.

DIFT on erittäin herkkä menetelmä akuutin ASF:n toteamiseksi. Taudin subakuutin tai kroonisen muodon osalta DIFT-testin herkkyys on noin 40 prosenttia, mikä voi johtua antigeeni-vasta-aine-kompleksien esiintymisestä. Komplekseihin sitoutuneen vasta-aineen sitoutumiskyky ASF-konjugoituun vasta-aineeseen todennäköisesti estyy. Testituloksen luotettavuutta saattaa vähentää epätarkka värjäys, erityisesti silloin, kun merkittävää kokemusta testin suorittamisesta ei ole tai kun testissä käytettävät elimet ovat ehtineet autolysoitua.

2. ELISA-menetelmä antigeeniosoitusta varten

Virusantigeenit voidaan osoittaa ELISA-tekniikoilla, mutta niitä suositellaan ainoastaan taudin akuutin muodon toteamiseksi, koska niiden herkkyys on alhainen silloin, kun esiintyy antigeeni-vasta-aine-komplekseja. Antigeeniosoituksessa käytettävän ELISA-menetelmän pitää olla niin herkkä, että akuutin ASF:n kliinisiä oireita osoittavista eläimistä saadaan positiivinen tulos. Joka tapauksessa tätä testiä suositellaan käytettäväksi ainoastaan ”karjan tasolla” ja yhdessä muiden virologisten testien kanssa.

⁽¹⁾ Yhteisön vertailulaboratoriolla on rajoittamaton lupa vastaanottaa diagnostisia näytteitä ja ASF:n viruskantoja muista jäsenvaltioista. Jos näytteet tulevat EU:n ulkopuolelta, jäljennös tuontiluvasta voidaan pyytää tältä laboratoriolta ennen kuljetusta ja kiinnittää pakkauksen ulkopuolelle kirjakuoreessa.

⁽²⁾ Fluoreseini-isotiosyanaatti.

B. VIRUSERISTYS JA -TUNNISTUS HEMADSORPTIOTESTILLÄ (HAD)

1. Viruksen eristäminen perustuu näytemateriaalin inokulointiin viruksen lisääntymiselle herkkiin sian primaariviljelmiin kuten monosyytti- ja makrofaagiviljelmät. Suositeltavia näytteitä ASF-viruksen eristämiseen ovat antikoagulantteilla käsitellyistä verinäytteistä otetut kokoveri ja leukosyytit sekä A kohdan 1 alakohdassa tarkoitetut elimet. Jos näytteessä on ASF-virusta, virus lisääntyessään soluissa tuottaa ASF-infektioille tyypillisen soluvaurion eli sytopaattisen efektin.
2. HAD-menetelmää suositellaan ASF-virusisolaattien tunnistamiseen sen herkkyden ja spesifisyyden vuoksi. HAD perustuu AFS-viruksen kykyyn lisääntyä sian makrofaageissa ja aiheuttaa sian punasolujen hemadsorption. Infektoituneiden makrofaagien ympärille muodostuu tyypillinen punasolujen "rosette". On kuitenkin mahdollista, että osa tautitapauksista eristetyistä ASF-viruskannoista aiheuttaa hemadsorption sijaan sytopaattisen efektin. Tällaiset kannat voidaan löytää soluviljelmien sedimenteistä joko DIF-testillä tai PCR-menetelmällä.
3. Viruksen eristäminen sopii pienen eläinmäärän näytteiden tutkimiseen paremmin kuin joukkoseurantaan. Viruksen eristämisen prosessi on työläs, ja tuloksia joudutaan odottamaan yhdestä kolmeen päivää. Kaksi muuta soluviljelyjaksoa saattavat olla tarpeen pienen virusmäärän havaitsemiseksi näytteestä. Tutkimusaika saattaa tämän vuoksi olla jopa 10 päivää ennen lopullisten tulosten saamista. Autolysoituneilla näytteillä saattaa olla sytotoksisia vaikutuksia soluviljelmään, mikä rajoittaa soluviljelmän käyttöä.
4. ELISA-, PCR- tai DIFT-menetelmillä saadun positiivisen tuloksen vahvistamiseksi suositellaan HAD-menetelmällä suoritettavaa viruksen eristämistä ja tunnistamista. Tätä menetelmää suositellaan myös silloin, kun ASF on jo vahvistettu muilla menetelmillä, erityisesti primaaritaudinpurkauksessa tai yksittäisessä tautitapauksessa.

Sian makrofaageista eristettyä ASF-virusta voidaan käyttää viruksen karakterisointiin ja molekulaari-epidemiologiaan tutkimuksiin.

5. Primaaritaudinpurkausten, luonnonvaraisten sikojen primaaritauditapausten tai teurastamossa tai kuljetusvälineessä ilmenneiden tautitapausten yhteydessä todetut kaikki ASF:n virusisolaatit on määritettävä jäsenvaltioiden kansallisissa vertailulaboratorioissa tai muussa kyseisen jäsenvaltion hyväksymässä laboratorioissa tai yhteisön vertailulaboratorioissa E kohdan mukaisesti.

Kaikissa tapauksissa virusisolaatit on lähetettävä viipymättä viruskantojen kokoelmista huolehtivaan yhteisön vertailulaboratorioon.

C. VIRUKSEN GENOMIN OSOITTAMINEN

1. Polymeerasiketjureaktio (PCR) -menetelmää käytetään viruksen genomien osoittamiseen veri-, seerumi-, kudokset tai elinnäytteistä. Viruksen DNA-fragmentti monistetaan PCR:llä havaittavaksi määräksi. Suuri määrä tunnettuihin viruksen eri genotyyppiin kuuluvia eristyksiä, sekä ei-hemadsorboivia ja alhaisen virulenssin isolaatteja, voidaan osoittaa käyttämällä genomien hyvin konservoiduilla alueilla valittuja alukkeita. Tämän testin avulla voidaan todentaa vain virusperäisen genomisekvenssin esiintyminen. On siis otettava huomioon, että PCR-testi saattaa olla positiivinen, vaikka viruseristyksessä ei olisi kyetty osoittamaan tarttuvaa virusta (esimerkiksi kun kyseessä ovat autolysoituneet kudokset tai toipuvista taikka toipuneista ja kliinisesti normaaleista sioista otetut näytteet).
2. PCR-menetelmää voidaan käyttää rajattuun määrään näytteitä, jotka on valittu epäillyistä eläimistä tarkkaan. Se on suositeltava menetelmä, jos elinnäytteet ovat sytotoksisia, jolloin viruksen eristäminen ei ole mahdollista (esimerkiksi luonnonvaraisista sioista saatavat näytteet).
3. PCR-tutkimukseen sopivia näytemateriaaleja ovat viruksen eristämisen yhteydessä kuvatut elimet ja seerumi. Myös puutiaisen homogenaatit voidaan tutkia PCR:llä.
4. PCR voidaan suorittaa yhden työpäivän aikana. Se edellyttää asianmukaista laboratoriolaitteistoa, erillisiä tiloja ja pätevää henkilöstöä. Menetelmän etuna on se, että tarttuvaa virusta ei tarvitse monistaa laboratorioissa. PCR-menetelmä on hyvin herkkä, mutta kontaminaatiota tapahtuu helposti, mikä voi johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin. Tämän vuoksi tarkat laadunvalvontamenettelyt ovat välttämättömiä.

D. SUOSITELTAVAT VIROLOGISET TESTIT JA TULOSTEN ARVIOINTI

Virologiset testit ovat välttämättömiä ASF:n esiintymisen toteamiseksi.

Virusten eristämistä ja HAD-menetelmää on pidettävä virologisina vertailutesteinä, ja niitä on käytettävä tarvittaessa varmistustesteinä. Niiden käyttö on erityisen suositeltavaa silloin, kun positiivisiin DIF- tai PCR-tuloksiin ei liity taudin kliinisiä oireita tai muutoksia, sekä kaikissa muissa epäselvissä tapauksissa.

ASF:n primaaritaudinpurkaus voidaan kuitenkin vahvistaa, jos kyseessä olevissa sioissa on havaittu taudin kliinisiä oireita tai muutoksia ja samasta epäilystä siasta otettujen näytteiden vähintään kaksi erillistä antigeenin, genomien tai vasta-aineen osoittamistestistä ovat antaneet positiivisen tuloksen.

ASF:n sekundaaritaudinpurkaus voidaan vahvistaa, jos vahvistettuun taudinpurkaukseen tai tautitapaukseen olemassa olevan epidemiologisen yhteyden lisäksi kyseessä olevissa sioissa on havaittu taudin kliinisiä oireita tai muutoksia ja antigeenin, genomien tai vasta-aineen osoittamistestistä on saatu positiivinen tulos.

ASF:n primaaritauditapaus voidaan vahvistaa luonnonvaraisissa sioissa viruseristyksellä tai jos vähintään kaksi antigeenin, genomien tai vasta-aineen osoittamistestistä ovat antaneet positiivisen tuloksen. Myöhemmät luonnonvaraisten sikojen ASF-tapaukset, joilla on epidemiologinen yhteys aiemmin vahvistettuihin tapauksiin, voidaan vahvistaa, jos antigeenin, genomien tai vasta-aineen osoittamistestistä on saatu positiivinen tulos.

E. ASF-VIRUSISOLAATTIEN GENEETTINEN KARAKTERISOINTI

1. ASF-virusisolaattien geneettinen karakterisointi suoritetaan määrittämällä virusgenomin katkaisuentymianalyysi ja nukleotidijaksojen sekvensointi. Resktriktio-fragmenttien tai sekvenssien samankaltaisuus aiemmista viruseristyksistä saatujen jaksojen kanssa voi osoittaa, aiheutuiko taudinpurkaus eurooppalaista vai afrikkalaista molekyyllisiä noudattavasta viruskannasta.

ASF-virusisolaattien geneettinen karakterisointi on ratkaisevan tärkeää ASF:n molekulaarista epidemiologiaa ja virusten geenivariaatiota koskevan nykyisen tietämyksen parantamiseksi. Molekulaaristen tietojen perusteella uudet virusisolaatit voidaan luokitella ja niiden mahdollisesta alkuperästä voidaan saada tietoa.

2. Jos virusten molekulaarista tyyppitystä ei voida suorittaa kansallisessa laboratorioissa tai muussa ASF:n diagnosoimiseen valtuutetussa laboratorioissa viipymättä, alkuperäinen näyte tai viruseristys on lähetettävä yhteisön vertailulaboratorioon molekulaarista tyyppitystä varten mahdollisimman pian.

Katkaisuentymianalyysiä ja viruseristysten sekvensointia koskevat tiedot, jotka ASF:n diagnosoinnista valtuutetuilla laboratorioilla on käytettävissään, on lähetettävä edelleen yhteisön vertailulaboratorioon, jotta nämä tiedot voidaan syöttää tämän laboratorion ylläpitämään tietokantaan.

Tietokannan sisältämien tietojen on oltava kaikkien jäsenvaltioiden kansallisten vertailulaboratorioiden käytettävissä. Jos tiedot aiotaan julkaista tieteellisessä julkaisussa, yhteisön vertailulaboratorio takaa tietojen luottamuksellisuuden niiden julkaisemiseen asti, jos kyseinen laboratorio pyytää tätä.

VII luku

Serologisten testien periaatteet ja käyttö sekä tulosten arviointi

A. PERUSPERIAATTEET JA MERKITYS TAUDINMÄÄRITYKSEN KANNALTA

1. ASF:n spesifin vasta-aineen osoitusta suositellaan taudin subakuuttiin ja krooniseen muotoon, laajamittaisen testaukseen sekä ASF:n hävittämisohjelmiin useista syistä, joita ovat seuraavat:
 - i) vasta-aineet syntyvät tartunnan saaneessa siassa nopeasti. Tällaisissa sioissa vasta-aineet voidaan yleensä osoittaa seeruminäytteistä 7–10 vuorokautta tartunnan saamisesta;
 - ii) ASF:ää vastaan ei ole rokotteita. Tämä tarkoittaa, että ASF:n spesifijä vasta-aineita syntyy yksinomaan ASF-virustartunnan kautta; ja
 - iii) pitkäkestoinen vasta-ainevaste. Taudista toipuneilla sioilla voidaan osoittaa useiden kuukausien ajan, ja joillakin sioilla jopa koko eliniän, runsaasti spesifisiä vasta-aineita.

Emältä saatuja ASF:n vasta-aineita voidaan havaita porsaissa ensimmäisten 10 elinviikon aikana. Emältä saatujen vasta-aineiden puoliintumisaika on porsaissa noin kolme viikkoa. Jos ASF:n vasta-aineita löytyy yli kolmen kuukauden ikäisistä porsaista, ne eivät todennäköisesti ole emältä saatuja.

2. Toimitettujen elinten seerumin tai plasman eksudaatista tutkitaan ASF-viruksen vasta-aineita ASF:n diagnosoinnin helpottamiseksi epäilyillä tiloilla, tartunnan saamisen ajankohdan määrittämiseksi vahvistetun taudinpurkauksen yhteydessä sekä valvontaa ja seuranta varten.

Seroposiitivisten sikojen paikka tilalla voi antaa arvokasta tietoa siitä, miten ASF-virus on kulkeutunut tilalle.

Serologisten kokeiden tulokset on kuitenkin arvioitava oikein ottamalla huomioon kaikki kliiniset, virologiset ja epidemiologiset löydökset, jotka saadaan direktiivin 2002/60/EY 8 artiklan mukaisesti ASF:n epäilyn poissulkemiseksi tai varmistamiseksi toteuttavien tutkimusten yhteydessä.

B. SUOSITELTAVAT SEROLOGISET TESTIT

1. ELISA, epäsuora immunofluoresenssitesti (IIFT) ja immunoblottaustesti (IB) ovat vaihtoehtoisia testejä ASF:n serologiseen vahvistamiseen.

Kansallisten laboratorioiden tekemän serologisen diagnoosin laatu ja tehokkuus on tarkistettava säännöllisesti yhteisön vertailulaboratorion kausittain järjestämän laboratorioiden välisen vertailukokeen avulla.

2. ELISA-testi on luotettavin ja hyödyllisin menetelmä laajamittaisiin serologisiin tutkimuksiin. Menetelmä perustuu ASF-viruksen vasta-aineiden osoittamiseen. Vasta-aineet sitoutuvat kiinteään faasiin kiinnitettyihin virusproteiineihin; osoittaminen tapahtuu lisäämällä reaktioon entsyymikonjugoitua proteiini-A:ta, jolloin muodostuu näkyvä värireaktio entsyymin reagoidessa sopivan substraatin kanssa.

3. Kansallisten laboratorioiden on tarkistettava säännöllisesti ELISA-reagenssien kunkin erän herkkyuden ja spesifisyyden taso yhteisön vertailulaboratorion toimittaman vertailuseerumivalikoiman avulla. Tämän valikoiman on sisällettävä:
 - niiden sikojen seerumia, joiden ASF-virustartunta on aikaisessa vaiheessa (alle 17 päivää tartunnasta),
 - toipuvien sikojen seerumia (yli 17 päivää tartunnasta).

ASF:n serologisessa diagnosoinnissa käytettävillä ELISA-testeillä on osoitettava toipuvien sikojen kaikki vertailuseerumit. Kaikki vertailuseerumien kanssa saadut tulokset on voitava toistaa. On suositeltavaa, että testien avulla voidaan osoittaa myös kaikki taudin aikaisen vaiheen positiiviset seerumit. Tulokset, jotka saadaan sairauden alkuvaiheessa olevien sikojen vertailuseerumien kanssa, antavat viitteitä ELISA:n herkkyydestä.

4. IIFT (immunofluoresenssi) on nopea ja herkkä menetelmä ASF:n vasta-aineiden osoittamiseksi joko seerumin tai kudoksen eksudaatista. Menetelmä perustuu ASF:n vasta-aineiden osoittamiseen: vasta-aineet tunnistetaan ASF-viruksella infektointuneiden MS-soluviljelmien avulla. Vasta-aine-antigeenireaktio osoitetaan fluorescein-leimatulla proteiini A:lla. Positiivisissa näytteissä todetaan fluoresenssia infektointuneiden solujen tuman läheisyydessä.

Käyttämällä sekä DIFT- että IIFT-menetelmiä ASF:n kliinisiä oireita osoittavien eläinten elinten, veren ja eksudaatin testaamiseksi voidaan tauti vahvistaa nopeasti ja luotettavasti.

5. Immunoblottaustesti on erittäin spesifinen ja herkkä menetelmä, jossa käytetään virusproteiini-antigeenejä sisältäviä nitroselluloosakaistaleita. Vasta-aine-antigeenireaktio osoitetaan lisäämällä peroksidaasikonjugoitua proteiini A:ta ja valittua substraattia. On erittäin hyödyllistä testata seerumi, josta ELISA-testillä saatu tulos on epäselvä.

VIII luku

ASF:n tutkimisesta vastaavien laboratorioiden vähimmäisturvavaatimukset

1. Jäljempänä olevassa taulukossa 1 säädettyjä vaatimuksia on noudatettava kaikissa laboratorioissa, joissa ASF-virusta aiotaan kasvattaa soluviljelmässä. *Post mortem* -tutkimukset, kudosten käsittely DIFT- tai PCR-testejä varten ja inaktivoitua antigeeniä hyödyntävät serologiset testit voidaan kuitenkin suorittaa tiloissa, joiden suojaustaso on alhaisempi, jos taulukon 1 vaatimuksia noudatetaan ja toimenpiteiden jälkeen huolehditaan perushygieniasta ja desinfioinnista sekä ruhot, kudokset ja seerumit hävitetään turvallisesti.

2. Laboratoriodien, joissa ASF-virus inokuloidaan eläimiin, on täytettävä taulukossa 2 esitetyt vaatimukset.
3. ASF-viruksen varastot on säilytettävä kaikissa tapauksissa turvallisesti joko jäädytettynä tai kylmäkuivattuina. Kaikki yksittäiset ampullit on merkittävä selkeästi nimilapuilla, ja virusvarastojen tiedot sekä laatutarkistusten päivämäärät ja tulokset on kirjattava tarkasti muistiin. Kirjanpitoa on pidettävä myös varastoon lisättävistä viruksista mukaan lukien tiedot niiden lähteistä sekä muihin laboratorioihin lähetetyistä viruksista.
4. On suositeltavaa, että ASF-virusta käsittelevällä bioturvalisella yksiköllä on käytössään tiloja, joissa ei käsitellä ASF-virusta. Tällaisia tiloja tulisi olla etenkin lasiesineiden ja välineiden preparointia, tautivapaiden soluviljelmien ylläpitoa ja valmistusta, seerumien käsittelyä ja serologisten testien (muiden kuin elävää ASF-virusta käyttävien menetelmien) suorittamista sekä hallinto- ja toimistotehtäviä varten.

Taulukko 1

Biologisen eristyksen periaatteet diagnostisissa laboratorioissa

	Yleinen ympäristö	Vähimmäisvaatimukset
Yleinen ympäristö	Normaali ilmanpaine. Pelkästään määrättyihin toimenpiteisiin varatut tilat.	Normaali ilmanpaine. Yksinkertainen poistoilman HEPA-filtraatio. Pelkästään klassisen sikaruton tai ASF:n diagnosointi-toimenpiteisiin varatut tilat. Mahdollisesti saastuneet jätevedet käsitellään ASF-viruksen inaktivoimiseksi (kuumentamalla tai kemiallisesti).
Laboratoriovaatetus	Päällysvaateet käytetään ainoastaan ASF-viruksen yksikössä. Kertakäyttöiset käsinneet aina käsiteltäessä saastunutta materiaalia. Päällysvaatteet steriloidaan ennen niiden vientiä pois yksiköstä tai pestään yksikön sisällä korkeassa lämpötilassa.	Kaikki vaatteet vaihdetaan laboratorioon tultaessa. Laboratoriovaatetusta käytetään ainoastaan ASF-viruksen yksikössä. Kertakäyttöiset käsinneet aina käsiteltäessä saastunutta materiaalia. Vaatteet steriloidaan ennen niiden vientiä pois yksiköstä tai pestään yksikön sisällä korkeassa lämpötilassa.
Henkilöstön valvonta	Yksikköön pääsee vain nimetty, koulutettu henkilöstö. Kädet pestään ja desinfioidaan yksiköstä poistuttaessa. Henkilöstö ei saa mennä yksiköstä poistumisen jälkeen 48 tuntiin sellaisiin tiloihin, joissa pidetään sikoja.	Yksikköön pääsee vain nimetty, koulutettu henkilöstö. Kädet pestään ja desinfioidaan yksiköstä poistuttaessa. Henkilöstö ei saa mennä yksiköstä poistumisen jälkeen 48 tuntiin sellaisiin tiloihin, joissa pidetään sikoja.
Laitteet	Kaikessa elävien virusten käsittelyssä käytetään suojaavaa laminaarivirtauskaappia (luokka I tai II). Kaapissa olisi oltava kaksinkertainen poistoilman HEPA-filtraatio. Kaikkien laboratoriotoimenpiteisiin tarvittavien varusteiden on oltava käytettävissä pelkästään näitä toimenpiteitä varten varatun laboratorioyksikön sisällä.	

Taulukko 2

Bioturvallisuuden vähimmäisvaatimukset koe-eläinhuoneita varten

	Vaatimukset
Yleinen ympäristö	Alipaine ilmastointi. Yksinkertainen poistoilman HEPA-filtraatio. Mahdollisuus tilojen täydelliseen dekontaminaatioon/kaasutukseen kokeen jälkeen. Kaikki kiinteä ja nestemäinen jäte ja jätevedet käsitellään ASF-viruksen inaktivoimiseksi (kuumentamalla tai kemiallisesti).

	Vaatimukset
Laboratoriovaatetus	<p>Kaikki vaatteet vaihdetaan laboratorioon tultaessa.</p> <p>Vaatteet steriloidaan ennen niiden vientiä pois yksiköstä tai pestään yksikön sisällä korkeassa lämpötilassa.</p>
Henkilöstön valvonta	<p>Yksikköön pääsee vain nimetty, koulutettu henkilöstö.</p> <p>Vaatteet jätetään sisäpuolelle ennen suihkussa peseytymistä. Perinpohjainen peseytyminen suihkussa yksiköstä poistuttaessa.</p> <p>Henkilöstö ei saa mennä yksiköstä poistumisen jälkeen 48 tuntiin sellaisiin tiloihin, joissa pidetään sikoja.</p>
Laitteet	<p>Kaikkien eläimille tehtäviin toimenpiteisiin tarvittavien varusteiden on oltava käytettävissä yksikön sisällä.</p> <p>Kaikki materiaalit steriloidaan ennen niiden vientiä pois yksiköstä. Eläinperäiset näytteet kääritään kaksinkertaisiin kääreisiin ennen sulkemista tiiviiseen säiliöön, jonka pinta desinfioidaan, kuljetettavaksi ASF:n tutkimuksesta vastaavaan laboratorioon.</p>
Eläimet	<p>Kaikki eläimet teurastetaan ennen niiden vientiä pois yksiköstä, <i>post mortem</i> -tutkimukset suoritetaan bioturvallisella alueella ja ruhot poltetaan tutkimuksen jälkeen.</p>