

KOMISSIO

KOMISSION PÄÄTÖS,

tehty 13 päivänä kesäkuuta 2003,

vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteista epäiltäessä lohien tarttuvaa anemiaa (ISA-tautia) tai sen esiintymisen varmistuttua

(tiedoksiannettu numerolla K(2003) 1831)

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

(2003/466/EY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon eläinten terveyttä koskevista edellytyksistä saatettaessa vesiviljeltyjä eläimiä ja tuotteita markkinoille 28 päivänä tammikuuta 1991 annetun neuvoston direktiivin 91/67/ETY⁽¹⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 806/2003⁽²⁾, ja erityisesti sen 15 artiklan,

ottaa huomioon yhteisön vähimmäistoimenpiteistä tiettyjen kalatautiin torjumiseksi 24 päivänä kesäkuuta 1993 annetun neuvoston direktiivin 93/53/ETY⁽³⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission päätöksellä 2001/288/EY⁽⁴⁾, ja erityisesti sen 5 artiklan 2 kohdan ja 6 artiklan,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Direktiivin 93/53/ETY mukaan näytteenotto ja laboratoriomääritykset direktiivin 91/67/ETY liitteessä A olevassa I ja II luettelossa tarkoitettujen tautien esiintymisen toteamiseksi on suoritettava direktiivin 91/67/ETY 15 artiklan mukaisesti määritellyjä menetelmiä noudattaen.
- (2) Näytteenottosuunnitelmat ja taudinmääritysmenetelmät II luettelon kalatautiin, verenvuotoseptikemian (VHS) ja vertamuodostavan kudoksen tarttuvan kuolion (IHN) esiintymisen havaitsemiseksi ja varmistamiseksi on määriteltävä komission päätöksessä 2001/183/EY⁽⁵⁾.
- (3) Direktiivin 93/53/ETY 5 artiklan 2 kohdan ja 6 artiklan mukaan kaikki lohien tarttuvan anemian (ISA-taudin) saastuttamaksi epäillyn tai varmistetun viljelylaitoksen kanssa samalla vesialueella tai rannikkovyöhykkeellä sijaitsevat viljelylaitokset on asetettava viralliseen valvontaan. Vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteet olisi määriteltävä.

- (4) Näytteenottosuunnitelmien ja taudinmääritysmenetelmien määrittämiseksi ISA-taudin havaitsemista ja varmistamista varten sekä vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteiden määrittämiseksi ISA-tautia epäiltäessä tai sen esiintymisen varmistuttua on käännytty kalaterveys- ja laboratorioasiantuntijoiden puoleen. Lisäksi on otettava huomioon Maailman eläintautijärjestön (OIE) vesieläintautien taudinmäärityksen käsikirjan (Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases) uusimmassa painoksessa esitetyt ISA-taudin taudinmääritystä koskevat suunta-aviivat.
- (5) Näiden uusien vaatimusten täytäntöönpanoon olisi annettava riittävästi aikaa.
- (6) Tässä päätöksessä säädetyt toimenpiteet ovat elintarviketietoa ja eläinten terveyttä käsittelevän pysyvän komitean lausunnon mukaiset,

ON TEHNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

Tämän päätöksen liitteessä vahvistetaan lohien tarttuvan anemian (ISA-taudin) osoittamiseen ja varmistamiseen tarkoitettujen näytteenottosuunnitelmien ja taudinmääritysmenetelmien sekä vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteet ISA-tautia epäiltäessä tai sen esiintymisen varmistuttua.

2 artikla

Tätä päätöstä sovelletaan 23. lokakuuta 2003 lähtien.

⁽¹⁾ EYVL L 46, 19.2.1991, s. 1.⁽²⁾ EUVL L 122, 16.5.2003, s. 1.⁽³⁾ EYVL L 175, 19.7.1993, s. 23.⁽⁴⁾ EYVL L 99, 10.4.2001, s. 11.⁽⁵⁾ EYVL L 67, 9.3.2001, s. 65.

3 artikla

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 13 päivänä kesäkuuta 2003.

Komission puolesta

David BYRNE

Komission jäsen

LIITE

Lohen tarttuvan anemian (ISA-taudin) osoittamiseen ja varmistamiseen tarkoitetut näytteenottosuunnitelmat ja taudinmäärittämenetelmät sekä vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteet epäiltäessä ISA-tautia tai sen esiintymisen varmistuttua

JOHDANTO JA MÄÄRITELMÄT

Tässä liitteessä

- annetaan ohjeet ja vähimmäisvaatimukset ISA-taudin esiintymisen osoittamiseksi ja varmistamiseksi tarkoitettuja näytteenottosuunnitelmia ja taudinmäärittämenetelmiä varten;
- esitetään myös direktiiveissä 91/67/ETY ja 93/53/ETY säädetyt säännökset ja määritelmät;
- vahvistetaan säännökset, joilla pyritään tehokkaaseen taudinmäärittämiseen, valvontaan ja seurantaan ISA-tartuntaa epäiltäessä tai tartunnan varmistuttua;
- osoitetaan annetut määräykset ISA-taudin valvonnasta vastaaville viranomaisille ja tätä tautia koskevia kokeita tekeväälle laboratoriohenkilöstölle. Liitteen pääpaino on näytteenottomenetelmissä, laboratoriokokeiden pääperiaatteissa ja käytännön sovellutuksissa ja niiden tulosten arvioinnissa sekä yksityiskohtaisissa laboratoriomenetelmissä. Laboratoriot voivat kuitenkin tarvittaessa tehdä muutoksia tässä liitteessä kuvattuihin kokeisiin tai käyttää eri kokeita, edellyttäen, että voidaan osoittaa sama tai parempi herkkyys ja spesifisyys. Lisäksi määrätään vyöhykejakoja ja virallista valvontaa koskevista perusteista ISA-tartuntaa epäiltäessä tai tartunnan varmistuttua.

Tässä liitteessä sovelletaan seuraavia lisämääritelmiä:

”Vesialueella” tarkoitetaan koko vesialuetta vesistöjen alkulähteiltä suistoon tai osaa vesialueesta vesistön alkulähteeltä luonnolliseen tai keinotekoiseen esteeseen, joka estää kaloja vaeltamasta esteen yli.

”Rannikkoalueella” tarkoitetaan sellaista rannikon, meriveden tai suiston osaa, jolla on tarkat maantieteelliset rajat ja joka käsittää homogeenisen hydrodynaamisen järjestelmän tai sarjan tällaisia järjestelmiä.

Liitteessä olevassa I osassa määrätään ISA-taudin määrittäystä ja varmistamista koskevista yleisistä periaatteista ja perusteista sekä ISA-tartuntaa epäiltäessä tai tartunnan varmistuttua suoritettavan vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteista.

Liitteessä olevassa II osassa vahvistetaan ISA-tartunnan toteamiseksi suoritettavat tarkastukset ja näytteenotto.

Liitteessä olevassa III osassa määrätään virologisissa tutkimuksissa käytettävistä menetelmistä.

Liitteessä olevassa IV osassa esitetään näytteiden RT-PCR-analyyseissä käytettävä menettely ISA:n toteamiseksi.

Liitteessä olevassa V osassa kuvataan IFAT-menetelmällä suoritettavaa munuaisnäytteiden (imprint) tutkimusmenettelyä ISA:n toteamiseksi.

Liitteessä olevassa VI osassa esitetään histologiset menetelmät.

Liitteen VII osassa on luettelo käytetyistä kirjainsanoista ja lyhenteistä.

I ISA-taudin määrittäystä, vyöhykejakoja sekä tiettyjä valvontatoimia ja virallista valvontaa koskevat perusteet**I.1 ISA-taudin määrittäyksessä sovellettavat yleiset periaatteet**

Tässä liitteessä olevassa I.2 kohdassa esitetään ne syyt, joiden perusteella on syytä epäillä kalojen saaneen ISA-virustartunnan. Jäsenvaltioiden on varmistettava, että epäiltäessä kalojen ISA-virustartuntaa viljelylaitoksessa suoritetaan mahdollisimman nopeasti virallinen tutkimus, jossa tartunta varmistetaan tai suljetaan pois soveltamalla tässä liitteessä olevassa III—VI osassa vahvistettuja tarkastusmenettelyjä ja kliinisiä tutkimusmenettelyjä, näytteiden valinta- ja keruumenetelmiä sekä laboratoriotutkimusmenetelmiä. ISA-tartunnan virallinen varmistaminen edellyttää, että yksi tässä liitteessä olevassa I.3 osassa vahvistetuista kolmesta perusteesta täyttyy.

I.2 ISA-tartunnan epäily

I.2.1 ISA-tartuntaa on syytä epäillä, jos vähintään yksi seuraavista perusteista täyttyy:

- ISA:n taudinkuvaan sopivat *post mortem*-löydökset, joihin liittyy tai joihin ei liity taudin kliinisiä merkkejä. *Post mortem*-löydöksiä ja taudin kliinisten merkkien on vastattava kansainvälisen eläintautiviraston (OIE) vesieläintautien taudinmäärittäksen käsikirjan (Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases) viimeisimmässä painoksessa esitettyä kuvausta.
- ISA-virus on eristetty ja tunnistettu III osassa kuvatulla tavalla soluviljelmässä yhdestä näytteestä, joka on peräisin mistä tahansa viljelylaitoksen kalasta.

- c) ISA-tartunnasta on saatu näyttö kahdessa erilaisessa laboratoriokokeessa, esimerkiksi RT-PCR-kokeessa (IV osa) ja IFAT-kokeessa (V osa).
- d) Eläviä kaloja on siirretty viljelylaitokselle ajankohtana, jolloin oli perusteltua syytä epäillä esiintyvän ISA-tautia.
- e) Tutkimuksissa havaitaan muita varteenotettavia epidemiologisia yhteyksiä viljelylaitoksiin, joilla epäillään ISA-tartuntaa tai joilla on todettu tartunta.

I.2.2 ISA-tartunnan epäily voidaan sulkea pois, jos vähintään kerran kuukaudessa puolen vuoden ajan tehtävissä kliinisissä tarkastuksissa ei ole saatu selvää näyttöä tartunnasta.

I.3 ISA-tartunnan varmistaminen

ISA-tartuntaa pidetään varmistettuna, jos a, b tai c kohdassa esitetty peruste täyttyy:

- a) Havaitaan OIE:n vesieläintautien taudinmäärityksen käsikirjan uusimman painoksen tietojen mukaisia ISA:n taudinkuvaan kuuluvia kliinisiä merkkejä ja *post mortem* -löydöksiä, mukaan lukien kuolleet, heikkokuntoiset tai poikkeavasti käyttäytyvät kalat, anemiaan viittaavat merkit, muut *post mortem* -löydökset ja patologiset muutokset, ja todetaan ISA-virus yhdellä tai useammalla seuraavista menetelmistä:
 - i) ISA-virus eristetään ja tunnistetaan III osassa kuvatulla tavalla soluviljelmässä vähintään yhdestä näytteestä, joka on peräisin mistä tahansa viljelylaitoksen kalasta.
 - ii) ISA-virus todetaan RT-PCR-analyysillä IV osassa kuvattuja menetelmiä käyttäen.
 - iii) ISA-virus todetaan kudoksista tai kudospreparaateista ISA-virukselle spesifien vasta-aineiden avulla (esimerkiksi V osassa kuvattu IFAT-menetelmä munuaisnäytteiden osalta).
- b) ISA-virus eristetään ja tunnistetaan kahdesta näytteestä, jotka on otettu III osassa kuvatun menetelmän mukaisesti erillisillä näytteenottokerroilla yhdestä tai useammasta viljelylaitoksen kalasta.
- c) ISA-virus eristetään ja tunnistetaan vähintään yhdestä näytteestä, joka on otettu III osassa kuvatun menetelmän mukaisesti viljelylaitoksen mistä tahansa kalasta, ja vahvistetaan RT-PCR-menetelmällä (IV osa) tai IFAT-menetelmällä (V osa) kudospreparaateista, jotka ovat peräisin viljelylaitoksen mistä tahansa kalasta.

I.4 Valvontavyöhykkeiden ja seurantavyöhykkeiden perustamisen ja purkamisen kriteerit ISA-tartuntaa epäiltäessä tai sen varmistuttua

I.4.1 Riskipohjaisen virallisen valvontaohjelman käyttöönottoa varten jäsenvaltioiden on perustettava asianmukaisia tarkkailu- ja valvontavyöhykkeitä sellaisen viljelylaitoksen läheisyyteen, jolla virallisesti epäillään tai jolla on todettu esiintyvän ISA-tautia.

I.4.2 Perustettavat vyöhykkeet määritellään tapauskohtaisesti taudin leviämisen riskin perusteella. Epitsootologisen tilanteen mukaan kyseessä oleva vesialue tai rannikkoalue

— määritellään valvontavyöhykkeeksi,

— voidaan jakaa valvontavyöhykkeeseen ja seurantavyöhykkeeseen, jos vesialue tai rannikkoalue on laaja ja jos jako ei vaaranna taudin leviämisen ehkäisyä.

Lisäksi voidaan tarvittaessa perustaa uusia valvontavyöhykkeitä vesialueen tai rannikkoalueen ulkopuolelle.

I.4.3 Edellä mainittuja vyöhykkeitä perustettaessa on otettava ensisijaisesti huomioon tekijät, jotka lisäävät taudin leviämisaarua viljelyihin ja luonnonvaraisiin kaloihin. Näitä tekijöitä ovat kalakuolemien määrä, osuus ja jakauma ISA-tartunnan saastuttamaksi epäillyssä tai varmistetussa viljelylaitoksessa, kalakuolemien aiheuttaja kyseisessä viljelylaitoksessa, etäisyys lähimpiin viljelylaitoksiin ja niiden sijaintitiheys, laitokset, joihin on oltu yhteydessä, laitoksissa viljeltävät lajit, saastuneissa viljelylaitoksissa ja niiden lähellä sijaitsevista laitoksista suoritettavat hallinnointitoimet, hydrodynaamiset olosuhteet ja muut epidemiologisesti merkittävät tekijät, jotka on identifioitu direktiivin 93/53/ETY 5 artiklan 2 kohdan ja 8 artiklan mukaisesti suoritettussa epitsootologisessa selvityksessä.

I.4.4 Vyöhykkeiden perustamista koskevat seuraavat vähimmäisedellytykset:

I.4.4.1 Jäsenvaltion on perustettava "valvontavyöhyke" ISA-tartunnan saastuttamaksi vahvistetun viljelylaitoksen välittömään läheisyyteen seuraavasti:

- rannikkoalueilla: säteeltään yhden vuorovesikantaman tai vähintään 5 kilometrin mittaisen ympyrän sisään jäävä alue, jonka keskipisteenä on ISA-viruksen saastuttamaksi vahvistettu viljelylaitos, taikka tätä vastaava alue, joka on määritetty asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta,
- sisävesialueilla: koko ISA-viruksen saastuttamaksi vahvistetun viljelylaitoksen vesialue. Jos kyseessä on laaja vesialue, jäsenvaltio voi rajoittaa vyöhykkeen koskemaan osia vesialueesta edellyttäen, että tämä ei vaaranna ISA-tartunnan leviämisen ehkäisyä.

I.4.4.2 "Väliaikainen valvontavyöhyke" on ISA-tartuntaa epäiltäessä perustettava kohdassa "Valvontavyöhyke" esitettyjen perusteiden pohjalta.

I.4.4.3 Jäsenvaltion on tarvittaessa perustettava "tarkkailuvyöhyke" niille valvontavyöhykkeen ulkopuolisille alueille, joilla löyhemmän tarkkailun arvioidaan riittävän ja joka vastaa

- rannikkoalueilla: valvontavyöhykettä ympäröivää aluetta, jonka vuorovesikantamat ovat päällekkäisiä, tai valvontavyöhykettä ympäröivää, sellaiseen ympyrään sisältyvää aluetta, jonka keskus on valvontavyöhykkeen keskus ja säde 10 km, taikka vastaavanlaista, asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta,
- sisävesialueilla: valvontavyöhykkeen ulkopuolelle tarvittaessa perustettua lisäaluetta.

I.5 *Viljelytauko ja perustettujen vyöhykkeiden purkaminen*

I.5.1 Jäsenvaltion toimivaltaisen viranomaisen on varmistettava, että kaikilla valvontavyöhykkeeseen kuuluvilla viljelylaitoksilla noudatetaan asianmukaista viljelytaukoa sen jälkeen, kun laitoksista on poistettu kalat ja kun laitokset on tarvittaessa desinfioitu. ISA-viruksen saastuttamaksi vahvistetun viljelylaitoksen viljelytaun on oltava vähintään 6 kuukauden pituinen. Muiden valvontavyöhykkeen laitosten osalta toimivaltainen viranomainen määrittelee viljelytaun pituuden suorittamansa riskinarvioinnin perusteella. Kun kalat on poistettu kaikista valvontavyöhykkeen laitoksista, laitosten on pidettävä samanaikaisesti vähintään 6 viikon pituinen viljelytauko.

Toimivaltainen viranomainen voi määrätä viljelytaun myös tarkkailuvyöhykkeellä sijaitseville laitoksille.

I.5.2 Perustettuja valvontavyöhykkeitä ei voida purkaa eikä niille voida tuoda uusia kaloja ennen kuin kalat on poistettu kaikista vyöhykkeillä sijaitsevista viljelylaitoksista, ennen kuin laitokset on tarvittaessa desinfioitu ja ennen kuin niissä on pidetty I.5.1 osan mukainen viljelytauko. Kun vyöhykkeille tuodaan uusia kaloja, valvontavyöhykkeet on muutettava I.4.4.3 osassa tarkoitetuiksi tarkkailuvyöhykkeiksi.

I.5.3 Väliaikaisia valvontavyöhykkeitä ei voida purkaa ennen kuin epäily ISA-tartunnasta on suljettu pois I.2.2 osan mukaisesti. Jos ISA-tartunta varmistetaan I.3 osan mukaisesti, väliaikainen valvontavyöhyke on muutettava valvontavyöhykkeeksi.

I.5.4 Perustetut tarkkailuvyöhykkeet voidaan purkaa vasta kahden vuoden kuluttua valvontavyöhykkeen purkamisesta.

I.6 *Virallinen valvonta ISA-tartuntaa epäiltäessä tai tartunnan varmistuttua*

I.6.1 Kun viljelylaitoksella epäillään tartuntaa tai kun tartunta on varmistettu, toimivaltaisen viranomaisen ja sen kanssa yhteistyössä ja sen suoran valvonnan alaisena toimivien kalaterveyden asiantuntijalaitosten on toteutettava riskipohjainen virallinen valvontaohjelma kaikilla perustetuilla vyöhykkeillä sijaitsevilla viljelylaitoksilla direktiivin 93/53/ETY 5 artiklan 2 kohdan ja 6 artiklan mukaisesti ISA-tartunnan levinneisyyden ja tautitilanteen kehityksen selvittämiseksi.

I.6.2 Edellä mainitun virallisen valvontaohjelman yhteydessä toimivaltaisen viranomaisen on tarvittaessa paikalla suoritettavan tarkastuksen avulla yksilöitävä kaikki vyöhykkeillä sijaitsevat viljelylaitokset ja suoritettava virallinen laskenta viljelylaitoksilla pidettyjen kalalajien, ikäluokkien ja kalojen lukumäärän osalta kuolleisuusluvut mukaan luettuina.

I.6.3 Väliaikaisilla valvontavyöhykkeillä sijaitsevien merilohta (*Salmo salar*) tai muuta OIE:n vesieläinten terveyttä koskevan kansainvälisen säännösten uusimmassa painoksessa tarkoitettua ja ISA-tartunnalle alttiiksi tai sitä mahdollisesti kantavaksi ilmoitettua kalalajia viljelevien laitosten on ilmoitettava kalakuolemista toimivaltaiselle viranomaiselle kahden viikon välein aluksi tehtävän virallisen laskennan jälkeen. Kuolleisuuden lisääntymisestä on ilmoitettava päivä- ja allaskohtaisesti. Toimivaltaisen viranomaisen on tutkittava kaikki viljelylaitosten ilmoittamat tavanomaista korkeammat kuolleisuusluvut.

Jos ISA-epäily vahvistetaan, kaikkien valvontavyöhykkeellä sijaitsevien viljelylaitosten on ilmoitettava toimivaltaiselle viranomaiselle kuolleisuusluvut viikoittain allas- ja päiväkohtaisesti eriteltyinä.

Tarkkailuvyöhykkeillä sijaitsevien viljelylaitosten on ilmoitettava kuolleisuusluvut toimivaltaiselle viranomaiselle kahden viikon välein.

Perustetuilla vyöhykkeillä on lisäksi suoritettava säännöllisiä tarkastuksia ympäri vuoden taulukossa 1 esitettyä tarkastustiheyttä noudattaen. Silloin kun tarkastuksia ei jonakin aikana vuodesta voida ilmastolosuhteiden takia suorittaa, jäsenvaltiot voivat määrätä toisenlaisesta tarkastustiheydestä valmiussuunnitelmassaan.

Taulukko 1

Virallinen valvontaohjelma

Laitoksen sijainti	Vuosittaisten tarkastusten vähimmäismäärä	Vuosittaisten tarkastusten vähimmäismäärä valvontavyöhykkeen purkamisen jälkeen
Valvontavyöhyke	12	
Tarkkailuvyöhyke	6	6
Väliaikainen valvontavyöhyke	6	

Valvontaohjelmaa on jatkettava, kunnes vyöhykkeet on purettu.

I.6.4 Tarkastukset sekä näytteiden valinta, keruu, valmistelu ja lähetys on suoritettava II.1—II.4 osassa määritellyllä tavalla. Näytteet on tutkittava III—VI osan mukaisesti.

II Tarkastukset ja näytteenotto

II.1 Tarkastukset ja näytteiden valinta ja keruu viljelylaitoksella, jolla epäillään ISA-tartuntaa

II.1.1 Liitteen I.6 osassa esitetyn virallisen valvontaohjelman mukaan suoritetuissa säännöllisissä tarkastuksissa sekä ISA-viruksen saastuttamiseksi epäillyillä viljelylaitoksilla suoritettavissa tarkastuksissa on tarkastettava viljelylaitoksen kaikki tilat (verkkoaltaat, muut altaat ja lammikot) kuolleiden, heikkokuntoisten tai poikkeavasti käyttäytyvien kalojen löytämiseksi. Äskettäin kuolleista (mutta ei vielä hajoamistilassa olevista), heikkokuntoisista tai poikkeavasti käyttäytyvistä kaloista on mahdollisuuksien mukaan tutkittava kliinisiä merkkejä tai *post mortem* -löydöksiä ISA-tartunnan osoittamiseksi OIE:n vesieläintautien taudinmäärityksen käsikirjan uusimmassa painoksessa kuvatulla tavalla.

II.1.2 Jos havaitaan tuoreita kliinisiä merkkejä, jotka sopivat ISA:n taudinkuvaan, tai jos tarkastajalla tai eläinlääkärillä on muuten syytä epäillä kalojen saaneen tartunnan, näytteeksi otetaan vähintään 10 kalaa. Näytteet on mahdollisuuksien mukaan kerättävä äskettäin kuolleista, heikkokuntoisista tai poikkeavasti käyttäytyvistä kaloista. Jos kliinisesti sairaiksi todettavia kaloja ei ole riittävästi, näytettä on täydennettävä niistä verkkoaltaista, muista altaista tai lammikoista valituilla terveillä kaloilla, joissa on esiintynyt eniten kalakuolemia tai kliinisiä merkkejä taudista.

II.1.3 Jos havaitaan äskettäin kuolleita, heikkokuntoisia tai poikkeavasti käyttäytyviä kaloja, joiden kliiniset merkit ja *post mortem* -löydökset eivät kuitenkaan sovi ISA:n taudinkuvaan, näytteenotto ei ole pakollista. Niitä voidaan kuitenkin ottaa tarkastajan tai eläinlääkärin harkinnan mukaan, koska ne saattavat olla tarpeellisia erotusdiagnoosin kannalta.

II.1.4 Jos luonnonvaraisilla kaloilla epäillään ISA-tartuntaa, jäsenvaltioiden on varmistettava, että kaloista otetaan asianmukaiset näytteet ja että ne tutkitaan II ja III—VI osassa määritellyillä asianmukaisilla kliinisillä menetelmillä ja laboratoriomenetelmillä ISA-tartunnan poissulkemiseksi tai vahvistamiseksi ja sen arvioimiseksi, aiheuttaako taudin esiintyminen merkittävän uhan viljelyille kaloille.

II.2 Kaloista otettujen näytteiden valmistelu

II.2.1 Histologiseen tutkimukseen tarkoitetut näytteet otetaan vain niistä äskettäin kuolleista kaloista, joissa on tautiin sopivia kliinisiä merkkejä tai *post mortem* -löydöksiä. Kaikista ulkoisista ja sisäisistä leesioista ja aina yksittäisten kalojen maksasta, munuaisen keskiosasta, sydäimestä ja pernasta on otettava (leikkauksveitsen avulla) näyte, joka siirretään 8—10-prosenttiseen (vol/vol) puskuroituun formolin fysiologiseen keittosuolasuolaliuokseen. Kiinnitysaineen ja kudospainon välisen suhteen on oltava vähintään 20:1, jotta kudokset säilyisivät riittävän hyvin.

II.2.2 Virologiseen tutkimukseen tarkoitetut kudospäytteenä otetaan kaikista niistä kaloista, jotka on kerätty näytteenottoa varten. Tulosten vahvistamista varten otetaan rinnakkaisnäyte. Maksasta, munuaisen etuosasta, sydäimestä ja pernasta otettavat kudospäytteenä irrotetaan steriilillä instrumentilla ja asetetaan muoviputkiin, jotka sisältävät 9 ml kuljetusainetta eli antibiootteja sisältävää soluviljelyyn käytettävää elatusainetta. Tarkoitukseen soveltuu yhdiste, joka sisältää 12,5 µg/ml fungisidia, 200 µg/ml polymysiini B:tä ja 200 µg/ml kanamysiiniä, mutta myös muita teholtaan tutkittuja yhdisteitä voidaan käyttää. Yhteen kuljetuselatusainetta sisältävään putkeen voidaan ottaa kudospäytteenä viidestä kalasta yhteisnäytteeksi. Kussakin näytteessä olevan kudoksen painon on oltava $1,0 \pm 0,5$ g.

II.2.3 IFAT-tutkimusta varten kerättävä munuaisnäyte otetaan vain äskettäin kuolleista kaloista (kahden tunnin kuluessa kuolemasta). Kudospäyte otetaan munuaisen keskiosasta steriilillä instrumentilla. Ylimääräisen veren poistamiseksi kudoksesta kuivataan imupaperin päällä, minkä jälkeen kudosta painetaan useaan kertaan poly-L-lysiinillä päällystettyä objektilasia vasten. Jotta solukerroksesta tulisi yhtenäinen, painamisjälkien on oltava vieressä, mutta ne eivät saa mennä päällekkäin. Verellä ja kudospäytteenä ei ole merkitystä tämän testin kannalta. Munuaisnäytettä ei saa jättää pitkäksi aikaa kuivumaan imupaperille, koska tämä saattaa johtaa veren hyytymiseen ja suurten seerumi-proteiinimäärien kerääntymiseen tutkittavalle objektilasille. Näytteet kuivataan ilmassa, ja ne on säilytettävä kuivassa ja viileässä paikassa, jos niitä ei kiinnitetä välittömästi. Näytteet on kiinnitettävä 72 tunnin kuluessa näytteenotosta. Vaihtoehtoisesti näytteet voidaan jäädyttää ilmakehävakuksen jälkeen ja säilyttää ennen kiinnittämistä enintään 1 kuukauden ajan -20 °C:n lämpötilassa.

II.2.4 Kaloja, joissa näkyy merkkejä anemiasta, voidaan tainnuttaa ja ottaa niistä heti heparinisoituja verinäytteitä hematologiseen analyysiin, esimerkiksi hematokriitin mittausta varten.

II.2.5 RT-PCR-analyysiä varten kudospäytteenä otetaan kaikista näytteenottoon valituista kaloista. Kudospäyte otetaan munuaisen etu- tai keskiosasta steriilillä instrumentilla ja siirretään mikrofugiputkeen, jossa on 1 ml tehokkaaksi osoitettua RNA:n säilytysliuosta. Yhteen säilytysliuosta sisältävään putkeen voidaan yhteisnäytettä varten ottaa kudospäytteenä viidestä kalasta. Kussakin näytteessä olevan kudoksen painon on oltava noin 0,5 g. Jos kalat ovat liian pieniä vaaditun painoisen näytteen saamiseksi, näytteeksi voidaan ottaa pala munuaista, sydäntä, pernaa, maksaa tai umpisuolta (tässä järjestyksessä), jotta saadaan 0,5 gramman painoinen näyte.

II.3 Kalanäytteiden lähettäminen

II.3.1 Virologiseen ja RT-PCR-analyysiin menevät verinäytteet ja kalan kudoksia sisältävät näyteputket on asetettava eristettyihin säiliöihin (esimerkiksi paksuseinäisiin polystyreenilaatikoihin), joissa on riittävästi jäätä tai kylmävaraajia, sen varmistamiseksi, että näytteet pysyvät jäädytettynä laboratorioon kuljettamisen aikana. Näytteitä on varjeltava jäätymiseltä, ja kuljetuslaatikossa on oltava jäätä vielä vastaanotto-paikassa tai yhden tai useamman kylmävaraajan on vielä oltava osittain tai kokonaan jäätyneet. Poikkeustapauksissa RT-PCR-näytteet ja virologisesti tutkittavat näytteet voidaan jäädyttää nopeasti (nestety-pessä) ja kuljettaa laboratorioon -20 °C:n tai sitä alemmassa lämpötilassa.

II.3.2 IFAT-menetelmällä analysoidavat objektilasit lähetetään objektilasitelineessä, ja niihin lisätään riittävästi kuivausainetta, jotta näytteet pysyvät kuivina ja jäätyneinä, kuten edellä on kuvattu.

II.3.3 Jos kalan kudoksia kuljetetaan histologiseen analyysiin kiinnitysaineessa, ne on lähetettävä vuotamattomissa putkissa iskunkestävissä säiliöissä, esimerkiksi paksuseinäisessä polystyreenilaatikossa.

- II.3.4 Ellei näytteitä ole pakastettu, virologinen analyysi on aloitettava mahdollisimman nopeasti ja viimeistään 72 tunnin kuluessa näytteenotosta. Tulosten vahvistamiseen tarkoitettua rinnakkaisnäytettä on säilytettävä vastaanottavassa laboratorioissa enintään -20°C :n lämpötilassa.
- II.3.5 Laboratorioon voidaan lähettää kokonaisia kaloja, jos II.3.1 osassa määritellyt kuljetuslämpötilalle asetetut ehdot täyttyvät. Kokonaiset kalat kääritään imupaperiin, ja ne lähetetään muovipussissa edellä kuvatulla tavalla jäädytettynä.
- II.3.6 Myös eläviä kaloja voidaan lähettää mutta vain viranomaisten valvonnassa.
- II.3.7 RNAlaterissa RT-PCR-analyysiä varten säilytettyjen kudosten RNA on eristettävä näytteen säilytyslämpötilan mukaan määrättyvässä määräajassa. Määräajat ovat seuraavat:
- | | |
|-------------------------|---------------|
| — 37°C | 1 vuorokausi, |
| — 25°C | 1 viikko, |
| — 4°C | 1 kuukausi, |
| — -20°C | ei määräaikaa |
- II.3.8 Pakkaaminen ja pakkausmerkinnät tehdään soveltuvin osin voimassa olevien kansallisten ja kansainvälisten kuljetussäännösten mukaisesti.

II.4 Diagnostisen lisäaineiston kerääminen

Muita kalojen kudoksia voidaan asianomaisen taudinmäärityslaboratorion luvalla kerätä ja valmistella lisätutkimuksia varten.

III Virologinen tutkimus

III.1 Näytteiden valmistelu

III.1.1 Jos solujen inokulointi 72 tunnin kuluessa kudoksenäytteiden ottamisesta on käytännön syistä mahdotonta, on hyväksyttävää jäädyttää kudoksenäytteet -80°C :n lämpötilassa enintään 28 päiväksi. Tämä kudosaadaan jäädyttää ja sulattaa vain kerran ennen tutkimusta.

III.1.2 Kukin näyte (yhteisnäyte kuljetuselatusaineessa) on laboratorioissa täydellisesti homogenoitava joko Stomacher- tai blender-tyyppisen homogenaattorin tai huumareen ja survimen avulla. Homogenaatti sentrifugoidaan kierrosnopeudella $2\,000\text{--}4\,000 \times g$ 15 minuutin ajan $0\text{--}6^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa, ja supernatantti suodatetaan $0,45\ \mu\text{m}$:n kalvosuodattimella ja inkuboidaan samassa määrässä sopivana laimennoksena IPN-viruksen kotoperäisten serotyyppien antiseerumiseoksen kanssa. Antiseerumin pitoisuuden on oltava vähintään $1/2000$ 50 prosentin plakkinneutralisaatiokokeessa. Seosta on inkuboitava yhden tunnin ajan 15°C :n lämpötilassa. Näin saadaan inokulaatti.

Kaikki inokulaatit käsitellään IPN-viruksen antiseerumilla (tiettyillä alueilla Euroopassa tätä virusta esiintyy 50 prosentissa kalanäytteistä), jotta voidaan ehkäistä IPN-viruksen aiheuttaman CPE:n muodostuminen inokuloiduissa soluviljelmissä. Tämä lyhentää virologisten tutkimusten kestoa sekä vähentää sellaisten tapausten määrää, joissa CPE:n ilmeneminen olisi katsottava ISA-viruksen mahdolliseksi indikaatioksi.

Jos näytteet ovat lähtöisin IPN-vapaiksi katsotuista tuotantoyksiköistä, inokulaatteja ei tarvitse käsitellä IPN-viruksen antiseerumilla.

III.2 Soluviljelmien inokulaatio

III.2.1 SHK-1-soluja (pasaasi 80. tai pienempi) tai TO-soluja viljellään 12- tai 24-kuoppaisella soluviljelylevyllä L-15-elatusaineessa, joka sisältää 5 % fetaalivasikan seerumia (FBS), 2 % (v/v) 200 mM L-glutamiinia ja 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptotetanolia. Muitakin solulinjoja voidaan käyttää, jos niiden on osoitettu olevan tehokkaita ja herkkiä ISA-viruksen eristyksessä. Tällöin on myös otettava huomioon kantojen vaihtelu ja niiden replikoitumiskyvyn vaihtelu eri solulinjoissa. Tuoreeseen aktiivisessa kasvuvaiheessa olevaan soluviljelmäkuoppaan inokuloidaan antiseerumilla käsiteltyä elinsuspensiota siten, että elatusaineen lopullinen laimennussuhde on 1:1 000. Kustakin elinsuspensiosta inokuloidaan 40 μl yhteen kuoppaan, joka sisältää 2 ml elatusainetta. Ristikontaminaatoriskin minimoimiseksi suositellaan, että kultakin viljelylaitokselta tulleille näytteille käytetään omia erillisiä 12- tai 24-kuoppalevyjä.

III.2.2 Yksi negatiivista kontrolliseerumia sisältävä levy jätetään inokuloimatta. Positiivista kontrolliseerumia sisältävä toinen levy inokuloidaan ISA-viruksen vertailuisolaatilla seuraavasti: Ensimmäiseen kuoppaan inokuloidaan 100 µl ISA-viruksen kantaliuosta (vähimmäistiteri 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹) ja sekoitetaan hyvin. Tätä liuosta siirretään ensimmäisestä kuopasta yksi tilavuusyksikkö toiseen kuoppaan, jotta saadaan laimennussuhde 1:10, ja sekoitetaan hyvin. Tätä menettelyä toistetaan levyn päähän asti, jolloin saadaan kuusi 10-kertaista laimennosta. ISA-viruksen kantaliuosta voidaan säilyttää -80 °C:n lämpötilassa ainakin 2 vuoden ajan, mutta sulatuksen jälkeen se on käytettävä 3 päivän kuluessa. Huomautus: Tutkittavat levyt on pidettävä erillään positiivisesta kontrolliseerumista ristikontaminaation estämiseksi. Tämän vuoksi positiiviset kontrolliseerumit on valmistettava ja niitä on käsiteltävä erillään tutkittavista levystä.

III.2.3 Näytteitä inkuboidaan 14 ± 2 °C:n lämpötilassa enintään 15 päivän ajan.

III.3 Mikroskopointi

Soluviljelmät on tarkastettava mikroskoopilla CPE:n havaitsemiseksi kaksi kertaa, 5.—7. päivänä ja 12.—14. päivänä inokulaatiosta. Jos jossakin yhteisnäytteessä näkyy merkkejä CPE:stä, viruksen tunnistamismenettelyt on aloitettava välittömästi (III.6 osa). Jos CPE:tä ei havaita 14 päivän inokulaation jälkeen, on suoritettava hemadsorptiokoe (III.4 osa).

III.4 Hemadsorptio

ISA-viruksen replikaatio soluviljelmässä ei aina johda CPE-muutoksiin. Tämän vuoksi jokaisesta kuopasta on tehtävä hemadsorptiokoe jäljempänä kuvatulla tavalla tai vaihtoehtoisesti jokaisesta kuopasta tehdään immunofluoresenssikoe III.6.1 osassa kuvatulla tavalla.

III.4.1 Kukin kuoppa, positiivista ja negatiivista kontrolliseerumia sisältävät kuopat mukaan lukien, tyhjenetään soluviljelyssä käytetystä elatusaineesta, joka siirretään etiketillä varustettuihin steriileihin putkiin. Jokaiseen kuoppaan lisätään 500 µl 0,2-prosenttista (v/v) kaniinin tai hevosen pestyjä punasoluja sisältävää suspensiota tai 0,05-prosenttista (v/v) kirjolohen tai merilohen pestyjä punasoluja sisältävää suspensiota, ja niitä inkuboidaan huoneenlämmössä 45 minuutin ajan. Punasolut poistetaan, ja jokainen kuoppa pestään kaksi kertaa L-15-elatusaineella. Jokaista kuoppaa tutkitaan mikroskoopilla.

III.4.2 Jos SHK-1- tai TO-solujen pintaan on kiinnittynyt punasolukertymiä, tätä on pidettävä alustavasti ortomyksovirusinfektiona. Jos hemadsorptiokoe on positiivinen, viruksen tunnistamiseksi on tehtävä välittömästi (III.6 osa).

III.5 Jatkoviljely

III.5.1 Jatkoviljely aloitetaan 13.—15. päivänä viruseristyksen alkamisesta. Aktiivisessa kasvuvaiheessa olevaan SHK-1-solukkoon 12-kuoppalevyllä lisätään 225 µl viljelmästä saatua supernatanttia, ja sitä inkuboidaan 14 ± 2 °C:n lämpötilassa enintään 18 päivän ajan. Soluviljelmistä tutkitaan CPE-muutoksia mikroskoopilla kahdesti, ensin 5—7 päivän kuluttua inokulaatiosta ja sitten 14—18 päivän kuluttua inokulaatiosta. Jos yhdessäkin yhteisnäytteessä on CPE-muutoksia, viruksen tunnistamismenettelyt on aloitettava välittömästi (III.6 osa). Jos CPE-muutoksia ei havaita 14—18 päivän kuluttua, on tehtävä hemadsorptiokoe (III.4 osa).

III.5.2 Jos sytotoksisuutta esiintyy ensimmäisten seitsemän päivän sisällä inkubaatiosta, jatkoviljely on tehtävä tässä vaiheessa ja soluja on inkuboitava 14—18 päivää, jatkoviljeltävä uudelleen ja inkuboitava taas 14—18 päivää. Jos sytotoksisuutta esiintyy seitsemännen päivän jälkeen, jatkoviljely suoritetaan kerran ja solujen inkubointia jatketaan, kunnes ensimmäisestä inokulaatiosta on kulunut kaikkiaan 28—36 päivää.

III.5.3 Jos primaariviljelmässä tapahtuu bakteerikontaminaatio, testi on aloitettava uudelleen käyttäen -80 °C:n lämpötilassa säilytettyä kudoshomogenaattia. Ennen inokulaatiota kudoshomogenaattia sentrifugoidaan ($4000 \times g$) 30 minuutin ajan 0—6 °C:n lämpötilassa ja supernatantti suodatetaan (0,22 µm:n suodatin). Jos jatkoviljelyvaiheen aikana tapahtuu bakteerikontaminaatiota, supernatantti suodatetaan (0,22 µm:n suodatin) ja inokuloidaan tuoreisiin soluihin; lisäksi sitä inkuboidaan vielä 14—18 päivän ajan.

III.6 Viruksen tunnistustestit

Jos jossain soluviljelyn vaiheessa todetaan CPE:n muodostumista tai jos hemadsorptiokoe on positiivinen, on suoritettava viruksen tunnistaminen. ISA-viruksen ensisijaisia tunnistusmenetelmiä ovat IF-menetelmä (III.6.1 osa) ja RT-PCR-menetelmä (IV osa). Jos näytteessä epäillään olevan muitakin viruksia, on suositeltavaa tehdä lisätestejä virusten tunnistamiseksi. Jos testeissä ei ole tunnistettu virusta varmuudella viikon kuluessa, supernatantti on toimitettava kansalliseen vertailulaboratorioon tai EU:n kalatauteja tutkivaan vertailulaboratorioon välittömästi tunnistusta varten.

III.6.1 Immunofluoresenssi (IF)

III.6.1.1 SHK-1-soluja (pasaasi 80. tai pienempi) tai TO-soluja viljellään 24- tai 96-kuoppalevyllä L-15-elatusaineessa, joka sisältää 5 % fetaalivasikan seerumia (FBS), 2 % (v/v) 200 mM L-glutaamiinia ja 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptoetanolia. Viljelmät käytetään, kun solut peittävät vähintään 50 prosenttia viljelypinta-alasta. Muitakin solulinjoja tai elatusaineita voidaan käyttää, jos niiden on osoitettu olevan tarkoitukseen sopivia. Viljelmästä lisätään kahteen rinnakkaiseen kuoppaan 225 µl mahdollisesti virusta sisältävää supernatanttia, sekoitetaan ja siirretään 225 µl kahteen uuteen kuoppaan (1:5-laimennos). Kaksi muuta kuoppaa jätetään inokuloimatta ja niitä käytetään kontrolleina. Eri kalanviljelylaitosten näytteitä ja viruskontrollinäytteitä on käsiteltävä erillisillä levyillä. Viruskontrollina käytetään ISAV-vertailuisolaattia.

III.6.1.2 Levyjä inkuboidaan 14 ± 2 °C:ssa ja niitä tarkastellaan mikroskoopilla enintään 7 päivän ajan. Kun havaitaan varhaisia CPE-muutoksia tai jos CPE-muutoksia ei havaita 7 päivän aikana, näytteet kiinnitetään. Kuopat pestään fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS) ja kiinnitetään inkuboimalla niitä 80-prosenttisessä asetonissa 20 minuutin ajan huoneenlämmössä. Levyjen annetaan kuivua, jonka jälkeen ne on värjättävä välittömästi tai niitä on säilytettävä 0–6 °C:ssa enintään 24 tunnin ajan ennen värjäystä.

III.6.1.3 Rinnakkaiskuopat värjätään ISAV:n monoklonaalisella vasta-aineella 3H6F8 tai muulla monoklonaalisella vasta-aineella, jonka teho ja spesifisyys on osoitettu, laimennetaan PBS:ään ja inkuboidaan 37 ± 4 °C:ssa 30 minuutin ajan. Monoklonaalinen vasta-aine poistetaan, ja levyt pestään kolme kertaa PBS:lla, johon on lisätty 0,05 % Tween 20:tä. Jokaiseen kuoppaan lisätään PBS:ään laimennettua anti-hiiri-IgG-FITC-konjugaattia, ja niitä inkuboidaan 37 ± 4 °C:ssa 30 minuutin ajan. Huomautus: monoklonaalisten vasta-aineiden ja FITC-konjugaatin eri erien laimennokset on optimoitava jokaisessa laboratoriossa erikseen. Vasta-aine poistetaan, ja levyt pestään kolme kertaa PBS:lla, johon on lisätty 0,05 % Tween 20:tä.

III.6.1.4 Kuoppia tarkastellaan välittömästi käänteisfluoresenssimikroskoopilla, joka on varustettu FITC:n virittymiseen sopivalla suotimella. Jos fluoresoivia soluja havaitaan, testin tulosta pidetään positiivisena. Testi on luotettava, jos positiiviset kontrollit ovat positiivisia ja negatiiviset kontrollit negatiivisia.

IV Näytteiden tutkiminen rt-pcr -menetelmällä

IV.1 Tässä jaksossa kuvataan menettelyjä, joita tarvitaan kalan kudoksesta tai ISA-virusviljelmästä tehtävässä ISA-virusgenomin segmentin 8 osan PCR-monistuksessa.

IV.1.1 RNA:n eristäminen

- Jokaisesta näytteestä poistetaan RNAlater. Jokaiseen putkeen lisätään 1 ml DEPC-käsiteltyä dH₂O:ta ja putkia sentrifugoidaan (13 000 rpm) 5 minuutin ajan 0–6 °C:ssa.
- Putkista poistetaan supernatantti. 800 µl TRIzol (Invitrogen) tai muuta teholtaan yhtä hyväksi tai paremmaksi osoitettua reagenssia lisätään näytteisiin sekä kontrolliputkeen, joka sisältää sopivaa kontrollimateriaalia (400 µl dH₂O:ta tai munuaishomogenaattia, joka on peräisin taudinaiheuttajista vapaaksi määritellystä kalasta). Kudokset hajotetaan tarvittaessa pumppaamalla varovasti suspensiota pipettiin ja ulos. Putkia inkuboidaan huoneenlämmössä 5 minuutin ajan. Jokaiseen putkeen lisätään 160 µl kloroformia ja putkia ravistellaan voimakkaasti 3 minuutin ajan, minkä jälkeen niitä sentrifugoidaan (13 000 rpm) 15 minuutin ajan 0–6 °C:ssa.
- Vesipitoinen ylempi kerros siirretään etiketillä varustettuun 1,5 ml:n mikrofugiputkeen, joka sisältää 500 µl isopropanolia. Putkia inkuboidaan 10 minuutin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen niitä sentrifugoidaan (6 500 rpm) 15 minuutin ajan 0–6 °C:ssa.

- d) Supernatantti poistetaan, ja 1 ml 75 % etanolia lisätään RNA-pellettiin. Tämän jälkeen putkia sentrifugoidaan (6 500 rpm) 5 minuutin ajan 0–6 °C:ssa.
- e) Supernatantti poistetaan ja putkia pidetään avonaisina noin 3 minuutin ajan, jotta kaikki etanoli haihtuisi. Pelletin resuspensoimiseksi lisätään 15 µl DEPC-käsiteltyä dH₂O:ta ja putkia vorteksoidaan tarvittaessa lyhyen aikaa.
- f) RNA-pitoisuus ja näytteiden puhtaus lasketaan spektrofotometrin avulla. Optinen tiheys mitataan aallonpituuksilla 260 ja 280 nm.
- g) Välttömästi (saman päivän aikana) käytettävää RNA:ta voidaan väliaikaisesti säilyttää 0–6 °C:ssa. Myöhemmin käytettävää RNA:ta on säilytettävä – 80 °C:ssa.

IV.1.2 RT

- a) DEPC-käsitelyyn dH₂O:hon laimennetaan 2 µg RNA:ta 1,5 ml:n mikrofugiputkissa. Jos näytteen RNA-pitoisuus on niin pieni, ettei RT-reaktioon saada 2 µg:a, on käytettävä suurinta saatavaa RNA-määrää. Laimennettua RNA:ta inkuboidaan 55–60 °C:ssa 10 minuutin ajan.
- b) Tämän jälkeen RNA:ta sisältävät putket asetetaan jäihin ja lisätään RT-reagenssit, jotta loppupitoisuuksiksi saadaan 1 × puskuri, 1 mM deoksinukleotiditriposfaatteja (dNTP), 100 ng satunnaisia kuuden emäksen alukkeita, 20 U RNAasi-inhibiittoria ja 200 U MMLV-RT:tä 20 µl:n kokonaistilavuudessa.
- c) Putkia inkuboidaan 37 °C:ssa yhden tunnin ajan.
- d) cDNA säilytetään 0–6 °C:ssa, kunnes sitä tarvitaan, ja se on käytettävä PCR-analysiin mahdollisimman nopeasti.

IV.1.3 PCR

- a) Lisätään 45 µl:aan PCR-seosta 5 µl cDNA:ta, jotta loppupitoisuuksiksi saadaan 1 × puskuri, 1,5 mM MgCl₂:ta, 0,2 mM kutakin dNTP:tä, 25 pmol kumpaakin aluketta ja 1 U Taq-polymeraasia. Alukkeet ovat ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (koodaavan suunnan aluke) ja ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (vastakkaisen suunnan aluke). Eristämis-, RT- ja PCR-vaiheille on oltava negatiiviset kontrollit.
- b) Putket asetetaan monistulaitteeseen, joka on ensin säädetty 94 °C:een 5 minuutiksi ja sitten 35 syklin ajaksi 94 °C:een yhdeksi minuutiksi, 55 °C:een yhdeksi minuutiksi ja 72 °C:een yhdeksi minuutiksi ja loppuinkubointiin 72 °C:een 5 minuutiksi.
- c) PCR:n tulokset arvioidaan etidiumbromidilla värjätystä 2-prosenttisestä agarosigeelistä elektroforeesijon jälkeen. Samaan elektroforeesijonon pipetoidaan näytteiden rinnalle molekyylikokostandardit sekä RT- ja PCR-vaiheiden negatiiviset kontrollit. Jos tuotteeksi saadaan yksi 155 emäsparin PCR-tuote, sitä tulee pitää osoituksena ISA-viruksen RNA:n esiintymisestä. Näytteiden, jotka sisältävät myös yhden 310 emäsparin tuotteen, katsotaan myös sisältävän ISA-viruksen RNA:ta. Näytteet, joista saadaan useita PCR-tuotteita ja vähintään yksi noin 155 emäsparin tuote, saattavat sisältää ISA-viruksen RNA:ta. Näille näytteille voidaan tehdä lisätutkimuksia DNA-koettimien tai nukleotidisekvenssoinnin avulla.

IV.1.4 Kudosviljelmässä eristetyn ISAV:n varmistaminen PCR:llä

Jos kudosnäytteiden virologisessa tutkimuksessa on havaittu täydellinen CPE-muutos SHK-1-solukossa, kuopasta siirretään 400 µl supernatanttia steriiliin 1,5 ml:n putkeen. RNA eristetään näytteestä III.1 osassa kuvatulla tavalla ja suoritetaan RT-PCR. Jos käytetään viljelmiä, joissa ei ole ilmennyt täydellistä CPE:tä, supernatantti poistetaan ja solut kaavitaan kuopan tai pullon seinämistä ja asetetaan steriiliin 1,5 ml:n putkeen RNA:n eristämistä ja RT-PCR-analysiä varten.

IV.1.5 PCR-tuotteiden varmistaminen DNA-koettimella

- a) 155 emäsparia sisältävän PCR-tuotteen spesifisyys voidaan arvioida käyttämällä koettimena oligonukleotidia, joka hybridisoituu PCR-tuotteen alueelle alukkeiden välissä. PCR-tuotteet ajetaan elektroforeesilla 1-prosenttisessä agarosigeelissä molekyylipainostandardien, positiivisen kontrollin ja RT- ja PCR-vaiheiden negatiivisten kontrollien kanssa.

- b) DNA siirretään membraanille Southern blot -menetelmää käyttäen, ja leimattu oligonukleotidi (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') inkuboidaan membraanin kanssa asianmukaisten prehybridisaatiovaiheiden jälkeen.
- c) Sitoutumaton ja epäspesifisesti sitoutunut koetin pestään kalvolta ja sitoutunut koetin visualisoidaan.
- d) 155 emäsparin fragmenttiin (ja mahdolliseen 310 emäsparin fragmenttiin) sitoutunutta koetinta on pidettävä osoituksena PCR:n spesifisyydestä ja näytteessä olevasta ISA-viruksen RNA:sta.

IV.1.6 PCR-tuotteiden nukleotidisekvensointi

PCR:n spesifisyys voidaan arvioida tutkimalla 155 emäsparin PCR-tuotteen nukleotidisekvenssiä.

- a) PCR-tuote puhdistetaan agarosigeelistä tai liuoksesta.
- b) Fragmentti sekvensoidaan samoilla alukkeilla, joita käytettiin PCR-analyysissä, tai vektorialukkeilla, jos fragmentti kloonattiin vektoriin ennen sekvensointia.
- c) Nukleotidisekvenssiä on verrattava ISA-virussegmentin 8 nukleotidisekvenssiin, jotka ovat saatavilla EMBL:n nukleotidisekvenssitietokannassa (tunnusnumerot Y10404, AJ012285 ja AJ242016).
- d) ISA-virussegmentin 8 sekvenssiä vastaavan segmentin löytyminen osoittaa, että näytteessä on ISA-viruksen RNA:ta.

V Munuaisnäytteiden tutkimus IFAT-menetelmällä

V.1 IFAT-menetelmällä suoritettavaan munuaisnäytteiden tutkimukseen on vahvistettu seuraava menettely

V.2 Munuaisnäytteiden valmistelu ja värjäys

- V.2.1 Objektilasit kiinnitetään asetonissa tai metanoli-asetoniseoksessa (1:1) 3 minuuttia ja kuivataan ilmassa. Ennen värjäystä jokaista objektilasia on tarkasteltava ja ympyröitävä siitä tarvittavat alueet ImmEdgeTM-kynällä (tai vastaavalla) ja annettava kuivua. Tämän jälkeen objektilasit upotetaan estoliuokseen (6 % rasvatonta maitoa PBS:ssä, joka sisältää 0,2 % Tween 20:tä) ja inkuboidaan kevyessä heilutuksessa 30 minuuttia huoneenlämmössä. Jokainen objektilasi valutetaan ja asetetaan horisontaalisesti objektilasikoteloon, jossa on märkä paperipyyhe kosteuden säilyttämiseksi.
- V.2.2 Jokainen näyte peitetään ISAV:n monoklonaalista vasta-ainetta 3H6F8 (tai muuta vasta-ainetta, jonka teho ja spesifisyys on osoitettu) sisältävällä liuoksella, minkä jälkeen objektilasikotelo suljetaan ja sitä inkuboidaan heilutuksessa 60 minuuttia huoneenlämmössä. Yleensä vasta-aine laimennetaan suhteessa 1:10 → 1:100 1-prosenttiseen rasvattomaan maitoon, mutta tarvittava laimennos on määritettävä eräkohtaisesti. Objektilasit pestään kolme kertaa 2 minuuttia kerrallaan PBS:ssä, joka sisältää 0,1 % Tween 20:tä. Jokainen näyte peitetään liuoksella, joka sisältää FITC-konjugoitua vuohen anti-hiiri-vasta-ainetta laimennettuna 1-prosenttiseen rasvattomaan maitoon suhteessa 1:1 000, ja inkuboidaan kosteassa 60 minuuttia huoneenlämmössä. Objektilasit pestään kolme kertaa 2 minuuttia kerrallaan PBS:ssä, joka sisältää 0,1 % Tween 20:tä. Jokainen objektilasi peitataan CitifluorTM-liuoksella (500 µl CitifluorTM:ää sekoitettuna 1,5 ml:aan PBS:ään valmistettua 0,1 % (v/v) Tween 20:tä) tai muulla sopivalla peittäysaineella 10 minuutiksi. Objektilasit pestään 3 kertaa PBS:ssä, joka sisältää 0,1 % Tween 20:tä. Jos vastavärjäys on tarpeen, jokainen näyte voidaan peittää propidiumjodidilla (0,01 mg/ml) PBS:ssä, joka sisältää 0,1 % Tween 20:tä, ja niitä voidaan inkuboida 3 minuuttia huoneenlämmössä. Objektilasit pestään kolme kertaa 2 minuuttia kerrallaan PBS:ssä, joka sisältää 0,1 % Tween 20:tä. Objektilasit valutetaan ja peitataan CitifluorTM-liuoksella tai muulla sopivalla peittäysaineella. Objektilasit säilytetään pimeässä 4 °C:ssa ennen mikroskopointia.

V.3 Tutkiminen fluoresenssimikroskopiolla

Jokainen objektilasi tutkitaan fluoresenssimikroskoopilla käyttäen fluoreseiini-isotiosyanaatille sopivaa suodinta etsien sille tunnusomaista vihreää fluoresenssia. Kaikki ImmEdgeTM-kynällä ympyröityjen alueiden sisällä olevat kentät on tutkittava 10- ja 20-kertaisella objektiivilla ja epäilyn herättävät alueet (vihreänä fluoresoivat alueet) on tutkittava tarkemmin 40-kertaisella objektiivilla ja faasikontrasti/fluoresenssivalaistuksella varmistukseksi siitä, että fluoresenssi tulee soluista. Epäilyä herättävien alueiden paikkakoordinaatit kirjataan ylös, jotta fluoresenssin luonne voidaan myöhemmin varmentaa toisen tutkijan suorittamalla tutkimuksella. Ensimmäisen tutkijan suorittaman tutkimuksen jälkeen toisen henkilön on tutkittava uudelleen positiiviset ja epäilyä herättävät objektilasit tulosten varmenttamiseksi.

V.4 *Kontrollit*

V.4.1 Jokaisessa IFAT-tutkimusta varten värjättyssä objektilasierässä on oltava seuraavat kontrollit:

- infektoitumattomasta merilohesta saatu munuaisnäyte (negatiivinen kontrolli),
- infektoitumaton SHK-1-soluviljelmä tai muu vastaava soluviljelmä (negatiivinen kontrolli),
- ISA-viruksen infektoima SHK-1-soluviljelmä tai muu vastaava soluviljelmä (positiivinen kontrolli).

V.4.2 On suositeltavaa käyttää ISA-viruksen infektoimasta merilohesta saatua munuaisnäytettä (jos sellainen on saatavilla) toisena positiivisena kontrollina.

V.4.3 Jos mistä tahansa negatiivisesta kontrollista saadaan positiivinen tulos, testiä pidetään epävalidina kaikkien kyseisen erän objektilasien osalta. Jos kaikki erän objektilasit, positiiviset kontrollit mukaan lukien, ovat negatiivisia, testiä pidetään epävalidina kaikkien kyseisen erän objektilasien osalta. Jos kontrollien epäonnistuminen tekee objektilasierästä epävalidin, objektilasit on hävitettävä ja tutkimus on suoritettava uudelleen rinnakkaisnäytteistä.

V.5 *Muiden kudosten tutkiminen*

Tätä menetelmää voidaan soveltaa kalan muihin kudoksiin kuten maksa-, perna- ja sydänkudoksiin, jos objektilasille saadaan riittävä määrä endoteelisoluja, leukosyyttejä tai lymfosyyttejä. Värjäysmenetelmä pysyy samana kaikille kudoksille, vaikka joidenkin kudosten kohdalla on suositeltavaa jättää pois propidiumjodidivärjäys ja käyttää näytteen solutyypin tunnistukseen vain faasikontrastivalaistusta.

VI **Histologia**

Parafiinileikkeet leikataan 5 µm:n paksuisiksi ja värjätään hematoksyliinillä ja eosiinilla. ISA-tautiin liittyvät histologiset muutokset on kuvattu OIE:n vesieläintautien taudinmäärityksen käsikirjan (OIE Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases) uusimmassa painoksessa.

VII **Kirjainsanat ja lyhenteet**

cDNA	komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo
CPE	sytopaattinen vaikutus
DEPC	dietyylipyrokarbonaatti
dNTP	deoksinukleotiditriposfaatti
FITC	fluoreseiini-isotiosyanaatti
IF	immunofluoresenssi
IFAT	epäsuora fluoresenssivasta-ainetestti
OIE	Maailman eläintautijärjestö
IPN(V)	tarttuva haimakuoliotauti (virus)
ISA(V)	lohen tarttuva anemia (virus)
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
RNA	ribonukleiinihappo
RT-PCR	käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktio
SHK-1	lohen munuaisen etuosan solut
TCID ₅₀	50 prosenttia soluviljelmästä infektoiva annos.