II

(Säädökset, joita ei tarvitse julkaista)

KOMISSIO

KOMISSION PÄÄTÖS,

tehty 5 päivänä helmikuuta 1996,

näytteenottosuunnitelmista ja taudinmääritysmenetelmistä tiettyjen kalatautien esiintymisen havaitsemiseksi ja vahvistamiseksi tehdyn komission päätöksen 92/532/ETY muuttamisesta

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

(96/240/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 direktiivillä 95/22/EY [2], ja erityisesti sen 15 artiklan,

sekä katsoo, että

näytteenottosuunnitelmista ja taudinmääritysmenetelmistä tiettyjen kalatautien esiintymisen havaitsemiseksi ja vahvistamiseksi määrätään komission päätöksessä 92/532/ETY [3],

tämän päätöksen hyväksymisen jälkeen on tapahtunut uutta käytännöllistä ja tieteellistä kehitystä, joka vaatii näytteenottosuunnitelmien ja taudinmääritysmenetelmien ajanmukaistamista,

tällainen ajanmukaistaminen koskee näytteiden kokoa, otettavia näytteitä, näytteiden kuljetusta ja näytteessä mahdollisesti esiintyvien virusten eristämismenetelmää,

komission päätöksellä 81/651/ETY [4] perustettua eläinlääkintäalan tiedekomiteaa on kuultu, ja

tässä päätöksessä määrätyt toimenpiteet ovat pysyvän eläinlääkintäkomitean lausunnon mukaiset,

ON TEHNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

Korvataan päätöksen 92/532/ETY liite tämän päätöksen liitteellä.

2 artikla

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 5 päivänä helmikuuta 1996.

Komission puolesta

Franz FISCHLER

Komission jäsen

---

[1] EYVL N:o L 46, 19.2.1991, s. 1
[2] EYVL N:o L 243, 11.10.1995, s. 1
[3] EYVL N:o L 337, 21.11.1992, s. 18
[4] EYVL N:o L 233, 19.8.1981, s. 32

LIITE

I OSA

VHS- JA IHN-VALVONNAN NÄYTTEENOTTO- JA TAUDINMÄÄRITYSMENETELMÄT

I. Näytteenotto

1. *Näytteenottoajankohta*

Viljelylaitoksissa on suoritettava kliininen tarkastus vähintään kaksi kertaa vuodessa loka-kesäkuun aikana tai muuna ajankohtana, jolloin veden lämpötila on alle 14 °C. Tarkastusten välillä on oltava vähintään neljä kuukautta. Kaikki tuotantoyksiköt (lammikot, altaat, akvaariot, verkkoaltaat jne.) on tarkastettava kuolleiden, heikkojen tai poikkeavasti käyttäytyvien kalojen havaitsemiseksi. Erityistä huomiota on kiinnitettävä poistovesipisteeseen (jos mahdollista), jonne heikoilla kaloilla on taipumus kerääntyä veden virtauksen vuoksi.

2. *Näytteiden valinta ja kerääminen*

Tutkimusta varten kerätään taulukossa 1 tarkoitettujen tarkastusten yhteydessä näytteitä, jotka koostuvat 30—150 kalasta ja/tai ovaarinesteistä. Jos viljelyssä on kirjolohia, näytteen olisi koostuttava kokonaisuudessaan tämän lajin kaloista. Muussa tapauksessa näytteen on sisällettävä kaikkien muiden viljelyssä olevien lajien kaloja siltä osin kuin nämä lajit ovat alttiita VHS- ja/tai IHN-taudille, siten kuin ne on luetteloitu eläinten terveyttä koskevista edellytyksistä saatettaessa vesiviljeltyjä eläimiä ja tuotteita markkinoille annetun direktiivin 91/67/ETY liitteessä A. Lajien on oltava oikeassa suhteessa edustettuna näytteessä. Hyväksyntää edeltävän alustavan neljän vuoden valvontajakson kahden ensimmäisen vuoden aikana näytteen on koostuttava 150 yksiköstä, jotta varmistetaan 95 prosentin luotettavuusaste levinneisyydeltään 2 prosenttia olevan viruksen havaitsemisessa, lukuun ottamatta rannikkovyöhykkeillä olevia lohensukuisia kaloja kasvattavia viljelylaitoksia, joissa ei ole emokaloja, jolloin näytteen koko on 30 yksikköä.

Valvontajakson kahden viimeisen vuoden aikana näytteen koko voidaan pienentää 30 yksikköön, jotta varmistetaan 95 prosentin luotettavuusaste levinneisyydeltään 10 prosenttia olevan viruksen havaitsemisessa. Seuraavina vuosina (hyväksynnän säilyttäminen) näytteen koko voidaan samoin pienentää 30 yksikköön.

Viljelylaitoksissa, jotka ovat todistettavasti olleet vähintään neljä vuotta VHS- ja IHN-vapaita (säännöllisen virallisen terveystarkastusohjelman perusteella), voidaan käyttää pientä näytekokoa myös koko alustavan neljän vuoden pituisen valvontajakson aikana.

Jos kalantuotannossa käytetään useampaa kuin yhtä vedensaantilähdettä, 150 tai 30 kalaa sisältävässä näytteessä on oltava kaikkia vedensaantilähteitä edustavia kaloja. Jos joukossa on heikkokuntoisia, poikkeavasti käyttäytyviä tai äskettäin kuolleita (mutta ei vielä hajoamistilassa olevia) kaloja, nämä on ensisijaisesti sisällytettävä näytteeseen. Jos joukossa ei ole tällaisia kaloja, näytteen on koostuttava terveistä, ulkonäöltään tavanomaisista kaloista, jotka on kerätty siten, että kaikki viljelylaitoksen osat ja kaikki vuosiluokat ovat oikeassa suhteessa edustettuina näytteessä.

3. *Kalanäytteiden valmistaminen ja lähettäminen*

Ennen lähettämistä tai siirtämistä laboratorioon tutkittavat elinten kappaleet on irrotettava kalasta saksien tai muiden steriilien välineiden avulla ja asetettava muoviputkiin, jotka sisältävät kuljetuselatusainetta eli 10 prosenttia vasikan seerumia ja antibiootteja sisältävää soluviljelyyn käytettävää elatusainetta. Suositeltava on yhdiste, joka sisälltää 200 KY penisilliiniä, 200 µg streptomysiiniä ja 200 µg kanamysiiniä millilitrassa, mutta voidaan myös käyttää muita teholtaan tutkittuja antibiootteja. Tutkittavat kudokset ovat perna, etummainen munuainen ja lisäksi joko sydän tai aivot. Joissain tapauksissa ovaarineste täytyy tutkia (taulukko 1).

Lukumäärältään 10 kalan (taulukko 1) ovaarineste tai elinten kappaleet voidaan kerätä yhteen 10 ml muoviputkeen, joka sisältää 4 ml kuljetuselatusainetta, yhteisnäytteeksi. Kussakin näytteessä olevan kudoksen painon on oltava vähintään 0,5 grammaa (g).

Putket ja riittävä määrä jäitä tai "kylmävaraajia" asetetaan eristettyihin säiliöihin (esimerkiksi paksuseinäisiin polystyreenilaatikoihin) sen varmistamiseksi, että näytteiden lämpötila on 0—5 °C laboratorioon kuljettamisen aikana. Näytteitä on varjeltava jäätymiseltä. Näytteen lämpötila kuljetuksen aikana ei saa koskaan ylittää 10 °C:ta, ja kuljetuslaatikossa on vielä oltava jäätä vastaanottopaikassa.

Virologinen tutkimus on aloitettava mahdollisimman pian ja viimeistään 48 tuntia näytteiden keräämisen jälkeen tai poikkeustapauksissa viimeistään 72 tuntia tutkittavan aineen keräämisen ja kuljetuselatusaineella suojelemisen jälkeen, silloin kun lämpötilavaatimukset kuljetuksen aikana voidaan täyttää (katso edellinen kohta).

Kokonaisia kaloja voidaan lähettää laboratorioon, jos lämpötilavaatimukset kuljetuksen aikana voidaan täyttää. Kokonaiset kalat voidaan kääriä imukykyiseen paperiin, ja ne on lopuksi lähetettävä muovipussissa edellä kuvatulla tavalla jäädytettynä. Eläviä kaloja voidaan myös lähettää.

4. *Taudinmäärityksen lisäaineiston kerääminen*

Muita kalojen kudoksia voidaan asianomaisen taudinmääritysLaboratorion kanssa tehdyn sopimuksen mukaisesti kerätä ja valmistaa lisätutkimuksia varten.

II. Näytteiden valmistaminen virologista tutkimusta varten

1. *Elinten homogenointi*

Putkissa olevat kudokset on laboratoriossa täydellisesti homogenoitava (joko *stomacher*-homogenisaattorin, sekoittimen tai huhmaren ja morttelin avulla) ja sen jälkeen suspendoitava alkuperäiseen kuljetuselatusaineeseen. Jos näyte koostuu kokonaisista kaloista, joiden pituus on alle 6 cm, nämä leikataan steriileillä saksilla pieniksi palasiksi sen jälkeen, kun suolen aukon takana oleva osa ruumiista on poistettu, homogenoidaan edellä kuvatun menetelmän mukaisesti ja suspendoidaan kuljetuselatusaineeseen. Kudosaineen ja kuljetuselatusaineen lopullisen suhteen on oltava 1:10.

2. *Homogenaatin sentrifugointi*

Homogenaatti sentrifugoidaan sentrifugissa, joka on jäähdytetty 2—5 °C:seen, 2 000—4 000 × g, 15 minuutin ajan, ja kelluva neste kerätään talteen, ja sitä käsitellään joko neljä tuntia 15 °C:ssa tai yön yli 4 °C:ssa antibiooteilla, esimerkiksi gentamysiini 1 mg/ml voi olla hyödyllinen tässä vaiheessa.

Jos näyte lähetetään elatusaineessa (eli antibiooteille altistuneena), kelluvan nesteen käsittely antibiooteilla voidaan jättää pois.

Antibioottikäsittelyllä pyritään pitämään näytteiden bakteerikontaminaatio hallinnassa ja tekemään suodatus kalvosuodattimilla tarpeettomaksi.

Jos kelluva osa varastoidaan −80 °C:seen 48 tunnin sisällä näytteenotton jälkeen, se voidaan sulattaa ja käyttää uudelleen vai kerran virologista tutkimusta varten.

Jos esiintyy käytännön ongelmia (esimerkiksi inkubaattori menee rikki, soluviljelyn kanssa on ongelmia), minkä takia on mahdotonta inokuloida soluja 48 tunnin sisällä kudosaineksen keräämisestä, on hyväksyttävää jäädyttää kelluva neste −80 °C:seen ja tehdä virologinen tutkimus 14 päivän sisällä.

Ennen inokulaatiota soluihin kelluva neste sekoitetaan tilavuudeltaan yhtä suureen määrään tarpeen mukaan laimennettua antiseerumiseosta, joka koostuu kotoperäisinä esiintyvien IPN-virusserotyyppien vasta-aineista, ja inkuboidaan tällaisena vähintään tunti 15 °C:ssa tai enintään 18 tuntia 4 °C:ssa. Antiseerumin pitoisuuden on oltava vähintään 1/2 000 50-prosenttisessa plakkineutralisaatiokokeessa.

Käsittelemällä kaikki inokulaatit IPN-viruksen antiseerumilla (tietyillä alueilla Euroopassa tämä virus esiintyy 50 prosentissa kalanäytteistä) pyritään estämään IPN-viruksesta aiheutuvan CPE:n kehittyminen inokuloiduissa soluviljelmissä. Tämä lyhentää virologisten tutkimusten kestoa sekä vähentää sellaisten tapausten lukumäärää, joissa CPE:n ilmeneminen olisi katsottava VHS:n tai IHN:n mahdolliseksi indikaatioksi.

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

III. Virologinen tutkimus

1. *Soluviljelmät ja elatusaineet*

Joko BF-2:ta tai RT6-2:ta ja joko EPC- tai FHM-solut kasvatetaan 20—30 °C:n lämpötilassa sopivassa elatusaineessa, esimerkiksi Eagle's MEM-elatusaineessa (tai sen muunnelmissa), johon on lisätty 10 prosenttia naudan sikiön seerumia ja antibiootteja standardipitoisuuksina.

Viljeltäessä soluja suljetuissa pulloissa elatusaineen puskuroimista bikarbonaatilla suositellaan. Avoimissa yksiköissä kasvatettavissa soluviljelmissä käytettävä elatusaine voidaan puskuroida Tris-HCl:lla (23 mM) ja natriumbikarbonaatilla (6 mM). PH:n on oltava mahdollisimman tarkasti 7,6.

Kudosaineen inokulaatiossa käytettävien soluviljelmien tulisi olla nuoria (4—48 tunnin ikäisiä) ja aktiivisessa kasvuvaiheessa (ei yhtyviä) inokulaatiohetkellä.

2. *Soluviljelmien inokulaatio*

Soluviljelmiin inokuloidaan antibioottikäsiteltyä elinsuspensiota kahtena laimennoksena eli itse primäärilaimennoksen lisäksi sen 1:10 laimennoksena, joka on tulosta kudosaineksen lopullisesta laimennuksesta soluviljelmissä käytettävään elatusaineeseen suhteessa 1:100 ja 1:1000 (homologisen interferenssin estämiseksi). Vähintään kaksi solulinjaa on inokuloitava (katso III.1 jakso). Inokulaatin koon ja soluviljelyelatusaineen tilavuuden suhteen tulisi olla noin 1:10.

Kutakin laimennosta ja solulinjaa kohti käytettävän solualueen tulisi olla vähintään noin 2 cm^2 vastaten yhtä kuoppaa 24-kuoppaisessa soluviljelyastiassa. Soluviljelyastioiden käyttö on suositeltavaa, mutta myös muut, samanlaisen tai suuremman kasvupinnan tarjoavat alustat soveltuvat tähän tarkoitukseen.

3. *Soluviljelmien inkubointi*

Inokuloituja soluviljelmiä inkuboidaan 15 °C:ssa 7—10 päivää. Jos soluviljelmän elatusaineen väri muuttuu punaisesta keltaiseksi osoittaen elatusaineen happamoitumista, pH-arvoa on säädettävä steriilin bikarbonaattiliuoksen tai vastaavien aineiden avulla solun virusinfektioherkkyyden varmistamiseksi.

Jäädytetyt VHS- ja IHN-viruskannat on titrattava kuuden kuukauden välein soluviljelmien infektioherkkyyden tarkistamiseksi.

4. *Mikroskopointi*

Inokuloidut soluviljelmät tarkastetaan päivittäin CPE:n muodostumisen havaitsemiseksi noin 40-kertaisella suurennuksella. Jos havaitaan selvä CPE-esiintymä, viruksen tunnistamismenetelmät on aloitettava välittömästi IV jakson mukaisesti.

5. *Jatkoviljelmät*

Jos CPE:tä ei ole kehittynyt 7—10 päivän primäärisen inkubaation jälkeen, suoritetaan jatkoviljely tuoreille soluviljelmille käyttäen samanlaista soluainetta kuin primäärisoluviljelmässä.

Kaikista primäärisoluviljelmän muodostavista viljelmistä/kuopista lähtöisin olevat elatusaineen määräosat (kelluva neste) ryhmitellään solukannan mukaan 7—10 päivää inokulaation jälkeen. Ryhmitelmät inokuloidaan tämän jälkeen homologisiin soluviljelmiin laimentamattomina ja laimennettuina suhteessa 1:10 (tulos kelluvan osan lopullisista laimennoksista suhteessa 1:10 ja 1:100), kuten I osan III jakson 2 kohdassa on kuvailtu. Inokulointia voi edeltää kaikkien laimennosten esi-inkubointi IPN-viruksen antiseerumin kanssa sopivana laimennoksen, kuten on kuvailtu I osan II jakson 2 kohdassa.

Tämän jälkeen inokuloituja viljelmiä inkuboidaan 7—10 päivän ajan 15 °C:ssa tarkkailun alaisena kuten III jakson 4 kohdassa on kuvailtu.

Jos myrkyllistä CPE:tä esiintyy kolmen ensimmäisen päivän sisällä inkubaatiosta, jatkoviljelmä voidaan tehdä tässä vaiheessa, mutta soluja on tällöin inkuboitava seitsemän päivän ajan ja jatkoviljeltävä uudelleen seitsemän uuden inkubaatiopäivän kanssa. Siinä tapauksessa, että myrkyllinen CPE kehittyy kolmen päivän jälkeen, solut voidaan vaihtaa kerran ja inkubaatiota jatkaa, kunnes 14 vuorokautta on kulunut ensimmäisestä inokulaatiosta. Seitsemänä viimeisenä inkubaatiopäivänä ei tulisi ilmetä myrkyllisyyttä.

IV. Viruksen tunnistaminen

1. *Viruksen tunnistamistestit*

Jos soluviljelmässä on todettu CPE:n muodostuminen, elatusaine (kelluva neste) kerätään talteen, ja tutkitaan yhdellä tai useammalla seuraavista menetelmistä: neutralisaatio, immunofluoresenssi (IF), ELISA-testi (enzyme linked immunosorbent assay).

Jos testeissä ei ole tunnistettu virusta varmuudella viikon kuluessa, virus on siirrettävä kansalliseen kalaviruksiin erikoisuneeseen vertailulaboratorioon tai EU:n kalatauteja tutkivaan vertailulaboratorioon välitöntä tunnistusta varten.

Immunoreagenssien käytön viruksen tunnistamisessa on oltava vertailulaatua, ja kansallisen kalaviruksiin erikoistuneen vertailulaboratorion on hyväksyttävä se pitoisuuden ja spesifisyyden suhteen.

2. *Neutralisaatio*

Solut poistetaan talteen kerätystä elatusaineesta sentrifugoinnilla (2 000—4 000 × g) tai suodattamalla kalvosuodattimella (0,45 µm), ja elatusaine laimennetaan suhteeseen 1:100 ja 1:10 000 soluviljelmän elatusaineessa.

Laimennosten määräosat sekoitetaan, ja niitä inkuboidaan erikseen 60 minuutin ajan 15 °C:ssa yhdessä seuraavien reagenssien samansuuruisten osien kanssa:

— VHS-viruksen (Egtved-virus) ryhmäspesifistinen vasta-aine	1:50 (*)
— tarttuvan verta muodostavan kudoksen kuolion (IHN) aiheuttavan viruksen ryhmäspesifinen vasta-aine	1:50 (*)
— tarttuvan haimakuoliotaudin (IPN) aiheuttavan viruksen kotoperäisinä esiintyvien serotyyppien erityinen antiseerumiseos (vertailukannat Sp, Ab tai VR 299)	1:50 (*)
— elatusaine	1:1

Vähintään kaksi soluviljelmää inokuloidaan kukin 50 µl:lla viruksen ja seerumin seosta ja inkuboidaan 15 °C:ssa. CPE:n kehittymistä valvotaan III jakson 4 kohdan mukaisesti.
Muita tehokkuudeltaan tutkittuja neutralisaatiotestejä voidaan käyttää vaihtoehtoisesti.

(*) Tai vertailulaboratorion määräämällä tavalla antiseerumien mahdollisen sytotoksisuuden osalta.

3. *Immunofluoresenssi (IF)*

Kutakin tunnistettavaa eristettyä virusta kohti istutetaan vähintään kahdeksalle peitinlasille tai vastaavalle alustalle CPE-soluja sellaisella tiheydellä, että se johtaa noin 60—90 prosentin peittoon 24 tunnin viljelyn jälkeen. CPE-solut valitaan tähän tarkoitukseen, koska ne kiinnittyvät voimakkaasti lasipintoihin.

Kun solut ovat asettuneet lasipinnalle (noin tunti istuttamisesta) tai kun viljelmiä on inkuboitu enintään 24 tunnin ajan, tunnistettava virus inokuloidaan. Neljä viljelmää inokuloidaan tilavuussuhtein 1:10 ja neljä viljelmää suhtein 1:100.

Sen jälkeen, kun inokulaatiosta on kulunut 20—30 tuntia, viljelmät huuhdotaan kahteen kertaan Eagle's MEM -tuotteella, joka ei sisällä seerumia, kiinnitetään asetonilla ja värjätään kaksikerros-IFAT:lla. Ensimmäinen reagenssikerros koostuu poly- tai monikloonisista vertailulaatua olevista vasta-aineista. Toinen reagenssikerros on ensimmäisessä kerroksessa käytetyn immunoglobuliinin FITC-konjugoitu antiseerumi. Kutakin kokeessa käytettyä antiseerumia kohti värjätään vähintään yksi suurella annoksella inokuloitu ja yksi pienellä annoksella inokuloitu viljelmä. Kokeen on sisällettävä asianmukaiset negatiiviset ja positiiviset kontrollit.

Värjätyt viljelmät irrotetaan glyserolisuolaliuoksella. Ne tutkitaan tulevan ultraviolettivalon alla. Käytetään 10 × tai 12 × -okulaaria ja × 25 tai × 40 -objektiivilinssejä, joiden vastaavat numeeriset aukot ovat > 0,7 ja > 1,3.

Tietyt Egtved-viruskannat reagoivat voimakkaasti IFAT:n F 1 -vertailukantojen antiseerumin kanssa, vaikka ne eivät reagoisi neutralisaatiokokeissa.

Edellä esitetty IF-tekniikka on annettu vain esimerkkinä. Muita teholtaan tutkittuja IF-tekniikoita (soluviljelyn, kiinnittymisen ja vertailulaatua olevien vasta-aineiden osalta) voidaan käyttää vaihtoehtoisesti.

4. *ELISA-testi (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys)*

Mikrotiitterilevyjen (esimerkiksi Nunc-immunolevyt, Maxisorp, Nunc, Tanska) kuopat peitetään yöksi vertailulaatua olevien vasta-aineiden proteiini A:lla puhdistettujen immunoglobuliinijakeiden suositelluilla laimennoksilla.

Sen jälkeen, kun kuopat on huuhdeltu PBS-Tween-20 -puskurilla, tunnistettava virus viedään kuoppiin kaksin- tai nelinkertaisina laimennossarjoina ja annetaan reagoida peittävän vasta-aineen kanssa 60 minuutin ajan 37 °C:ssa. PBS-Tween-20 -puskurilla tapahtuvan huuhtelun jälkeen lisätään spesifisyydeltään peittäviä vasta-aineita vastaavia biotinyylillä käsiteltyjä vasta-aineita ja annetaan reagoida 60 minuutin ajan 20 °C:ssa. Sen jälkeen, kun edellä kuvattu huuhtelu on toistettu, lisätään HRP-konjugoitu streptavidiini ja annetaan reagoida tunnin ajan 20 °C:ssa. Viimeisen huuhtelun jälkeen sidottu entsyymi saadaan näkyviin sopivien ELISA-substraattien (OPD tai muut) avulla.

Edellä esitetty biotiini- ja avidiini-pohjainen ELISA-versio on annettu vain esimerkkinä. Sen asemesta voidaan käyttää myös muita teholtaan tutkittuja ELISA-versioita.

Taulukko 1 A

Hyväksynnän saaminen

	Kliinisten tarkastusten lukumäärä vuosittain: 1. ja 2. vuosi	Kasvavat kalat: elintutkimukseen otettavien kalojen lukumäärä: 1. ja 2. vuosi	Emokalat: ovaarinesteen tutkimukseen otettavien kalojen lukumäärä: 1. ja 2. vuosi
Mannervyöhykkeet			
a) Viljelylaitokset, joissa on emokaloja	2	120 (1. tarkastus) (*) 150 (2. tarkastus)	30 (1. tarkastus) 0
b) Viljelylaitokset, joissa on yksinomaan emokaloja	2	0	150 (1. tai 2. tarkastus)
c) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokaloja	2	150 (1. ja 2. tarkastus)	0
Rannikkovyöhykkeet			
a) Lohensukuisia kaloja kasvattavat viljelylaitokset, joissa ei ole emokaloja	2	30 (1. ja 2. tarkastus)	0
b) Viljelylaitokset, jotka eivät kasvata lohensukuisia kaloja ja joissa ei ole emokaloja	2	150 (1. ja 2. tarkastus)	0
c) Viljelylaitokset, joissa on emokaloja	2	120 (1. tarkastus) 150 (2. tarkastus)	30 (1. tarkastus) 0

	Kliinisten tarkastusten lukumäärä vuosittain: 3. ja 4. vuosi	Elintutkimukseen otettavien kalojen lukumäärä: 3. ja 4. vuosi	Ovaarinesteen tutkimukseen otettavien kalojen lukumäärä: 3. ja 4. vuosi
Mannervyöhykkeet			
a) Viljelylaitokset, jossa on emokaloja	2	20 (1. tai 2. tarkastus)	10 (1. tai 2. tarkastus)
b) Viljelylaitokset, joissa on yksinomaan emokaloja	2	0	30 (1. tai 2. tarkastus)
c) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokaloja	2	30 (1. tai 2. tarkastus)	0
Rannikkovyöhykkeet			
a) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokaloja	2	30 (1. tai 2. tarkastus)	0
b) Viljelylaitokset, joissa on emokaloja	2	20 (1. tai 2. tarkastus)	10 (1. tai 2. tarkastus)

Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytettä kohti: 10

(*) Kliininen tarkastus.

Taulukko 1 B

Hyväksynnän säilyttäminen

	Kliinisten tarkastusten lukumäärä vuosittain	Kasvavat kalat: elintutkimukseen otettavien kalojen lukumäärä (1)	Emokalat: ovaarinesteen tutkimukseen otettavian kalojen lukumäärä (1)
Mannervyöhykkeet			
a) Viljelylaitokset, joissa on emokaloja	2	20 (1. tai 2. tarkastus)	10 (1. tai 2. tarkastus) (2)
b) Viljelylaitokset, joissa on yksinomaan emokaloja	2	0	30 (1. tai 2. tarkastus) (2)
c) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokaloja	2	30 (1. tai 2. tarkastus)	0
Rannikkovyöhykkeet			
a) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokaloja	1	30 (3)	0
b) Viljelylaitokset, joissa on emokaloja	2	20 (1. tai 2. tarkastus)	10 (1. ja 2. tarkastus) (2)

Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytettä kohti: 10

(1) Näytteet on kerättävä vuorollaan vain 50 prosentista vyöhykkeen kalanviljelylaitoksia vuosittain.

(2) Jos ovaarinestettä on mahdotonta saada, poikkeustapauksissa voidaan näytteiksi lähettää elimiä.

(3) Näytteet on kerättävä aikaisintaan kolmen viikon kuluttua kalojen siirtämisestä makeasta vedestä meriveteen.

II OSA

TAUDINMÄÄRITYSMENETTELYT IHN:N TAI VHS:N VAHVISTAMISEKSI TAUTIEPÄILYTAPAUKSISSA

IHN:n ja VHS:n taudinmääritys voidaan suorittaa käyttäen jotakin seuraavista tekniikoista:

— A. Tavanomainen viruseristys ja sitä seuraava viruksen serologinen tunnistaminen,

— B. Viruseristys samanaikaisesti viruksen serologisen tunnistamisen kanssa,

— C. Muut taudinmääritystekniikat (IFAT, ELISA).

IHN:n ja VHS:n ensimmäinen taudinmääritys hyväksytyillä vyöhykkeillä sijaitsevissa viljelylaitoksissa ei saa perustua pelkästään menetelmään C. Lisäksi on käytettävä joko menetelmää A tai B.

Virologiseen tutkimukseen tarkoitetun kudoksen mukana voi jossakin tapauksissa olla myös lisäaineistoa bakteriologista, parasitologista, histologista tai muuta tutkimusta varten erotusdiagnoosin mahdollistamiseksi. Kyseinen aineisto olisi kerättävä OIE:n määrittelemien menettelyjen mukaisesti.

II.A Viruksen tavanomainen eristäminen ja sitä seuraava viruksen serologinen tunnistaminen

II.A.I.1 *Näytteiden valinta*

Tutkimuskäyttöön on syytä valita vähintään 10 kalaa, joissa ilmenee tyypillisiä IHN:n tai SHV:n merkkejä.

II.A.I.2 *Kalanäytteiden valmistaminen ja lähettäminen*

Katso I.I.3.

II.A.I.3 *Taudinmäärityksen lisäaineiston kerääminen*

Katso I.I.4.

II.A.II *Näytteiden valmistelu virologista tutkimusta varten*

Katso I.II.

II.A.III *Virologinen tutkimus*

Kuten I osan III jaksossa, lukuun ottamatta sitä, että joko BF-2:ta tai RTG-2:ta ja joko EPC- tai FHM-soluja voidaan käyttää inokulaatioon kudosaineksen kanssa.

II.A.IV *Viruksen tunnistaminen*

Katso I.IV.

II.B Viruksen eristäminen samanaikaisesti viruksen serologisen tunnistamisen kanssa

II.B.I.1 *Näytteiden valinta*

Katso II.A.I.1.

II.B.I.2 *Kalanäytteiden valmistaminen ja lähettäminen*

Katso I.I.3.

II.B.I.3 *Taudinmäärityksen lisäaineiston kerääminen*

Katso I.I.4.

II.B.II.1 *Elinten homogenointi*

Katso I.II.1.

II.B.II.2 *Homogenaatin sentrifugointi*

Katso I.II.2.

II.B.II.3 *Kelluvan liuoksen käsittely diagnostisten antiseerumien avulla*

Antibiootilla ja anti-IPN:llä käsitelty elinsuspensio laimennetaan suhteeseen 1:10 ja 1:10 000 soluviljelyelatusaineessa, ja määräosat sekoitetaan ja inkuboidaan 60 minuutin ajan 15 °C:ssa I osan IV jakson 2 kohdassa lueteltujen reagenssien samansuuruisten osien kanssa.

II.B.III.1 *Soluviljelmät ja elatusaineet*

Joko BF-2:ta tai RTG-2:ta ja joko EPC- tai FHM-soluja kasvatetaan 20—30 °C:ssa sopivassa elatusaineessa, esimerkiksi Eagle's MEM -elatusaineessa (tai sen muunnelmissa), johon on lisätty 10 prosenttia naudan sikiön seerumia ja antibiootteja standardipitoisuuksina.

Viljeltäessä soluja suljetuissa pulloissa elatusaineen puskuroimista bikarbonaatilla suositellaan. Avoimissa yksiköissä kasvatettavissa soluviljelmissä käytettävä elatusaine voidaan puskuroida Tris-HCl:lla (23 mM) ja natriumbikarbonaatilla (6mM). PH:n on oltava mahdollisimman tarkasti 7,6.

Kudosaineen inokulaatiossa käytettävien soluviljelmien tulisi olla nuoria (4—48 tunnin ikäisiä) ja aktiivisessa kasvuvaiheessa (ei yhtyviä) inokulaatiohetkellä.

II.B.III.2 *Soluviljelmien inokulaatio*

Kustakin (II.B.II.3 jakson mukaisesti valmistetusta) virus/seerumiseoksesta inokuloidaan 50 µl vähintään kahteen kunkin solulinjan soluviljelmään.

II.B.III.3 *Soluviljelmien inkubaatio*

Katso I.III.3.

II.B.III.4 *Mikroskopointi*

Inokuloidut soluviljelmät tarkastetaan päivittäin CPE:n muodostumisen havaitsemiseksi noin 40-kertaisella suurennuksella. Jos jokin käytetyistä antiseerumeista estää CPE:n muodostumisen, virus voidaan katsoa tunnistetuksi.

Jos kyseiset antiseerumit eivät estä CPE:n muodostumista, on syytä panna toimeen viruksen tunnistamismenettelyt I osan IV jakson mukaisesti.

II.B.III.5 *Jatkoviljelmät*

Jos CPE:tä ei ole muodostunut seitsemän päivän kuluessa, on suoritettava jatkoviljely kelluvalla liuoksella inokuloiduista viljelmistä ja elatusaineesta (II.B.II.3) I osan III jakson 5 kohdan mukaisesti.

II.C **Muut taudinmääritystekniikat**

Supernatantti, joka on valmistettu II.A.II.2 jaksossa kuvatulla tavalla, käsitellään IFAT:lla tai ELISAlla vastaavasti II.A.IV.3 tai II.A.IV.4 jakson mukaisesti. Näitä nopeita tekniikoita on täydennettävä virologisella tutkimuksella A:n tai B:n mukaisesti alle 48 tunnin kuluessa näytteenotosta, jos

a) on saatu negatiivinen tulos

tai

b) on saatu positiivinen tulos ensimmäistä IHN- tai VHS-tapausta edustavista näytteistä hyväksytyllä vyöhykkeellä.

Kudosaines voidaan alistaa muille tekniikoille, kuten jäähdytettyjen kantojen IF-testi tai formaliinilla kiinnitetyn kudosaineksen immunohistokemia. Näihin tekniikoihin on liityttävä kiinnittämättömän kudosaineen inokulaatio soluviljelmiin.

LYHENTEET

BF-2	*bluegill* fibroblast (solulinja)
CPE	solutuhovaikutus
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
EPC	*Epithelioma papulosum cyprinii* (solulinja)
FHM	fathead minnow (solulinja)
FITC	fluoreseiini-isotiosyanaatti
HPR	retikkaperoksidaasi
IF	immunofluorenssi
IFAT	epäsuora fluorenssivasta-ainetesti
IHN(V)	tarttuvan verta muodostavan kudoksen kuolio (virus)
IPN(V)	kalojen tarttuva haimakuoliotauti (virus)
MEM	vähimmäismäärä olennaista elatusainetta
OPD	o-fenyleenidiamiini
PBS	fosfaattipuskuroitu suolalios
RTG-2	rainbow trout gonad (solulinja)
Tris-HCl	tris(hydroksimetyyli) aminometaani — HCl
VHS(V)	virusperäinen verenvuotoseptikemia (virus)