II

(Незаконодателни актове)

РЕШЕНИЯ

РЕШЕНИЕ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ (ЕС) 2015/1554 НА КОМИСИЯТА

от 11 септември 2015 година

за определяне на правила за прилагането на Директива 2006/88/ЕО по отношение на изискванията за надзор и диагностичните методи

(нотифицирано под номер C(2015) 6188)

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Директива 2006/88/ЕО на Съвета от 24 октомври 2006 г. относно ветеринарномедицинските изисквания за аквакултури и продукти от тях и за предотвратяване и борба с някои болести по водните животни ([1]), и по-специално член 49, параграф 3, член 50, параграф 4, член 57, буква б) и член 61, параграф 3 от нея,

като има предвид, че:

(1) С Директива 2006/88/ЕО се определят минималните предпазни мерки за надзор и ранно откриване по водните животни на болестите от списъка, установен в приложение IV към посочената директива („вписаните в списъка болести“), и мерките за борба, които се прилагат при съмнение или огнище на вписаните в списъка болести. С нея също така се определят изискванията за обявяване на държави членки, зони или компартменти от тях за „свободни от болест“.

(2) Ликвидирането на вписаните в списъка болести и обявяването на дадена държава членка, зона или компартмент за „свободна от болест“ следва да бъдат въз основа на едни и същи принципи и да бъдат съобразени с един и същ научен подход в целия Съюз. Поради това на равнището на Съюза е необходимо да се определят специални изисквания за схемите за ликвидиране и надзор, както и методи за вземане на проби и диагностичните методи, които да се използват от държавите членки, за да бъдат дадена държава членка (на цялата ѝ територия), зона или компартмент от нея обявени за свободни от болест.

(3) Лабораторните изследвания, които се извършват при съмнение или потвърждение на присъствие на вписани в списъка болести, следва да бъдат еднакви на равнището на Съюза и следва да бъдат съобразени с еднакви научни стандарти и протоколи. В съответствие с Директива 2006/88/ЕО е необходимо да бъдат установени специфични диагностични методи и процедури, които да се използват от лабораториите, определени за тази цел от компетентния орган на държавите членки.

(4) В здравния кодекс за водните животни („Кодекса за водните животни“), приет от Световната организация за здравеопазване на животните (OIE), се установяват стандарти за подобряване на здравето на водните животни и хуманното отношение към рибата от рибовъдни стопанства по света, включително стандарти за безопасност при международната търговия с водни животни и продукти от тях. В няколко глави от Кодекса за водните животни се формулират препоръки относно употребата на някои диагностични тестове. Такива тестове, предвидени от OIE, са установени в Наръчника на OIE за тестове за диагностика на водни животни („Наръчника за водните животни“). С цел да се гарантира, че изискванията на Съюза по отношение на диагностиката на болестите по водните животни отговарят на международните стандарти, в правилата, определени в настоящото решение, следва да бъдат взети предвид стандартите и препоръките по Кодекса за водните животни.

([1]) ОВ L 328, 24.11.2006 г., стр. 14.

(5) В тази връзка по отношение на редица от вписаните в списъка болести, в Кодекса за водните животни се изброяват няколко теста и процедури, които да се използват за лабораторните изследвания. За да се уеднакви на равнището на Съюза научната основа за диагностичната работа за включените в списъка болести, е необходимо да се направи избор между диагностичните тестове и процедури, препоръчани от OIE, и да се посочи кои тестове следва да бъдат задължителни за лабораторно изследване, когато се провеждат програми за надзор и за отхвърляне на съмнение за присъствие на вписана в списъка болест или за потвърждение на присъствието ѝ. Макар в някои случаи да се предполага, че ще са необходими алтернативни методи и процедури, следва да се предоставят описания и някои научни обяснения за това кога и как биха могли да се приложат алтернативните методи. По-специално, това е необходимо за по-подробните диагностични процедури.

(6) С цел да бъдат получени точни и възпроизводими диагностични резултати, е важно подробните процедури и протоколи, които се използват, да са валидирани в съответствие със съответните стандарти за качество, посочени в част I от приложение VI към Директива 2006/88/ЕО. За редица от диагностичните методи, предвидени в настоящото решение, използването на търговски комплекти за изследвания е необходима част от диагностичните протоколи, като тези комплекти за тестове са били валидирани с акредитирани от референтните лаборатории на ЕС тестове за съответните болести. В интерес на правната сигурност в настоящото решение следва да бъдат споменати търговските наименования на тези валидирани търговски комплекти за изследвания.

(7) Може да се окаже трудно за някои държави членки да бъдат обявени за „свободни от болест“ за цялата им територия, зона или компартмент от нея по отношение на една или повече от вписаните в списъка болести. В подобни случаи държавите членки могат да пожелаят да не получат или да не си възстановят статуса на свободни от болест. Минималните мерки за борба, които се прилагат в случаите, когато засегнатата държава членка не желае да получи или да си възстанови статуса на свободна от болест, следва да бъдат еднакви на равнището на Съюза и следва да отговарят на еднакви критерии. Следователно в съответствие с Директива 2006/88/ЕО е необходимо да бъдат определени подробни правила за ограничаването на разпространението на посочените вписани в списъка болести, както и минималните изисквания за премахването на тези мерки за ограничаване на разпространението.

(8) С Решение 2001/183/ЕО на Комисията ([1]) се определят изискванията относно плановете за вземане на проби и диагностичните методи за откриване и потвърждаване на вписаните в списъка болести инфекциозна хемопоетична некроза и вирусна хеморагична септицемия. С Решение 2003/466/ЕО на Комисията ([2]) се определят изискванията относно плановете за вземане на проби и диагностичните методи за откриване на инфекциозна анемия по сьомгите, както и критериите за зониране и официалния надзор при съмнение и потвърждение на присъствието на тази болест. С Решение 2002/878/ЕО на Комисията ([3]) се определят изискванията относно плановете за вземане на проби и диагностичните методи за откриване и потвърждаване на присъствието на болестите *Bonamia ostreae* и *Marteilia refringens* по мекотелите. С цел изискванията да бъдат актуализирани, посочените три решения следва да бъдат заменени с настоящото решение. Поради това Решение 2001/183/ЕО, Решение 2002/878/ЕО и Решение 2003/466/ЕО следва да бъдат отменени.

(9) Тъй като някои държави членки имат нужда от време, за да подготвят своите национални референтни лаборатории с цел да бъдат изпълнени изискванията, определени в настоящото решение, то следва да се прилага от 1 април 2016 г.

(10) Мерките, определени в настоящото решение, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по растенията, животните, храните и фуражите,

ПРИЕ НАСТОЯЩОТО РЕШЕНИЕ:

Член 1

Предмет

С настоящото решение се определят правила за следното:

а) надзора, буферните зони, методите за вземане на проби и диагностичните методи, които да се използват от държавите членки във връзка със статуса по отношение на болестта на държавите членки, зоните или компартментите от тях за неекзотични болести по водните животни, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО („вписаните в списъка болести“);

([1]) Решение 2001/183/ЕО на Комисията от 22 февруари 2001 г. относно определяне на плановете за вземане на проби и диагностичните методи за откриване и потвърждаване на някои болести по рибите и за отмяна на Решение 92/532/ЕИО (ОВ L 67, 9.3.2001 г., стр. 65).

([2]) Решение 2003/466/ЕО на Комисията от 13 юни 2003 г. за установяване на критериите за зониране и мерките, които трябва да се предприемат за официален надзор при съмнение или потвърждение на присъствието на инфекциозна анемия по сьомгите (ISA) (ОВ L 156, 25.6.2003 г., стр. 61).

([3]) Решение 2002/878/ЕО на Комисията от 6 ноември 2002 г. за определяне на планове за вземане на проби и диагностични методи за откриване и потвърждаване на наличието на болестите *Bonamia ostreae* и *Marteilia refringens* по мекотелите (ОВ L 305, 7.11.2002 г., стр. 57).

б) диагностичните методи, които да се използват за лабораторни изследвания при съмнение или потвърждение на присъствието на вписаните в списъка болести; както и

в) минималните мерки за борба, които да се прилагат при съмнение или потвърждение на вписана в списъка болест в държава членка, зона или компартмент, които не са обявени за свободни от посочената вписана в списъка болест.

Член 2

Определения

За целите на настоящото решение се прилагат следните определения:

а) „вирусна хеморагична септицемия (ВХС)“ е болест, която се причинява от вируса на вирусната хеморагична септицемия (ВХС), известен също като вирус Егтвед — вирус от род *Novirhabdovirus* семейство *Rhabdoviridae*;

б) „инфекциозната хемопоетична некроза“ (ИХН) е болест, причинена от вируса на инфекциозната хемопоетична некроза (ИХН), принадлежащи към рода *Novirhabdovirus*, от семейство *Rhabdoviridae*;

в) „кой-херпесвирусна болест по шарана (КХБШ)“ е болест, причинена от кой херпес вирус по шарана (КХВШ) от семейство *Alloherpesviridae*. Научното наименование е херпес вирус 3 по сладководните риби (CyHV-3);

г) „инфекциозна анемия по сьомгата (ИАС)“ е болест, предизвикана от заразяване с ISAV с генотип HPR-с делеции, вирус от род *Isavirus*, семейство *Orthomyxoviridae*;

д) „заразяване с *Marteilia refringens*“ е болест, предизвикана от заразяване с протозойния паразит *Marteilia refringens*, принадлежащ към тип *Paramyxea*;

е) „заразяване с *Bonamia ostreae*“ е болест, предизвикана от заразяване с протозойния паразит *Bonamia ostreae*, принадлежащ към тип *Paramyxea*;

ж) „бяло петнисто заболяване“ е болест, причинена от вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване — вирус с двойно верижна ДНК от род *Whispovirus* семейство *Nimaviridae*.

Член 3

Минимални изисквания за програмите за ликвидиране и надзор

Държавите членки гарантират, че правилата за програмите за надзор и ликвидиране, буферните зони, методите за вземане на проби и диагностичните методи, посочени в приложение I, и специфичните методи и процедурите, подробно описани в приложение II, се спазват, когато статусът „свободен от болест“ се предоставя, преустановява или възстановява на държава членка, на зона или компартмент от нея за една или повече от вписаните в списъка болести.

Член 4

Минимални изисквания за диагностичните методи и специфичните процедури

Държавите членки гарантират, че методите за борба, посочени в приложение I, и специфичните методи за диагностика и подробните процедури, посочени в приложение II, са спазени, когато се извършват лабораторни изследвания, за да се потвърди или отхвърли присъствието на вписана в списъка болест.

Член 5

Минимални мерки за борба с цел ограничаване на разпространението и минимални изисквания за премахване на ограничителните мерки в държавите членки, зони или компартменти, необявени за свободни от вписаните в списъка болести

При изпълнението на мерките за борба и при премахването на ограничителните мерки за една или повече от вписаните в списъка болести в дадена държава,зона или компартмент от нея, необявени за свободни от тези вписани в списъка болести, държавите членки гарантират, че са спазени минималните мерки за борба и минималните изисквания за премахване на ограничителните мерки, предвидени в приложение I.

Член 6

Отмяна

Решения 2001/183/ЕО, 2002/878/ЕО и 2003/466/ЕО се отменят.

Член 7

Дата на прилагане

Настоящото решение се прилага от 1 април 2016 г.

Член 8

Адресати

Адресати на настоящото решение са държавите членки.

Съставено в Брюксел на 11 септември 2015 година.

За Комисията
Vytenis ANDRIUKAITIS
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

МЕТОДИ ЗА НАДЗОР И БОРБА

I. **Въведение**

В настоящото приложение се определят:

а) изискванията за програмите за ликвидиране и надзор, както е предвидено в член 44 от Директива 2006/88/ЕО, и методите за вземане на проби и диагностичните методи, които се използват, за да се обяви дадена държава членка, зона или компартмент от нея за „свободна от болест“, както е предвидено в глава VII от същата директива;

б) вземането на проби и диагностичните методи, които се използват за лабораторни изследвания при съмнение и за потвърждение на присъствие на неекзотичните болести, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО („вписани в списъка болести“), както е предвидено в член 28, буква а) и член 57, буква б) от посочената директива;

в) ограничителните мерки, които да бъдат предприети при потвърждаване на присъствието на вписана в списъка болест, както е предвидено в член 39 от Директива 2006/88/ЕО, както и мерките, които да бъдат предприети, за да бъде получен здравен статус категория III за държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V.

Изискванията, изложени в настоящото приложение, обхващат следните вписани в списъка болести:

1.	Вирусна хеморагична септицемия (ВХС)	Част 1
2.	Инфекциозна хемопоетична некроза (IHN)	Част 1
3.	Кой-херпесвирусна болест по шарана (КХБШ)	Част 2
4.	Инфекциозна анемия по сьомгата (ИАС)	Част 3
5.	Заразяване с *Marteilia refringens*	Част 4
6.	Заразяване с *Bonamia ostreae*	Част 5
7.	Бяло петнисто заболяване	Част 6

II. **Определения**

За целите на приложения I и II се прилагат следните определения:

а) „континентален компартмент“ е едно или повече стопанства, разположени на континенталната част на една или повече държави членки, които са в обща система за биологична сигурност, обхващаща популация от водни животни с определен здравен статус по отношение на конкретна болест;

б) „континентално стопанство“ е стопанство, в което се отглеждат аквакултурни животни, разположени на континенталната част на територията на една държава членка;

в) „континентална зона“ е определена географска област, разположена на континенталната част на една или повече държави членки с еднородна хидрологична система, обхващаща части от водосборен басейн от извора до естествена или изкуствена граница, която предотвратява миграцията нагоре на водни животни от по-ниски протежения на водосборния басейн, цял водосборен басейн от неговия извор до устието му, или повече от един водосборен басейн, включително техните устия, поради епидемиологичната връзка между водосборните райони чрез устието;

г) „официално обявено за заразено стопанство“ е стопанство, в което се отглеждат водни животни и където една или повече от вписаните в списъка болести е потвърдена от компетентния орган в съответствие с членове 28, буква а), член 29 и член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО.

д) „контактно стопанство“ е стопанство, където се отглеждат водни животни, за което има дадено доказателство или силно съмнение, че е заразено с инфекциозен материал от официално обявено за заразено стопанство.

ЧАСТ I

МЕТОДИ ЗА НАДЗОР И БОРБА С ВИРУСНАТА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИЦЕМИЯ (ВХС) И ИНФЕКЦИОЗНАТА ХЕМОПОЕТИЧНА НЕКРОЗА (ИХН)

I. **Изисквания за програмите за надзор и ликвидиране, за да бъде получен и запазен здравният статус „свободен от болест“ по отношение на ВХС и ИХН, и за ограничителните мерки за посочените вписани в списъка болести**

I.1. Общи изисквания за санитарните инспекции и вземането на проби за ВХС и ИХН:

а) санитарните инспекции, а когато е целесъобразно — и вземането на проби, се извършват през периода от годината, когато температурата на водата е под 14 °C или когато температурата на водата е вероятно да достигне най-ниската си годишна стойност;

б) когато се изисква целенасочен надзор върху популации от диви животни в съответствие с част I, точка 2, втори параграф от приложение V към Директива 2006/88/ЕО, броят и географското разпределение на пунктовете за вземане на проби се определят така, че да се постигне разумно покритие на държавата членка, зоната или компартмента. Пунктовете за вземане на проби са представителни за различните екосистеми, в които се намират популации от диви животни от възприемчиви видове;

в) когато стопанства или популации от диви животни подлежат на санитарни инспекции или от тях се вземат проби повече от веднъж годишно, интервалите между санитарните инспекции и между вземането на пробите е най-малко четири месеца и тези интервали са възможно най-дълги, като се вземат предвид изискванията за температурата, предвидени в буква а);

г) във всички производствени единици, като например езера, водоеми, мрежести клетки, се извършват санитарни инспекции за установяване на наличието на мъртви, слаби или с анормално поведение риби. Специално внимание се отделя на водоотливната точка, където заради течението на водата обикновено се струпват слабите риби;

д) рибите от възприемчивите видове, от които се вземат проби, се подбират, както следва:

i) ако има дъгова пъстърва, за вземане на проби се подбират само риби от този вид, освен когато има и други възприемчиви видове, които показват типични признаци за ХВС или ИХН; ако няма дъгова пъстърва, пробата трябва да бъде представителна за всички други присъстващи възприемчиви видове;

ii) ако има слаби риби, риби с анормално поведение или такива, които са умрели наскоро, но не са разложени, се подбира тази риба; ако за производството на рибата се използва повече от един воден източник, в пробата се включват риби от всички водни източници;

iii) подбраната риба включва риби, събрани по такъв начин, че в пробата са представени пропорционално всички части на стопанството, както и всички възрастови групи по години.

I.2. Специални изисквания за получаване на здравен статус „свободен от болест“ (категория I) по отношение на ВХС и ИХН

I.2.1. Програми за надзор:

а) държава членка, зона или компартмент, които са със здравен статус категория III, както е посочено в част Б от приложение III към Директива 2006/88/ЕО по отношение на ВХС или ИХН или и на двете, могат да получат здравен статус категория I по отношение на вписаните в списъка болести, при условие че всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към посочената директива, в посочената държава членка, зона или компартмент отговарят на изискванията, определени в приложение V към посочената директива, като всички тези стопанства, а когато се изисква съгласно част I, точка 2, втори параграф от приложение V към нея — и пунктовете за вземане на проби от популации от диви животни, подбрани в съответствие с тази част, са били подложени на една от следните програми за надзор:

i) модел А — програма за двегодишен надзор:

Стопанствата или пунктовете за вземане на проби трябва да са били подложени на санитарни инспекции и от тях да са вземани проби за период от най-малко две последователни години, както е определено в таблица 1.А, посочена в раздел II.

По време на този двегодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., трябва да е дало отрицателни резултати за ВХС или ИХН или и двете, като всяко съмнение за присъствието на ВХС или ИХН или и двете трябва да е било отхвърлено в съответствие с методите за вземане на проби и диагностичните методи, посочени в точка II.3;

ii) модел Б — програма за четиригодишен надзор с намален размер на пробата:

Стопанствата или пунктовете за вземане на проби трябва да са били подложени на санитарни инспекции и от тях да са вземани проби за период от най-малко четири последователни години, както е определено в таблица 1.Б, посочена в раздел II.

По време на този четиригодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., трябва да е дало отрицателни резултати за ВХС или ИХН или и двете, като всяко съмнение за присъствието на ВХС или ИХН или и двете трябва да е било отхвърлено в съответствие с методите за вземане на проби и диагностичните методи, посочени в точка II.3;

б) ако по време на изпълнението на програмата за надзор, посочена в буква а), бъде потвърдено заразяване с ВХС или ИХН или и двете в стопанство, включено в посочената програма за надзор, и поради това се оттегля здравният статус категория II на стопанството, съответното стопанство може незабавно да си възвърне здравния статус категория II и да продължи изпълнението на програмата за надзор за получаване на статус на свободно от болест, без да изпълнява програма за ликвидиране, както е посочено в точка I.2.2, при условие че стопанството отговаря на следните условия:

i) то е континентално стопанство, чийто здравен статус по отношение на ВХС или ИХН или и двете не зависи от здравния статус на водните популации от животни в заобикалящите естествени води по отношение на болестите, вписани в списък, в съответствие с част II, точка 3 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО;

ii) то е изпразнено, почистено, дезинфекцирано и преминало период на некултивиране; продължителността на периода на некултивиране е най-малко шест седмици;

iii) заредено е с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на ВХС или ИХН или и двете.

I.2.2. Програми за ликвидиране

I.2.2.1. Общи изисквания

Държава членка, зона или компартмент със здравен статус категория V по отношение на ВХС или ИХН или и двете могат да получат здравен статус категория I по отношение на вписаните в списъка болести, при условие че всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в рамките на тази държава членка, зона или компартмент са били включени в програма за ликвидиране, която отговаря на изискванията на букви а) — д):

а) минималните мерки за борба, предвидени в глава V, раздел 4 от Директива 2006/88/ЕО, трябва да са били приложени ефективно, а в близост до стопанствата, официално обявени за заразени с ВХС или ИХН или и двете от тези вписани в списъка болести, трябва да е установена ограничена област, както е посочено в член 32, буква б) от посочената директива, състояща се от предпазна и надзорна зона.

Ограничената област трябва да бъде определена според конкретния случай, като се вземат предвид фактори, които оказват влияние върху рисковете от разпространението на болестта сред риби, отглеждани в стопанства, или дива риба, а именно: броят, делът и разпространението на смъртните случаи сред рибата в стопанствата, заразени с ВХС или ИХН или и двете; разстоянието до съседните стопанства и тяхната гъстота; близостта до кланици; контактни стопанства; видове, които са в стопанството; прилаганите селскостопански практики в засегнатите стопанства и в съседните им стопанства; хидродинамични условия и други установени фактори от епидемиологично значение.

За установяването на предпазните и надзорните зони се прилагат следните минимални изисквания по отношение на географското означение на посочените зони:

i) предпазната зона се установява в непосредствена близост до стопанството, което е официално обявено за заразено с ВХС или ИХН или и двете от тези вписани в списъка болести, и съответства на:

(1) в крайбрежни зони: област, попадаща в кръг с радиус, равен най-малко на терена на приливите и отливите или най-малко 5 km — което от двете е по-голямо, с център на кръга стопанството, официално обявено за заразено с ВХС или ИХН или и двете, или еквивалентна зона, определена според съответните хидродинамични и епидемиологични данни;

(2) във вътрешните райони: целия водосборен басейн на стопанството, официално обявено за заразено с ВХС или ИХН или и двете; компетентният орган може да ограничи обхвата на зоната до части от водосборния басейн или площта на стопанството, при условие че предотвратяването на разпространението на ВХС или ИХН или и двете не е застрашено;

ii) надзорна зона се установява от компетентния орган извън предпазната зона и съответства на:

(1) в крайбрежни зони: областта, която е около предпазната зона и обхваща припокриващите се терени на приливите и отливите; или област около предпазната зона и включена в кръг с радиус 10 km от центъра на предпазната зона; или еквивалентна област, определена според съответните хидродинамични и епидемиологични данни;

(2) във вътрешните райони: като разширена област извън определената предпазна зона;

б) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в границите на предпазната зона и които не са официално обявени за заразени с ВХС или ИХН или и двете, са предмет на официално разследване, включващо най-малко следните елементи:

i) събиране на проби за изследване от 10 риби, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследвания на умряла риба, които отговарят на признаците за заразяване с ВХС или ИХН или и двете, или от минимум 30 риби, когато не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умряла риба;

ii) една санитарна инспекция: в стопанствата, където тестовете, посочени в подточка i), са дали отрицателни резултати; санитарните проверки продължават веднъж месечно през периода, когато температурата на водата е под 14 °C, освен когато рибовъдните басейни и мрежестите клетки са покрити с лед, докато предпазната зона не бъде оттеглена в съответствие с точка I.2.2.1, буква в);

в) всички стопанства, официално обявени за заразени с ВХС или ИХН или и двете, се изпразват, почистват, дезинфекцират и преминават период на некултивиране. Продължителността на периода на некултивиране е най-малко шест седмици. Когато всички стопанства, официално обявени за заразени в рамките на една и съща предпазна зона, са изпразнени, се провеждат най-малко 3 седмици на синхронизиран период на некултивиране. Настоящият параграф се прилага и по отношение на нови стопанства, официално обявени за заразени по време на изпълнението на програмата за ликвидиране.

Докато трае периодът на некултивиране на официално обявените за заразени стопанства, предпазните зони стават надзорни зони.

Компетентният орган може да реши да изиска изпразване, почистване, дезинфекциране и преминаване на период на некултивиране на други стопанства в установените предпазни и надзорни зони. Продължителността на периода на некултивиране за стопанствата се определя от компетентния орган въз основа на оценката на риска за всеки отделен случай.

г) всички стопанства, официално обявени за заразени с ВХС или ИХН или и двете от тези вписани в списъка болести, както и всички останали стопанства, преминали период на некултивиране в рамките на предпазната и на надзорната зона, както е посочено в буква в), се зареждат с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус „свободен от болест“ (категория I) по отношение на ВХС или ИХН или и двете.

Зареждането с риба се извършва само когато всички стопанства, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и преминали период на некултивиране в съответствие с точка I.2.2.1, буква в);

д) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в рамките на държава членка, зона или компартмент, обхванати от програмата за ликвидиране, а когато се изисква надзор на популациите от диви животни — и пунктовете за вземане на проби, подбрани в съответствие с точка I.1, впоследствие се подлагат на схема за надзор, определена в точка I.2.1.

I.2.2.2. Изисквания за възстановяване на статус „свободен от болест“ за континенталните компартменти, включващи едно-единствено стопанство, което преди е било обявено за свободно от ИХН и ВХС или и двете

Континентален компартмент, включващ едно-единствено стопанство, което преди е бил обявено за свободно от ИХН и ВХС или двете от тези вписани в списъка болести, чийто здравен статус по отношение на тези вписани в списъка болести не зависи от заобикалящите естествени води в съответствие с част II, точка 3 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО и чийто здравен статус категория I е оттеглен в съответствие с член 53, параграф 3 от посочената директива, може да си възвърне здравния статус категория I незабавно след като компетентният орган е потвърдил, че са изпълнени следните условия:

а) стопанството, официално потвърдено за обявено за заразено с ВХС или ИХН или и двете, трябва да бъде изпразнено, почистено, дезинфекцирано и преминало период на некултивиране; продължителността на периода на некултивиране трябва да бъде най-малко шест седмици;

б) стопанството, официално потвърдено за обявено за заразено с ВХС или ИХН или и двете, е било заредено с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на ВХС или ИХН или и двете.

I.3. Специални изисквания за запазване на здравен статус „свободен от болест“ (категория I) по отношение на ВХС или ИХН или и двете

Когато се изисква целенасочен надзор с цел да се запази здравен статус категория I, както е предвидено в член 52 от Директива 2006/88/ЕО, всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към посочената директива, в държавата членка, зона или компартмент, подлежат на санитарна инспекция и от рибата се вземат проби в съответствие с таблица 1.B, посочена в раздел II от настоящата част, като се взема предвид нивото на риска от заразяването в стопанството с ВХС или ИХН или и двете от тези вписани в списъка болести.

При определяне на честотата на санитарните инспекции за здравен статус категория I по отношение на ВХС или ИХН или и двете на компартментите, които се намират в континентални области и в които здравният статус по отношение на ВХС или ИХН зависи от здравния статус на популациите водни животни в заобикалящите естествени води в съответствие с част II, точка 2 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО, рискът от заразяване с ВХС или ИХН или и двете се счита за висок.

Статусът „свободен от болест“ се запазва само ако всички изследвани проби, при които са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., са с отрицателни резултати за ВХС или ИХН или и двете от тези вписани в списъка болести и всяко съмнение за ВХС или ИХН или и двете е отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3.

I.4. Изисквания за отменяне на ограничителните мерки, предвидени в член 39 от Директива 2006/88/ЕО, а именно преминаването от здравен статус категория V към категория III.

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на ВХС или ИХН или и двете могат да получат здравен статус категория III по отношение на вписаните в списъка болести, при условие че:

а) изискванията, посочени в точка I.2.2.1, букви а), б) и в), са спазени. Ако поради технически причини не е възможно да се проведе период на некултивиране, засегнатите стопанства подлежат на алтернативна мярка, която предлага почти същата гаранция за ликвидирането в околната среда на стопанството на вирусите на ИХН или ВХС или и двете;

б) всички стопанства, които са официално обявени за заразени, както и всички други стопанства, преминали период на некултивиране/подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а) в рамките на установените предпазна и надзорна зона, са заредени с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I, II или III по отношение на ВХС или ИХН или и двете;

в) зареждането с риба е извършено едва след като всички стопанства, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и са преминали период на некултивиране/са били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а).

II. **Диагностични методи и методи за вземане на проби**

II.1. Органи, от които се взема проба:

Тъканите, които се изследват, са от далака, предната част на бъбрека и или от сърцето, или от мозъка. Когато се вземат проби от риби за развъждане, могат да се изследва овариална или семенна течност.

Ако пробата се взема от малки риби, рибите с дължина под 4 cm могат да бъдат надробени на малки парченца посредством стерилни ножици или скалпел, след като се премахне частта от тялото зад коремния отвор. Ако пробата се състои от цели риби с дължина 4 — 6 cm, се събират вътрешностите, включително бъбреците.

Парченца от органите на максимум 10 риби могат да бъдат обединени.

II.2. Диагностични методи за получаване и запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на ВХС или ИХН или и двете

Диагностичният метод, в съответствие с одобрените диагностични методи и процедури, посочени в част 1, точка I от приложение II, за получаване и запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на ВХС или ИХН или двете, е:

а) изолиране на вируса в клетъчни култури, след което се прави идентификация чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), индиректен имунофлуоресцентен тест (IFAT), вирус неутрализационен тест или обратно транскриптазна полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR); или

б) RT-qPCR.

II.3. Вземане на проби и диагностични методи, за да се отхвърли или потвърди присъствието на ВХС или ИХН

При съмнение за ВХС или ИХН или и двете се изисква то да бъде потвърдено или отхвърлено в съответствие с член 28 от Директива 2006/88/ЕО и тогава се извършват следните проверка, вземане на проби и процедури за изследване:

а) стопанството, за което се отнася подозрението, подлежи на поне една санитарна инспекция и едно взимане на проби за изследване от 10 риби, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследвания на умряла риба, които отговарят на признаците за заразяване с ВХС или ИХН или и двете, или от минимум 30 риби, когато не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умряла риба; Пробите се изследват, като се използват един или няколко от диагностичните методи, посочени в подточки i) и ii), в съответствие с подробните диагностични методи и процедури, посочени в част 1, раздел II от приложение II:

i) конвенционално изолиране на вируса в клетъчна култура с последваща имунохимична или молекулярна идентификация на вируса;

ii) откриване на вируса с RT-qPCR;

iii) други диагностични техники с доказана подобна ефективност, например непряко изследване с флуоресцентно белязано антитяло (IFAT), ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), RT-PCR и имунохистохимия (IHC).

б) присъствието на ВХС се смята за потвърдено, ако един или повече от тези диагностични методи са положителни за вируса на ВХС. Присъствието на ИХН се смята за потвърдено, ако един или повече от тези диагностични методи са положителни за вируса на ИХН. Потвърждаването на първия случай на ХВС или ИХН в държави членки, зони или компартменти, които преди не са били заразени, се основава на конвенционално изолиране на вируса в клетъчна култура или RT-qPCR;

в) подозрение за вируса на ВХС или на ИХН или и двата може да се изключи, ако при култивирането на клетки или при изследванията с RT-qPCR не бъдат разкрити други доказателства за присъствието на вируса на ВХС или за ИХН или и двете.

Таблица 1.А

Схема за надзор за зони и компартменти, за двегодишния период на контрол, посочен в точка I.2.1, буква а), подточка i), който предхожда предоставянето на статуса „свободен от болест“ по отношение на ВХС или ИХН

Вид стопанство	Брой санитарни инспекции за година (две години)	Брой вземания на проби за година (две години)	Брой на рибите в пробата (1)	
			Брой на растящите риби	Брой на рибите за развъждане (2)
а) Стопанства с екземпляри за развъждане	2	2	50 (първа инспекция) 75 (втора инспекция)	30 (първа или втора инспекция) 0 (първа или втора инспекция)
б) Стопанства само с екземпляри за развъждане	2	1	0	75 (първа или втора инспекция)
в) Стопанства без екземпляри за развъждане	2	2	75 (3) (първа и втора инспекция)	0

Максимален брой риби на воден басейн: 10

(1) Пробите трябва да бъдат събрани не по-рано от три седмици след прехвърлянето на рибата от прясна в солена вода.
(2) Овариална и семенна течност от рибите за развъждане се събират по време на зреенето във връзка с десорбцията.
(3) Трябва да бъдат взети проби от такъв брой риби, който ще гарантира откриването на вируса на ВХС или ИХН с 95 % сигурност, ако предвиденото разпространение на болестта е 5 %.

Таблица 1.Б

Схема за надзор с намален размер на пробите за четиригодишния период на контрол, посочен в точка I.2.1, буква а), подточка ii), който предхожда предоставянето на статуса „свободен от болест“ по отношение на ВХС или ИХН

Вид стопанство	Брой санитарни инспекции за година	Брой на вземането на проби годишно	Брой на рибите в пробата (1)	
			Брой на растящите риби	Брой на рибите за развъждане (2)
Първите две години от периода на надзора				
а) Стопанства с екземпляри за развъждане	2	1	0 (първа инспекция) 30 (втора инспекция)	0 (първа инспекция) 0 (втора инспекция)
б) Стопанства само с екземпляри за развъждане	2	1	0	30 (първа или втора инспекция)
в) Стопанства без екземпляри за развъждане	2	1	30 (3) (първа или втора инспекция)	0
Последните две години от периода на надзор				
а) Стопанства с екземпляри за развъждане	2	2	30 (първа инспекция) 0 (втора инспекция)	0 (първа инспекция) 30 (втора инспекция)

Вид стопанство	Брой санитарни инспекции за година	Брой на вземането на проби годишно	Брой на рибите в пробата (1)	
			Брой на растящите риби	Брой на рибите за развъждане (2)
б) Стопанства само с екземпляри за развъждане	2	2		30 (първа и втора инспекция)
в) Стопанства без екземпляри за развъждане	2	2	30 (3) (първа и втора инспекция)	

Максимален брой риби на воден басейн: 10

(1) Пробите трябва да бъдат събрани не по-рано от три седмици след прехвърлянето на рибата от прясна в солена вода.
(2) Овариална и семенна течност от рибите за развъждане се събира по време на зреенето във връзка с десорбцията.
(3) Трябва да бъдат взети проби от такъв брой риби, който ще гарантира откриването на вируса на ВХС или ИХН с 95 % сигурност, ако предвиденото разпространение на болестта е 10 %.

Таблица 1.B

Схема за надзор за зони или компартменти за запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на ВХС или ИХН, както е посочено в точка I.3

Ниво на риска	Брой санитарни инспекции	Брой на рибите в пробата (3)
Високо	2 всяка година	30 (1) (2)
Средно	1 всяка година	30 (1)
Ниско	1 на всеки 2 години	30 (1)

Максимален брой риби на воден басейн: 10

(1) Пробите трябва да бъдат събрани не по-рано от три седмици след прехвърлянето на рибата от прясна в солена вода.
(2) Трябва да бъдат взети проби от такъв брой риби, който ще гарантира откриването на вируса на ВХС или ИХН с 95 % сигурност, ако предвиденото разпространение на болестта е 10 %.
(3) Трябва да има най-малко една проба за всяка санитарна инспекция.

ЧАСТ 2

МЕТОДИ ЗА НАДЗОР И БОРБА С КОЙ-ХЕРПЕСВИРУСНА БОЛЕСТ ПО ШАРАНА (КХБШ)

I. **Изисквания за програми за надзор и ликвидиране с цел получаване и запазване на здравния статус „свободен от болест“ по отношение на КХБШ и за овладяване на заразата с кой херпес вирус по шарана (КХВШ)**

I.1. Общи изисквания

Когато се изисква целенасочен надзор върху популации от диви животни в съответствие с част I, точка 2, втори параграф от приложение V към Директива 2006/88/ЕО, броят и географското разпределение на пунктовете за вземане на проби се определят така, че да се постигне разумно покритие на държавата членка, зоната или компартмента. Пунктовете за вземане на проби са представителни за различните екосистеми, където се намират популациите от възприемчиви диви животни, а именно речните системи и езерата.

При целенасочения надзор се разчита на редовния мониторинг на обектите, в които има възприемчиви видове. Обектите се подлагат на мониторинг, когато температурата на водата е достигнала стойности, благоприятстващи развитието на болестта (> 15 °C), и не по-рано от две седмици след датата, на която тази стойност на температурата е достигната. Проба се взема и се изследват всички болни риби или риби с анормално поведение, които се намират в обекта.

Когато е възможно, проба се взема от риби, които са стояли за продължителен период от време при стойности на температурата на водата, благоприятстващи развитието на вируса, а именно две до три седмици при температура от 15 °C до 26 °C. Може обаче да се възприеме следният подход:

а) да се събере субпопулация при прехвърляне от зимни към летни водоеми и да се държи рибата в същата вода като в летния водоем до достигането на минималните изисквания за температурата, или

б) проби да се събират по време на събирането или в друг момент на обработка на рибата с риболовни съоръжения като част от обичайните практики на отглеждане. Ако е възможно, пробите се събират между 24 и 72 часа след такива практики на отглеждане в обекта, за да се увеличи възможността за откриване на КХВШ.

Когато стопанства или популации от диви животни е необходимо да бъдат подложени на санитарни инспекции или от тях да бъдат взети проби повече от веднъж годишно, интервалите между здравните инспекции или вземането на проби са възможно най-дълги в рамките на един сезон, когато температурата на водата е вероятно да достигне най-високите си годишни стойности, без да надхвърля границата от 28 °C.

Във всички производствени единици, като например езера, водоеми, трябва да се извършват санитарни инспекции за установяване на наличието на мъртви, слаби или с анормално поведение риби.

Cyprinus carpio и неговите хибриди, като например *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, се събират, когато присъстват в стопанството.

Рибите, от които се вземат проби, се подбират, както следва:

i) ако има слаби риби, риби с анормално поведение или такива, които са умрели наскоро, но не са разложени, трябва да се подберат екземпляри от тях;

ii) ако за производството на рибата се използва повече от един воден източник, в пробата трябва да бъдат включени риби, представляващи всички водни източници;

iii) подбраната риба трябва да включва риби, събрани по такъв начин, че в пробата да са представени пропорционално всички части на стопанството, както и всички възрастови групи по години.

I.2. Специални изисквания за получаване на здравен статус „свободен от болест“ (категория I) по отношение на КХБШ

I.2.1. Програми за надзор

а) държава членка, зона или компартмент, които по отношение на КХБШ имат здравен статус категория III могат да получат здравен статус категория I, когато всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в посочената държава членка, зона или компартмент отговарят на изискванията за статус „свободен от болест“, определени в приложение V към посочената директива, като всички тези стопанства, а когато се изисква съгласно част I, точка 2, параграф 2 от посоченото приложение — и пунктовете за вземане на проби от популации от диви животни, подбрани в съответствие с тази част, са били подложени на една от следните програми за надзор:

i) модел А — програма за двегодишен надзор:

Стопанствата или пунктовете за вземане на проби трябва да са били подложени на санитарни инспекции и от тях да са вземани проби за период от най-малко две последователни години, както е определено в таблица 2.А, посочена в раздел III.

По време на този двегодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., трябва да е дало отрицателни резултати за КХВШ, като всяко съмнение за КХБШ трябва да е било отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка III.2;

ii) модел Б — програма за четиригодишен надзор с намален размер на пробата:

Стопанствата или пунктовете за вземане на проби трябва да са били подложени на санитарни инспекции и от тях да са вземани проби за период от най-малко четири последователни години, както е определено в таблица 2.Б, посочена в раздел III.

По време на този четиригодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., трябва да е дало отрицателни резултати за КХВШ, като всяко съмнение за КХБШ трябва да е било отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка III.2;

б) ако по време на изпълнението на четиригодишната програма за надзор, посочена в буква а), бъде потвърдено заразяване с КХВШ в стопанство, включено в посочената програма за надзор, и поради това се оттегля неговият здравен статус категория II, съответното стопанство може незабавно да си възвърне здравния статус категория II и да продължи изпълнението на програмата за надзор за получаване на статус на свободно от болест, без да изпълнява програма за ликвидиране, както е посочено в точка I.2.2, при условие че стопанството отговаря на следните условия:

i) то е континентално стопанство, чийто здравен статус по отношение на КХБШ не зависи от здравния статус на водните популации от животни в заобикалящите естествени води по отношение на болестите, вписани в списък, в съответствие с част II, точка 3 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО;

ii) то е изпразнено, почистено, дезинфекцирано и преминало период на некултивиране; продължителността на периода на некултивиране е най-малко шест седмици;

iii) заредено е с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на КХБШ.

I.2.2. Програми за ликвидиране

I.2.2.1. Общи изисквания

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на КХБШ, могат да получат здравен статус категория I по отношение на посочената вписана в списъка болест, когато всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в тази държава членка, зона или компартмент са били подложени поне на следната програма за ликвидиране на болести:

а) минималните мерки за борба, предвидени в глава V, раздел 4 от Директива 2006/88/ЕО, са били приложени ефективно, а в близост до стопанствата, официално обявени за заразени с КХВШ, е установена ограничена област, както е посочено в член 32, буква б) от посочената директива, състояща се от предпазна и надзорна зона.

Ограничената област трябва да бъде определена според конкретния случай, като се вземат предвид фактори, които оказват влияние върху рисковете от разпространението на КХБШ сред риби, отглеждани в стопанства, или дива риба, а именно: броят, делът и разпространението на смъртността сред рибите в стопанствата, заразени с КХВШ; разстоянието и гъстотата на съседните стопанства; близостта до кланици; контактни стопанства; видовете, които са в стопанствата; прилаганите развъдни практики в засегнатите и в съседните стопанства; хидродинамични условия и други установени фактори от епидемиологично значение.

За установяването на предпазните и надзорните зони се прилагат следните минимални изисквания по отношение на географското означение на посочените зони:

i) предпазна зона се установява в непосредствена близост до стопанство, официално обявено за заразено с КХВШ и съответства на целия водосборен басейн на стопанството, официално обявено за заразено с КХВШ; компетентният орган може да ограничи обхвата на зоната до части от водосборния басейн, при условие че предотвратяването на разпространението на КХБШ не е застрашено;

ii) надзорна зона се установява извън предпазната зона и съответства на разширена зона, обкръжаваща предпазната зона;

б) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в границите на предпазната зона и които не са официално обявени за заразени с КХВШ, са предмет на официално разследване, включващо най-малко следните елементи:

i) събирането на проби за изследване от 10 риби, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследвания на умряла риба, които отговарят на признаците за заразяване с КХБШ, или от 30 риби, когато не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умряла риба;

ii) санитарна инспекция; в стопанствата, където тестовете, посочени в точка III.2, са дали отрицателни резултати; санитарните проверки продължават веднъж месечно през сезона, когато температурата на водата е вероятно да достигне > 15°C, докато предпазната зона не бъде оттеглена в съответствие с точка I.2.2.1, буква в);

в) всички стопанства, официално обявени за заразени с КХВШ, се изпразват, почистват, дезинфекцират и преминават период на некултивиране. Продължителността на периода на некултивиране е най-малко шест седмици. Когато всички стопанства, официално обявени за заразени, са изпразнени, се провеждат най-малко 3 седмици на синхронизиран период на некултивиране. Настоящият параграф се прилага и по отношение на нови стопанства, официално обявени за заразени по време на изпълнението на програмата за ликвидиране.

Докато трае периодът на некултивиране на официално обявените за заразени стопанства, предпазните зони стават надзорни зони.

Компетентният орган може да реши да изиска изпразване, почистване, дезинфекциране и преминаване на период на некултивиране на други стопанства в установените предпазни и надзорни зони. Продължителността на периода на некултивиране се определя от компетентния орган въз основа на оценката на риска за всеки отделен случай;

г) Всички стопанства, официално обявени за заразени с КХВШ и всички други стопанства, преминали период на некултивиране в установените предпазна и надзорна зона, се зареждат с риба:

i) с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на КХБШ; или

ii) за преходен период до 31 декември 2020 г. — с риба от държави членки, зони или компартменти с одобрена програма за надзор на КХБШ.

Възстановяването на запасите от риба се извършва само когато всички стопанства, официално обявени за заразени с КХВШ, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и преминали период на некултивиране в съответствие с точка I.2.2.1, буква в);

д) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в рамките на държава членка, зона или компартмент, обхванати от програмата за ликвидиране, а когато се изисква надзор на популациите от диви животни — и пунктовете за вземане на проби, подбрани в съответствие с точка I.1, впоследствие трябва да са били подложени поне на програмите за надзор, определени в точка I.2.1.

I.2.2.2. Изисквания за възстановяване на статус „свободен от болест“ за континенталните компартменти, включващи едно-единствено стопанство, което преди е било обявено за свободно от КХБШ

Континентален компартмент, включващ едно-единствено стопанство, което преди е имало здравен статус категория I по отношение на КХБШ, чийто здравен статус по отношение на КХБШ не зависи от заобикалящите естествени води в съответствие с част II, точка 3 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО и чийто здравен статус категория I е оттеглен в съответствие с член 53, параграф 3 от посочената директива, може да си възвърне здравния статус категория I по отношение на КХБШ незабавно след като компетентният орган е потвърдил, че са изпълнени следните условия:

а) то е изпразнено, почистено, дезинфекцирано и преминало период на некултивиране; продължителността на периода на некултивиране трябва да е била най-малко шест седмици;

б) заредено е с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I или компартменти със здравен статус с одобрена програма за надзор на КХБШ (здравен статус категория II).

I.3. Специални изисквания за запазване на здравен статус категория I по отношение на КХБШ

Когато се изисква целенасочен надзор с цел да се запази здравен статус категория I, както е предвидено в член 52 от Директива 2006/88/ЕО, всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към посочената директива, в държавата членка, зона или компартмент, подлежат на санитарна инспекция и се вземат проби в съответствие с таблица 2.Б, посочена в раздел III от настоящата част, като се взема предвид нивото на риска от заразяването в стопанството с КХВШ.

Честотата на проверките на санитарните инспекции в компартментите с категория I по отношение на КХБШ, намиращи се в континентални области и обхващащи едно или повече стопанства, чийто здравен статус по отношение на КХБШ зависи от здравния статус за съответната вписана в списъка болест на заобикалящите естествени води в съответствие с част II, точка 2 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО, е в съответствие с броя, определен за високо ниво на риск в посочената таблица 2.В.

В държави членки, зони или компартменти, в които броят на стопанствата е ограничен, а целенасоченият надзор в тези стопанства не предоставя достатъчно епидемиологични данни, схемите за надзор за запазване на статуса „свободен от болест“ включват пунктове за вземане на проби, подбрани в съответствие с изискванията, изложени в точка I.1.

Всяка година тези пунктове за вземане на проби се инспектират и на ротационен принцип се вземат проби от 50 % от пунктовете за вземане на проби. Вземането на пробите се извършва в съответствие с таблица 2.В., определена в раздел III. Пробите се подбират, подготвят и изследват, както е описано в раздел II, а лабораторните изследвания трябва да бъдат с отрицателен резултат по отношение на присъствието на агент на КХБШ.

Статусът „свободен от болест“ се запазва само ако всички изследвани проби, при които са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., са с отрицателни резултати за КХБШ, а всяко съмнение за КХБШ е отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка III.2.

I.4. Специални изисквания за отмяна на ограничителните мерки, предвидени в член 39 от Директива 2006/88/ЕО за предоставяне на здравен статус категория III по отношение на КХБШ в държавите членки, компартментите или зоните, които имат здравен статус категория V

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на КХБШ, могат да получат здравен статус категория III по отношение на вписаните в списъка болести, при условие че:

а) изискванията, посочени в точка I.2.2.1, букви а), б) и в), са спазени. Ако поради технически причини не е възможно да се проведе период на некултивиране, съответните стопанства подлежат на алтернативна мярка, която предлага почти същата гаранция за ликвидиране в околната среда на стопанството на КХВШ;

б) всички стопанства, които са официално обявени за заразени, както и всички други стопанства, преминали период на некултивиране/подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а) в рамките на установените предпазна и надзорна зона, са заредени с нова риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I, II или III по отношение на КХБШ;

в) зареждането с риба е извършено едва когато всички стопанства, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и са преминали период на некултивиране/били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а).

II. **Диагностични методи и методи за вземане на проби за надзор за получаване и запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на КХБШ**

II.1. Проби

Тъканният материал, които се изследва, е части от хрилете и бъбреците. Парченца от органите на максимум две риби могат да бъдат обединени.

II.2. Диагностични методи за надзор за получаване и запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на КХБШ

Диагностичният метод за получаване или запазване на статус „свободен от болест“ за КХБШ е количествена полимеразна верижна реакция в реално време (qPCR) в съответствие с подробните диагностични методи и процедури, посочени в част 2, точка II от приложение II.

III. **Диагностични методи и методи за вземане на проби за диагностициране при официални разследвания за потвърждение или отхвърляне на съмнение на КХБШ**

III.1. Проби

Тъканният материал, които се изследва, е части от хрилете и бъбреците. Парченца от органите на максимум две риби могат да бъдат обединени.

III.2. Официално разследване и диагностични методи, за да се отхвърли или да се потвърди присъствието на КХВШ

При съмнение за КХБШ се изисква то да бъде потвърдено или отхвърлено в съответствие с член 28 от Директива 2006/88/ЕО и тогава се извършват следните проверка, вземане на проби и процедура за изследване:

а) официалното разследване включва поне една санитарна инспекция и едно взимане на проби за изследване от 10 риби, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследвания на умряла риба, които отговарят на признаците за заразяване с КХВШ, или от минимум 30 риби, когато не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умряла риба. Пробите се изследват, като се използва диагностичният метод, посочен в буква б) в съответствие с подробните диагностични методи и процедури, посочени в част 2, точка II от приложение II;

б) присъствието на инфекция с КХВШ се счита за потвърдено, ако КХВШ се открива чрез полимеразна верижна реакция (PCR);

съмнение за КХБШ може да се отхвърли, ако посочените тестове не разкрият друго доказателство за присъствието на КХВШ.

Таблица 2.А

Схема за надзор на зони и компартменти за двегодишния период на контрол, който предхожда предоставянето на статуса „свободен от болест“ за КХБШ, както е посочено в точка I.2.1

		Брой клинични проверки за година (две години)	Брой лабораторни изследвания за година (две години)	Брой на рибите в пробата
Стопанства/обекти за вземане на проби	Първите две години от периода на надзор	2	2	75 [1]
	Максимален брой риби на воден басейн: 2			

[1] Трябва да бъдат взети проби от такъв брой риби, който ще гарантира откриването на КХВШ с 95 % сигурност, ако предвиденото разпространение на болестта е 5 %.

Таблица 2.Б

Схема за надзор на зони и компартменти за четиригодишния период на контрол, който предхожда предоставянето на статуса „свободен от болест“ за КХБШ, както е посочено в точка I.2.1

		Брой клинични проверки за година	Брой лабораторни изследвания за година	Брой на рибите в пробата
Стопанства/обекти за вземане на проби	Първите две години от периода на надзор	1	1	30
Стопанства/обекти за вземане на проби	Последните две години от периода на надзор	2	2	30
	Максимален брой риби на воден басейн: 2			

Таблица 2.В

Схема за надзор за зони или компартменти за запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на КХБШ, както е посочено в точка I.3

Ниво на риска	Брой санитарни инспекции	Брой на рибите в пробата
Високо	2 всяка година	30
Средно	1 всяка година	30
Ниско	1 на всеки 2 години	30

Максимален брой риби на воден басейн: 2

Таблица 2.Г

Схема за надзор за запазване на статуса „свободен от болест“ в държави членки, зони или компартменти, в които броят на стопанствата е ограничен, а целенасоченият надзор в тези стопанства не предоставя достатъчно епидемиологични данни, както е посочено в точка I.3

	Брой клинични проверки за година	Брой лабораторни изследвания за година	Брой на рибите в пробата
Пунктове за вземане проби	1 на всеки 2 години	1 на всеки 2 години	30

Максимален брой риби на воден басейн: 2

ЧАСТ 3

МЕТОДИ ЗА НАДЗОР И БОРБА С ИНФЕКЦИОЗНА АНЕМИЯ ПО СЬОМГАТА (ИАС)

I. **Изисквания за програми за надзор и ликвидиране с цел получаване и запазване на здравния статус „свободен от болест“ по отношение на ИАС и за ограничаване на заразяването с вируса на ИАС (ВИАС) генотип HPR-с делеции**

I.1. Общи изисквания

В случаите, когато санитарните инспекции и вземането на проби от стопанства в съответствие с част I, точка 2, втори параграф от приложение V към Директива 2006/88/ЕО се изисква да се провежда повече от веднъж годишно, интервалите между санитарните инспекции или между събирането на пробите са възможно най-дълги.

Когато се изисква целенасочен надзор върху популации от диви животни в съответствие с част I, точка 2, втори параграф от приложение V към Директива 2006/88/ЕО, броят и географското разпределение на пунктовете за вземане на проби се определят така, че да се постигне разумно покритие на държавата членка, зоната или компартмента. Пунктовете за вземане на проби са представителни за различните екосистеми, където се намират популациите от възприемчиви диви животни.

Санитарните инспекции се извършват във всички производствени единици, като например езера, водоеми и мрежести клетки, за установяване на наличието на мъртви, слаби или с анормално поведение риби. Специално внимание се отделя на водоотливната точка, където заради течението на водата обикновено се струпват слабите риби.

Рибите, от които се вземат проби, се подбират, както следва:

а) подбират се само умиращи или наскоро умрели екземпляри, но неразложени; по-специално риби, при които се наблюдава анемия, кръвоизливи или други клинични признаци, предполагащи циркулаторни нарушения, се определят като приоритетни за събирането на пробите;

б) ако атлантическата сьомга е сред възприемчивите видове в обекта, пробите от атлантическата сьомга се определят като приоритетни. Ако в рибното стопанство няма атлантическа сьомга, проби се вземат от други възприемчиви видове;

в) ако за производството на рибата се използва повече от един воден източник, в пробата се включват риби от всички водни източници;

г) подбраната риба включва риби, събрани по такъв начин, че в пробата да са представени пропорционално всички производствени единици, като например мрежести клетки, водоеми и езера, в стопанството, както и всички възрастови групи по години.

I.2. Специални изисквания за получаване на здравен статус категория I по отношение на ИАС

I.2.1. Програми за надзор

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория III в съответствие с част Б от приложение III към Директива 2006/88/ЕО по отношение на ИАС, могат да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в държавата членка, зона или компартмент отговарят на съответните изисквания, определени в приложение V към посочената директива, като всички тези стопанства, а когато се изисква съгласно част I, точка 2, втори параграф от приложение V към нея — и пунктовете за вземане на проби от популации от диви животни, подбрани в съответствие с тази точка, са били подложени на една от следните програми за надзор:

а) стопанствата или пунктовете за вземане на проби са били подложени на санитарни инспекции и от тях са вземани проби за период от най-малко две последователни години, както е определено в таблица 3.A, посочена в раздел II;

б) по време на този двегодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2, трябва да е дало отрицателни резултати за ВИАС с генотип HPR-с делеции, като всяко съмнение за ИАС трябва да е било отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3;

в) ако по време на изпълнение на програмата за надзор, ИАС бъде потвърдена в стопанство, включено в посочената програма за надзор, и следователно здравният му статус категория II е оттеглен, се провежда програма за ликвидиране в съответствие с точка I.2.2.

I.2.2. Програми за ликвидиране

I.2.2.1. Общи изисквания

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на ИАС, могат да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в държавата членка, зона или компартмент са били подложени на програма за ликвидиране, която отговаря на следните точки а) — д).

а) Минималните мерки за борба, предвидени в глава V, раздел 3 от Директива 2006/88/ЕО, са били приложени ефективно, а по-специално в близост до стопанствата, официално обявени за заразени с ВИАС с генотип HPR-с делеции или с потвърдена ИАС, е установена ограничена област, както е посочено в член 32, буква б) от посочената директива, състояща се от предпазна и надзорна зона.

Ограничената област трябва да е определена според конкретния случай, като се вземат предвид фактори, които оказват влияние върху рисковете от разпространението на ИАС сред риби, отглеждани в стопанства, или дива риба, а именно: броят, делът и разпространението на смъртността на рибата в стопанствата, заразени с ВИАС с генотип HPR-с делеции или с потвърдена ИАС; разстоянието и гъстотата на съседните стопанства; близостта до кланици; контактни стопанства; видовете, които са в стопанствата; прилаганите развъдни практики в засегнатите и в съседните стопанства; хидродинамични условия и други установени фактори от епидемиологично значение.

За установяването на предпазните и надзорните зони се прилагат следните минимални изисквания по отношение на географското означение на посочените зони:

i) предпазната зона се установява в непосредствена близост до стопанство, което е официално обявено за заразено с ИАС, и съответства на:

1. в крайбрежни зони: област, попадаща в кръг с радиус, равен най-малко на терена на приливите и отливите или най-малко 5 km — което от двете е по-голямо, с център на кръга стопанството, официално обявено за заразено с ИАС, или еквивалентна зона, определена според съответните хидродинамични и епидемиологични данни;

2. във вътрешните райони: целия водосборен басейн на стопанството, официално обявено за заразено с ИАС; компетентният орган може да ограничи обхвата на зоната до части от водосборния басейн, при условие че предотвратяването на разпространението на ИАС не е застрашено;

ii) надзорна зона се установява извън предпазната зона и съответства на:

1. в крайбрежни зони: областта, която е около предпазната зона и обхваща припокриващите се терени на приливите и отливите; или област около предпазната зона и включена в кръг с радиус 10 km от центъра на предпазната зона; или еквивалентна област, определена според съответните хидродинамични и епидемиологични данни; или

2. във вътрешните райони: като разширена област извън определената предпазна зона;

б) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в границите на предпазната зона и които не са официално обявени за заразени с ИАС, са предмет на официално разследване, включващо най-малко следните елементи:

i) събирането на проби за изследване от минимум 10 умиращи риби, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследвания на умряла риба, които отговарят на признаците за заразяване с ИАС, или от минимум 30 риби, когато не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умряла риба;

ii) санитарна инспекция; в стопанствата, където изследванията, посочени в подточка i), са дали отрицателен резултат, санитарните инспекции продължават веднъж месечно, докато предпазната зона не бъде оттеглена в съответствие с точка I.2.2.1, буква в);

в) всички стопанства, официално обявени за заразени с ВИАС с генотип HPR-с делеции или с потвърдена ИАС, се изпразват, почистват, дезинфекцират и преминават период на некултивиране за срок от най-малко три месеца. Предпазните и надзорните зони могат да бъдат отменени, когато всички стопанства в предпазната зона са изпразнени, почистени, дезинфекцирани и преминали синхронизиран период на некултивиране в продължение на най-малко шест седмици.

При извършването на периода на некултивиране на официално обявените за заразени стопанства предпазните зони стават надзорни зони.

Компетентният орган може да реши да изиска изпразване, почистване, дезинфекциране и преминаване на период на некултивиране на други стопанства в установените предпазни и надзорни зони. Продължителността на периода на некултивиране за стопанствата се определя от компетентния орган въз основа на оценката на риска за всеки отделен случай;

г) всички стопанства, официално обявени за заразени с ВИАС с генотип HPR-с делеции или с потвърдена ИАС, както и всички останали стопанства, преминали период на некултивиране в установените предпазна и надзорна зона, се зареждат с риба с произход от държави членки, зони или компартменти с категория I по отношение на ИАС.

зареждането се извършва само когато всички стопанства, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и преминали период на некултивиране в съответствие с точка I.2.2.1, буква в);

д) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в рамките на държава членка, зона или компартмент, обхванати от програмата за ликвидиране, а когато се изисква надзор на популациите от диви животни — и пунктовете за вземане на проби, подбрани в съответствие с точка I.1, впоследствие се подлагат на схема за надзор, определена в точка I.2.1.

I.2.2.2. Изисквания по отношение на възвръщането на статут „свободен от болест“ за континентални компартменти, включващи едно-единствено стопанство, което преди е било обявено със здравен статус категория I

Континентален компартмент, включващ едно-единствено стопанство, което има здравен статус категория I по отношение на ИАС, чийто здравен статус не зависи от заобикалящите естествени води в съответствие с част II, точка 3 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО и чийто здравен статус категория I е оттеглен в съответствие с член 53, параграф 3 от посочената директива, може да го възвърне незабавно след като компетентният орган е потвърдил, че то отговаря на следните условия:

а) то е изпразнено, почистено, дезинфекцирано и преминало период на некултивиране; продължителността на периода на некултивиране е най-малко шест седмици;

б) заредено е с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на ИАС.

I.3. Минимални мерки за борба с болест с цел запазване на здравен статус категория I по отношение на ИАС

Когато се изисква целенасочен надзор с цел да се запази здравен статус категория I, както е предвидено в член 52 от Директива 2006/88/ЕО, всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към посочената директива в рамките на държавата членка, зона или компартмент, подлежат на санитарни инспекции и се вземат проби в съответствие с таблица 3.Б ([1]), посочена в раздел II от настоящата част, като се взема предвид нивото на риска за заразяване с ИАС в стопанството.

При определяне на честотата на санитарните инспекции за здравен статус категория I по отношение на ИАС на компартментите, които се намират в континентални области и при които здравният статус по отношение на ИАС зависи от здравния статус на заобикалящите естествени води, обитавани от атлантическа сьомга (*Salmo salar*), рискът от заразяване с ИАС се счита за висок.

Статусът „свободен от болест“ по отношение на ИАС се запазва само ако всички проби, при които са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., са с отрицателни резултати за ВИАС с генотип HPR-с делеции, а всяко съмнение за ИАС е отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3.

I.4. Специални изисквания за получаване на здравен статус категория III по отношение на ВИАС с генотип HPR-с делеции в държави членки, зони или компартменти, които преди са имали здравен статус категория V.

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на ИАС, могат да получат здравен статус категория III, при условие че:

а) изискванията, посочени в точка I.2.2.1, букви а), б) и в), са спазени. Ако поради технически причини не е възможно да се проведе период на некултивиране, стопанствата подлежат на алтернативна мярка, която предлага почти същата гаранция за ликвидиране в околната среда на стопанството на ВИАС;

б) всички стопанства, които са официално обявени за заразени, както и всички други стопанства, преминали период на некултивиране или които са били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а) в рамките на установените предпазна и надзорна зона, са заредени с риба с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I, II или III по отношение на ИАС;

в) зареждането е извършено едва след като всички стопанства, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и са преминали период на некултивиране/били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а).

г) не е имало потвърждение за ВИАС с генотип HPR-с делеции за период от две години след приключването на мерките, посочени в букви а), б) и в), а съмненията през този период са били отхвърлени в съответствие с процедурите, установени в точка II.3.

([1]) Не се прилага за стопанства, които отглеждат само дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*) или кафява пъстърва (*Salmo trutta*) или и двете, и когато водоизточниците са предимно сладководни, а в тях не живее атлантическа сьомга (*Salmo salar*).

II. **Диагностични методи и официални разследвания**

II.1. Проби

Тъканният материал, които се изследва, е:

а) Хистология: предна част на бъбрек, черен дроб, сърце, панкреас, черва, далак и хриле;

б) Имунохистохимичен метод: средната част на бъбрек и сърце, включително клапи и *bulbus arteriosus*;

в) анализ с RT-qPCR: средна част на бъбрек и сърце;

г) култура с вируси: средна част на бъбрек, сърце, черен дроб и далак.

Парченца от органите на максимум пет риби могат да бъдат обединени.

II.2. Диагностични методи за получаване и запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на ИАС

Диагностичният метод, който да се използва за получаване или запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на ИАС в съответствие с точки I.2 и I.3, е RT-qPCR, последван от секвениране на положителни проби в съответствие с подробните методи и процедури, определени в част 3 от приложение II.

При положителен резултат на RT-qPCR се изследват още проби преди изпълнението на първоначалните мерки за борба, предвидени в член 28 от Директива 2006/88/ЕО.

Тези проби се изследват, както следва в съответствие с подробните методи и процедури, определени приложение II, част 3:

а) преглеждане на пробите с RT-qPCR, включително секвениране на HE-ген за потвърждаване на HPR-с делеции;

както и

б) изследване в препарати от тъкани с помощта на специални антитела срещу ВИАС (а именно IHC по определени раздели или IFAT върху тъканни отпечатъци); или

в) изолиране и идентифициране на ВИАС в клетъчна култура от най-малко една проба, взета от която и да било риба в стопанството.

II.3. Официални разследвания и диагностични методи, за да се отхвърли или потвърди присъствието на ИАС

При съмнение за ИАС то се потвърждава или отхвърля в съответствие с член 28 от Директива 2006/88/ЕО и тогава се извършват следните проверка, вземане на проби и процедура за изследване:

а) официалното разследване, което включва поне една санитарна инспекция и вземане на проби от 10 умиращи риби, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умряла риба, които отговарят на признаци за заразяване с ИАС. Ако не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умряла риба, които отговарят на признаци за заразяване с ИАС, след санитарната инспекция се извършва целенасочено вземане на проби от минимум 30 умиращи риби или наскоро умряла риба с нормална структура в съответствие с точка I.1. Пробите се изследват в съответствие с диагностичните методи, посочени в буква б);

б) При положителен резултат на RT-qPCR за ВИАС с генотип HPR-с делеции се изследват още проби преди изпълнението на първоначалните мерки за борба, предвидени в член 28 от Директива 2006/88/ЕО. При съмнение за заразяване с ИАС то се потвърждава в съответствие със следните критерии, като се използват подробните методи и процедури, установени в част 3 от приложение II:

i) Откриване на ВИАС с RT-qPCR, включително секвениране на HE-ген за потвърждаване на HPR-с делеции, откриване на ВИАС в препаратите от тъкани с помощта на специални антитела срещу ВИАС (а именно IHC за фиксирани участъци или IFAT върху тъканни отпечатъци)

или

ii) откриване на ВИАС с RT-qPCR, включително секвениране на HE-ген за потвърждаване на HPR-с делеции и

изолиране и идентифициране на ВИАС в клетъчна култура от най-малко една проба, взета от риба в стопанството;

в) когато се наблюдават клинични общи патологични промени или хистопатологични находки, които отговарят на признаци за ИАС, находките трябва да бъдат потвърдени с откриване на вируса по два диагностични метода с независими принципи на откриване, като например RT-qPCR и IHC в съответствие с част 3 от приложение II.

Съмнението за ИАС може да бъде отхвърлено, ако при изследванията и инспекциите за период от 12 месеца от датата на възникване на съмнението не са открити доказателства за наличието на ИАС.

Таблица 3.А

Схема за надзор на зони и компартменти за двегодишния период на контрол, който предхожда предоставянето на статуса „свободен от болест“ по отношение на ИАС, както е посочено в точка I.2.1

Година на надзор	Брой санитарни инспекции за година (две години)	Брой лабораторни изследвания за година (две години)	Брой на рибите, от които да се взимат проби годишно
Година 1	6	2 (1)	2 * 75 (2)
Година 2	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Пробите трябва да се събират, съхраняват и изследват по време на два едномесечни периода на изследване годишно (а именно през пролетта и есента) или когато е целесъобразно в съответствие с актуалните обстоятелства.
(2) Максимален брой риби на воден басейн: 5.

Таблица 3.Б

Схема за надзор за зони или компартменти за запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на ИАС, както е посочено в точка I.3 (2)

Ниво на риска	Брой санитарни инспекции за година	Брой лабораторни изследвания за година	Брой на рибите, от които да се взимат проби годишно
Високо	2	2 (1)	2 * 30
Средно	1	1 (1)	30
Ниско	1 на всеки 2 години	1 на всеки 2 години	30 на всеки 2 години

(1) Пробите трябва да се събират и изследват по време на два годишни едномесечни периода на изследване годишно (а именно през пролетта и есента) или когато е целесъобразно в съответствие с актуалните обстоятелства.
(2) Не се прилага за стопанства, които отглеждат само дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*) или кафява пъстърва (*Salmo trutta*) или и двете, и когато водоизточниците са предимно сладководни, а в тях не живее атлантическа сьомга (*Salmo salar*).

ЧАСТ 4

МЕТОДИ ЗА НАДЗОР И БОРБА СЪС ЗАРАЗЯВАНЕТО С *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Изисквания за програми за надзор и ликвидиране с цел получаване и запазване на здравния статус „свободен от болест“ по отношение на заразяване с *Marteilia refringens***

I.1. Общи изисквания

Санитарните инспекции, а когато е целесъобразно и вземането на проби за лабораторно изследване, се извършва в периода на годината, когато наличието на паразита в държавата членка, зона или компартмент е възможно най-голямо. Когато тези данни не са налични, вземането на проби се извършва веднага след като температурата на водата е надвишила 17 °C.

Когато от мекотелите трябва да се вземат проби в съответствие с изискванията, посочени в част 4, се прилагат следните критерии:

а) ако в производствените единици или в производствената зона присъстват *Ostrea* spp. и *Mytilus* spp., и от двата рода ще бъдат взети еднакви по размер проби. Ако е наличен само един от посочените родове, то тогава се вземат проби от него. Ако няма представители нито на *Ostrea*, нито на *Mytilus*, пробите трябва да бъдат представителни за всички останали присъстващи възприемчиви видове;

б) ако в производствените единици има слаби, отворени или наскоро умрели мекотели, но които още не са се разложили, се подбират предимно те. Ако няма такива мекотели, подбраните мекотелите включват най-старите здрави мекотели;

в) когато се вземат проби от стопанства с мекотели, в които за производство на мекотели се използва повече от един водоизточник, за вземане на проба се включват мекотели от всички водоизточници по такъв начин, че в пробата да са представени пропорционално всички части от стопанството;

г) когато се вземат проби от стопанства за мекотели, пробата включва мекотели от достатъчно на брой пунктове за събиране на проби по такъв начин, че в пробата да са представени пропорционално всички части от стопанството. Основните фактори, които се вземат под внимание при подбирането на тези пунктове за вземане на проби, са предишните пунктове за вземане на проби, където е открит *Marteilia refringens*, гъстотата на мекотелите, водните течения, присъствието на възприемчиви видове, присъствието на векторни видове, батиметричните характеристики на басейна и практиките на отглеждане. Във вземането на пробите се включват и естествени легла.

I.2. Специални изисквания за получаване на здравен статус категория I по отношение на *Marteilia refringens*

I.2.1. Програми за надзор

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория III по отношение на заразяването с *Marteilia refringens*, могат да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства за мекотели или райони за отглеждане на мекотели, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в тази държава членка, зона или компартмент са били подложени поне на следната програма за надзор, която се състои от санитарни инспекции и събирането на проби за изследване.

Двегодишна програма за надзор на болестите:

а) стопанствата или пунктовете за вземане на проби трябва да са били подложени на санитарни инспекции и от тях да са вземани проби за период от най-малко две последователни години, както е определено в таблица 4.A, посочена в раздел II;

б) по време на този двегодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2, е дало отрицателни резултати за *Marteilia refringens*, като всяко съмнение за *Marteilia refringens* е било отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3;

в) когато *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* или *Mytilus galloprovincialis* са с произход от държава членка, зона или компартмент със здравен статус категория I и трябва да бъдат включени в пробата, те трябва да са били въведени в стопанството или областта за отглеждане на мекотели поне през пролетта непосредствено предхождаща периода, през който се извършва програмата за надзор.

I.2.2. Програми за ликвидиране

Счита се, че в повечето случаи ликвидирането на *Marteilia refringens* е невъзможно, но когато държавата членка прецени, че това е осъществимо, се прилага следният модел за програма за ликвидиране.

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на заразяването с *Marteilia refringens*, могат да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в рамките на тази държава членка, зона или компартмент са били подложени поне на следната програма за ликвидиране:

а) мерките, предвидени в глава V, раздел 3 от Директива 2006/88/ЕО, са били приложени ефективно, а по-специално в близост до стопанствата или районите за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени с *Marteilia refringens*, е установена ограничена област, както е посочено в член 32, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, състояща се от предпазна и надзорна зона.

Ограничената област се определя според конкретния случай, като се вземат предвид фактори, които оказват влияние върху рисковете от разпространението на *Marteilia refringens*, а именно: броя, дела, възрастта и разпространението на смъртността на мекотелите в стопанството или в района за отглеждане на мекотели, заразени с *Marteilia refringens*, включително диви мекотели; разстоянието и гъстотата в съседните стопанства или райони за отглеждане на мекотели, включително диви мекотели; близостта до преработвателни предприятия, контактни стопанства или райони за отглеждане на мекотели; видовете, особено възприемчивите видове и векторните видове, които са в стопанствата или в районите за отглеждане на мекотели; прилаганите развъдни практики в засегнатите и в съседните стопанства или в районите за отглеждане на мекотели; хидродинамични условия и други установени фактори от епидемиологично значение.

За установяването на предпазните и надзорните зони се прилагат следните минимални изисквания:

i) предпазна зона се установява в непосредствена близост до стопанство или район за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени с *Marteilia refringens*, и съответства на район, определен според съответните хидродинамични и епидемиологични данни;

ii) надзорна зона се установява извън предпазната зона и съответства на район, заобикалящ предпазната зона, определен според съответните хидродинамични и епидемиологични данни;

б) всички стопанства и райони за отглеждане на мекотели, в които има възприемчиви видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в границите на предпазната зона и които не са официално обявени за заразени с *Marteilia refringens*, подлежат на официално разследване, включващо поне събирането на пробите за изследване на 150 мекотели след началото на периода на предаване на *Marteilia refringens*. Когато периодът на предаване не е известен, вземането на проби започва през периода, след като температурата на водата е надвишила 17 °C;

в) всички стопанства и райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени с *Marteilia refringens*, се изпразват, преминават период на некултивиране и ако е възможно, се почистват и дезинфекцират.

Продължителността на периода на некултивиране е най-малко:

i) два месеца за стопанства и райони за отглеждане на мекотели с ограничени връзки с околните води, като например рибарници и развъдници;

ii) два месеца за стопанства и райони за отглеждане на мекотели с неограничени връзки с околните води, при условие че заразените мекотели от възприемчивите видове и мекотелите от възприемчиви видове с епидемиологични връзки със заразеното стопанство или район за отглеждане на мекотели са били събрани или отстранени преди периода от годината, когато е известно, че разпространението на *Marteilia refringens* е в максимална степен, а ако този период не е известен — преди периода, когато температурата на водата надвишава 17 °C;

iii) четиринадесет месеца за стопанства и райони за отглеждане на мекотели с неограничени връзки с околните води, при условие че заразените мекотели от възприемчивите видове и мекотелите от възприемчиви видове с епидемиологични връзки със заразеното стопанство или район за отглеждане на мекотели не са били събрани или отстранени преди периода от годината, когато е известно, че разпространението на *Marteilia refringens* е в максимална степен, а ако тези данни не са известни — когато мекотелите от възприемчивите видове не са били събрани или отстранени преди периода, когато температурата на водата надвишава 17 °C.

Когато всички стопанства и райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени, са изпразнени, се провеждат най-малко четири седмици на синхронизиран период на некултивиране.

Компетентният орган може да реши да изиска изпразване, почистване, дезинфекциране и преминаване на период на некултивиране на други стопанства или райони за отглеждане на мекотели в установените предпазни и надзорни зони. Продължителността на периода на некултивиране се определя от компетентния орган въз основа на оценката на риска за всеки отделен случай;

г) всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени, както и всички останали стопанства или райони за отглеждане на мекотели, преминали период на некултивиране в установените предпазна и надзорна зона, се зареждат с мекотели с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на заразяването с *Marteilia refringens*.

Зареждането се извършва само когато всички стопанства, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и преминали период на некултивиране в съответствие с точка I.2.2, буква в);

д) всички стопанства и райони за отглеждане на мекотели, в които има възприемчиви видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в рамките на държавата членка, зоната или компартмента, обхванати от програмата за ликвидиране, впоследствие подлежат на схема за надзор, предвидена в точка I.2.1 от настоящата част.

I.3. Специални изисквания за запазване на здравен статус „свободен от болест“ (категория I) по отношение на заразяването с *Marteilia refringens*

Когато се изисква целенасочен надзор с цел да се запази здравен статус категория I, както е предвидено в член 52 от Директива 2006/88/ЕО, всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в държавата членка, зона или компартмент подлежат на санитарни инспекции и се вземат проби в съответствие с таблица 4.Б, посочена в раздел II, като се взема предвид нивото на риска от прихващане на *Marteilia refringens* в стопанството или района за отглеждане на мекотели.

Статусът „свободен от болест“ се запазва само ако всички проби, при които са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., са с отрицателни резултати за *Marteilia refringens*, а всяко съмнение за *Marteilia refringens* е отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3.

I.4. Изисквания за премахване на ограничителните мерки, предвидени в член 39 от Директива 2006/88/ЕО (промяна от здравен статус категория V на здравен статус категория III) по отношение на заразяването с *Marteilia refringens*

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на заразяването с *Marteilia refringens*, могат да получат здравен статус категория III по отношение на тази вписана в списъка болест, при условие че:

а) изискванията, посочени в точка I.2.2, букви а), б) и в), са спазени. Ако поради технически причини не е възможно да се проведе период на некултивиране, стопанствата подлежат на алтернативна мярка, която предлага почти същата гаранция за ликвидиране на *Marteilia refringens* в околната среда на стопанството;

б) всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, които са официално обявени за заразени, както и всички други стопанства или райони за отглеждане на мекотели, преминали период на некултивиране/били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а) в рамките на установените предпазна и надзорна зона, са заредени с мекотели с произход от държави членки, зона или компартменти със здравен статус категория I, II или III по отношение на заразяването с *Marteilia refringens*;

в) зареждането е извършено, след като всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и са преминали период на некултивиране/били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а);

г) не е имало потвърждение за заразяване с *Marteilia refringens* за период от две години след приключването на мерките, посочени в букви а), б) и в), а подозренията през този период са били отхвърлени в съответствие с процедурите, установени в точка II.3.

II. **Диагностични методи и официални разследвания**

II.1. Проби

Цялото животно се предава в лабораторията за извършването на диагностичните тестове, предвидени в точки II.2 и II.3.

II.2. Диагностични методи за получаване и запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на заразяване с *Marteilia refringens*

Диагностичните методи, които да се използват за получаване или запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на заразяване с *Marteilia refringens*, като се спазват подробните диагностични методи и процедури, посочени в част 4 от приложение II, са хистопатология, тъканни отпечатъци или PCR.

II.3. Методи за официално разследване и диагностични методи за потвърждаване на присъствието или за отхвърляне на съмнение за заразяване с *Marteilia refringens*

При съмнение за заразяване с *Marteilia refringens* се изисква то да бъде потвърдено или отхвърлено в съответствие с член 28 от Директива 2006/88/ЕО и тогава се извършват следните проверка, вземане на проби и процедури за изследване:

а) методите за официално разследване включват поне една проба от 30 мекотели от възприемчиви видове, ако съмнението е въз основа на доклад за смъртността, а ако не е въз основа на доклад — 150 мекотели от възприемчиви видове след началото на периода на предаване на *Marteilia refringens*. Когато периодът на предаване не е известен, вземането на проби започва през периода, след като температурата на водата е надвишила 17 °C;

б) Пробите се изследват, като се използват диагностичните методи, посочени в подточка i) в съответствие с подробните диагностични методи и процедури, посочени в част 4, раздел I от приложение II:

i) присъствието на *Marteilia refringens* се смята за потвърдено при положителен резултат от хистопатологията, тъканните отпечатъци или *in situ* хибридизация заедно с положителен резултат при PCR, допълнен от секвениране;

ii) съмнението за заразяване с *Marteilia refringens* може да бъде отхвърлено, ако при изследванията, посочени в подточка i), не са открити доказателства за наличието на *Marteilia refringens*.

Таблица 4.А

Схема за надзор на държави членки, зони или компартменти за периода на контрол, който предхожда предоставянето на статуса „свободен от болест“ по отношение на *Marteilia refringens*, както е посочено в точка I.2.1

	Брой санитарни инспекции за година	Брой лабораторни изследвания за година	Брой на мекотелите в пробата
Стопанство или район за отглеждане на мекотели	1	1	150

Таблица 4.Б

Схема за надзор за държави членки, зони или компартменти за запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на *Marteilia refringens*, както е посочено в точка I.3

Ниво на риска	Брой санитарни инспекции	Брой лабораторни изследвания	Брой мекотели в пробата
Високо	1 всяка година	1 на всеки 2 години	150
Средно	1 на всеки 2 години	1 на всеки 2 години	150
Ниско	1 на всеки 2 години	1 на всеки 4 години	150

ЧАСТ 5

МЕТОДИ ЗА НАДЗОР И БОРБА СЪС ЗАРАЗЯВАНЕТО С *BONAMIA OSTREAE*

I. **Изисквания за програми за надзор или ликвидиране с цел получаване и запазване на здравния статус „свободен от болест“ по отношение на заразяване с *Bonamia ostreae***

I.1. Общи изисквания

Санитарните инспекции, а когато е целесъобразно и вземането на проби от производствените единици, се извършват в периода на годината, когато равнището на разпространението на *Bonamia ostreae* в държавата членка, зона или компартмент се знае, че е възможно най-голямо. Когато тези данни не са на разположение, вземането на проби се извършва през зимата или в началото на пролетта.

Когато от мекотелите трябва да се вземат проби в съответствие с изискванията, посочени в част 5, се прилагат следните критерии:

а) ако присъства *Ostrea edulis*, за взимането на проби се подбират само стриди от този вид. Ако не присъства *Ostrea edulis*, пробата трябва да бъде представителна за всички други възприемчиви видове, които присъстват;

б) ако има слаби, отворени или наскоро умрели мекотели, но които още не са се разложили, се подбират предимно те. Ако няма такива мекотели, подбраните мекотелите включват най-старите здрави мекотели;

в) когато се вземат проби от стопанства, в които за производство на мекотели се използва повече от един водоизточник, за вземане на проба се включват мекотели от всички водоизточници по такъв начин, че в пробата да са представени пропорционално всички части от стопанството;

г) когато се вземат проби от райони за отглеждане на мекотели, в пробата се включват мекотели от достатъчно пунктове за вземане на проби. Основните фактори, които се вземат под внимание при подбирането на тези пунктове за вземане на проби, са предишни пунктове, където е открит *Bonamia ostreae*, гъстотата на мекотелите, водните течения, присъствието на възприемчиви видове, присъствието на векторни видове, батиметрични характеристики на басейна и практиките на отглеждане. При вземането на пробите се включват естествени легла във или близо до райони за отглеждане.

I.2. Специални изисквания за получаване на здравен статус категория I по отношение на *Bonamia ostreae*

I.2.1. Програми за надзор

държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория III по отношение на заразяването с *Bonamia ostreae*, могат отново да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в държавата членка, зона или компартмент са били подложени поне на следната програма за надзор, която се състои от санитарни инспекции и събирането на проби за изследване.

Двегодишна програма за надзор:

а) стопанствата и районите за отглеждане на мекотели, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, са били подложени на санитарни инспекции и от тях са вземани проби за период от най-малко две последователни години, както е определено в таблица 5.A, посочена в настоящата част;

б) по време на този двегодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2, е дало отрицателни резултати за *Bonamia ostreae*, като всяко съмнение за *Bonamia ostreae* е било отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3;

в) когато *Ostrea edulis* с произход от държава членка, зона или компартмент със здравен статус категория I трябва да бъдат включени в извадката, те трябва да са били въведени в стопанството или района за отглеждане на мекотели поне през есента непосредствено предхождаща периода, през който се провежда програмата за надзор.

I.2.2. Програми за ликвидиране

Счита се, че в повечето случаи ликвидирането на *Bonamia ostreae* не е възможно, но когато държавата членка прецени, че това е осъществимо, се прилага следният модел за програма за ликвидиране.

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на заразяването с *Bonamia ostreae*, могат отново да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в тази държава членка, зона или компартмент са били подложени поне на следната програма за ликвидиране:

а) минималните мерки за борба, предвидени в глава V, раздел 3 от Директива 2006/88/ЕО, са били приложени ефективно, а по-специално в близост до стопанствата или районите за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени с *Bonamia ostreae*, е установена ограничена област, както е посочено в член 32, буква б) от посочената директива, състояща се от предпазна и надзорна зона.

Ограничената област се определя според конкретния случай, като се вземат предвид фактори, които оказват влияние върху рисковете от разпространението на посочената включена в списъка болест, а именно: броя, дела, възрастта и разпространението на смъртността на мекотелите в стопанството или в района за отглеждане на мекотели, заразени с *Bonamia ostreae*, включително диви мекотели; разстоянието и гъстотата на съседните стопанства или райони за отглеждане на мекотели, включително диви мекотели; близостта до преработвателни предприятия, контактни стопанства или райони за отглеждане на мекотели; видовете в стопанствата или районите за отглеждане на мекотели, най-вече възприемчиви видове и векторни видове; прилагани развъдни практики в засегнатите и в съседните стопанства или райони за отглеждане на мекотели; хидродинамични условия и други установени фактори от епидемиологично значение.

За установяването на предпазните и надзорните зони се прилагат следните минимални изисквания:

i) предпазна зона се установява в непосредствена близост до стопанство или район за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени с *Bonamia ostreae*, и съответства на район, определен според съответните хидродинамични и епидемиологични данни;

ii) надзорна зона се установява извън предпазната зона и съответства на район, заобикалящ предпазната зона, определен според съответните хидродинамични и епидемиологични данни;

б) всички стопанства и райони за отглеждане на мекотели, в които има възприемчиви видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО в границите на предпазната зона, и които не са официално обявени за заразени с *Bonamia ostreae*, подлежат на официално разследване, включващо поне събирането на пробите за изследване на 150 мекотели от възприемчиви видове след началото на периода на предаване на *Bonamia ostreae*. Когато периодът на предаване не е известен, вземането на проби започва през зимата или в началото на пролетта;

в) всички стопанства и райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени с *Bonamia ostreae*, се изпразват, преминават период на некултивиране и ако е възможно, се почистват и дезинфекцират. Продължителността на периода на некултивиране е най-малко шест месеца.

Когато всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени, са изпразнени, се провеждат най-малко четири седмици на синхронизиран период на некултивиране.

Компетентният орган може да реши да изиска изпразване, почистване, дезинфекциране и преминаване на период на некултивиране на други стопанства или райони за отглеждане на мекотели в установените предпазни и надзорни зони. Продължителността на периода на некултивиране се определя от компетентния орган въз основа на оценката на риска за всеки конкретен случай;

г) всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени, както и всички останали стопанства или райони за отглеждане на мекотели, преминали период на некултивиране в установените предпазна и надзорна зона, се зареждат с мекотели с произход от държави членки или компартменти със здравен статус категория I по отношение на заразяването с *Bonamia ostreae*. Зареждането се извършва само когато всички стопанства, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и преминали период на некултивиране в съответствие с точка I.2.2, буква в);

д) всички стопанства и райони за отглеждане на мекотели, в които има възприемчиви видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в държавата членка, зоната или компартмента, обхванати от програмата за ликвидиране, впоследствие трябва да бъдат подложени на програмата за надзор, предвидена в точка I.2.

I.3. Специални изисквания за запазване на здравен статус „свободен от болест“ (категория I) по отношение на заразяването с *Bonamia ostreae*

Когато се изисква целенасочен надзор с цел да се запази здравен статус категория I, както е определено в член 52 от Директива 2006/88/ЕО, всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към посочената директива, в държавата членка, зона или компартмент подлежат на санитарни инспекции и се вземат проби в съответствие с таблица 5.Б, посочена в раздел II от настоящата част, като се взема предвид нивото на риска от прихващане на заразяване с *Bonamia ostreae* в стопанството или района за отглеждане на мекотели.

Статусът „свободен от болест“ по отношение на заразяване с *Bonamia ostreae* може да се запази само ако всички проби, при които са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2., са с отрицателни резултати за *Bonamia ostreae*, а всяко съмнение за *Bonamia ostreae* е отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3.

I.4. Изисквания за премахване на ограничителните мерки, предвидени в член 39 от Директива 2006/88/ЕО (промяна от здравен статус категория V на здравен статус категория III) по отношение на заразяването с *Bonamia ostreae*.

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на заразяване с *Bonamia ostreae*, могат да получат здравен статус категория III по отношение на тази вписана в списъка болест, при условие че:

а) изискванията, посочени в точка I.2.2, букви а), б) и в), са спазени. Ако поради технически причини не е възможно да се проведе период на некултивиране, стопанствата подлежат на алтернативна мярка, която предлага почти същата гаранция за ликвидиране на *Bonamia ostreae* в околната среда на стопанството;

б) всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, които са официално обявени за заразени, както и всички други стопанства или райони за отглеждане на мекотели, преминали период на некултивиране/подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а) в рамките на установените предпазна и надзорна зона, са заредени с мекотели с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I, II или III по отношение на заразяването с *Bonamia ostreae*.

в) възстановяването на запасите от мекотели се извършва, след като всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели, официално обявени за заразени, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и са преминали период на некултивиране/били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а);

г) не е имало потвърждение за заразяване с *Bonamia ostreae* за период от две години след приключването на мерките, посочени в букви а), б) и в), а съмненията през този период са били отхвърлени в съответствие с процедурите, установени в точка II.3.

II. **Диагностични методи и критерии за диагностициране**

II.1. Проби

Цялото животно се предава в лабораторията за извършването на диагностичните тестове, предвидени в точки II.2 и II.3.

II.2. Диагностични методи за получаване и запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на заразяване с *Bonamia ostreae*

Диагностичните методи, които да се използват за получаване или запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на заразяване с *Bonamia ostreae*, са хистопатология, тъканни отпечатъци или PCR. При прилагането на тези диагностични методи се спазват съответните подробни методи и процедури, определени в част 5 от приложение II.

II.3. Критерии за диагностициране за потвърждаване на присъствието или за отхвърляне на съмнението за заразяване с *Bonamia ostreae*

При съмнение за заразяване с *Bonamia ostreae* се изисква то да бъде потвърдено или отхвърлено в съответствие с член 28 от Директива 2006/88/ЕО и тогава се извършват следните проверка, вземане на проби и процедури за изследване:

официалното разследване включва поне една проба от 30 мекотели от възприемчиви видове, ако съмнението е въз основа на доклад за смъртността, а ако не е въз основа на доклад — 150 мекотели от възприемчиви видове след началото на периода на предаване на *Bonamia ostreae*. Когато периодът на предаване не е известен, вземането на проби започва през зимата или в началото на пролетта. Пробите се изследват, като се използват диагностичните методи, посочени в подточка i) в съответствие с подробните диагностични методи и процедури, посочени в част 5, точка I от приложение II.

i) присъствието на *Bonamia ostreae* се смята за потвърдено при положителен резултат от хистопатологията, тъканните отпечатъци или *in situ* хибридизация заедно с положителен резултат при PCR, допълнен от секвениране в съответствие с одобрените методи и процедури, посочени в част 5 от приложение II;

ii) съмнението за присъствие на заразяване с *Bonamia ostreae* се отхвърля, ако при тези изследвания не са открити други доказателства за присъствието на *Bonamia ostreae*.

Таблица 5.А

Схема за надзор на държави членки, зони или компартменти за периода на контрол, който предхожда получаването на статуса „свободен от болест“ по отношение на *Bonamia ostreae,* както е посочено в точка I.2.1

	Брой санитарни инспекции за година	Брой лабораторни изследвания за година	Брой на мекотелите в пробата
Стопанство или район за отглеждане на мекотели	1	1	150

Таблица 5.Б

Схеми за надзор за държави членки, зони или компартменти за запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на *Bonamia ostreae,* както е посочено в точка I.3

Ниво на риска	Брой санитарни инспекции	Брой лабораторни изследвания	Брой мекотели в пробата
Високо	1 всяка година	1 на всеки 2 години	150
Средно	1 на всеки 2 години	1 на всеки 2 години	150
Ниско	1 на всеки 2 години	1 на всеки 4 години	150

ЧАСТ 6

МЕТОДИ ЗА НАДЗОР И БОРБА С БАЛОТО ПЕТНИСТО ЗАБОЛЯВАНЕ

I. **Изисквания за програми за надзор и ликвидиране с цел получаване и запазване на здравния статус „свободен от болест“ по отношение на бялото петнисто заболяване и за ограничаване на заразяването с вируса на бялото петнисто заболяване**

I.1. Общи изисквания за проверките и вземането на проби

Вземането на проби от ракообразни за лабораторни изследвания се извършва, когато температурата на водата е вероятно да достигне най-високата си стойност за годината. Това изискване по отношение на температурата на водата се прилага също за санитарни инспекции, когато е възможно и целесъобразно те да бъдат извършвани.

Когато от ракообразни, отглеждани в стопанства, трябва да се вземат проби в съответствие с изискванията, посочени в настоящата част, се прилагат следните критерии:

а) ако в производствените единици има слаби или умиращи ракообразни, се подбират предимно те. Ако няма такива ракообразни, сред подбраните трябва да има ракообразни от различни групи, а именно млади и възрастни, от подбраните възприемчиви видове, пропорционално представени в пробата;

б) ако за производството на ракообразните се използва повече от един воден източник, в пробата трябва да бъдат включени ракообразни, представляващи всички водни източници.

Когато се изисква целенасочен надзор върху популации от диви животни в съответствие с част I, точка 2, втора алинея от приложение V към Директива 2006/88/ЕО, броят и географското разпределение на пунктовете за вземане на проби се определят така, че да се постигне разумно покритие на държавата членка, зоната или компартмента. Пунктовете за вземане на проби са представителни за различните екосистеми, където се намират популациите от възприемчиви диви животни, а именно морските, естуарните, речните и езерните системи.

Когато се изисква целенасочен надзор върху популации от диви животни в съответствие с част I, точка 2, втора алинея от приложение V към Директива 2006/88/ЕО, ракообразните, от които се вземат проби, се подбират, както следва:

i) в районите на морските и естуарните системи се подбират един или повече от следните видове: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* или видове скариди от семейство *penaeid*, а именно *Penaeus japonicus, Penaeus kerathurus, Penaeus semisulcatus*. Ако тези видове не присъстват, пробата трябва да бъде представителна за други възприемчиви видове ракообразни с десет крака, които присъстват. Като се има предвид широкият обхват гостоприемници от възприемчив вид, могат да бъдат подбрани гостоприемници от родове или семейства на ракообразни с десет крака, при които възприемчивостта е била доказана експериментално или естествено;

ii) в речните и езерните системи се подбират един или повече от следните видове: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* или *Orconectes limosus*. Ако тези видове не присъстват, пробата трябва да бъде представителна за други възприемчиви видове ракообразни с десет крака, които присъстват. Като се има предвид широкият обхват гостоприемници от възприемчив вид, могат да бъдат подбрани гостоприемници от родове или семейства на ракообразни с десет крака, при които възприемчивостта е била доказана експериментално или естествено;

iii) ако има слаби или умиращи ракообразни, се подбират предимно те. Ако не присъстват такива ракообразни, сред подбраните трябва да присъстват ракообразни от различни групи, а именно млади и възрастни, от подбраните възприемчиви видове, пропорционално представени в пробата;

I.2. Специални изисквания за получаване на здравен статус категория I по отношение на бялото петнисто заболяване

I.2.1. Програми за надзор

а) държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория III в съответствие с част Б от приложение III към Директива 2006/88/ЕО по отношение на бялото петнисто заболяване, могат да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към посочената директива, в държавата членка, зона или компартмент отговарят на съответните изисквания, определени в приложение V към посочената директива, като всички тези стопанства, а когато се изисква съгласно част I, точка 2, втора алинея от приложение V към нея — и пунктовете за вземане на проби от популации от диви животни, подбрани в съответствие с тази точка, са били подложени на следната двегодишна програма за надзор, състояща се от санитарни инспекции и събиране на проби за изследване.

Стопанствата или пунктовете за вземане на проби са били подложени на санитарни инспекции и от тях са вземани проби за период от най-малко две последователни години, както е определено в таблица 6.A, посочена в раздел II.

По време на този двегодишен период изследването на всички проби, при което са използвани диагностичните методи, определени в точка II.2, е дало отрицателни резултати за заразяване с бяло петнисто заболяване, като всяко съмнение за бяло петнисто заболяване е било отхвърлено в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.3.

б) ако по време на изпълнение на програмата за надзор, посочена в буква а), бъде потвърдено заразяване с вирус на синдрома на бялото петнисто заболяване в стопанство, включено в посочената програма за надзор, и поради това се оттегля здравният му статус категория II, съответното стопанство може незабавно да си възвърне здравния статус категория II и да продължи изпълнението на програмата за надзор, за да получи статус на свободно от болест, без да изпълнява програма за ликвидиране, както е посочено в точка I.2.2, при условие че:

i) то е континентално стопанство, чийто здравен статус по отношение на бялото петнисто заболяване не зависи от здравния статус на заобикалящите естествени води по отношение на посочената включена в списъка болест в съответствие с част II, точка 3 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО;

ii) то е изпразнено, почистено, дезинфекцирано и преминало период на некултивиране; продължителността на периода на некултивиране трябва да бъде най-малко шест седмици;

iii) заредено е с ракообразни с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на бялото петнисто заболяване.

I.2.2. Програми за ликвидиране

I.2.2.1. Общи изисквания

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на бялото петнисто заболяване, могат да получат здравен статус категория I по отношение на тази вписана в списъка болест, когато всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в тази държава членка, зона или компартмент са били подложени поне на следната програма за ликвидиране:

а) минималните мерки за борба, предвидени в глава V, раздел 4 от Директива 2006/88/ЕО, са били приложени ефективно, а в близост до стопанствата, официално обявени за заразени с бяло петнисто заболяване, е установена ограничена област, както е посочено в член 32, буква б) от посочената директива, състояща се от предпазна и надзорна зона.

Ограничената област трябва да е определена според конкретния случай, като се вземат предвид фактори, които оказват влияние върху рисковете от разпространението на бяло петнисто заболяване сред ракообразни, отглеждани в стопанства, или диви екземпляри, а именно: броят, делът и разпространението на смъртността сред ракообразните в стопанствата, заразени с бяло петнисто заболяване; разстоянието и гъстотата на съседните стопанства; контактни стопанства; видовете, които са в стопанствата; прилаганите развъдни практики в засегнатите и в съседните стопанства; хидродинамични условия и други установени фактори от епидемиологично значение.

За установяването на предпазните и надзорните зони се прилагат следните минимални изисквания:

i) предпазната зона се установява в непосредствена близост до стопанство, което е официално обявено за заразено с бяло петнисто заболяване, и съответства на:

(1) в морските и естуарните райони: област, попадаща в кръг с радиус, равен най-малко на терена на приливите и отливите или най-малко 5 km — което от двете е по-голямо, с център на кръга стопанството, официално обявено за заразено с бяло петнисто заболяване, или еквивалентна зона, определена според съответните хидродинамични и епидемиологични данни; или

(2) в сладководните източници: целия водосборен басейн на стопанството, официално обявено за заразено с бяло петнисто заболяване; компетентният орган може да ограничи обхвата на зоната до части от водосборния басейн, при условие че предотвратяването на разпространението на бялото петнисто заболяване не е застрашено;

ii) надзорна зона се установява извън предпазната зона и съответства на:

(1) в морските райони: областта, която е около предпазната зона и обхваща припокриващите се терени на приливите и отливите; или област около предпазната зона и включена в кръг с радиус 10 km от центъра на предпазната зона; или еквивалентна област, определена според съответните хидродинамични и епидемиологични данни; или

(2) в сладководните източници: като разширена област извън определената предпазна зона;

б) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в границите на предпазната зона и които не са официално обявени за заразени с бяло петнисто заболяване, са предмет на официално разследване, включващо най-малко следното:

i) събирането на проби за изследване от 10 ракообразни, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследвания на умрели ракообразни, които отговарят на признаците за заразяване с бяло петнисто заболяване, или от 150 ракообразни, когато не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умрели ракообразни; както и

ii) санитарна инспекция; в стопанствата, където изследванията, посочени в подточка i), са дали отрицателни резултати, санитарните инспекции продължават веднъж месечно през сезона, когато температурата на водата е вероятно да достигне най-високата си стойност за годината, докато предпазната зона е оттеглена в съответствие с точка I.2.2.1, буква в).

в) всички стопанства, официално обявени за заразени с бяло петнисто заболяване, се изпразват, почистват, дезинфекцират и преминават период на некултивиране. Продължителността на периода на некултивиране е най-малко шест седмици. Когато всички стопанства, официално обявени за заразени, са изпразнени, се провеждат най-малко три седмици на синхронизиран период на некултивиране. Настоящият параграф се прилага и по отношение на нови стопанства, официално обявени за заразени по време на изпълнението на програмата за ликвидиране.

Докато трае периодът на некултивиране на официално обявените за заразени стопанства, предпазните зони стават надзорни зони.

Компетентният орган може да реши да изиска изпразване, почистване, дезинфекциране и преминаване на период на некултивиране на други стопанства в установените предпазни и надзорни зони. Продължителността на този период на некултивиране се определя от компетентния орган въз основа на оценката на риска за всеки отделен случай.

г) Всички стопанства, официално обявени за заразени, и всички други стопанства, преминали период на некултивиране в установените предпазна и надзорна зона, се зареждат:

i) с ракообразни с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на бяло петнисто заболяване; или

ii) за преходен период до 31 декември 2020 г. — с ракообразни от държави членки, зони или компартменти с одобрена програма за надзор на бяло петнисто заболяване.

Зареждането се извършва само когато всички стопанства, официално обявени за заразени с бялото петнисто заболяване, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и преминали период на некултивиране в съответствие с точка I.2.2.1, буква в);

д) всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО, в рамките на държава членка, зона или компартмент, обхванати от програмата за ликвидиране, а когато се изисква надзор на популациите от диви животни — и пунктовете за вземане на проби, подбрани в съответствие с част I, точка 2, втори параграф от приложение V към посочената директива, впоследствие трябва да са били подложени поне на програмата, определена в точка I.2.1.

I.2.2.2. Изисквания за възстановяване на статуса „свободен от болест“ по отношение на бялото петнисто заболяване за континенталните компартменти, включващи едно-единствено стопанство, което преди е било обявено за свободно от бяло петнисто заболяване.

Континентален компартмент, включващ едно-единствено стопанство, което има здравен статус категория I по отношение на бяло петнисто заболяване, чийто здравен статус по отношение на тази вписана в списъка болест не зависи от заобикалящите естествени води в съответствие с част II, точка 3 от приложение V към Директива 2006/88/ЕО и чийто здравен статус категория I е оттеглен в съответствие с член 53, параграф 3 от посочената директива, може да си възвърне здравния статус категория I незабавно след като компетентният орган е потвърдил, че са изпълнени следните условия:

а) стопанството с бяло петнисто заболяване е изпразнено, почистено, дезинфекцирано и преминало период на некултивиране; продължителността на периода на некултивиране трябва да е била най-малко шест седмици;

б) стопанството с бяло петнисто заболяване е заредено с ракообразни с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I по отношение на бялото петнисто заболяване.

I.3. Специални изисквания за запазване на здравен статус „свободен от болест“ (категория I) по отношение на бяло петнисто заболяване

Когато се изисква целенасочен надзор с цел да се запази здравен статус категория I, както е определено в член 52 от Директива 2006/88/ЕО, всички стопанства, в които се отглеждат възприемчивите видове, изброени в част II на приложение IV към посочената директива, в държавата членка, зона или компартмент подлежат на санитарна инспекция и се вземат проби в съответствие с таблица 6 Б, посочена в раздел II, като се взема предвид нивото на риска от заразяване с бяло петнисто заболяване в стопанството.

В държави членки, зони или компартменти, в които броят на стопанствата е ограничен, а целенасоченият надзор в тези стопанства не предоставя достатъчно епидемиологични данни, програмите за надзор за запазване на статуса „свободен от болест“ включват пунктове за вземане на проби, подбрани в съответствие с изискванията, изложени в точка I.1.

Всяка година тези пунктове за вземане на проби се инспектират и на ротационен принцип се вземат проби от 50 % от пунктовете за вземане на проби. Вземането на пробите се извършва в съответствие с таблица 6 Б, посочена в раздел II. Пробите се подбират, подготвят и изследват в съответствие с диагностичните методи и методите за вземане на проби, посочени в раздел II, а лабораторните изследвания трябва да бъдат с отрицателен резултат по отношение на присъствието на агент на бялото петнисто заболяване.

Статусът „свободен от болест“ се запазва само ако всички проби, при които са използвани диагностичните методи и методите за вземане на проби, посочени в точка II.2., са с отрицателни резултати за бяло петнисто заболяване, а всяко съмнение за бяло петнисто заболяване е отхвърлено в съответствие с официалното разследване и диагностичните методи, посочени в точка II.3.

I.4. Изисквания за премахване на ограничителните мерки, предвидени в член 39 от Директива 2006/88/ЕО (промяна от здравен статус категория V на здравен статус категория III) по отношение на бяло петнисто заболяване.

Държава членка, зона или компартмент, които имат здравен статус категория V по отношение на бяло петнисто заболяване, могат да получат здравен статус категория III по отношение на вписаната в списъка болест, при условие че:

а) изискванията, посочени в точка I.2.2.1, букви а), б) и в), са спазени. Ако поради технически причини не е възможно да се проведе период на некултивиране, стопанствата подлежат на алтернативна мярка, която предлага почти същата гаранция за ликвидиране в околната среда на стопанството на вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване;

б) всички стопанства, които са официално обявени за заразени с бяло петнисто заболяване, както и всички други стопанства, преминали период на некултивиране/били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а) в рамките на установените предпазна и надзорна зона, са заредени с ракообразни с произход от държави членки, зони или компартменти със здравен статус категория I, II или III по отношение на бяло петнисто заболяване.

в) зареждането се извършва, след като всички стопанства, официално обявени за заразени с бяло петнисто заболяване, са били изпразнени, почистени, дезинфекцирани и са преминали период на некултивиране/били подложени на алтернативни мерки в съответствие с буква а);

г) бяло петнисто заболяване не е било откриван за период от две години след приключването на мерките, посочени в букви а) и б), а съмненията през този период са били отхвърлени в съответствие с процедурите, установени в точка II.3.

II. **Диагностични методи и методи за вземане на проби**

II.1. Проби

Проби от интегументалния епидермис, изрязан или съдържащ се в крайниците, плеоподалните крачка, частите от устата или хрилете на опитното животно трябва да бъдат фиксирани в 95 % етанол преди подготвянето на пробите за двуетапен PCR.

Други проби, фиксирани за хистология и трансмисионна електронна микроскопия, могат да бъдат събрани в подкрепа на диагностичните данни от PCR.

II.2. Диагностични методи за получаване и запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на бяло петнисто заболяване

Диагностичният метод, който да се използва за получаване или запазване на статус „свободен от болест“ по отношение на бяло петнисто заболяване, като се спазват подробните методи и процедури, посочени в част 6 от приложение II, е двуетапен PCR.

При положителен резултат от двуетапния PCR той трябва да бъде подкрепен със секвениране на ампликона, преди да са изпълнени първоначалните мерки за борба, предвидени в член 28 от Директива 2006/88/ЕО, ако е възможно при практически условия с доказване на патогномонични признаци на бялото петнисто заболяване в тези подбрани възприемчиви към болестта приемници чрез хистология и трансмисионна електронна микроскопия.

II.3. Официални разследвания и диагностични методи, за да се отхвърли съмнението за или да се потвърди присъствието на бяло петнисто заболяване

Когато се изисква присъствието на заразяване с бяло петнисто заболяване да бъде потвърдено, а съмнението за такова заразяване — да бъде отхвърлено в съответствие с член 28 от Директива 2006/88/ЕО, се извършват следните проверка, вземане на проби и процедури за изследване:

а) официалното разследване включва поне една санитарна инспекция и едно взимане на проби за изследване от 10 ракообразни, когато са забелязани клинични признаци или признаци при изследвания на умрели ракообразни, които отговарят на признаците за заразяване с бяло петнисто заболяване, или от минимум 150 ракообразни, когато не са забелязани клинични признаци или признаци при изследване на умрели ракообразни. Пробите се изследват в съответствие с диагностичните методи, посочени в точка II.2. (двуетапен PCR);

б) присъствието на бяло петнисто заболяване се смята за потвърдено, когато резултатите от двуетапния PCR и последващото секвениране, извършени в съответствие с подробните методи и процедури, посочени в настоящата част 6 от приложение II, са с положителен резултат за вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване и когато за патогномоничните признаци за бяло петнисто заболяване присъстват в подбраните гостоприемници.

Съмнение за бяло петнисто заболяване може да се отхвърли, ако посочените изследвания не покажат друго доказателство за присъствието на бяло петнисто заболяване.

Таблица 6 А

Схема за надзор на държави членки, зони и компартменти за двегодишния период на контрол, който предхожда предоставянето на статуса „свободен от болест“, както е посочено в точка I.2.1

	Брой клинични проверки за година	Брой лабораторни изслед-вания за година	Брой на ракообразните в пробата
Стопанства/обекти за вземане на проби	1	1	150

Таблица 6 Б

Схема за надзор за държави членки, зони или компартменти за запазване на статуса „свободен от болест“ по отношение на бяло петнисто заболяване, както е посочено в точка I.3

Ниво на риска	Брой санитарни инспекции	Брой лабораторни изследвания	Брой на ракообразните в пробата
Високо	1 всяка година	1 на всеки 2 години	150
Средно	1 на всеки 2 години	1 на всеки 2 години	150
Ниско	1 на всеки 2 години	1 на всеки 4 години	150

ПРИЛОЖЕНИЕ II

ПОДРОБНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ПРОЦЕДУРИ

I. **Въведение**

В настоящото приложение се установяват подробните процедури за диагностичните методи, които да се използват за лабораторните изследвания по програмите за ликвидиране и надзор, посочени в приложение I към настоящото решение, и за потвърждаване или отхвърляне на съмнението за присъствие на следните неекзотични болести, изброени в част II от приложение IV към Директива 2006/88/ЕО („изброените в списъка болести“) в съответствие с член 57, буква б) от посочената директива:

1.	Вирусна хеморагична септицемия (ВХС)	Част 1
2.	Инфекциозна хемопоетична некроза (ИХН)	Част 1
3.	Кой-херпесвирусна болест по шарана (КХБШ)	Част 2
4.	Инфекциозна анемия по сьомгата (ИАС)	Част 3
5.	Заразяване с *Marteilia refringens*	Част 4
6.	Заразяване с *Bonamia ostreae*	Част 5
7.	Бяло петнисто заболяване	Част 6

II. **Определения**

За целите на настоящото приложение „транспортна среда“ означава среда за клетъчна култура, съдържаща 10 % телешки серум с 200 iu пеницилин, 200 μg стрептомицин и 200 μg канамицин на милилитър или с други антибиотици с доказана ефективност.

ЧАСТ 1

ПОДРОБНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ПРОЦЕДУРИ ЗА НАДЗОР И ПОТВЪРЖДЕНИЕ НА ИХН И ВХС

I. **Диагностични методи и процедури за надзор на ВХС и ИХН**

При вземането на пробите и лабораторното изследване с цел получаване или запазване на статут „свободен от болест“ по отношение на ИХН или ВХС, както е посочено в част 1, раздел I от приложение I, като се използват диагностичните методи, посочени в точки II.1 и II.2 от част 1 от посоченото приложение, се прилагат подробните диагностични методи и процедури, посочени в следните точки от I.1 — I.6.

I.1. Подготовка и изпращане на пробите от риби

I.1.1. Тъкани за вирусологично изследване на клетъчна култура

Преди да бъдат изпратени или предадени на лабораторията, с помощта на стерилни дисекционни инструменти от рибата се отстраняват парченцата от органите, които ще се изследват, и се предават поставени в стерилни пластмасови епруветки, съдържащи транспортната среда.

Количеството на материала от рибата, подходящ за вирусологично изследване на клетъчна култура и чрез RT-qPCR, зависи от размера на рибата. Следователно тъканите, от които се вземат проби, са цяла личинка (дължина на тялото < 4 cm), вътрешностите, включително бъбреците (4 cm < дължината на тялото < 6 cm) или при риби с по-голям размер — бъбрек, далак, сърце и/или мозък, както и овариална течност от риби за размножаване по време на хвърляне на хайвера.

Овариалната или семенната течност или парченцата от органите от максимум 10 риби могат да бъдат събрани в стерилна епруветка, която съдържа минимум 4 ml транспортна среда и представлява една обща проба. Тъканта във всяка проба е с тегло минимум 0,5 g.

Вирусологичното изследване на клетъчна култура започва възможно най-бързо и най-късно 48 часа след събирането на пробите. При изключителни случаи вирусологичното изследване може да започне най-късно 72 часа след събирането на материала за изследване, при условие че той е защитен в транспортна среда и че са били спазени изискванията за температурата по време на транспортирането.

I.1.2. Проби за анализ с обратно транскриптазна полимеразна верижна реакция в реално време (RT-PCR или RT-qPCR)

С помощта на стерилен инструмент се вземат проби от рибите в съответствие с процедурата, описана в точка I.1.1, и се поставят в стерилна пластмасова епруветка, съдържаща транспортна среда. В една епруветка може да се събира тъканта от 10 риби и представлява една обща проба. Ако обаче количеството на инокулума е малко, може да се използва тъкан от до пет риби. Друг начин е пробите да бъдат събрани в реагенти за стабилизиране на РНК, като например реагент 0,2 g тъкан/ml в съответствие с препоръката от производителите, въпреки че всяка риба се обработва самостоятелно и не може да бъде обединявана в пробите поради малкото количество на материала, който се използва за извличането.

Цели риби също могат да бъдат изпращани в лабораторията.

I.2. Изпращане на пробите от риби

Епруветките, които съдържат тъканите от рибите в транспортната среда за клетъчно култивиране или анализ с RT-PCR/RT-qPCR, се поставят в изолирани съдове, като например кутии от полистирен с дебели стени с достатъчно количество лед или друга охлаждаща среда със сходен охлаждащ ефект, за да се гарантира изстудяването на пробите по време на транспорта до лабораторията. Замразяване на пробите обаче трябва да се избягва. Температурата на пробата по време на транспортирането ѝ не трябва в нито един момент да надвишава 10 °C, а при получаването ѝ в съда за транспортиране все още трябва да има лед или едно или няколко от охлаждащите блокчета все още да са частично или изцяло замръзнали.

В лабораторията могат да бъдат изпращани цели риби, ако по време на транспортирането могат да бъдат спазени изискванията за температурата, посочени в първия параграф. Цялата риба се увива в абсорбираща хартия и в крайна сметка се транспортира в найлоново пликче. Жива риба също може да бъде изпращана.

I.3. Събиране на допълнителен материал за диагностициране

Когато това е одобрено от диагностичната лаборатория, други тъкани от риба могат също така да бъдат събирани и подготвени за допълнителни изследвания.

I.4. Подготовка на пробите за изследване на клетъчна култура и RT-qPCR

I.4.1. Замразяване в изключителни случаи

При възникване на затруднения от практическо естество, които възпрепятстват обработката на пробите до 48 часа след събирането на рибните тъкани, може да се допусне тези тъканни проби да бъдат замразени в транспортна среда при – 20 °C или при по-ниска температура, а вирусологичното изследване да се направи до 14 дни. Рибните тъкани обаче се замразяват и размразяват само веднъж преди изследването. Водят се и се съхраняват записи, в които се посочват причините за всяко замразяване на тъканни проби от риба.

I.4.2. Хомогенизация на органите

В лабораторията рибните тъкани, които се съдържат в епруветките, са напълно хомогенизирани или чрез торбичка Stomacher, смесител, чукче и хаванче и стерилен пясък, а в последствие поставени в суспензия в първоначалната транспортна среда.

Ако пробата се състои от цяла риба с дължина под 4 cm, тя се нарязва на малки парченца с помощта на стерилни ножици или със скалпел, след като се премахне частта от тялото зад коремния отвор. Ако пробата се състои от цели риби с дължина 4—6 cm, се събират вътрешностите, включително бъбреците. Ако пробата се състои от цели риби с дължина над 6 cm, тъканните проби се събират, както е описано в точка I.I. Тъканните проби се нарязват на малки парченца с помощта на стерилни ножици или скалпел, хомогенизират се, както е описано в първия параграф от настоящата точка, и се поставят в суспензия в транспортна среда.

Крайното съотношение между тъканния материал и транспортната среда се нагласява в лабораторията на стойности 1:10.

I.4.3. Центрофугиране на хомогенат

Хомогенатът се центрофугира в охладена центрофуга на температура между 2 °C и 5 °C при 2 000 до 4 000 × *g* за 15 минути, а супернатантът се събира и може да се третира с антибиотици или за четири часа при 15 °C, или за една нощ при 4 до 8 °C. Ако пробата е изпратена в транспортна среда, третирането на супернатанта с антибиотици не е необходимо.

При възникване на затруднения от практическо естество, като например повреда на инкубатор или проблеми с клетъчните култури, които възпрепятстват инокулирането на клетки в рамките на 48-те часа след събирането на тъканните проби от рибите, супернатантът може да бъде замразен при – 80 °C, а вирусологичното изследване може да бъде направено до 14 дни.

Ако събраният супернатант е съхранен при – 80 °C в рамките на 48-те часа след вземането на пробите, той може да се използва само още един път за вирусологично изследване.

Преди да се инокулират клетките, супернатантът се смесва в равни части заедно с антисеруми против местните серотипове на вируса на инфекциозната панкреатична некроза (ИПН), разтворени по съответния начин, и се инкубира така най-малко един час при 15 °C или максимум 18 часа при 4 °C. Титърът на антисерума е най-малко 1/2 000 при неутрализационен тест на плаки по 50 %.

Третирането на всички инокулуми с антисерум за вируса на ИПН цели предотвратяването на развитието в инокулираните клетъчни култури на цитопатичен ефект, който се дължи на вируса на ИПН. Това третиране позволява да се намали времето за вирусологичните изследвания, както и броят на случаите, при които появата на цитопатичен ефект ще трябва да се разглежда като потенциална индикация за вируса на ВХС или на ИХН.

Когато пробите произхождат от производствени единици, считани за свободни от ИПН, третирането на инокулумите с антисерум за вируса на ИПН не е необходимо.

I.4.4. Подготовка на пробите за програми за надзор, основани на RT-PCR и RT-qPCR

Ако пробите са събрани в транспортна среда, се извършват процедурите, посочени в точки I.4.2 и I.4.3. Супернатантът се събира след центрофугиране и се извлича РНК. Ако веднага след центрофугирането не е предприето допълнително изследване, пробите незабавно се замразяват при – 20 °C или по-малко.

За анализа на тъкани от риби, съхранени в реагенти за стабилизиране на РНК, трябва да бъде извършена допълнителна работа в рамките на следните срокове за проби, съхранявани при различна температура:

проби, съхранявани при 37 °C: един ден;

проби, съхранявани при 25 °C: една седмица;

проби, съхранявани при 4 °C: един месец;

проби, съхранявани при – 20 °C: безсрочно.

Обединени заедно проби в реагент за стабилизиране на РНК се разглеждат като единични проби в реагент за стабилизиране на РНК. За проби, обединени заедно в реагент за стабилизиране на РНК, количеството на пробата не надвишава стойността, препоръчана от производителя за извличане с комплекти за РНК, като например RNeasy Mini kits (Qiagen) или други подобни. Ако се обединяват по-големи проби, в комплектите или методите за извличане това обединяване трябва да бъде отразено.

Пробите, събрани в реагент за стабилизиране на РНК, не се използват за култивирането на клетки.

I.4.5. Обединяване на проби за RT-qPCR

Тъй като протоколите за RT-qPCR са със сходна или по-висока чувствителност от методите за култивиране на клетката, може да е приемливо да се използва супернатант от материал от хомогенизирана рибна тъкан от няколко органа, обединени в едно, от до 10 риби в среда за клетъчна култура за PCR. Поради много по-малкия инокулум, използван за PCR, в сравнение с култивирането на клетката, всички тъкани от риби се хомогенизират внимателно преди събирането на материал за извличане.

Същият принцип се прилага и ако пробите са събрани в реагент за стабилизиране на РНК. В този случай обаче често е трудно да събере представителен материал от до 10 риби в една епруветка, като броят на рибите в обединената проба следователно се намалява на 2 до 5.

I.5. Вирусологично изследване на клетъчна култура

I.5.1. Клетъчни култури и среди

Клетъчна линия -2 (BF-2) от слънчева риба или полова жлеза от дъгова пъстърва клетъчна линия -2 (RTG-2), както и клетки от *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) или от Pimephales promelas се култивират на температура от 20 до 30 °C в подходяща среда, а именно минимална основна среда на Игъл или нейни модификации, към която е добавен 10 % серум от говежди фетус и антибиотици в стандартни концентрации.

Когато клетките се култивират в затворени флакони, средата се буферира с бикарбонат. Средата, използвана за клетъчна култура в отворени съдове може да се буферира с трис(хидроксиметил)аминометан-HCl (Трис-HCl) (23 mM) и натриев бикарбонат (6 mM). pH трябва да бъде 7,6 ± 0,2.

Клетъчните култури, които ще се използват за инокулацията с тъканен материал от риба, са млади риби, обикновено монослоеве от еднодневна клетъчна култура, когато това е възможно; може обаче да бъде допустима и когато е между 4 до 48 часа. Клетките трябва да са във фаза на активен растеж в момента на инокулацията.

I.5.2. Инокулация на клетъчните култури

Третирана с антибиотик суспенсия от орган се инокулира в клетъчни култури в две разреждания, а именно първоначалното разреждане, а след това разредено 1:10, което дава съответно крайни разреждания на тъканния материал съответно 1:100 и 1:1 000, така че да се предотвратят хомологичните интерференции. Поне две клетъчни линии се инокулират, както е посочено в точка I.5.1. Съотношението между размера на инокулума и обема на средата на клетъчната култура е около 1:10.

За всяко разреждане и всяка клетъчна култура се използва минимум около 2 cm^2 клетки, което съответства на едно клетъчно гнездо от плочка за тъканна култура с 24 гнезда. Когато е възможно, се използва гнездо от плочка за тъканна култура.

I.5.3. Инкубация на клетъчните култури

Инокулираните клетъчни култури се инкубират при 15 °C седем до десет дни. Ако цветът на средата на клетъчната култура се промени от червено към жълто, индикация за повишаване на киселинното съдържание в средата, pH трябва да се регулира с помощта на стерилен бикарбонатов разтвор или еквивалентни субстанции, за да се осигури възприемчивостта на клетката към вирусната инфекция.

Най-малко на шест месеца или когато има съмнение за намаляване на клетъчната възприемчивост, се извършва титруване на замразените запаси от вируси на ВХС и ИХН, за да се провери възприемчивостта на клетъчните култури към инфекцията. Ако е възможно, се следва процедурата, посочена в точка III.

I.5.4. Микроскопия

Инокулираните клетъчни култури се проверяват редовно (поне три пъти седмично), за да може да се открие появата на цитопатичен ефект при увеличение от 40 до 150 пъти. Ако отчетливо се наблюдава цитопатичен ефект, незабавно се започват процедурите за идентификация на вируса в съответствие с точка I.6.

I.5.5. Субкултивиране

Ако не се наблюдава цитопатичен ефект след първата инкубация за период от 7 до 10 дни, се прави Субкултивиране от пресни клетъчни култури, като се използва клетъчна площ, подобна на тази на първичната култура.

Аликвотни части от средата (супернатанта), произхождащи от всички култури или клетъчни гнезда, съставляващи първичната култура, се обединяват според клетъчната линия 7до 10 дни след инокулацията. След това обединените проби се инокулират в хомологични клетъчни култури, неразредени и разредени 1:10 (като в крайна сметка се стига до разреждания на супернатанта 1:10 и 1:100), както е описано в точка I.5.2. Десетпроцентови аликвотни части от средата, съставляваща първичната култура, също могат да бъдат директно инокулирани в клетъчно гнездо с пресни клетъчни култури (а именно субкултивиране от гнездо в гнездо). Инокулацията може да се предшества от предварителна инкубация на разрежданията с антисерум за вируса на ИПН със съответното разреждане, както е описано в точка I.4.3.

След това инокулираните култури се инкубират 7 до 10 дни при температура 15 °C, като се инспектират в съответствие с точка I.5.4.

Ако се получи токсичен цитопатичен ефект през първите три дни след инкубацията, на този етап може да бъде реализирано субкултивиране, но тогава клетките се инкубират седем дни и подложени на ново субкултивиране с още седем дни инкубация. Когато се появи токсичен цитопатичен ефект след три дни, клетките се пренасят един път и се инкубират, за да се получи общо 14 дни от първичната инокулация. Не трябва да има признак за токсичност през последните седем дни инкубация.

Ако се получи бактериална зараза въпреки третирането с антибиотици, субкултивирането се предшества от центрофугиране при 2 000 до 4 000 × g за 15 до 30 минути на температура 2 до 5 °C и от филтриране на супернатанта през филтър 0,45 μm или и двете (мембрана с нисък процент свързване с протеините). Освен това при субкултивирането се следват същите процедури, както е описано за токсичния цитопатичен ефект в четвъртия параграф от настоящата точка.

Ако не се наблюдава цитопатичен ефект, изследването може да се обяви за отрицателно.

I.6. Идентификация на вируса

Ако се наблюдават данни за цитопатичен ефект в клетъчна култура, средата (супернатанта) се събира и се изследва с помощта на една или няколко от следните техники: Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), имунофлуоресценция (IF), неутрализация, RT-PCR или RT-qPCR. Ако тестовете не са позволили вирусът да бъде идентифициран окончателно за една седмица, супернатантът се изпраща в националната референтна лаборатория или в референтната лаборатория на ЕС за болести по рибите, посочени в приложение VI към Директива 2006/88/ЕО, за да бъде незабавно идентифициран.

I.6.1. ELISA

Извършва се двоен сандвич ELISA за антитела, за да се идентифицира изолатът на вируса. Микроплаките се покриват с 50 µl/клетъчно гнездо (0,9 pg) с доказано качествени пречистени с белтък-А имуноглобулини (Ig) от заешки антисеруми срещу вируса на ИХН или ВХС, разтворени в карбонатен буферен разтвор (pH 9,6), съдържащ 15 mM натриев азид и инкубирани от 18 часа до *2* седмици при температура 4 °C.

Върху плочка за разреждане всяка проба, съдържаща 1 % Triton X-100, и положителните контролни проби се разреждат с буферен разтвор (а именно фосфатен буферен разтвор (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) в 4-кратно разреждане: неразреден, 1:4, 1:16, 1:64. Плаките за ELISA се измиват в PBS, съдържащ 0,05 % Tween-20 (PBS-T) и 50 µl от всяко разреждане се пренася от плочката за разреждане към измитата и покрита плочка за ELISA.

След това плаките за ELISA се инкубират в продължение на 30 минути на 37 °C. След това плаките се измиват и инкубират в продължение на 30 минути при 37 °C със специфични моноклонални антитела (а именно съответно за идентификация на вируса на ВХС MAb IP5B11, а за вируса на ИХН Hyb 136-3). На плочката за ELISA се прехвърлят 50µl анти-миши заешки антитела, конюгирани с пероксидаза от хрян (HRP), разредени в съотношение 1:1 000 в PBS-T-BSA.

И накрая, след ново миене реакциите се предизвикват, като се добавя 50 µl/клетъчно гнездо от орто-фенилен-диамин. Плаките за ELISA се инкубират в продължение на 20 минути на стайна температура на тъмно, като реакцията се прекратява с добавянето на 100 µl/клетъчно гнездо от 0,5 M H_2SO_4.

Абсорбцията се наблюдава при дължина на вълната 492 и 620 nm в четеца на плаките ELISA. Пробите се определят като положителни или отрицателни след сравняване на резултатите от теста със стойностите на абсорбцията за положителните и отрицателните контролни проби. По принцип пробите с комбинирана абсорбция (A) < 0,5 за неразреден материал се считат за отрицателни, пробите с А стойности между 0,5 и 1,0 се считат са съмнителни, а пробите с А стойности > 1,0 се считат за положителни.

Вместо посочените в настоящата точка варианти на ELISA могат да се използват и други варианти на ELISA с доказана сходна ефективност.

I.6.2. Имунофлуоресценция — IF

Идентификацията на включените в списъка патогени вируса на ВХС и на ИХН се извършва посредством заразяване на клетки в плаки Black с 96 клетъчни гнезда, конвенционални 24-ямкови плаки или покривни стъкла в 24-ямкови плаки. Когато бъдат идентифицирани вирусите на ВХС или ИХН или и двете посредством заразяването клетки върху покривни стъкла, се прилага следният протокол:

а) покривните стъкла се посяват с клетки с гъстота, която предизвиква между 60 % и 90 % формиран монослой след 24-часова култура. За тази цел, когато е възможно, се използват клетките EPC поради силното им прилепване към стъклените повърхности, но могат да бъдат използвани и други клетъчни линии, като BF-2, RTG-2 или FHM. 150 µl клетъчен супернатант в две различни разреждания (1:10 и 1:1 000) се инокулира в дубликат върху еднодневни монослоеве и се инкубира при температура 15 °C в продължение на 24 часа;

б) след това се отстранява средата с клетъчна култура, а заразените клетъчни монослоеве се фиксират с 0,5 ml ледено студен воден разтвор на ацетон (80 % обем:обем). Фиксирането се извършва в лабораторна камина в продължение на 15 минути на стайна температура, след което ацетоновият разтвор се отстранява, и покривните стъкла се изсушават на въздух в продължение на най-малко 30 минути. На този етап плаките или се обработват незабавно, или се съхраняват при температура – 20 °C за по-нататъшна употреба;

в) специфични моноклонални антитела (а именно съответно за идентификация на вируса на ВХС Mab IP5B11, а за вируса на ИХН Hyb 136-3) се разреждат с 0,01 M PBST, pH 7,2 в разреждането, препоръчано от доставчика на MAbs; 50 до 100 µl/клетъчно гнездо се добавя към фиксирания монослой и плаките се инкубират в продължение на час при 37 °C във влажна камера;

г) покривните стъкла се измиват внимателно три пъти с PBS, съдържащ 0,05 % Tween-20 (PBS-T), а буферният разтвор се отстранява изцяло след последното изплакване. След това клетките се инкубират за един час при 37 °C с конюгирани с флуоресцеин изотиоцианат (FITC) или с тетраметилродамин-5-(и- 6-) изотиоцианат (TRITC) антитела срещу миши имуноглобулин, използвани като първично антитяло, разтворени в съответствие с инструкциите на доставчика и отново се изплакват с PBS-T и изсушават. Оцветените култури се поставят върху предметно стъкло, като се използва солен глицеролов разтвор и се изследват под ултравиолетови (УВ) лъчи. Използват се окуляри 10 × или 12 × обективни лещи × 25 или × 40, чиито дигитални отвори са съответно > 0,7 и > 1,3.

По отношение на клетъчните култури, фиксирането и антителата за референтно качество могат да бъдат прилагани други IF техники, които са с доказана сходна ефективност.

I.6.3. Неутрализация

Клетките на събрания супернатант се премахват посредством центрофугиране (2 000 to 4 000 × *g*) или чрез филтриране през мембрана (0,45 μm) с нисък процент на свързване на протеините, след това супернатантът се разрежда 1:100 и 1: 10 000 в среда за клетъчна култура.

Смесват се аликвотни части от минимум два разредени разтвора на супернатанта и се инкубират поотделно за 60 минути при 15 °C с равни части със следните реактиви:

а) серум, съдържащ групови специфични антитела на вируса на ХВС при разреждане 1:50 (обем:обем);

б) серум, съдържащ групови специфични антитела на вируса на ИХН при разреждане 1:50 (обем:обем);

в) обединени антисеруми срещу местните серотипове на вируса на ИПН при разреждане 1:50 (обем:обем);

г) само среда за култура (положителна контролна проба).

От всяка вирусна супернатантна-серумна смес се инокулират най-малко две клетъчни култури с 50 μl всяка, а след това инкубирани при 15 °C. Развитието на цитопатичен ефект се проверява, както е описано в точка I.5.4.

Щамове и изолати на ВХС, които не реагират при неутрализационните тестове, се идентифицират чрез техниките IF или ELISA.

Могат да бъдат използвани и други неутрализационни тестове с доказана сходна ефективност.

I.6.4. RT-PCR/ RT-qPCR

I.6.4.1. Подготовка на вирусна РНК

Работата с РНК се извършва върху лед, като се използват ръкавици.

РНК се извлича с помощта на метода фенол-хлороформ или с помощта на спин колонки за извличане на РНК в съответствие с инструкциите на производителя. Могат да бъдат използвани подробно описаните в точките по-долу налични в търговската мрежа комплекти за извличане на РНК, които ще предоставят висококачествена РНК и са подходящи за използване с RT-PCR протоколи.

РНК се поставя отново в суспензия в дестилирана вода без RNAse (а именно вода, обработена с 0,1 % диетилов пирокарбонат) или в подходящ елюиран буферен разтвор.

I.6.4.2. RT-PCR

Използват се следните праймери за откриване на вируса на ИХН:

Прав праймер 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

Обратен праймер 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

Използват се следните цикли (едностепенна RT-PCR): 1 цикъл: 50 °C в продължение на 30 минути; 1 цикъл: 95 °C в продължение на 2 минути; 30 цикъла: 95 °C в продължение на 30 секунди, 50 °C в продължение на 30 секунди, 72 °C в продължение на 60 секунди; 1 цикъл: 72 °C в продължение на 7 минути и накисване при 4 °C.

Използват се следните праймери за откриване на вируса на ВХС:

VN прав 5′-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3′;

VN обратен 5′-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3′.

Използват се следните цикли (едностепенна RT-PCR): 50 °C в продължение на 30 минути, 95 °C в продължение на 15 минути, 35 цикъла при температура 94 °C в продължение на 30 секунди, 55 °C в продължение на 30 секунди и 68 °C за 60 секунди. Впоследствие реакцията се задържа при 68 °C за 7 минути.

Количеството и специфичността на RT-PCR реакциите се оценяват от гел електрофореза в 1,5 % агарозен гел с етидиев бромид и се наблюдават чрез УВ осветление. За вируса на ИХН се наблюдава А 693 pb PCR ампликон. За вируса на ХВС размерът е 505 bp.

Резултатите от PCR може да се променят в зависимост от условията, при които се получават, а именно за термичните протоколи може да се наложи оптимизиране в зависимост от използвания термоциклер. Освен това може да се появят фалшиви положителни резултати поради неправилно отгряване на праймера или лабораторно замърсяване. Следователно се включват подходящи положителни и отрицателни контроли и секвенирани ампликони, за да бъдат избегнати всякакви съмнения. За праймерите на вируса на ВХС се прилагат специални мерки при използването на клетки BF-2, тъй като праймерите могат да реагират с клетъчни линии ДНК/РНК, произвеждащи фалшиви положителни резултати със сходен размер. При изследване на супернатант от BF-2 клетки се секвенират всички PCR фрагменти.

I.6.4.3. RT-qPCR за вируса на ВХС

За вируса на ВХС амплификацията се извършва, като се използват следните праймери и сонди:

Прав праймер: 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′;

Обратен праймер: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′;

и сонда: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Едностепенна RT-qPCR:

Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Условия на циклите: 50 °C в продължение на 30 минути, 95 °C в продължение на 15 минути, 40 цикъла при температура 94 °C в продължение на 15 секунди, 60 °C в продължение на 40 секунди, 72 °C за 20 секунди. при необходимост да се адаптира. Могат да бъдат използвани и други варианти на RT-PCR или RT-qPCR с доказана сходна ефективност.

I.6.4.4. RT-qPCR за вируса на ИХН

За вируса на ИХН амплификацията се извършва, като се използват следните праймери и сонди:

Прав праймер: 5′- AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′;

Обратен праймер: 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA — 3′;

и сонда: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Двустепенна RT-qPCR:

Тъй като следният анализ зависи от двустепенна амплификация, допълнително трябва да се внимава при боравенето с епруветките от една реакция към друга, за да се предотврати замърсяване.

Условия на циклите (след етапа RT): 50 °C в продължение на 2 минути, 95 °C в продължение на 10 минути, последвани от 40 цикъла при температура 95 °C в продължение на 15 секунди и 60 °C в продължение на 1 минута; при необходимост да се адаптира.

Могат да бъдат използвани и други варианти на RT-PCR или RT-qPCR с доказана сходна ефективност.

II. **Подробни диагностични методи и процедури за потвърждаване или за отхвърляне на съмнението за ХВС и ИХН или и двете при подозирани огнища**

Когато се изисква лабораторно изследване, за да се потвърди или отхвърли присъствието на ИХН или ВХС или и двете в съответствие с член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, като се използват диагностичните методи, определени в част 1, точка II.3 от приложение I, се прилагат следните подробни диагностични методи и процедури:

а) конвенционално изолиране на вируса, последвано от серонеутрализация, имунно-химична или молекулярна идентификация на вируса;

б) откриване на вируса посредством RT-PCR или RT-qPCR;

в) други диагностични техники, като например IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

II.1. Конвенционално изолиране на вируса, последвано от идентификация на вируса

II.1.1. Подбор на пробите

За изследване се подбират минимум 10 риби с типични признаци на ИХН или ВХС.

II.1.2. Подготовка и изпращане на пробите от риби

Подготовката и изпращането за конвенционално изолиране на вируса се извършват съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.2.

II.1.3. Събиране на допълнителен материал за диагностициране

Събирането на допълнителен материал за конвенционално изолиране на вируса се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.3.

II.1.4. Подготовка на пробите за изследване на клетъчна култура

Подготовката на пробите за изследване на клетъчна култура за конвенционално изолиране на вируса се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.4.

II.1.5. Вирусологично изследване на клетъчна култура

Вирусологичното изследване за конвенционално изолиране на вируса се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.5.

II.1.6. Идентификация на вируса

Идентификацията на вируса за конвенционално изолиране на вируса се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.6.

II.2. Откриване на вируса посредством RT-qPCR;

II.2.1. Подбор на пробите

Подборът на пробите за откриване на вируса посредством RT-qPCR се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.1.2.

II.2.2. Подготовка и изпращане на пробите от риби

Подготовката и изпращането за откриване на вируса посредством RT-qPCR се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.2.

II.2.3. Събиране на допълнителен материал за диагностициране

Събирането на допълнителен материал за диагностициране за откриване на вируса посредством RT-qPCR се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.3.

II.2.4. Подготовка на пробите за RT-qPCR

Подготовката и на пробите за откриване на вируса посредством RT-qPCR се извършва съгласно методите и процедурите, предвидени в точка I.6.4.1.

II.2.5. RT-qPCR

Откриването на вируса посредством RT-qPCR следва методите и процедурите, определени в точки I.6.4.1, I.6.4.3 и I.6.4.4.

II.3. Други диагностични техники

Супернатантът, приготвен както е описано в точка I.4.3, може да бъде предаден за ELISA, индиректен имунофлуоресцентен тест (IFAT) или RT-PCR в съответствие съответно с точки I.6.1, I.6.2 или точка I.6.4. Тъканен материал може да бъде подложен на други диагностични техники като IFAT върху замразени елементи или имунохистохимия върху тъканнен материал, фиксиран с формалин. Тези бързи техники се допълват с вирусологично изследване в съответствие или с точка II, буква а), или точка II, буква б) до 48 часа след вземането на пробите:

а) ако е получен отрицателен резултат; или

б) ако е получен положителен резултат от материал, представляващ първия случай на ИХН или ВХС.

III. **Титриране с цел проверка на възприемчивостта на клетъчните култури към заразяването**

Когато се извършва титриране за проверка на възприемчивостта на клетъчните култури към заразяването, както е посочено в точка I.5.3, се следват процедурите, посочени в параграфите от настоящата точка по-долу.

Използват се най-малко два изолата на вируса на ВХС и един изолат на вируса на ИХН. Тези изолати са представителни за основните групи вируси в Европейския съюз, напр. вируса на ВХС, един патогенен изолат от сладководна дъгова пъстърва и един морски патогенен изолат за калкан, а по отношение на вируса на ИХН — патогенен щам от дъгова пъстърва от Европейския съюз. Използват се добре дефинирани изолати от държавите членки. Групи вируси с ниско число на клетъчен пасаж в култури се отглеждат във флакони с клетъчни култури върху клетки BF-2 или RTG-2 за вируса на ВХС, и върху клетки EPC или FHM за вируса на ИХН. Използва се среда за клетъчна култура, към която е добавен минимум 10 % серум. За инокулация се използва ниско MOI (< 1).

При цялостен цитопатичен ефект вирусът се събира чрез центрофугиране на супернатанта от клетъчната култура при 2 000 × g в продължение на 15 минути, стерилизиран чрез филтриране през мембрана 0,45 μm и разпределен в етикетирани криоепруветки. Вирусът се съхранява при – 80 °C.

Седмица след замразяването три епруветки от всеки вирус се размразяват под студена вода и титрират по съответните им клетъчни линии. Всеки вирусен изолат се размразява и титрира минимум на шест месеца или ако има съмнение за снижаване на възприемчивостта на клетъчните линии.

Процедурите за титриране трябва да бъдат подробно описани и всеки път трябва да се прилага една и съща процедура.

Титрирането чрез гранично разреждане включва минимум шест повторения от всяка серия разреждания. Титрите се сравняват с титрите, получени преди това. Ако титърът на един от трите вирусни изолата намалее с фактор от 2 лога или повече спрямо първоначалния титър, клетъчната линия повече не следва да се използва за надзор.

Ако в лабораторията се съхраняват различни клетъчни линии, всяка линия се изследва поотделно.

Регистрите следва да се съхраняват за период от минимум 10 години.

ЧАСТ 2

ПОДРОБНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ПРОЦЕДУРИ ЗА НАДЗОР И ПОТВЪРЖДЕНИЕ НА КХВШ

I. **I. Подробните диагностични методи и процедури за потвърждение на присъствието или за отхвърляне на съмнението за КХВШ**

Когато се изисква лабораторно изследване за потвърждение на присъствието или за отхвърляне на съмнението за КХВШ в съответствие с член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, като се използват диагностичните методи, посочени в част 2, раздел III от приложение I към настоящото решение, се прилагат подробните диагностични методи и процедури, посочени в точки I.1 — I.2 от настоящата част.

I.1. Подготовка на пробите от риби

За диагностични цели рибите (изпращани живи или умъртвени и опаковани поотделно в запечатани асептични съдове) или замразени органи или парчета от органи, поставени за съхранение в 80 %-ов до чист етанол или вирусна транспортна среда (да се обработят в рамките на 48 часа след събирането), могат да бъдат използвани за изследване с конвенционален PCR или методи, основани на qPCR.

За откриване на КХВШ се събират хрилете и бъбрекът; освен това в допълнителна отделна проба могат да се включат далакът, мозъкът и червата. В крайни случаи може да се обедини тъканен материал от максимум пет риби.

Освен това в някои случаи могат да бъдат използвани проби от неумрели екземпляри, като кръв, натривки от хриле, биопсия от хриле, слуз (а именно тъй като при съмнение за присъствие на КХВШ може да се използва много ценна риба).

I.1.1. Извличане на ДНК

ДНК се извлича в съответствие със стандартните процедури.

Могат да бъдат използвани описаните в точка I.2 налични в търговската мрежа комплекти за извличане на ДНК, които ще предоставят висококачествена ДНК и са подходящи за използване с PCR протоколи.

I.2. Откриване и идентификация на агенти посредством методи, основани на полимеразна верижна реакция (PCR)

I.2.1. qPCR за откриване на КХВШ

За откриване с qPCR на КХВШ се използват следните анализи:

Прав праймер (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

Обратен праймер (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

и сонда (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Условия на циклите: един цикъл при 95 °C в продължение на 15 минути, последван от 40 цикъла при 94 °C в продължение на 15 секунди и 60 °C в продължение на 60 секунди. Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Вместо това обаче могат да бъдат използвани и други варианти на qPCR с доказана сходна ефективност.

I.2.2. Конвенционална PCR за откриване КХВШ

Използва се анализът, описан в настоящата точка, насочен към гена тимин киназа (Thymine kinase, TK) на КХВШ. Могат обаче да се използват и други PCR анализи с доказани сходни на описаните чувствителност и характеристики.

Прав праймер (KHV-TKf): 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′;

Обратен праймер (KHV-TKr): 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Условия на циклите: един цикъл при 95 °C в продължение на 5 минути, последван от 35 цикъла при 95 °C в продължение на 30 секунди, при 52 °C в продължение на 30 секунди, 72 °C в продължение на една минута и един цикъл при 72 °C в продължение на 10 минути. Размерът следва да бъде 409 bp.

Резултатите от PCR може да се променят в зависимост от условията, при които се получават, а именно за термичните протоколи може да се наложи оптимизиране в зависимост от използвания термоциклер. Освен това може да се появят фалшиви положителни резултати поради неправилно отгряване на праймера или замърсяване. Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Вместо това обаче могат да бъдат използвани и други варианти на PCR с доказана сходна ефективност.

Първото откриване в даден район се потвърждава посредством секвениране или се препраща в национална референтна лаборатория или в референтната лаборатория на ЕС за болести по рибите, посочени в приложение VI към Директива 2006/88/ЕО, за да бъде незабавно идентифицирано.

II. **Подробни диагностични методи и процедури за надзор на КХБШ**

При вземането на пробите и лабораторното изследване с цел получаване или запазване на статут „свободен от болест“ по отношение на КХБШ, както е посочено в част 2, раздел I от приложение I, като се използват диагностичните методи, посочени в раздели II или III от част 2 от посоченото приложение, се прилагат подробните диагностични методи и процедури, посочени в следните точки II.1 и II.2 от настоящата част.

II.1. Подготовка на пробите от риби

Когато е възможно, проба се взема от риби, които са стояли за продължителен период от време при стойности на температурата на водата, благоприятстващи развитието на вируса, а именно две до три седмици при температура от 15 °C до 26 °C. За да се подобри възможността за откриване на КХВШ, при възможност пробите се събират 24 часа и не по-късно от 72 часа след прилагането на практики на отглеждане, които могат да активират наново вируса в риба, която е носител, като например използване на мрежи или транспорт.

За надзора на КХБШ рибите могат да бъдат изпращани живи или да се умъртвяват и да се пакетират поотделно в запечатани асептични съдове, или пък замразени органи или парчета от органи, поставени за съхранение в алкохол 80 % до 100 % или вирусна транспортна среда (да се обработят в рамките на 48 часа след събирането), могат да бъдат използвани за изследване с основани на PCR методи. За надзора на КХВШ се събира тъкан от хрилете и бъбрека.

За целите на надзора на КХВШ, когато е възможно, обединяването се избягва. Ако е необходимо обединяване, може да бъде обединен тъканен материал от максимум две риби. По-големите проби се хомогенизират с чукче и хаванче или в торбичка Stomacher, а подпробите за извличане на ДНК — преди избистрянето. Друг вариант е подпробите да се събират от всяка тъкан, включена в пробата, и да се поставят в микроепруветки за лизиране.

II.1.1. Извличане на ДНК

ДНК се извлича в съответствие със стандартните процедури. Могат да бъдат използвани описаните в точка II.2 налични в търговската мрежа комплекти за извличане на ДНК, които ще предоставят висококачествена ДНК и са подходящи за използване с PCR протоколи.

Приемливото съотношение на тъканната среда е 1:9 w/v. В изследването се включват 20 до 25 mg тъканен материал.

II.2. Надзор на КХБШ посредством основани на PCR методи

За надзора на КХВШ се използва qPCR. Ако има положителни проби за област, за която преди не е имало потвърдени положителни проби, резултатите от изследванията трябва да се потвърдят:

а) или чрез секвениране на продукт от пробите на полимеразна верижна реакция (PCR) или спрегната полимеразна верижна реакция,

Получената прояснена консенсусна секвенция съвпада (с най-малко 98 %) с тези референтни секвенции;

б) или пробите се изпращат до националната референтна лаборатория за потвърждение.

II.2.1. qPCR за откриване на КХВШ

Използва се qPCR, описана, както следва:

Прав праймер (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

Обратен праймер (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

и сонда (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Условия на циклите: един цикъл при 95 °C в продължение на 15 минути, последван от 50 цикъла при 94 °C в продължение на 15 секунди и 60 °C в продължение на 60 секунди.

Резултатите от qPCR може да се променят в зависимост от условията, при които се получават, а именно за термичните протоколи може да се наложи оптимизиране в зависимост от използвания термоциклер. Освен това може да се появят фалшиви положителни резултати поради неправилно отгряване на праймера или лабораторно замърсяване. Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Вместо това обаче могат да бъдат използвани и други варианти на qPCR с доказана сходна ефективност.

II.2.2. Конвенционална PCR за потвърждение на откриване на КХВШ

За потвърждение на присъствието на заразяване с КХВШ се използва генеричната спрегната полимеразна верижна реакция, описана в следната таблица 2.1, последвана от секвениране на амплифицирания продукт.

Таблица 2.1

Праймери и условия за анализа на спрегната полимеразна верижна реакция, насочени към всички херпес вируси по шарана (CyHV-1, CyHV-2 и CyHV-3)

Наименование на праймера	Последователност	Условия на циклите	Размер на продукта
CyHVpol-прав	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	Първи кръг на полимеразна верижна реакция (PCR) *1 цикъл:* 95 °C в продължение на 2 минути. *40 цикъла:* 95 °C в продължение на 30 секунди 55 °C в продължение на 30 секунди 72 °C в продължение на 45 секунди *1 цикъл:* 72 °C в продължение на 10 минути	362 bp
CyHVpol-обратен	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Наименование на праймера	Последователност	Условия на циклите	Размер на продукта
CyHVpol-вътрешен прав	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	Втори кръг на полимеразна верижна реакция (PCR) *1 цикъл:* 95 °C в продължение на 2 минути *40 цикъла:* 95 °C в продължение на 30 секунди 55 °C в продължение на 30 секунди 72 °C в продължение на 45 секунди *1 цикъл:* 72 °C в продължение на 10 минути	339 bp
CyHVpol-вътрешен обратен	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

Резултатите от PCR може да се променят в зависимост от условията, при които се получават, а именно за термичните протоколи може да се наложи оптимизиране в зависимост от използвания термоциклер. Освен това може да се появят фалшиви положителни резултати поради неправилно отгряване на праймера или лабораторно замърсяване. Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Вместо това могат да бъдат използвани и варианти на PCR с доказана сходна ефективност.

Секвенирането може да се извършва в лабораторията или във външни специализирани дружества за секвениране. Резултатите от секвенирането се анализират, като секвенциите се подравняват с известните референтни последователности на КХВШ (номера за присъединяване на GenBank AP008984, DQ657948 и DQ177346). Получената прояснена консенсусна секвенция трябва да съвпада с най-малко 98 % с тези референтни секвенции.

ЧАСТ 3

ПОДРОБНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ПРОЦЕДУРИ ЗА НАДЗОР И ПОТВЪРЖДЕНИЕ НА ИНФЕКЦИОЗНАТА АНЕМИЯ ПО СЬОМГАТА (ИАС)

I. **I. Процедури за вземане за надзор и борба с ИАС**

При вземането на проби и лабораторно изследване за целите на програмите за надзор или ликвидиране, посочени в част 3 от приложение I, или за потвърждение или отхвърляне на присъствието на ИАС в съответствие с член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, се прилагат подробните методи и процедури, посочени в точки I.1, I.2 и I.3 от настоящия раздел.

I.1. Подготовка на пробите от риби

За целите на лабораторните изследвания за присъствие на ИАС по възможност пробите от риби не се групират. За целите на надзора на ИАС обаче се приема обединяването на 2 до 5 риби.

Проби за обратна транскриптазна полимеразна верижна реакция в реално време (RT-PCR) се вземат от всички риби за проби. Взема се парче от средната част на бъбрека на рибите с помощта на стерилен инструмент и се поставя в микроепруветка, която съдържа един ml разтвор с доказана ефикасност за съхранение на РНК. Тъканта от максимум пет риби може да се събере в епруветка с разтвор за съхранение и това да представлява обща проба. Теглото на тъканта в една проба е 0,5 g. Когато рибите са много малки, за да се получи проба с желаното тегло, могат да се вземат парченца от бъбрека, сърцето, далака, черния дроб или пилорите на сляпото черво, в този порядък, за да се получат 0,5 g.

Тъканта за хистологично изследване се взема само от прясно умъртвени риби с нормална структура, които показват клинични признаци или след настъпване на смъртта има находки, съвместими с присъствието на болестта. Вземат се проби от всички външни или вътрешни лезии, а при всички случаи пробите от средната част на бъбрека, сърцето, черния дроб, панкреаса, корема и далака се вземат от всяка риба с помощта на скалпел и се поставят в 8 % до 10 % (обем:обем) солен буферен разтвор с формол. Съотношението между фиксатива и тъканта е най-малко 20:1, за да се гарантира задоволително съхранение на тъканите. За имунохистохимията се вземат проби от средната част на бъбрека и сърцето.

От всички риби, от които са взети проби, се взема тъкан за вирусологично изследване на клетъчна култура. Парченца от черния дроб, предната и средната част на бъбрека, сърцето и далака се вземат от рибите с помощта на стерилен инструмент и се поставят в пластмасови епруветки, които съдържат 9 ml транспортен разтвор. Тъкани, взети максимум от пет риби, могат да се поберат в една епруветка, която съдържа транспортен разтвор: те представляват обща проба. Теглото на тъканта в една проба е 1,0 ± 0,5 g.

I.2. Изпращане на пробите от риби

Цяла риба може да бъде транспортирана до лабораторията, ако могат да бъдат осигурени температурните условия по време на транспортирането, както е описано в параграф 3 от настоящата точка. Цялата риба се обвива в абсорбираща хартия и се изпраща в пластмасова торбичка, охладена, както е посочено в настоящия параграф.

Може да се изпраща и жива риба, но единствено под надзора на националната референтна лаборатория за болести по рибите и като се вземат под внимание допълнителните въпроси за дезинфекцията и биологичната сигурност, когато се транспортират живи риби.

Кръвните проби и епруветките, които съдържат рибните тъкани, предназначени за вирусологичното изследване или за анализ RT-PCT, се поставят в изолирани съдове, като например кутии от полистирол с дебели стени, с достатъчно количество лед или охлаждащи блокове, за да се гарантира изстудяването на пробите по време на транспортирането им до лабораторията. Пълното замразяване се избягва и при получаването на пратката съдът за транспортиране все още съдържа лед, а един или няколко от тези охлаждащи блокове все още трябва да са частично или изцяло замразени при приемането. При изключителни обстоятелства пробите, предназначени за анализ RT-PCR, или тези, предназначени за вирусологичното изследване, могат да бъдат дълбоко замразени и транспортирани до лабораторията при – 20 °C или още по-ниска температура.

За RT-PCR анализа на тъкани, по-късно съхранени в рибонуклеинова киселина (РНК), извличането на РНК се извършва в следните срокове в зависимост от температурата, при която се съхраняват пробите:

проби, съхранявани при 37 °C: един ден;

проби, съхранявани при 25 °C: една седмица;

проби, съхранявани при 4 °C: един месец;

проби, съхранявани при – 20 °C: безсрочно.

Ако рибните тъкани се транспортират във фиксатив за хистологично изследване, те се изпращат в непропускливи епруветки, поставени в съдове, които издържат на удар. Замразяване на пробите обаче трябва да се избягва.

Вирусологичното изследване на клетъчна култура започва възможно най-бързо и най-късно 48 часа след събирането на пробите. При изключителни случаи вирусологичното изследване може да започне най-късно 72 часа след събирането на материала за изследване, при условие че той е защитен в транспортна среда и че са били спазени изискванията за температурата по време на транспортирането.

I.3. Събиране на допълнителен материал за диагностициране

При одобрение на лабораторията по диагностика тъкани от риби, различни от посочения в точка I.1, могат да бъдат събрани и подготвени за допълнително изследване.

II. **Подробни диагностични методи и процедури за надзор и за потвърждение на присъствието или за отхвърляне на съмнението за ИАС**

Когато се извършва лабораторно изследване за получаване или запазване на даден здравен статус по отношение на ИАС, както е посочено в част 3, раздел I от приложение I, или за потвърждение на присъствието или за отхвърляне на съмнението за ИАС в съответствие с член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, като се използват диагностичните методи, посочени в част 3, раздел II от приложение I, се прилагат подробните методи и процедури, посочени в следните точки II.1 — II. 5.

II.1. Изследване на пробите с помощта на RT-PCR

Диагностичният метод, който се използва за проверка за вируса на ИАС, е RT-qPCR. Тъй като резултатите от RT-qPCR могат да се променят в зависимост от условията, при които се получават, за да се избегнат съмнения се включват съответните положителни и отрицателни контроли и ампликони.

II.1.1. Извличане на РНК

Работата с РНК се извършва върху лед, като се използват ръкавици.

Цялата РНК се извлича с помощта на метода фенол-хлороформ или с помощта на спин колонки за извличане на РНК в съответствие с инструкциите на производителя.

Пречистената РНК се поставя отново в суспензия в дестилирана вода без RNase (а именно вода, обработена с 0,1 % диетил пирокарбонат).

Концентрацията и чистотата на извлечената РНК се оценява, като се измерва оптичната плътност при 260 nm и при 280 nm. Друга възможност може да бъде включването на вътрешните контроли, насочени срещу вирусния геном, както е посочено в точка II.1.3.

II.1.2. RT-PCR за откриване на вируса на ИАС

Няколко RT-PCR метода могат да бъдат използвани за амплификация на генома на вируса на ИАС. Може да се извърши двустепенен RT-PCR, при който етапите с реакциите на RT и PCR се извършват в две отделни епруветки. Може обаче да се извърши също така едностепенна реакция, при която двете реакции се извършват в една епруветка. Едностепенният метод се използва, когато е възможно, като анализът с една епруветка свежда до минимум риска от кръстосано замърсяване, тъй като не е необходимо да се прехвърля съдържание и чувствителността по този метод се счита за равна с тази по двустепенния метод.

Използват се праймерите и анализът, описани в тази точка, а именно двойката праймери ILA1 или ILA2, насочени към сегмент 8 и за които е установено, че са подходящи за откриването на вируса на ИАС при огнища и при риби носители на вируса. Обратният праймер ILA 2 не съответства на изолати от Северна Америка и в тези случаи се използва друга двойка праймери.

Прав праймер (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′;

Обратен праймер (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3.′

Условия на циклите: един цикъл при 50 °C в продължение на 30 минути, 1 цикъл при 94 °C в продължение на 15 минути, 40 цикъла при 94 °C в продължение на 30 секунди, 55 °C в продължение на 30 секунди, 72 °C в продължение на 60 секунди; един цикъл при 72 °C в продължение на 5 минути. Размер на продукта 155 bp.

Резултатите от PCR може да се променят в зависимост от условията, при които се получават, а именно за термичните протоколи може да се наложи оптимизиране в зависимост от използвания термоциклер. Освен това може да се появят фалшиви положителни резултати поради неправилно отгряване на праймера или лабораторно замърсяване. Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Вместо това обаче могат да бъдат използвани и други варианти на RT-PCR с доказана сходна ефективност.

II.1.3. RT-qPCR за откриване на вируса на ИАС

Използването на RT-qPCR може да увеличи специфичността, а вероятно и чувствителността. Методът може да се осъществи по-бързо, тъй като не се изисква етап с гел електрофореза и се намалява рискът от кръстосано замърсяване, тъй като е възможно да се направи оценка на количеството вирусни геномни РНК в епруветката с пробата. Недостатък на анализа с RT-qPCR е, че често не е възможно да се секвенират амплифицираните продукти. Ако обаче има съмнение относно спецификата на амплифицирания продукт, трябва да се проведе друг специфичен анализ на вируса на ИАС, за да се провери резултатът.

Използва се анализът, описан в настоящата точка, който е анализ, който е насочен към сегмент 8. Този анализ обхваща изолати от Европейския съюз, Европейската асоциация за свободна търговия и Северна Америка. Където е възможно, се използва едностепенният метод на етап, тъй като анализът с една епруветка свежда до минимум риска от кръстосано замърсяване.

Прав праймер: 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;

Обратен праймер: 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;

и сонда: 5′-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC — *MGBNFQ*-3′.

Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Условия на циклите: един цикъл при 50 °C в продължение на 30 минути, един цикъл при 95 °C в продължение на 15 минути, 40 цикъла при 94 °C в продължение на 15 секунди, 60 °C в продължение на 60 секунди; при необходимост се адаптира. Могат да бъдат използвани и други варианти на RT-PCR или RT-qPCR с доказана сходна ефективност.

II.1.4. Секвениране на амплифицирани PCR продукти

Прав праймер (ILAs6-3F): 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;

Обратен праймер (ILAs6-2R): 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.

Отрицателни контроли на образеца и положителни контроли се включват за всеки цикъл с плаките. Условия на циклите (едностепенен RT-PCR): един цикъл при 50 °C в продължение на 30 минути, един цикъл при 94 °C в продължение на 15 минути, 40 цикъла при 94 °C в продължение на 30 секунди, 55 °C в продължение на 30 секунди, 72 °C в продължение на 60 секунди, един цикъл при 72 °C в продължение на 5 минути; при необходимост се адаптира. Могат да бъдат използвани и други варианти на RT-PCR или RT-qPCR с доказана сходна ефективност.

В противен случай може да се използва следният метод за секвениране на HPR в сегмент 6:

Прав праймер: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′;

Обратен праймер: 5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′;.

Размер на продукта: 304 nt, ако HPR0.

Могат също така да бъдат използвани анализи RT-PCR със сходна чувствителност и особености като на анализите, описани в настоящата точка.

Чистотата на амплифицирания RT-PCR продукт се проверява чрез гел електрофореза преди секвениране. Ако се появи само един чист фрагмент, той се пречиства директно от реакцията PCR. Ако са налице множество амплифицирани фрагменти, фрагментът, който представлява интерес, се пречиства чрез гел електрофореза. Пречистването на PCR фрагментите от разтвори или агарозни гелове се прави, като се използват спин колонки за извличане с PCR фрагменти в съответствие с инструкциите на производителя.

Секвенирането се извършва, като се използват праймери за амплификация във външни специализирани дружества за секвениране. Резултатите се анализират посредством инструмента за търсене BLAST, като секвенциите се съпоставят с други известни секвенции в нуклеотидна база данни на Националния център за биотехническа информация (NCBI) на САЩ.

Секвенирането трябва да премахне всички съмнения относно спецификата на амплифицирания RT-PCR продукт.

II.2. Изолиране на вируса на ИАС в клетъчните култури

II.2.1. Подготовка на пробите

Тъканите могат да бъдат съхранявани при – 80 °C. Тъканите се замразяват и размразяват само веднъж преди тяхното изследване. За целите на надзора и контрола изследването се извършва възможно най-бързо.

Всяка проба (смес от тъкани в транспортен разтвор) се хомогенизира напълно с помощта на одобрен хомогенизатор и се центрофугира при 2 000 до 4 000 × g в продължение на 15 минути при температура от 0 до 6 °C, а супернатантът се филтрира (0,45 μm) и се инкубира с обем, равен на избрана смес, разредена с антисеруми срещу местни серотипове на вируса на ИПН. Титърът на антисерума трябва да бъде най-малко 1:2 000 в 50 % неутрализационен тест за утайка. Сместа се инкубира в продължение на един час при 15 °C. Това представлява инокулума.

Третирането на всички инокулуми с антисерум за инфекциозната панкреатична некроза (вирус, който в някои части в Европа присъства в 50 % от пробите от риби) цели да се възпрепятства появата в инокулирани клетъчни култури на цитопатичен ефект (ECP) вследствие вируса на инфекциозна панкреатична некроза (ИПН). Такова третиране може да се извърши, за да се намали времето за вирусологичните изследвания, както и броят на случаите, при които появата на цитопатичен ефект ще трябва да се разглежда като потенциална индикация за вируса на ИАС. Когато пробите произхождат от производствени единици, считани за свободни от ИПН, третирането на инокулумите с антисерум за вируса на ИПН не е необходимо.

II.2.2. Инокулация на клетъчните култури

Клетки от бъбрек на атлантическа сьомга се използват за първоначалното изолиране на вируса на ИАС. Могат да се използват други клетъчни линии с доказана ефикасност и чувствителност за изолиране на вируса на ИАС, като се има предвид изменчивостта на щама и способността на различните щамове да се възпроизвеждат в различни клетъчни линии. Клетките от бъбрек на атлантическа сьомга изглежда подкрепят изолирането и растежа на известните до този момент изолати на вируса, стига да се използва ниско ниво на пасаж. В клетките от бъбрек на атлантическа сьомга може да се наблюдава по-изразен цитопатичен ефект, отколкото в други възприемчиви клетъчни линии като SHK-1 (предна част на бъбрек — 1).

Клетки от бъбрек на атлантическа сьомга (пасаж 65 или по-малко) се култивират в среда L-15, която съдържа 10 % серум от говежди фетус, 2 % (обем/обем) 200 mM на L-глутамин и 0,08 % (обем/обем) 50 mM 2-меркаптоетанол с 50 mM върху плаки с множество клетъчни гнезда. Инокулира се суспензия от органи, обработени с антисерум, в млади клетъчни култури във фаза на активен растеж, за да се получи крайно разреждане на тъкания материал в среда от култура със съотношение 1:1 000. За всеки орган се прибавя суспензия 40 µL инокулум към клетъчно гнездо, което съдържа 2 ml среда от култура. За да се намали рискът от кръстосано замърсяване, се използват отделни плаки с 12 или 24 клетъчни гнезда за пробите с произход от различни рибовъдни стопанства.

Една неинокулирана плака се оставя неинокулирана, за да служи за отрицателен контрол. Отделна плака се инокулира с референтен изолат от вируса на ИАС, за да служи за положителен контрол, както следва. Сто µl от основния препарат от вируса на ИАС (минимален титър 10^7 заразена доза тъканна култура на 50 % крайна точка (TCID50 ml^{-1})) се инокулира в първото клетъчно гнездо и се смесва. Количество от този материал се пренася от първото клетъчно гнездо във второто, за да се получи разреждане 1:10, и се смесва. Това се повтаря по цялата плака, за да се получат шест разреждания 1:10. Основният препарат от вируса на ИАС може да бъде съхраняван при температура – 80 °C за най-малко две години, но веднъж размразен, трябва да се използва в рамките на три дни. Внимава се да се възпрепятства кръстосаното замърсяване на пластинките за теста с положителния контролен материал. За да се избегне тази опасност, пластинките за положителен контрол се установяват и обработват отделно от пластинките за теста. Изпитването на всеки шест месеца на чувствителността на клетките от бъбрек на атлантическа сьомга към изолати на вируса на ИАС може да замени употребата на включването на положителен контрол на всяка инокулация.

Пробите се инкубират при температура 15 ± 2 °C за максимум петнадесет дни. Клетъчните култури се изследват два пъти под микроскоп за цитопатичен ефект между 5 и 7 дни и между 12 и 14 дни след инокулацията. Ако някоя обединена проба от клетки показва цитопатичен ефект, незабавно се пристъпва към процедури за идентификация на вируса в съответствие с точка II.2.4. Ако не се наблюдава цитопатичен ефект до четиринадесетия ден, се прави индиректен имунофлуоресцентен тест (IFAT), хемадсорпция или RT-PCR.

II.2.3. Субкултивиране

Субкултивиране се извършва между тринадесетия и петнадесетия ден. Супернатант от културата се прибавя към клетъчните гнезда, които съдържат клетки в активна фаза на нарастване в съответното разреждане (1/10) върху пластинките с множество клетъчни гнезда, след това се оставят да инкубират при температура 14 ± 2 °C за максимум 18 дни. Клетъчните култури се изследват два пъти с микроскоп, за да се открие цитопатичен ефект между петия и седмия ден и между 14-ия и 18-ия ден след инокулацията. Ако някоя обединена проба от клетки показва цитопатичен ефект, незабавно се пристъпва към процедури за идентификация на вируса в съответствие с точка II.2.4. Ако не се наблюдава цитопатичен ефект между 14-ия и 18-ия ден, се прави хемадсорбционен тест или RT-PCR.

Ако се наблюдава цитотоксикация през първите седем дни след инкубацията, се извършва субкултивиране на този етап и клетките се инкубират за 14 до 18 дни, след което се прави ново субкултивиране за още един период инкубация за 14 до 18 дни. Ако се наблюдава цитотоксикация след седем дни, се пристъпва към субкултивиране и клетките се оставят да инкубират, така че да се достигне период от общо 28 до 36 дена инкубация от деня на първичната инокулация.

В случай на бактериално заразяване в първичната култура тестът се възобновява, като се използват хомогенатът от тъкани, съхранен при температура – 80 °C. Преди инокулацията хомогенатът от тъкани се центрофугира при 4 000 × *g* в продължение на 15 до 30 минути при температура 0 до 6 °C, супернатантът се филтрира при 0,22 µm. Ако възникне бактериално заразяване по време на етапа на субкултивирането, супернатантът се филтрира при 0,22 µm, инокулиран върху млади клетки и инкубиран за още 14 до 18 дни.

II.2.4. Тестове за идентификация на вируса

Ако в независимо кой стадий се наблюдава доказателство за цитопатичен ефект или хемадсорбционният тест е положителен, се извършва идентификация на вируса. Методите, които могат да бъдат избрани за идентификация на вируса на ИАС, са RT-PCR в съответствие с точка II.1 и имунофлуоресценция (IF) в съответствие с точка II.2.6. Ако се счита, че е възможно присъствието на други вируси, се провеждат допълнителни тестове за идентификация на вируса. Ако тези тестове не са довели до окончателно идентифициране на вируса в срок от една седмица, супернатантът се изпраща за незабавна идентификация до:

а) референтната лаборатория за ИАС към Световната организация за здравеопазване на животните (OIE) или

б) национална референтна лаборатория или референтната лаборатория на ЕС за болести по рибите, посочени в приложение VI към Директива 2006/88/ЕО.

II.2.5. Хемадсорбция

Тъй като размножаването на вируса на ИАС в клетъчни култури не винаги води до цитопатичен ефект, всяко клетъчно гнездо се подлага на RT-PCR тест или хемадсорбционен тест в съответствие с настоящата точка, или IF тест в съответствие с точка II. 2.6.

Проба от средата на клетъчната култура се отнема от всяко клетъчно гнездо, включително от онези за положителна и отрицателна контрола, и се поставя в стерилни етикетирани епруветки. Към всяко клетъчно гнездо се прибавят 500 µL от суспензия 0,2 % (обем/обем) от измити червени кръвни тела от заек или кон или от суспензия с 0,05 % (обем/обем) с измити червени кръвни тела от дъгова пъстърва или атлантическа сьомга и се оставят да инкубират на стайна температура в продължение на 45 минути. Червените кръвни тела се премахват и всяко клетъчно гнездо се промива два пъти със среда L-15. Всяко клетъчно гнездо се изследва с микроскоп.

Наличието на сраствания от червени кръвни тела прикрепени към повърхността на клетките от бъбрек на атлантическа сьомга е признак за вероятно заразяване с ортомиксовирус. Ако хемадсорбционният тест от е положителен, незабавно се пристъпва към тест за идентификация на вируса в съответствие с точка II.2.4.

II.2.6. Имунофлуоресценция (IF)

Клетки от бъбрек на атлантическа сьомга (пасаж 65 или по-нисък) се култивират в среда L-15, която съдържа 10 % серум от говежди фетус, 2 % (обем/обем) 200 mM L-глутамин и 0,08 % (обем/обем) 50 mM 2-меркаптоетанол в пластинки с множество клетъчни гнезда и използвани при формиран монослой над 50 %. Могат също така да се използват други клетъчни линии или среда на култура с доказана ефективност. 225 µl от на супернатанта с евентуално заразената от вируса култура се добавя във всяко от двете клетъчни гнезда, смесват се и 225 µl се прехвърлят в други две клетъчни гнезда, а именно с разреждане 1:5. Две други клетъчни гнезда се оставят неинокулирани, за да служат като контролни. Пробите от различните рибни стопанства се обработват върху отделни пластинки, както и контролните проби за вируса. Контрол за вируса се установява, като се използва референтен изолат с вируса на ИАС.

Плаките се инкубират при температура 14 ± 2 °C и се изследват под микроскоп за максимум седем дни. Ако се наблюдава ранен цитопатичен ефект или не се наблюдава цитопатичен ефект в рамките на седем дни, следващият етап е фиксацията. За тази цел клетъчните гнезда се промиват с буферен разтвор с фосфат (PBS) и се фиксират чрез инкубация с 80 % ацетон в продължение на 20 минути при стайна температура. Плаките се оставят да изсушат на въздух и се оцветят незабавно или се съхраняват при температура от 0 до 6 °C за не повече от 24 часа преди оцветяването.

Дублираните клетъчните гнезда се оцветяват със смес от моноклонални антитела (MAb) 3H6F8 и 1OC9F5 срещу вируса на ИАС или с друго MAb с доказана ефективност и специфичност, разреждат се в PBS и се инкубират при температура 37 ± 4 °C в продължение на 30 минути. MAb се отстранява и пластинките се промиват три пъти с разтвор 0,05 % в 20 Tween в PBS. Конюгат на флуоресцеин изотиоцианат (FITC) от антитела срещу миши имуноглобулин, разреден в PBS, се добавя във всяко клетъчно гнездо и се инкубира при температура 37 ± 4 °C в продължение на 30 минути. Разтворите от различни партиди MAb и конюгат с FITC се оптимизират във всяка лаборатория. Антитялото се отстранява и плаките се промиват три пъти с 0,05 % разтвор Tween 20 в PBS.

Клетъчните гнезда се изследват незабавно под инвертен микроскоп, оборудван за флуоресценция с адаптиран филтър, който да възбужда FITC. Даден тест се счита за положителен, ако се наблюдават флуоресцентни клетки. За да е валиден тестът, положителните контролни плаки трябва да дадат положителен резултат, а отрицателните контролни плаки — отрицателен.

II.3. Изследване на други тъкани

Техниката, посочена в точка II.2.6, може да се прилага за други тъкани от риби, като например черен дроб, далак и сърце, при условие че достатъчно количество от ендотелиалните клетки, левкоцитите или лимфоцитите могат да бъдат депозирани върху плаката. Процедурата по маркиране е еднаква за всички тъкани, въпреки че за някои тъкани е за предпочитане да се премахне оцветяването с пропидиев йодид и да се разчита на осветяването във фаза, за да се идентифицират типовете клетки, които присъстват в пробата.

II.4. Хистология

Участъците, поставени в парафин, се изрязват на 5 µm и се оцветяват с хематоксилин и еозин.

Хистологичните промени в клинично заболяла атлантическа сьомга са различни, но могат да включват следното:

а) голям брой еритроцити в централния венозен синус и ламелните капиляри на хрилете, където също могат да се образуват еритроцитни тромби;

б) мултифокални до конфлуентни петехии или некроза на хепатоцитите, или и двете на известно разстояние от по-големи съдове в черния дроб; мултифокална акумулация на еритроцити в разширените чернодробни синусоиди;

в) акумулация на еритроцити в кръвоносните съдове на чревната ламина проприя и в крайна сметка кръвоизлив в ламина проприя;

г) стромата на далака се разширява от акумулация на еритроцити;

д) леки мултифокални до екстензивни дифузни интерстициална кръвоизливи с тубуларна некроза в областите с кръвоизливи, акумулация на еритроцити в гломерулите на бъбрека;

е) еритрофагоцитоза в далака и вторични кръвоизливи в черния дроб и бъбрека.

II.5. Имунохистохимия (IHC)

Върху участъци с парафин от тъканта, фиксирана с формалин, се използват поликлонални антитела с нуклеопротеини срещу вируса на ИАС. Органи, които трябва да се изследват, са средната част на бъбрека и сърцето (преходна зона, включително всички три камери и клапи). Случаите на съмнение поради патологични признаци се проверяват с положителна имунохистохимия (IHC). Хистологичните участъци се подготвят в съответствие със стандартните методи.

(1) Подготовка на тъканните участъци

Тъканите се фиксират в неутрален буферен разтвор с фосфат с 10 % формалин за най-малко един ден, дехидратират се в степенувана серия етанол, почистват се в ксилен и се поставят в парафин в съответствие със стандартните протоколи. Участъци с дебелина приблизително 5 μm (за проби с IHC върху предметни стъкла, покрити с поли-L-лизин) се загряват до температура от 56 °C до 58 °C (максимум 60 °C) в продължение на 20 минути, депарафинирани в ксилен, рехидратирани чрез степенувана серия етанол и оцветени с хематоксилин и еозин за патоморфология и IHC в съответствие с точка 2).

(2) Процедура по оцветяване при IHC

Всички инкубации се извършват при стайна температура върху люлееща се платформа, освен ако в настоящото решение не е предвидено друго:

а) извличане на антигена се прави чрез кипене на участъците в 0,1 M цитратен буферен разтвор pH 6,0 в продължение на 2 × 6 минути, последвано от блокиране с 5 % обезмаслено сухо мляко и 2 % кози серум в 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) в продължение на 20 минути;

б) участъците се инкубират за една нощ с първични антитела (моноспецифични заешки антитела с нуклеопротеини срещу вируса на ИАС), разтворени в TBS с 1 % обезмаслено сухо мляко, последвано от три промивания в разтвор TBS с 0,1 % разтвор Tween 20;

в) за откриване на свързани антитела участъците се инкубират с конюгирани с алкална фосфатаза антитела срещу IgG на заек в продължение на 60 минути. След последното измиване се добавя Фаст Ред (1 mg ml^{-1}) и Нафтол AS-MX фосфат (0,2 mg ml^{-1}) с 1 mM Левамисол в 0,1 M TBS (pH 8,2), за да се развиват в продължение на 20 минути. След това участъците се измиват с чешмяна вода преди контрастно оцветяване с Харис хематоксилин и поставят във водна среда. Тъканни участъци, които са с положителен резултат за вируса на ИАС и с отрицателен резултат за вируса на ИАС, се включват като контроли проби във всеки препарат.

(3) Тълкуване на резултата от IHC

Тълкуването на резултата от изследването на IHC се извършва, както е посочено в букви а) и б):

а) контролните участъци се считат за положителни, когато се забележи, че контролните участъци имат ясно отчетливо цитоплазмено и интранюклеарно червено (червеникаво) оцветяване на ендотелиалните клетки в кръвоносните съдове на ендокарда. Участък от тестовата проба се счита за положителен само ако се констатира такова ясно, интранюклеарно червено оцветяване на ендотелиалните клетки;

б) контролните участъци се считат за отрицателни, ако не са придобили значителна цветна реакция.

Тъй като интранюклеарната локализация е характерна за нуклеопротеина на ортомиксовируса по време на етапа на размножаване на вируса, но често доминантно е паралелното цитоплазмично оцветяване, цитоплазмени и други видове оцветяване без интрануклеарна локализация се считат за нехарактерни или неокончателни.

Най-силните положителни реакции на оцветяване обикновено се получават в ендотелиалните клетки на сърцето и бъбреците. Реакциите на ендотелиално оцветяване в големи хеморагични лезии може да са слаби или да липсват, вероятно поради лизис на заразени ендотелиални клетки.

ЧАСТ 4

ПОДРОБНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ПРОЦЕДУРИ ЗА НАДЗОР И ПОТВЪРЖДЕНИЕ НА ЗАРАЗЯВАНЕ С *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Подробни методи и процедури за диагноза за заразяване с *Marteilia refringens***

Когато се извършват вземане на проби и лабораторно изследване за получаване или запазване на здравен статус по отношение на заразяване с *Marteilia refringens*, както е посочено в част 4, раздел I от приложение I, или за потвърждение или за отхвърляне на присъствието на тази включена в списък болест в съответствие с член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, като се използват диагностичните методи, посочени в част 4, раздел II от приложение I, се прилагат подробно описаните диагностични методи и процедури, посочени в точки I.1, I.2 и I.3 от настоящата част.

I.1. Процедура за вземане на проби

С приоритет се вземат проби от отворени или наскоро умрели мекотели, за да се увеличат шансовете за откриване на заразени животни.

След като бъдат взети пробите, стридите или мидите се държат при температура 4 °C или върху хладилен лед за не повече от 24 часа, ако в пробите са включени отворени мекотели, а ако такива не са включени — не повече от 72 часа, в найлонова торбичка, с етикет с информация, свързана с естеството и произхода на стридите или мидите. Отворените или наскоро умрели мекотели се държат отделно от други мекотели.

Участъци от тъкани с дебелина от 3 до 5 mm, включително хриле и тъкан от сърцето, се използват за диагностика на *Marteilia refringens* посредством хистология. За някои от изследванията се използва част от храносмилателната жлеза, включително проби с отпечатък и полимеразна верижна реакция (PCR).

I.2. Микроскопски техники

I.2.1. Цитология (отпечатъчна цитология)

След изсушаване на храносмилателната жлеза върху попивателна хартия, върху стъклено предметно стъкло се правят няколко проби с отпечатък. Предметните стъкла се оставят да се изсушат на въздух, фиксират се в метанол или в чист етанол и се оцветяват, като се използва достъпен в търговската мрежа комплект за оцветяване на кръвта, като Diff-Quik®/Hemacolor®, съобразно инструкциите на производителя. След промиване с течаща вода и изсушаване предметните стъкла се покриват с капак, като се използва подходяща синтетична смола. Предметните стъкла първо се разглеждат при увеличение × 200, а след това при маслено потопяване с увеличение × 1 000.

За положителен резултат се счита, когато се наблюдават клетки с размер между 30 и 40 μm. Цитоплазмата се оцветява базофилно, а ядрото се оцветява еозинофилно. Наблюдава се блед ореол около големите, силно оцветени (рефрингентни) гранули, а в по-големите клетки се наблюдават клетки в клетъчните подредби.

Тази техника не е характерна за паразитите.

I.2.2. Хистология

Участъците от тъканите, които включват хриле, храносмилателна жлеза, мантия и полови жлези се фиксират за най-малко 24 часа във фиксатор на Дейвидсън, последвано от нормално обработване за парафинна хистология и оцветяване, например с хематоксилин и еозин. Наблюденията се извършват с растящо увеличение до × 1 000.

За положителен резултат се счита, когато се наблюдават клетки с размер между 4 и 40 μm. Ранните етапи се състоят от многоядрени, сферични до удължени клетки. Те се срещат основно в епителa на хранопровода и стомаха, а в някои случаи и в лабиалното пипало. Спорообразуването включва разделяне на клетките вътре в клетките и се извършва в каналчетата и тръбичките на храносмилателната жлеза. Рефрингентните гранули се образуват в хода на спорообразуването, но не се наблюдават в ранните етапи. В последните етапи на заразяването се наблюдават спори в свободно състояние в лумена на храносмилателния тракт. Цитоплазмата се оцветява базофилно, а ядрото се оцветява еозинофилно. Гранулите може да варират от наситено оранжево до тъмночервено.

Тази техника не е характерна за паразитите.

I.3. Молекулярни техники

I.3.1. Извличане на ДНК

ДНК се извлича в съответствие със стандартните процедури.

Могат да се използват комплекти за извличане на ДНК, които могат да бъдат намерени в търговската мрежа и обикновено с тях се постига висококачествена ДНК, подходяща за използване с PCR протоколите, както е описано в точка I.3.2.

I.3.2. Полимеразна верижна реакция(PCR)

Бяха разработени и публикувани няколко PCR протокола.

Използват се PCR праймери, насочени към района на вътрешния транскрибиран спейсър (ITS1), тъй като те могат да увеличават само *M. refringens*.

PCR се извършва в обем 50 µl. PCR смесите съдържат буферен разтвор (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 при 25 °C] и 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP смес, 1 µM прав и обратен праймер, 0,02 единици μl^{-1} Taq DNA полимераза и 10 до 100 ng от извлечена ДНК. След денатурация на ДНК при 94 °C в продължение на пет минути, се провеждат 30 цикъла, както следва: денатурация при 94 °C в продължение на една минута, отгряване при 55 °C в продължение на една минута и удължение при 72 °C в продължение на една минута за двойка на база кило. Провежда се окончателен етап на удължаване в продължение на 10 минути при 72 °C. За откриването на *M. refringens* се извършва PCR с праймери, които са насочени към района на ITS1 (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ и 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Положителните контроли се състоят от геномна ДНК от силно заразен приемник или плазмидна ДНК, като се включва целевият район.

Отрицателните контроли се състоят от геномна ДНК от незаразен приемник и PCR реактиви без целева ДНК.

За положителен резултат се счита положителна PCR амплификация на очаквания размер (412bp), като всички отрицателни контроли са отрицателни, а всички положителни контроли са положителни.

I.3.3. Хибридизация *in-situ* (ISH)

Бяха разработени и публикувани няколко PCR протокола.

Използва се сонда, насочена към SSU от rRNA генен комплекс, тъй като тя е валидирана в съответствие с хистологията.

Участъците от тъканите, които включват хриле и храносмилателна жлеза, се фиксират за най-малко 24 часа във фиксатор на Дейвидсън, последвано от нормална обработка за парафинна хистология. Нарязват се и върху предметни стъкла, покрити с аминоалкилсилан, се поставят участъци от 5 µm, които след това се пекат за една нощ в пещ при температура 40 °C. Участъците се почистват от восъка чрез потапяне в ксилен в продължение на 10 минути. Тази стъпка се повтаря веднъж, след което разтворителят се отстранява чрез потапяне в две последователни вани с чист етанол в продължение на 10 минути всяка. След това да участъците се дехидратират чрез потапяне в степенувана серия етанол. Участъците се третират с протеиназа K (100 $\mu g\ ml^{-1}$) в TE буферен разтвор (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), при 37 °C в продължение на 30 минути. Предметните стъкла се дехидратират чрез потапяне в степенувана серия етанол и след това се изсушават на въздух. Участъците се инкубират с 100 µl от хибридизационния буферен разтвор (4 × SSC [стандартен солен цитрат], 50 % формамид, 1 × разтвор на Денхард, 250 $\mu g\ ml^{-1}$ дрожди tRNA, 10 % декстран сулфат), съдържащи 10 ng (1 µl от PCR реакцията, подготвена, както е описано в точка I.3.2, като се използват праймери CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG и TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) от означената с дигоксигенин сонда. Участъците се покриват *in-situ* с пластмасови похлупаци и се поставят върху нагряващ блок при 95 °C в продължение на пет минути. След това предметните стъкла се охлаждат върху лед в продължение на една минута преди извършването на хибридизация за една нощ при 42 °C във влажна камера. Участъците се промиват два пъти в продължение на пет минути в 2 × SSC при стайна температура и веднъж в продължение на 10 минути в 0,4 × SSC при 42 °C. Етапите на откриването се провеждат съгласно инструкциите на производителя. Предметните стъкла след това се изплакват в стерилна дестилирана вода (dH2O). Участъците се оцветяват обратно с жълто-кафяво Бисмарк, изплакват се в dH2O и се поставят капаци, като се използва водна среда за поставяне.

Положителните и отрицателните контроли са участъците от съответно заразени и незаразени приемници.

Положителният резултат се доказва с лилаво-черното означение на клетките *M. refringens* в рамките на познати прицелни тъкани, като всички отрицателни контроли са отрицателни, а всички положителни контроли — положителни.

I.3.4. Секвениране

Секвенирането се извършва като един от последните етапи за потвърждаване на диагнозата. Целевите региони са SSU rDNA и ITS1.

II. **Подробни диагностични методи и процедури за надзор и потвърждение на заразяване с *Marteilia refringens***

За целите на програмите за надзор и за потвърждение на присъствието на *Marteilia refringens* или за отхвърляне на съмнението за съответната включена в списъка болест в съответствие с изискванията, определени в част 4, раздел II от приложение I, диагностичните методи и съответните процедури, които да се използват, са в съответствие с насоките, определени в таблица 4.1, както следва:

Таблица 4.1

Насоки за използването на диагностичните методи за програмите за надзор и за потвърждение или отхвърляне на заразяването с *Marteilia refringens*

Метод	Целенасочен надзор	Предполагаема диагноза	Потвърдителна диагноза
Проби с отпечатък от храносмилателната жлеза	X	X	X или
Хистопатология	X		X или
In situ хибридизация			X и
PCR	X	X	X и
Секвениране			X

ЧАСТ 5

ПОДРОБНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ПРОЦЕДУРИ ЗА НАДЗОР И ПОТВЪРЖДЕНИЕ НА ЗАРАЗЯВАНЕ С *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **I. Процедури за диагностика на заразяване с *Bonamia ostreae***

Когато се извършват вземане на проби и лабораторно изследване за получаване или запазване на здравен статус по отношение на *Bonamia ostreae*, както е посочено в част 5, раздел I от приложение I или за потвърждение или за отхвърляне на присъствието на тази включена в списък болест в съответствие с член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, като се използват диагностичните методи, посочени в част 5, раздел II от приложение I, се прилагат подробно описаните диагностични методи и процедури, посочени в следните точки I.1, I.2 и I.3.

I.1. Процес на вземане на проби

С приоритет се вземат проби от отворени или наскоро умрели мекотели, за да се увеличат шансовете за откриване на заразени животни.

След като бъдат взети пробите, стридите се държат при температура 4 °C или върху хладилен лед за не повече от 24 часа, ако в пробите са включени отворени мекотели, а ако такива не са включени — 72 часа, в найлонова торбичка, с етикет с информация, свързана с естеството и произхода на стридите. Отворените или наскоро умрели мекотели се държат отделно от други мекотели.

Участъци от тъкани с дебелина от 3 до 5 mm, включително хриле и тъкан от сърцето, се използват за диагностика на *Bonamia ostreae* посредством хистология. За някои от изследванията се използва част от храносмилателната жлеза, включително проби с отпечатък и полимеразна верижна реакция (PCR).

I.2. Микроскопски техники

I.2.1. Цитология (отпечатъчна цитология)

След изсушаване на хрилете или тъканите от сърцето върху попивателна хартия, върху стъклено предметно стъкло се правят няколко проби с отпечатък. Предметните стъкла се оставят да се изсушат на въздух, фиксират се в метанол или в чист етанол и се оцветяват, като се използва достъпен в търговската мрежа комплект за оцветяване на кръвта (а именно Diff- Quik®/Hemacolor®,) съобразно инструкциите на производителя. След промиване с течаща вода и изсушаване предметните стъкла се покриват с капак, като се използва подходяща синтетична смола. Предметните стъкла първо се разглеждат при увеличение × 200, а след това при маслено потопяване с увеличение × 1 000.

За положителен резултат се счита присъствието на малки сферични или овални организми (с ширина 2 до 5 μm) в хемоцитите. Паразитът обаче може да се наблюдава и извън клетките. При тези организми се наблюдава базофилна цитоплазма и езинофилно ядро (цветовете може да са различни според използваното багрило) и тъй като те се разстилат върху предметното стъкло, може да изглеждат по-широки при пробите с отпечатък отколкото при хистологичното изследване. Може да се наблюдават многоядрени клетки. Тази техника не е характерна за видовете паразити.

I.2.2. Хистология

Участъците от тъканите, които включват хриле и храносмилателна жлеза, се фиксират за най-малко 24 часа във фиксатор на Дейвидсън, последвано от нормална обработка за парафинна хистология и оцветяване, например с хематоксилин и еозин. Наблюденията се извършват с растящо увеличение до × 1 000.

За положителен резултат се счита присъствието на паразити като много малки клетки с ширина от 2 до 5 μm в хемоцитите или свободно в съединителната тъкан или синуси на перките, червата и епитела на мантията, което често се свързва със силна възпалителна реакция. За да се избегнат съмнения, паразитът се наблюдава вътре в хемоцита за диагноза с положителен резултат. Тази техника не е характерна за видовете паразити.

I.3. Молекулярни техники

I.3.1. Извличане на ДНК

ДНК се извлича в съответствие със стандартните процедури.

Могат да се използват комплекти за извличане на ДНК, които са налични в търговската мрежа и обикновено с тях се постига висококачествена ДНК, подходяща за използване с PCR протоколите, както подробно е описано по-долу.

I.3.2. Полимеразна верижна реакция (PCR)

Бяха разработени и публикувани няколко PCR протокола.

Могат да се използват два PCR протокола, насочени към малките подединици (SSU) rDNA:

а) първият е традиционен PCR, с който се увеличават няколко от членовете на *Haplosporidia* включително *Bonamia spp.*; праймерите, наречени Bo и Boas, са съответно 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ и 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′, като те увеличават продукт 300 bp. PCR смесите съдържат буферен разтвор (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 при 25 °C] и 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP смес, 1 μM прав и обратен праймер, 0,02 единици μl^{-1} Taq DNA полимераза и 0,2 ng μl^{-1} от образеца на ДНК в общ обем от 50 μl. Пробите се денатурират в термоциклер в продължение на пет минути при 94 °C, преди да бъдат предадени за 30 цикъла (94 °C в продължение на една минута, 55 °C в продължение на една минута, 72 °C в продължение на една минута), последвано от окончателно удължаване в продължение на 10 минути при 72 °C.

Положителните контроли се състоят от геномна ДНК от силно заразен приемник или плазмидна ДНК, като се включва целевият район.

Отрицателните контроли се състоят от геномна ДНК от незаразен приемник и PCR реактиви без целева ДНК.

За положителен резултат се счита положителна PCR амплификация на очаквания размер (а именно 300 bp), като всички отрицателни контроли са отрицателни, а всички положителни контроли са положителни;

б) вторият PCR протокол е анализ SYBR® Green PCR в реално време. Той позволява конкретно откриване на *B. ostreae* (описано по-долу) и може да се комбинира с анализа SYBR® Green PCR в реално време, което позволява конкретно откриване на *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Праймерите BOSTRE-F (5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) и BOSTRE-R (5′- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) увеличават продукт 208 bp. PCR смесите съдържат SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 μM прави и обратни праймери и 200 ng от извлечената ДНК. Пробите се денатурират в система за откриване в реално време в продължение на 10 минути при 95 °C, преди да бъдат предадени за 35 цикъла (при 95 °C в продължение на 30 секунди, при 55 °C в продължение на 45 секунди и 72 °C в продължение на една минута). Анализът на кривата на топене се извършва с увеличаване на температурата с по 0,5 °C/s, като се започне при температура 55 °C и се приключи при 95 °C и регистриране на флуоресценцията при всяка промяна на температурата.

Положителните контроли се състоят от геномна ДНК от силно заразен приемник или плазмидна ДНК, като се включва целевият район.

Отрицателните контроли се състоят от геномна ДНК от незаразен приемник и PCR реактиви без целева ДНК.

За положителен резултат се счита положителна PCR амплификация с единствен пик на топене на температурата (78,25 ± 0,25 °C при условията, публикувани от Ramilo et al. 2013), като всички отрицателни контроли са отрицателни, а всички положителни контроли — положителни.

I.3.3. Хибридизация *in-situ* (ISH)

Бяха разработени и публикувани няколко PCR протокола.

Използва се сонда, насочена към SSU от комплекса гени rDNA, въпреки че е доказано, че има кръстосана реакция с други членове на семейството *Haplosporidia*.

Участъците от тъканите, които включват хриле и храносмилателна жлеза, се фиксират за най-малко 24 часа във фиксатор на Дейвидсън, последвано от нормална обработка за парафинна хистология. Нарязват се и върху предметни стъкла, покрити с аминоалкилсилан, се поставят участъци от 5 μm, които след това се пекат за една нощ в пещ при температура 40 °C. Участъците се почистват от восъка чрез потапяне в ксилен в продължение на 10 минути. Тази стъпка се повтаря веднъж, след което разтворителят се отстранява чрез потапяне в две последователни вани с чист етанол в продължение на 10 минути всяка. След това да участъците се дехидратират чрез потапяне в степенувана серия етанол. Участъците се третират с протеиназа K (100 μg ml^{-1}) в TE буферен разтвор (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), при 37 °C в продължение на 30 минути. Предметните стъкла се дехидратират чрез потапяне в степенувана серия етанол и след това се изсушават на въздух. Участъците се инкубират с 100 μl от хибридизационния буферен разтвор (4 × SSC [стандартен солен цитрат], 50 % формамид, 1 × разтвор на Денхард, 250 μg ml^{-1} дрожди tRNA, 10 % декстран сулфат), съдържащи 20 ng (2 μl от PCR реакцията, подготвена, както е описано в точка I.3.2, като се използват праймери Bo и Boas) от означената с дигоксигенин сонда. Участъците се покриват *in-situ* с пластмасови похлупаци и се поставят върху нагряващ блок при 95 °C в продължение на пет минути. След това предметните стъкла се охлаждат върху лед в продължение на една минута преди извършването на хибридизация за една нощ при 42 °C във влажна камера. Участъците се промиват два пъти в продължение на пет минути в 2 × SSC при стайна температура и веднъж в продължение на 10 минути в 0,4 × SSC при 42 °C. Етапите на откриването се провеждат съгласно инструкциите на производителя. Предметните стъкла след това се изплакват в стерилна дестилирана вода (dH2O). Участъците се оцветяват обратно с жълто-кафяво Бисмарк, изплакват се в dH2O и се поставят капаци, като се използва водна среда за поставяне.

Положителните и отрицателните контроли са участъците от съответно заразени и незаразени приемници.

За положителен резултат се счита когато в хемоцитите има обозначени паразити, като всички отрицателни контроли са отрицателни, а всички положителни контроли са положителни.

I.3.4. Секвениране

Секвенирането се извършва като един от последните етапи за потвърждаване на диагнозата. Целевите региони са SSU rDNA и ITS1.

II. **Процедури за надзор и потвърждение на заразяването с *Marteilia refringens***

За целите на надзора и за потвърждението на присъствието или за отхвърляне на подозрение за заразяване с *Bonamia ostreae* в съответствие с изискванията, определени в част 5, раздел II от приложение I, диагностичните методи и съответните процедури, които да се използват, са в съответствие с насоките, определени в таблица 5.1.

Таблица 5.1

Насоки за използването на диагностичните методи за програмите за надзор и за отхвърляне или потвърждаване на заразяването с *Bonamia ostreae*

Метод	Целенасочен надзор	Предполагаема диагноза	Потвърдителна диагноза
Проби с отпечатък от сърцето или хрилете	X	X	X или
Хистопатология	X		X или
In situ хибридизация			X и
PCR	X	X	X и
Секвениране			X

ЧАСТ 6

ПОДРОБНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ПРОЦЕДУРИ ЗА НАДЗОР И ПОТВЪРЖДЕНИЕ НА БЯЛО ПЕТНИСТО ЗАБОЛЯВАНЕ

1. **Диагностични процедури за откриване на вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване**

Когато се изискват взимане на проби и лабораторно изследване за програмите за надзор и ликвидиране, посочени в част 6, раздел I от приложение I и за потвърждението на присъствието или за отхвърлянето на съмнението за заразяване с вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване в съответствие с член 57, буква б) от Директива 2006/88/ЕО, като се използват диагностичните методи, посочени в част 6, раздел II от приложение I, се прилагат подробните диагностични методи и процедури, посочени в точки 2 — 7 от настоящата част.

Методите и процедурите, описани в настоящата част от приложение II, се адаптират от акредитирания тест ISO 17025, прилаган в референтната лаборатория на Европейския съюз за болести по ракообразните. Могат да се прилагат алтернативни подходи, при които се използват равностойни условия или комплекти, произведени от различни производители, но които предлагат еквивалентна чувствителност и характеристики като описаните в настоящата част. Във всички случаи продукт, амплифициран с PCR, се секвенира, за да се потвърди идентичност с вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване.

2. **Процес на вземане на проби**

Тъкан (плеоподалните крачка и хриле), съдържаща вирус на синдрома на бялото петнисто заболяване, от ракообразни може да се съхранява в етанол, RNAlater или да бъдат дълбоко замразени при − 80 °C. Етапите, необходими за идентификацията на вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване от тъканните отпечатъци, са, както следва: Хомогенизиране на тъканта, извличане на ДНК, специфична амплификация на ДНК на вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване, като се използва PCR, визуализиране на амплифицирания продукт върху гел, пречистване на ДНК и секвениране за потвърждение на идентичността на патогена.

3. **Хомогенизиране на тъканта**

Разкъсването на тъканите и приготвянето на хомогенат в подходящ буферен разтвор се извършва, като се използват тъканен нарушител Fast Prep и епруветки Lysing модел A (MP Biomedicals). Тъканта се мери, поставя се в епруветки Lysing модел A, разредена в съотношение 1 към 10 w/v или съгласно инструкциите на производителите, в подходящ буферен разтвор (G 2 и 10μl протеиназа K за употреба с комплект за тъкани за ДНК (Qiagen)) и се хомогенизира последством хомогенизатор Fastprep 24 в продължение на две минути. Хомогенизираните проби се инкубират при температура 56 °C в продължение на минимум четири часа или за цялата нощ. Пробите се разбъркват с помощта на вихров смесител, центрофугират се при 9 000 rpm в продължение на две минути, като 50 μl от супернатанта или обем, равен на 5 mg от тъканта (тегло на тъканта, което е оптимално за комплектите за извличане), се добавят към епруветка за извличане на ДНК и обем, съставен от 200 μl, като се използва G2 буферен разтвор.

4. **Извличане на ДНК**

Обща ДНК се извлича с помощта на комплект за извличане на ДНК и EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen), като се следват инструкциите на производителите. Контролна проба на извличането (ДНК от тимус на теле) и отрицателна контролна проба (G2 буферен разтвор) се извършва с всяка пратка проби. ДНК се елюира в 50 µl обем. За да се гарантира, че извличането е завършило успешно, концентрацията на ДНК за всички проби и контроли се определя, като се използва машина Nano Drop. Извлечената ДНК се замразява при – 20 °C, ако не се изисква незабавно.

5. **Полимеразна верижна реакция (PCR) за вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване**

Методът, който трябва да се използва за откриване на вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване, е протоколът за откриване на вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване чрез спрегната PCR, посочена в следващите параграфи, при който се амплифицира ампликон 1 447 bp и ампликон от 848bp от ген 18s rRNA при първата и втората PCR.

Първата PCR реакция се провежда в 50 µl обем, който съдържа крайни концентрации от 1 × GoTaq Buffer (Promega), 5mM $MgCl_2$, 1pmol/ µl вирус на синдрома на бялото петнисто заболяване 146 F1 праймер, 1pmol/µl WSSV 146 R1 праймер (таблица 1), 0,25mM dNTPs, 1,25U Taq полимераза и 2,5µl ДНК. Всяка проба се провежда в два екземпляра заедно с отрицателно контролно извличане, отрицателен PCR контрол, (2,5µl H_2O добавени вместо ДНК) и позитивна контрола. Положителната контрола се разрежда с плазмид на вируса на синдрома на бялото петнисто заболяване, произведени и валидирани за вътрешно ползване (на разположение от референтната лаборатория на ЕС).

Втората PCR реакция на вирус на синдрома на бялото петнисто заболяване се прави като реакцията първия път, но се използва комплектът праймери вирус на синдрома на бялото петнисто заболяване 146 F2/R2 и се използва втора позитивна контрола, за да се провери дали функционира този етап на PCR.

Праймер	Секвенция
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Провеждат се и първият, и вторият цикъл на PCR, като се използват следните условия на циклите по ДНК Engine Tetrad 2 Peltier (или сходен). Начален етап на денатурация при 94 °C в продължение на две минути, последван от 94 °C в продължение на 30 секунди, 62 °C в продължение на 30 секунди, 72 °C в продължение на 30 секунди и повторен 30 цикъла, етап на удължение при 72 °C в продължение на две минути и задържан при 4 °C.

6. **Гел електрофореза**

Амплифицирани PCR продукти, както от първия, така и от втория цикъл PCR се визуализират върху 2 % агарозен гел с помощта на TAE буферен разтвор. 15 µl от всяка проба минават през 120 волта в продължение на приблизително 20 минути и се разглеждат под ултравиолетова светлина. Положителни проби произвеждат лента от 1 447 bp през първия цикъл PCR и 848 bp през втория цикъл на PCR. Проби с такъв размер се изрязват и се поставят в микротубичка от 1,5 ml. ДНК, съдържаща се в отрязаните части от гела, се прочиства, като се използва гел Promega Wizard SV и система за пречистване на PCR съгласно инструкциите на производителите. Концентрацията на ДНК се изчислява, като се използва машина Nano Drop. Пречистената ДНК се замразява при – 20 °C, ако не се използва незабавно.

7. **Секвениране на PCR продукти**

ДНК се секвенира, като се използва комплектът Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Общият обем при всяка реакция е 20µL, като окончателните концентрации са 1 × Big Dye terminator, 1 × буферен разтвор за секвениране, 10pmol/µl прав или обратен праймер и 10 µl пречистена ДНК (разредена до около 10ng/µl), използвани според условията на циклите на термоциклер ДНК Engine Tetrad 2 Peltier (или сходен): 94 °C в продължение на 30 секунди, последвано от 96 °C в продължение на 10 секунди, при 50 °C в продължение на 10 секунди и 60 °C в продължение на четири минути, като циклите при последните три етапа са 30 пъти.

PCR продуктите се отделят на твърда фаза, като се използва метод с натриев ацетат, при който 20 µl ДНК се добавя към 10 µl NaAc, 70µl H_2O и 250µl етанол, разбъркват се с помощта на вихров смесител и се центрофугират при 13 000 rpm в продължение на 20 минути, супернатантът се отстранява и утайката се промива с 200µl чист етанол, с центрофугиране при 13 000 rpm в продължение на пет минути. Утайката се суши в продължение на пет минути при 37 °C. 25 µl от Hi-Di формамид се добавят към утайката, загряти до 95 °C в продължение на две минути и разбъркани с помощта на вихров смесител. Пробите се секвенират с помощта на анализатор ABI3130xl Avant Genetic съгласно инструкциите на производителите. Резултатите от секвенирането се анализират посредством софтуер Sequencher, а секвенциите се съчетават със секвенции от базата данни NCBI, като се използва функцията BLAST.