

Επίσημη Εφημερίδα

L 247

της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Έκδοση
στην ελληνική γλώσσα

Νομοθεσία

58ο έτος

23 Σεπτεμβρίου 2015

Περιεχόμενα

II Μη νομοθετικές πράξεις

ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ

- * Εκτελεστική απόφαση (ΕΕ) 2015/1554 της Επιτροπής, της 11ης Σεπτεμβρίου 2015, σχετικά με τον καθορισμό κανόνων για την εφαρμογή της οδηγίας 2006/88/ΕΚ όσον αφορά τις απαιτήσεις για τις μεθόδους επιτήρησης και διάγνωσης [κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό C(2015) 6188] ⁽¹⁾ 1

⁽¹⁾ Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ

EL

Οι πράξεις οι τίτλοι των οποίων έχουν τυπωθεί με ημίμαυρα στοιχεία αποτελούν πράξεις τρεχούσης διαχείρισεως που έχουν θεσπισθεί στο πλαίσιο της γεωργικής πολιτικής και είναι γενικά περιορισμένης χρονικής ισχύος.

Οι τίτλοι όλων των υπολοίπων πράξεων έχουν τυπωθεί με μαύρα στοιχεία και επισημαίνονται με αστερίσκο.

II

(Μη νομοθετικές πράξεις)

ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ

ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΗ ΑΠΟΦΑΣΗ (ΕΕ) 2015/1554 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 11ης Σεπτεμβρίου 2015

σχετικά με τον καθορισμό κανόνων για την εφαρμογή της οδηγίας 2006/88/ΕΚ όσον αφορά τις απαιτήσεις για τις μεθόδους επιτήρησης και διάγνωσης

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό C(2015) 6188]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη την οδηγία 2006/88/ΕΚ του Συμβουλίου, της 24ης Οκτωβρίου 2006, σχετικά με τις απαιτήσεις υγειονομικού ελέγχου για τα ζώα υδατοκαλλιέργειας και τα προϊόντα τους και σχετικά με την πρόληψη και την καταπολέμηση ορισμένων ασθενειών των υδρόβιων ζώων⁽¹⁾, και ειδικότερα το άρθρο 49 παράγραφος 3, το άρθρο 50 παράγραφος 4, το άρθρο 57 στοιχείο β) και το άρθρο 61 παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Η οδηγία 2006/88/ΕΚ θεσπίζει τα ελάχιστα προληπτικά μέτρα για την επιτήρηση και την πρόωμη ανίχνευση στα ζώα υδατοκαλλιέργειας των ασθενειών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας (εφεξής «οι ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο»), καθώς και τα μέτρα ελέγχου που πρέπει να εφαρμόζονται σε περίπτωση υπόνοιας ή εκδήλωσης των ασθενειών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο. Ορίζει επίσης τις απαιτήσεις για τον χαρακτηρισμό κρατών μελών, ζωνών ή διαμερισμάτων αυτών ως απαλλαγμένων από ασθένειες.
- (2) Η εξάλειψη των ασθενειών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο και ο χαρακτηρισμός κράτους μέλους, ζώνης ή διαμερισματος ως απαλλαγμένου από ασθένειες πρέπει να βασίζονται στις ίδιες αρχές και να ακολουθούν την ίδια επιστημονική προσέγγιση σε ολόκληρη την Ένωση. Για τον λόγο αυτό, είναι αναγκαίο να θεσπιστούν σε επίπεδο Ένωσης ειδικές απαιτήσεις για τα συστήματα εξάλειψης και επιτήρησης των ασθενειών, καθώς και για τις μεθόδους δειγματοληψίας και διάγνωσης που πρέπει να εφαρμόζονται από τα κράτη μέλη για τον χαρακτηρισμό ολόκληρου του κράτους μέλους ή ζώνης ή διαμερισματος αυτού ως απαλλαγμένου από ασθένειες.
- (3) Οι εργαστηριακές εξετάσεις που διεξάγονται σε περίπτωση υπόνοιας ή επιβεβαιωμένης παρουσίας των ασθενειών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο πρέπει να είναι οι ίδιες σε επίπεδο Ένωσης και να ακολουθούν τα ίδια επιστημονικά πρότυπα και πρωτόκολλα. Σύμφωνα με την οδηγία 2006/88/ΕΚ, είναι απαραίτητο να θεσπιστούν ειδικές διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες που θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από τα εργαστήρια που έχουν οριστεί για τον σκοπό αυτό από την αρμόδια αρχή κάθε κράτους μέλους.
- (4) Ο κώδικας υγείας υδρόβιων οργανισμών που εγκρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό για την Υγεία των Ζώων (ΟΙΕ) (εφεξής ο «κώδικας για τους υδρόβιους οργανισμούς») ορίζει πρότυπα για τη βελτίωση της υγείας των υδρόβιων οργανισμών και την καλή μεταχείριση των εκτρεφόμενων ιχθύων, συμπεριλαμβανομένων προτύπων για το ασφαλές διεθνές εμπόριο υδρόβιων οργανισμών και προϊόντων αυτών. Ορισμένα κεφάλαια του κώδικα για τους υδρόβιους οργανισμούς περιλαμβάνουν συστάσεις σχετικά με τη χρήση ορισμένων διαγνωστικών δοκιμών. Οι εν λόγω δοκιμές που προβλέπονται από τον ΟΙΕ ορίζονται στο Εγχειρίδιο διαγνωστικών δοκιμών για τους υδρόβιους οργανισμούς του ΟΙΕ (εφεξής το «εγχειρίδιο για τους υδρόβιους οργανισμούς»). Προκειμένου να διασφαλιστεί η συνέπεια των ενωσιακών απαιτήσεων όσον αφορά τις μεθόδους διάγνωσης ασθενειών υδρόβιων ζώων με τα διεθνή πρότυπα, οι κανόνες που ορίζονται στην παρούσα απόφαση θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τα πρότυπα και τις συστάσεις του κώδικα για τους υδρόβιους οργανισμούς.

⁽¹⁾ ΕΕ L 328 της 24.11.2006, σ. 14.

- (5) Εν προκειμένω, για πολλές από τις ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, το εγχειρίδιο για τους υδρόβιους οργανισμούς απαριθμεί διάφορες δοκιμές και διαδικασίες που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τους σκοπούς των εργαστηριακών εξετάσεων. Για την εφαρμογή ενιαίας επιστημονικής βάσης στο πλαίσιο του διαγνωστικού έργου που επιτελείται σε επίπεδο Ένωσης όσον αφορά τις ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, είναι απαραίτητο να γίνει επιλογή μεταξύ των διαγνωστικών δοκιμών και διαδικασιών που συνιστά ο ΟΙΕ και να προσδιοριστεί ποιες δοκιμές πρέπει να είναι υποχρεωτικές για τους σκοπούς των εργαστηριακών εξετάσεων κατά την εκτέλεση προγραμμάτων επιτήρησης και για να αποκλειστεί η υπόνοια ή να επιβεβαιωθεί η παρουσία των εν λόγω ασθενειών. Δεδομένου ότι θα είναι επίσης αναγκαίο να υπάρχουν διαθέσιμες εναλλακτικές μέθοδοι και διαδικασίες σε ορισμένες περιπτώσεις, θα πρέπει να διατίθενται περιγραφές και ορισμένες επιστημονικές επεξηγήσεις σχετικά με τον χρόνο και τον τρόπο εφαρμογής των εναλλακτικών μεθόδων. Αυτό είναι αναγκαίο ιδίως για τις πιο λεπτομερείς διαγνωστικές διαδικασίες.
- (6) Προκειμένου να εξασφαλίζονται ακριβή και αναπαραγώγιμα διαγνωστικά αποτελέσματα, είναι σημαντικό οι λεπτομερείς διαδικασίες και τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται να επικυρώνονται σύμφωνα με τα σχετικά πρότυπα ποιότητας που αναφέρονται στο μέρος I του παραρτήματος VI της οδηγίας 2006/88/ΕΚ. Για πολλές από τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση, η χρήση εμπορικών κιτ δοκιμών αποτελεί απαραίτητο μέρος των διαγνωστικών πρωτοκόλλων και τα εν λόγω κιτ δοκιμών έχουν επικυρωθεί στο πλαίσιο δοκιμών διαπιστευμένων από τα ευρωπαϊκά εργαστήρια αναφοράς για τις αντίστοιχες ασθένειες. Για λόγους ασφάλειας δικαίου, θα πρέπει να αναφέρονται στην παρούσα απόφαση οι εμπορικές ονομασίες των εν λόγω επικυρωμένων εμπορικών κιτ δοκιμών.
- (7) Ενδέχεται να είναι δύσκολο για ορισμένα κράτη μέλη να επιτύχουν τον χαρακτηρισμό του απαλλαγμένου από μία ή περισσότερες από τις ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο για ολόκληρο το κράτος μέλος ή για ζώνη ή διαμέρισμα αυτού. Στις περιπτώσεις αυτές, το κράτος μέλος ενδέχεται να μην επιθυμεί την εξασφάλιση ή την αποκατάσταση του χαρακτηρισμού του ως απαλλαγμένου από τις εν λόγω ασθένειες. Τα ελάχιστα μέτρα ελέγχου που πρέπει να εφαρμόζονται στις περιπτώσεις όπου το ενδιαφερόμενο κράτος μέλος δεν επιθυμεί να εξασφαλίσει ή να αποκαταστήσει τον χαρακτηρισμό του ως απαλλαγμένου από ασθένειες πρέπει να είναι τα ίδια σε επίπεδο Ένωσης και να ακολουθούν τα ίδια κριτήρια. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία, σύμφωνα με την οδηγία 2006/88/ΕΚ, η θέσπιση λεπτομερών κανόνων για την περιστολή των ασθενειών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο και η θέσπιση ελάχιστων απαιτήσεων για την άρση των εν λόγω μέτρων περιστολής.
- (8) Η απόφαση 2001/183/ΕΚ της Επιτροπής⁽¹⁾ καθορίζει τις απαιτήσεις σχετικά με τις τεχνικές δειγματοληψίας και τις διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση και τη διαπίστωση δύο εκ των ασθενειών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, της λοιμώδους αιματοποιητικής νέκρωσης και της ιογενούς αιμορραγικής σηψαιμίας. Η απόφαση 2003/466/ΕΚ της Επιτροπής⁽²⁾ καθορίζει τις απαιτήσεις σχετικά με τα σχέδια δειγματοληψίας και τις διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση της λοιμώδους αναίμιας του σολομού, και θεσπίζει τα κριτήρια για τον καθορισμό ζωνών και την εντεταλμένη επιτήρηση κατόπιν υπονοιών για την ύπαρξη ή κατόπιν επιβεβαίωσης της ύπαρξης της εν λόγω ασθένειας. Η απόφαση 2002/878/ΕΚ της Επιτροπής⁽³⁾ καθορίζει τις απαιτήσεις σχετικά με τα σχέδια δειγματοληψίας και τις διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση των ασθενειών των μαλακίων βοναμώσης (*Bonamia ostreae*) και μαρτειλώσης (*Marteilia refringens*). Προκειμένου να επικαιροποιηθούν οι απαιτήσεις, οι προαναφερθείσες τρεις αποφάσεις θα πρέπει να αντικατασταθούν από την παρούσα απόφαση. Ως εκ τούτου, η απόφαση 2001/183/ΕΚ, η απόφαση 2002/878/ΕΚ και η απόφαση 2003/466/ΕΚ θα πρέπει να καταργηθούν.
- (9) Δεδομένου ότι ορισμένα κράτη μέλη χρειάζονται χρόνο για την επικαιροποίηση των εθνικών τους εργαστηρίων αναφοράς ώστε να συμμορφωθούν με τις απαιτήσεις της παρούσας απόφασης, η απόφαση θα πρέπει να εφαρμόζεται από την 1η Απριλίου 2016.
- (10) Τα μέτρα που θεσπίζονται με την παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής φυτών, ζώων, τροφίμων και ζωοτροφών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Αντικείμενο

Η παρούσα απόφαση θεσπίζει κανόνες σχετικά με τα εξής:

- α) την επιτήρηση, τις ζώνες προστασίας και τις μεθόδους δειγματοληψίας και διάγνωσης που πρέπει να χρησιμοποιούνται από τα κράτη μέλη σε σχέση με την κατάσταση των κρατών μελών ή ζωνών ή διαμερισμάτων αυτών ως προς τις μη εξωτικές ασθένειες των υδρόβιων ζώων που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ (οι «ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο»).

(¹) Απόφαση 2001/183/ΕΚ της Επιτροπής, της 22ας Φεβρουαρίου 2001, για τον καθορισμό των τεχνικών δειγματοληψίας και των διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση και τη διαπίστωση ορισμένων ασθενειών ιχθύων, καθώς και για την κατάργηση της απόφασης 92/532/ΕΟΚ (ΕΕ L 67 της 9.3.2001, σ. 65).

(²) Απόφαση 2003/466/ΕΚ της Επιτροπής, της 13ης Ιουνίου 2003, για τη θέσπιση κριτηρίων για τον καθορισμό ζωνών και την εντεταλμένη επιτήρηση μετά από υπονοιές για την ύπαρξη ή επιβεβαίωση της ύπαρξης λοιμώδους αναίμιας του σολομού (ΛΑΣ) (ΕΕ L 156 της 25.6.2003, σ. 61).

(³) Απόφαση 2002/878/ΕΚ της Επιτροπής, της 6ης Νοεμβρίου 2002, περί θέσπισης των σχεδίων δειγματοληψίας και των διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της παρουσίας των ασθενειών των μαλακίων βοναμώσης (*Bonamia ostreae*) και μαρτειλώσης (*Marteilia refringens*) (ΕΕ L 305 της 7.11.2002, σ. 57).

- β) τις διαγνωστικές μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για εργαστηριακές εξετάσεις σε περίπτωση υπόνοιας ή επιβεβαιωμένης παρουσίας ασθνεσιών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο· και
- γ) τα ελάχιστα μέτρα ελέγχου που πρέπει να εφαρμόζονται σε περίπτωση υπόνοιας ή επιβεβαιωμένης παρουσίας ασθένειας που περιλαμβάνεται στον κατάλογο σε κράτος μέλος, ζώνη ή διαμέρισμα που δεν έχει χαρακτηριστεί ως απαλλαγμένο από την εν λόγω ασθένεια.

Άρθρο 2

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας απόφασης, ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

- α) «ιογενής αιμορραγική σηψαιμία» («VHS»): η ασθένεια που προκαλείται από τον ιό της ιογενούς αιμορραγικής σηψαιμίας (VHSV), επίσης γνωστό ως ιό Egtved, ο οποίος ανήκει στο γένος *Novirhabdovirus* της οικογένειας *Rhabdoviridae*.
- β) «λοιμώδης αιματοποιητική νέκρωση» («IHN»): η ασθένεια που προκαλείται από τον ιό της λοιμώδους αιματοποιητικής νέκρωσης (IHNV), ο οποίος ανήκει στο γένος *Novirhabdovirus* της οικογένειας *Rhabdoviridae*.
- γ) «νόσος του έρπητα του ψαριού σαζάνι» (νόσος «KHVD»): η ασθένεια που προκαλείται από τον ιό του έρπητα του ψαριού σαζάνι (KHV), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Alloherpesviridae*. Η επιστημονική ονομασία του είναι ερπητιόδης κυπρινοειδών 3 (cyprinid herpesvirus 3 — CyHV-3).
- δ) «λοιμώδης αναμία του σολομού» («ΛΑΣ»): η ασθένεια που προκαλείται από τη λοίμωξη με ιό αναμίας του σολομού (ISAV) απαλειμμένης ιδιαίτερα πολυμορφικής περιοχής (HPR), ο οποίος ανήκει στο γένος *Isavirus* της οικογένειας *Orthomyxoviridae*.
- ε) «λοιμώξη με *Marteilia refringens*»: η ασθένεια που προκαλείται από λοίμωξη με το πρωτόζωο *Marteilia refringens* του φύλου *Paramyxia*.
- στ) «λοιμώξη με *Bonamia ostreae*»: η ασθένεια που προκαλείται από λοίμωξη με το πρωτόζωο *Bonamia ostreae* του γένους *Haplosporidia*.
- ζ) «ιχθυοφθειρίαση» («WSD»): η ασθένεια που προκαλείται από τον ιό της ιχθυοφθειρίασης (WSSV), ο οποίος είναι ένας ιός δίκλωνου DNA του γένους *Whispovirus*, της οικογένειας *Nimaviridae*.

Άρθρο 3

Ελάχιστες απαιτήσεις για τα προγράμματα επιτήρησης και εξάλειψης

Κατά τη διαδικασία απονομής, ανάκλησης ή αποκατάστασης του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες σε κράτος μέλος ή σε ζώνη ή διαμέρισμα αυτού για μία ή περισσότερες από τις ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, τα κράτη μέλη διασφαλίζουν τη συμμόρφωση με τους κανόνες που αφορούν τα προγράμματα επιτήρησης και εξάλειψης ασθνεσιών, τις ζώνες προστασίας και τις μεθόδους δειγματοληψίας και διάγνωσης που ορίζονται στο παράρτημα I, καθώς και με τις ειδικές μεθόδους και τις λεπτομερείς διαδικασίες που ορίζονται στο παράρτημα II.

Άρθρο 4

Ελάχιστες απαιτήσεις για τις διαγνωστικές μεθόδους και τις ειδικές διαδικασίες

Όταν διεξάγονται εργαστηριακές εξετάσεις προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η ύπαρξη ασθένειας που περιλαμβάνεται στον κατάλογο, τα κράτη μέλη διασφαλίζουν τη συμμόρφωση με τις μεθόδους ελέγχου που ορίζονται στο παράρτημα I και με τις ειδικές διαγνωστικές μεθόδους και τις λεπτομερείς διαδικασίες που ορίζονται στο παράρτημα II.

Άρθρο 5

Ελάχιστα μέτρα ελέγχου για την περιστολή των ασθνεσιών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο και ελάχιστες απαιτήσεις για την άρση των μέτρων περιστολής σε κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα αυτών που δεν έχουν χαρακτηριστεί ως απαλλαγμένα από ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο

Κατά την εφαρμογή μέτρων ελέγχου και την άρση των μέτρων περιστολής για μία ή περισσότερες από τις ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο σε κράτος μέλος ή σε ζώνη ή διαμέρισμα αυτού που δεν έχει χαρακτηριστεί ως απαλλαγμένο από τις εν λόγω ασθένειες, τα κράτη μέλη διασφαλίζουν τη συμμόρφωση με τα ελάχιστα μέτρα ελέγχου και με τις ελάχιστες απαιτήσεις για την άρση των μέτρων περιστολής που ορίζονται στο παράρτημα I.

Άρθρο 6**Κατάργηση πράξεων**

Οι αποφάσεις 2001/183/ΕΚ, 2002/878/ΕΚ και 2003/466/ΕΚ καταργούνται.

Άρθρο 7**Ημερομηνία εφαρμογής**

Η παρούσα απόφαση εφαρμόζεται από την 1η Απριλίου 2016.

Άρθρο 8**Αποδέκτες**

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 11 Σεπτεμβρίου 2015.

Για την Επιτροπή
Vytenis ANDRIUKAITIS
Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ

I. Εισαγωγή

Στο παρόν παράρτημα καθορίζονται:

- α) οι απαιτήσεις για τα προγράμματα εξάλειψης και επιτήρησης, όπως προβλέπονται στο άρθρο 44 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, και οι μέθοδοι δειγματοληψίας και διάγνωσης που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό κρατών μελών ή ζωνών ή διαμερισμάτων αυτών ως απαλλαγμένων από ασθένειες, όπως προβλέπονται στο κεφάλαιο VII της εν λόγω οδηγίας·
- β) οι μέθοδοι δειγματοληψίας και διάγνωσης που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τις εργαστηριακές εξετάσεις σε περίπτωση υπόνοιας ή για την επιβεβαίωση της παρουσίας των μη εξωτικών ασθενειών που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ (οι «ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο»), όπως προβλέπονται στο άρθρο 28 στοιχείο α) και στο άρθρο 57 στοιχείο β) της εν λόγω οδηγίας·
- γ) τα μέτρα περιστολής που πρέπει να λαμβάνονται σε περίπτωση επιβεβαίωσης της παρουσίας ασθένειας που περιλαμβάνεται στον κατάλογο, όπως προβλέπονται στο άρθρο 39 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, καθώς και τα μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται ώστε ένα κράτος μέλος ή ζώνη ή διαμέρισμα αυτού, που έχει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V, να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III.

Οι απαιτήσεις που καθορίζονται στο παρόν παράρτημα αφορούν τις ακόλουθες ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο:

1.	Ιογενής αιμορραγική σηψαιμία (VHS)	Μέρος 1
2.	Λοιμώδης αιματοποιητική νέκρωση (IHN)	Μέρος 1
3.	Νόσος του έρπητα του ψαριού σαζάνι (νόσος KHV)	Μέρος 2
4.	Λοιμώδης αναιμία του σολομού (ΛΑΣ)	Μέρος 3
5.	Λοιμώξεις από <i>Marteilia refringens</i>	Μέρος 4
6.	Λοιμώξεις από <i>Bonamia ostreae</i>	Μέρος 5
7.	Ιχθυοφθειρίαση (WSD)	Μέρος 6

II. Ορισμοί

Για τους σκοπούς των παραρτημάτων I και II ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

- α) «ηπειρωτικό διαμέρισμα»: μία ή περισσότερες εκμεταλλεύσεις ευρισκόμενες στο ηπειρωτικό τμήμα ενός ή περισσότερων κρατών μελών, οι οποίες υπάγονται σε κοινό σύστημα βιοασφάλειας και περιλαμβάνουν πληθυσμό υδρόβιων ζώων με διαφορετικό υγειονομικό καθεστώς ως προς συγκεκριμένη ασθένεια·
- β) «ηπειρωτική εκμετάλλευση»: εκμετάλλευση στην οποία διατηρούνται ζώα υδατοκαλλιέργειας και η οποία βρίσκεται στο ηπειρωτικό τμήμα του εδάφους ενός κράτους μέλους·
- γ) «ηπειρωτική ζώνη»: ακριβής γεωγραφική περιοχή ευρισκόμενη στο ηπειρωτικό τμήμα ενός ή περισσότερων κρατών μελών με ομοιογενές υδρολογικό σύστημα που περιλαμβάνει τμήματα λεκάνης απορροής από την πηγή ή τις πηγές έως φυσικό ή τεχνητό φράγμα που εμποδίζει την προς τα άνω μετανάστευση υδρόβιων ζώων από χαμηλότερες περιοχές της λεκάνης απορροής, ολόκληρη λεκάνη απορροής από την πηγή ή τις πηγές έως τις εκβολές της, ή περισσότερες από μία λεκάνες απορροής, συμπεριλαμβανομένων των εκβολών τους, λόγω της επιδημιολογικής σύνδεσης μεταξύ των λεκανών απορροής μέσω των εκβολών·

- δ) «εκμετάλλευση επισήμως χαρακτηρισμένη ως μολυσμένη»: εκμετάλλευση στην οποία διατηρούνται υδρόβια ζώα και στην οποία έχει επιβεβαιωθεί από την αρμόδια αρχή η παρουσία μιας ή περισσότερων από τις ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, σύμφωνα με το άρθρο 28 στοιχείο α), το άρθρο 29 και το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/ΕΚ.
- ε) «εφαπτόμενη εκμετάλλευση»: εκμετάλλευση στην οποία διατηρούνται υδρόβια ζώα και για την οποία, με οποιοδήποτε τρόπο, έχει αποδειχθεί ή υπάρχει ισχυρή υπόνοια ότι έχει μολυνθεί με λοιμώδες υλικό από εκμετάλλευση επισήμως χαρακτηρισμένη ως μολυσμένη.

ΜΕΡΟΣ 1

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΙΟΓΕΝΗ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΗ ΣΗΨΑΙΜΙΑ (VHS) ΚΑΙ ΤΗ ΛΟΙΜΩΔΗ ΑΙΜΑΤΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΝΕΚΡΩΣΗ (IHN)

- I. **Απαιτήσεις σχετικά με τα προγράμματα επιτήρησης και εξάλειψης για την απόκτηση και διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από τις ασθένειες VHS και IHN και σχετικά με τα μέτρα περιστολής για τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο**
- I.1. Γενικές απαιτήσεις σχετικά με τις υγειονομικές επιθεωρήσεις και τη δειγματοληψία για τις ασθένειες VHS και IHN:
- α) οι υγειονομικές επιθεωρήσεις και, κατά περίπτωση, η δειγματοληψία διενεργούνται κατά τη διάρκεια της περιόδου του έτους όπου η θερμοκρασία του νερού είναι χαμηλότερη από 14 °C ή όταν η θερμοκρασία του νερού είναι πιθανότερο να φθάσει τα χαμηλότερα ετήσια επίπεδα·
- β) όταν απαιτείται στοχευμένη επιτήρηση άγριων πληθυσμών σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, ο αριθμός και η γεωγραφική κατανομή των σημείων δειγματοληψίας καθορίζονται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται εύλογη κάλυψη του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος. Τα σημεία δειγματοληψίας είναι αντιπροσωπευτικά των διαφορετικών οικοσυστημάτων όπου βρίσκονται οι άγριοι πληθυσμοί ευπαθών ειδών·
- γ) όταν οι εκμεταλλεύσεις ή οι άγριοι πληθυσμοί πρέπει να υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις ή δειγματοληψίες περισσότερες από μία φορές ανά έτος, τα διαστήματα μεταξύ των υγειονομικών επιθεωρήσεων και της συλλογής δειγμάτων πρέπει να έχουν διάρκεια τουλάχιστον τεσσάρων μηνών και να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερα, λαμβανομένων υπόψη των απαιτήσεων που προβλέπονται στο στοιχείο α) όσον αφορά τη θερμοκρασία·
- δ) όλες οι μονάδες παραγωγής, όπως τεχνητές λίμνες, δεξαμενές και δικτυοκλωβοί, υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν παρουσία ιχθύων νεκρών, αδύναμων ή με ασυνήθη συμπεριφορά. Δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στο σημείο απορροής του νερού όπου τείνουν να συγκεντρώνονται αδύναμοι ιχθύες λόγω του υδατικού ρεύματος·
- ε) οι ιχθύες ευπαθών ειδών που συλλέγονται για δειγματοληψία επιλέγονται ως εξής:
- i) εάν υπάρχουν ιριδίζουσες πέστροφες, επιλέγονται για δειγματοληψία μόνο ιχθύες αυτού του είδους, εκτός εάν υπάρχουν άλλα ευπαθή είδη τα οποία παρουσιάζουν τυπικά συμπτώματα VHS ή IHN· εάν δεν υπάρχουν ιριδίζουσες πέστροφες, το δείγμα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό όλων των λοιπών ευπαθών ειδών που υπάρχουν·
- ii) εάν υπάρχουν ιχθύες αδύναμοι, με ασυνήθη συμπεριφορά, ή πρόσφατα νεκροί (αλλά όχι σε αποσύνθεση), επιλέγονται τέτοιου είδους ιχθύες· εάν για την παραγωγή ιχθύων χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία πηγές νερού, στο δείγμα συμπεριλαμβάνονται ιχθύες που αντιπροσωπεύουν όλες τις πηγές νερού·
- iii) οι ιχθύες που επιλέγονται περιλαμβάνουν ιχθύς που έχουν συλλεχθεί κατά τρόπο ώστε στο δείγμα να αντιπροσωπεύονται κατ' αναλογία όλα τα τμήματα της εκμετάλλευσης, καθώς και όλες οι ηλικιακές κλάσεις.
- I.2. Ειδικές απαιτήσεις για την απόκτηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες (κατηγορία I) όσον αφορά τη VHS και την IHN
- I.2.1. Προγράμματα επιτήρησης:
- α) ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III, όπως αναφέρεται στο μέρος Β του παραρτήματος III της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, όσον αφορά τη VHS ή την IHN ή αμφότερες, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, υπό την προϋπόθεση ότι όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος συμμορφώνονται με τις απαιτήσεις που προβλέπονται στο παράρτημα V της εν λόγω οδηγίας και όλες αυτές οι εκμεταλλεύσεις και, όταν απαιτείται βάσει του παραρτήματος V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της εν λόγω οδηγίας, τα σημεία δειγματοληψίας σε άγριους πληθυσμούς που επιλέγονται σύμφωνα με το εν λόγω μέρος, υπόκεινται σε ένα από τα ακόλουθα προγράμματα επιτήρησης:

i) υπόδειγμα Α — διετές πρόγραμμα επιτήρησης:

Οι εκμεταλλεύσεις ή τα σημεία δειγματοληψίας πρέπει να έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο δύο συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 1.Α που παρατίθεται στο τμήμα ΙΙ.

Κατά τη διάρκεια της εν λόγω διετούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο ΙΙ.2 πρέπει να έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙΗΝ ή αμφότερες και οποιαδήποτε υπόνοια είτε για VHS είτε για ΙΗΝ ή αμφότερες πρέπει να έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις μεθόδους δειγματοληψίας και διάγνωσης που προβλέπονται στο σημείο ΙΙ.3·

ii) υπόδειγμα Β — τετραετές πρόγραμμα επιτήρησης με μειωμένο μέγεθος δείγματος:

Οι εκμεταλλεύσεις ή τα σημεία δειγματοληψίας πρέπει να έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο τεσσάρων συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 1.Β που παρατίθεται στο τμήμα ΙΙ.

Κατά τη διάρκεια της εν λόγω τετραετούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο ΙΙ.2 πρέπει να έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙΗΝ ή αμφότερες και οποιαδήποτε υπόνοια είτε για VHS είτε για ΙΗΝ ή αμφότερες πρέπει να έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις μεθόδους δειγματοληψίας και διάγνωσης που προβλέπονται στο σημείο ΙΙ.3·

β) εάν κατά τη διάρκεια εφαρμογής του προγράμματος επιτήρησης που αναφέρεται στο στοιχείο α) επιβεβαιωθεί λοίμωξη είτε με VHS είτε με ΙΗΝ ή αμφότερες σε εκμετάλλευση η οποία περιλαμβάνεται στο εν λόγω πρόγραμμα επιτήρησης, και ως εκ τούτου ανακληθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας ΙΙ της εκμετάλλευσης, η εν λόγω εκμετάλλευση δύναται να επανακτηθεί αμέσως το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας ΙΙ και να συνεχίσει την εφαρμογή του προγράμματος επιτήρησης προκειμένου να αποκτήσει καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες χωρίς να εφαρμόσει πρόγραμμα εξάλειψης όπως προβλέπεται στο σημείο Ι.2.2, υπό τον όρο ότι η εκμετάλλευση πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

i) είναι ηπειρωτική εκμετάλλευση της οποίας το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙΗΝ ή αμφότερες είναι ανεξάρτητο από το υγειονομικό καθεστώς των πληθυσμών υδρόβιων ζώων στα φυσικά ύδατα που την περιβάλλουν όσον αφορά τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος ΙΙ σημείο 3 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ·

ii) η εκμετάλλευση εκκενώθηκε, καθαρίστηκε, απολυμάνθηκε και τέθηκε σε ανάπαυση· η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων·

iii) επαναπληρώθηκε με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας Ι όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙΗΝ ή αμφότερες.

Ι.2.2. Προγράμματα εξάλειψης

Ι.2.2.1. Γενικές απαιτήσεις

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙΗΝ ή αμφότερες, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας Ι όσον αφορά τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, υπό την προϋπόθεση ότι όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος ΙΙ του παραρτήματος ΙV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος έχουν υποβληθεί σε πρόγραμμα εξάλειψης που πληροί τις προϋποθέσεις των στοιχείων α) έως ε):

α) τα ελάχιστα μέτρα ελέγχου που προβλέπονται στο τμήμα 4 του κεφαλαίου V της οδηγίας 2006/88/ΕΚ πρέπει να έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά και πρέπει να έχει οριστεί περιοχή περιστολής, όπως αναφέρεται στο άρθρο 32 στοιχείο β) της εν λόγω οδηγίας, συμπεριλαμβανομένης ζώνης προστασίας και ζώνης επίβλεψης περίε της εκμετάλλευσης ή των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες είτε με VHS είτε με ΙΗΝ ή με αμφότερες τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο

Η περιοχή περιστολής πρέπει να έχει οριστεί κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη παραγόντων που επηρεάζουν τους κινδύνους διάδοσης της ασθένειας που περιλαμβάνεται στον κατάλογο στους εκτρεφόμενους ιχθύς και στους άγριους πληθυσμούς, όπως: ο αριθμός, η αναλογία και η κατανομή των κρουσμάτων θανάτου ιχθύων στην εκμετάλλευση που έχει μολυνθεί είτε με VHS είτε με ΙΗΝ ή αμφότερες· η απόσταση από τις γειτονικές εκμεταλλεύσεις και η πυκνότητα των τελευταίων· η εγγύτητα σε σφαγεία· οι εφαπτόμενες εκμεταλλεύσεις· τα είδη που φιλοξενούν οι εκμεταλλεύσεις· οι πρακτικές καλλιέργειας που εφαρμόζονται στις πληγείσες εκμεταλλεύσεις και σε εκμεταλλεύσεις γειτονικές προς τις πληγείσες· οι υδροδυναμικές συνθήκες και άλλοι σημαντικοί από επιδημιολογική άποψη παράγοντες.

Για τον καθορισμό των ζωνών προστασίας και επίβλεψης ισχύουν οι ακόλουθες ελάχιστες απαιτήσεις όσον αφορά τη γεωγραφική οριοθέτηση των εν λόγω ζωνών:

i) η ζώνη προστασίας ορίζεται σε άμεση γειτνίαση με την εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη είτε με VHS είτε με IHN ή αμφότερες τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο και αντιστοιχεί:

(1) σε παράκτιες περιοχές: σε ζώνη που περιέχεται σε κύκλο ακτίνας τουλάχιστον ίσης με την απόσταση μετακίνησης της παλίρροιας ή τουλάχιστον 5 χιλιομέτρων, όποια είναι μεγαλύτερη, με κέντρο την εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη είτε με VHS είτε με IHN ή αμφότερες, ή ισοδύναμη ζώνη που καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων·

(2) σε περιοχές της ενδοχώρας: σε ολόκληρη τη λεκάνη απορροής της εκμετάλλευσης που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με VHS ή IHN ή αμφότερες· η αρμόδια αρχή δύναται να περιορίσει την επέκταση της ζώνης σε τμήματα της λεκάνης απορροής, ή στην περιοχή της εκμετάλλευσης, υπό τον όρο ότι δεν τίθεται σε κίνδυνο η πρόληψη της διάδοσης είτε της VHS είτε της IHN ή αμφότερων·

ii) η ζώνη επίβλεψης ορίζεται από την αρμόδια αρχή εξωτερικά της ζώνης προστασίας και αντιστοιχεί:

(1) σε παράκτιες περιοχές: σε ζώνη η οποία, περιβάλλοντας τη ζώνη προστασίας, επικαλύπτει τις ζώνες μετακίνησης της παλίρροιας· ή σε ζώνη η οποία περιβάλλει τη ζώνη προστασίας και περιέχεται σε κύκλο ακτίνας 10 km από το κέντρο της ζώνης προστασίας· ή σε ισοδύναμη ζώνη που έχει καθοριστεί βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων·

(2) σε περιοχές της ενδοχώρας: σε εκτεταμένη ζώνη εκτός της καθορισθείσας ζώνης προστασίας·

β) όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός της ζώνης προστασίας και οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες είτε με VHS είτε με IHN ή αμφότερες, υπόκεινται σε εντεταλμένη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

i) συλλογή δειγμάτων προς εξέταση, τα οποία περιλαμβάνουν 10 ιχθύς όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε λοίμωξη είτε με VHS είτε με IHN ή αμφότερες, ή τουλάχιστον 30 ιχθύς όταν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα·

ii) μία υγειονομική επιθεώρηση: στις εκμεταλλεύσεις όπου έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα από τις εξετάσεις που αναφέρονται στο σημείο i)· οι υγειονομικές επιθεωρήσεις συνεχίζονται μία φορά ανά μήνα κατά τη διάρκεια της περιόδου του έτους όπου η θερμοκρασία του νερού είναι χαμηλότερη από 14 °C, εκτός εάν οι τεχνητές λίμνες ιχθυοκαλλιέργειας ή οι δικτυοκλωβοί καλύπτονται με πάγο, έως την ανάκληση της ζώνης προστασίας σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ)·

γ) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες είτε με VHS είτε με IHN ή αμφότερες εκκενώνονται, καθαρίζονται, απολυμνίζονται και τίθενται σε ανάπαυση. Η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων. Όταν εκκενωθούν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες εντός της ίδιας ζώνης προστασίας, εφαρμόζεται συγχρονισμένη ανάπαυση διάρκειας τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Η παρούσα παράγραφος εφαρμόζεται επίσης στην περίπτωση νέων εκμεταλλεύσεων που χαρακτηρίζονται επισήμως ως μολυσμένες κατά τη διάρκεια της εφαρμογής του προγράμματος εξάλειψης.

Όταν τίθενται σε ανάπαυση οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες, οι ζώνες προστασίας μετατρέπονται σε ζώνες επίβλεψης.

Η αρμόδια αρχή δύναται να αποφασίσει να ζητήσει την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση και άλλων εκμεταλλεύσεων εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης. Η διάρκεια της περιόδου ανάπαυσης για τις εν λόγω εκμεταλλεύσεις καθορίζεται από την αρμόδια αρχή κατόπιν εκτίμησης του κινδύνου κατά περίπτωση.

δ) όλες οι εκμεταλλεύσεις που χαρακτηρίζονται επισήμως ως μολυσμένες είτε με VHS είτε με IHN ή αμφότερες τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο και όλες οι εκμεταλλεύσεις που τίθενται σε ανάπαυση εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης όπως αναφέρονται στο στοιχείο γ) επαναπληρούνται με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες (κατηγορία I) όσον αφορά είτε τη VHS είτε την IHN ή αμφότερες.

Η επανεισαγωγή των πληθυσμών ιχθύων πραγματοποιείται μόνον όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες έχουν εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ).

- ε) όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος που καλύπτεται από το πρόγραμμα εξάλειψης και, όταν απαιτείται επιτήρηση άγριων πληθυσμών, τα σημεία δειγματοληψίας που επιλέγονται σύμφωνα με το σημείο I.1, υπόκεινται στη συνέχεια στο σύστημα εποπτείας που προβλέπεται στο σημείο I.2.1.

I.2.2.2. Απαιτήσεις όσον αφορά την αποκατάσταση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για ηπειρωτικά διαμερίσματα που περιλαμβάνουν μία και μόνο εκμετάλλευση η οποία προηγουμένως είχε χαρακτηριστεί ως απαλλαγμένη είτε από ΙHN είτε από VHS ή αμφότερες

Ένα ηπειρωτικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει μία και μόνο εκμετάλλευση η οποία προηγουμένως είχε χαρακτηριστεί ως απαλλαγμένη είτε από VHS είτε από ΙHN ή αμφότερες τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο και της οποίας το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά τις εν λόγω ασθένειες είναι ανεξάρτητο από τα φυσικά ύδατα που την περιβάλλουν σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος II σημείο 3 της οδηγίας 2006/88/EK, και της οποίας το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I έχει ανακληθεί σύμφωνα με το άρθρο 53 παράγραφος 3 της εν λόγω οδηγίας, δύναται να επανακτήσει το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I αμέσως μόλις η αρμόδια αρχή επιβεβαιώσει ότι πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

- α) η εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη είτε με VHS είτε με ΙHN ή αμφότερες έχει εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και έχει τεθεί σε ανάπαυση· η περίοδος ανάπαυσης πρέπει να έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων·
- β) η εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη είτε με VHS είτε με ΙHN ή αμφότερες έχει επαναπληρωθεί με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη VHS ή την ΙHN ή αμφότερες.

I.3. Ειδικές απαιτήσεις για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες (κατηγορία I) όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙHN ή αμφότερες

Όταν απαιτείται στοχοθετημένη επιτήρηση προκειμένου να διατηρηθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, όπως προβλέπεται στο άρθρο 52 της οδηγίας 2006/88/EK, όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας, εντός του οικείου κράτους μέλους, ζώνης ή διαμερίσματος, υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και διενεργείται δειγματοληψία στους ιχθύς σύμφωνα με τον πίνακα 1.Γ που παρατίθεται στο τμήμα II του παρόντος μέρους, λαμβανομένου υπόψη του επιπέδου κινδύνου της εκμετάλλευσης για λοίμωξη είτε από VHS είτε από ΙHN ή αμφότερες τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο.

Κατά τον προσδιορισμό της συχνότητας των υγειονομικών επιθεωρήσεων στα διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙHN ή αμφότερες τα οποία βρίσκονται σε ηπειρωτικές περιοχές και στα οποία το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά τη VHS ή την ΙHN εξαρτάται από το υγειονομικό καθεστώς των πληθυσμών υδρόβιων ζώων στα φυσικά ύδατα που περιβάλλουν τα εν λόγω διαμερίσματα, σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος II σημείο 2 της οδηγίας 2006/88/EK, ο κίνδυνος λοίμωξης είτε από VHS είτε από ΙHN ή αμφότερες θεωρείται υψηλός.

Το καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες διατηρείται μόνον εφόσον για όλα τα δείγματα που θα ελεγχθούν με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 προκύψουν αρνητικά αποτελέσματα είτε για VHS είτε για ΙHN ή αμφότερες τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο και εφόσον αποκλειστεί οποιαδήποτε υπόνοια είτε για VHS είτε για ΙHN ή αμφότερες σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3.

I.4. Απαιτήσεις σχετικά με την άρση των μέτρων περιστολής που προβλέπονται στο άρθρο 39 της οδηγίας 2006/88/EK, και ειδικότερα για τη μετάβαση από το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V στο υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙHN ή αμφότερες δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά τις εν λόγω ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, υπό την προϋπόθεση ότι:

- α) πληρούνται οι απαιτήσεις που προβλέπονται στο σημείο I.2.2.1 στοιχεία α), β) και γ). Σε περίπτωση που η θέση σε ανάπαυση δεν είναι τεχνικώς εφικτή, οι εμπλεκόμενες εκμεταλλεύσεις υπόκεινται σε εναλλακτικό μέτρο που παρέχει σχεδόν παρόμοια εγγύηση εξάλειψης είτε του ΙHNV είτε του VHSV ή αμφότερων από το περιβάλλον της εκμετάλλευσης·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες και όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν τεθεί σε ανάπαυση/έχουν υποβληθεί σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης έχουν επαναπληρωθεί με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, II ή III όσον αφορά είτε τη VHS είτε την ΙHN ή αμφότερες·

- γ) η επαναπλήρωση έχει λάβει χώρα μόνο μετά την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση/υποβολή σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) όλων των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες.

II. Μέθοδοι δειγματοληψίας και διάγνωσης

II.1. Όργανα που επιλέγονται προς δειγματοληψία:

Το ιστολογικό υλικό προς εξέταση είναι σπλήνα, πρόσθιο νεφρό και εγκέφαλος ή καρδιά. Κατά τη δειγματοληψία γεννητόρων μπορεί επίσης να εξεταστεί ωοθηκικό ή σπερματικό υγρό.

Στην περίπτωση ιχθυδίων, ολόκληροι ιχθύες μικρότεροι από 4 cm μπορούν να τεμαχίζονται με αποστειρωμένο ψαλίδι ή νυστέρι μετά την αφαίρεση του σώματος που βρίσκεται όπισθεν του ανοίγματος των εντοσθίων. Εάν το δείγμα αποτελείται από ολόκληρους ιχθύς με μήκος σώματος μεταξύ 4 και 6 cm, συλλέγονται τα εντόσθια, συμπεριλαμβανομένου του νεφρού.

Τμήματα οργάνων από 10 ιχθύς κατά το μέγιστο μπορούν να αποτελέσουν ένα ενοποιημένο δείγμα.

II.2. Διαγνωστικές μέθοδοι για την απόκτηση και διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες είτε για τη VHS είτε για την IHN ή αμφότερες

Η διαγνωστική μέθοδος, σύμφωνα με τις εγκεκριμένες διαγνωστικές μεθόδους και διαδικασίες που ορίζονται στο παράρτημα II μέρος 1 σημείο I., για την απόκτηση ή διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για τη VHS ή την IHN ή αμφότερες είναι είτε:

- α) η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια ακολουθούμενη από ταυτοποίηση με τη χρήση ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA), δοκιμής έμμεσα φθορίζοντων αντισωμάτων (IFAT), δοκιμής εξουδετέρωσης ιού ή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)· είτε

β) RT-qPCR.

II.3. Μέθοδοι δειγματοληψίας και διάγνωσης για τον αποκλεισμό ή την επιβεβαίωση της παρουσίας VHS ή IHN

Όταν απαιτείται η επιβεβαίωση ή ο αποκλεισμός υπόνοιας είτε για VHS είτε για IHN ή αμφότερες σύμφωνα με το άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/EK, τηρούνται οι ακόλουθες διαδικασίες επιθεώρησης, δειγματοληψίας και δοκιμής:

- α) η εκμετάλλευση για την οποία υπάρχει υπόνοια υποβάλλεται σε τουλάχιστον μία υγειονομική επιθεώρηση και σε συλλογή δείγματος 10 ιχθύων όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε λοίμωξη είτε από VHS είτε από IHN ή αμφότερες, ή τουλάχιστον 30 ιχθύων όταν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα. Τα δείγματα εξετάζονται με τη χρήση μιας ή περισσότερων διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στα σημεία i) και ii) σύμφωνα με τις λεπτομερείς διαγνωστικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο παράρτημα II μέρος 1 τμήμα II:

(i) συμβατική απομόνωση ιού σε κυτταροκαλλιέργεια, ακολουθούμενη από ανοσοχημική ή μοριακή ταυτοποίηση του ιού·

(ii) ανίχνευση ιού με RT-qPCR·

(iii) άλλες διαγνωστικές τεχνικές αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας, όπως δοκιμή έμμεσα φθορίζοντων αντισωμάτων (IFAT), ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (ELISA), RT-PCR και ανοσοϊστοχημεία (IHC).

- β) η παρουσία VHS θεωρείται επιβεβαιωμένη εάν μία ή περισσότερες από τις εν λόγω διαγνωστικές μεθόδους είναι θετική/-ές για VHSV. Η παρουσία IHN θεωρείται επιβεβαιωμένη εάν μία ή περισσότερες από τις εν λόγω διαγνωστικές μεθόδους είναι θετική/-ές για IHNV. Η επιβεβαίωση του πρώτου κρούσματος VHS ή IHN σε κράτος μέλος, ζώνη ή διαμέρισμα που προηγουμένως δεν ήταν μολυσμένο βασίζεται σε συμβατική απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια ή RT-qPCR·

- γ) η υπόνοια είτε για VHSV είτε για IHNV ή αμφότερους μπορεί να αποκλειστεί εάν από την καλλιέργεια κυττάρων ή τις δοκιμές RT-qPCR δεν προκύψουν περαιτέρω αποδείξεις της παρουσίας είτε VHSV είτε IHNV ή αμφότερων.

Πίνακας 1.A

Σύστημα εποπτείας ζωνών και διαμερισμάτων για την αναφερόμενη στο σημείο I.2.1 στοιχείο α) σημείο i) διετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για τη VHS ή την IHN

Είδος εκμετάλλευσης	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων ανά έτος (δύο έτη)	Αριθμός δειγματοληψιών ανά έτος (δύο έτη)	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα (1)	
			Αριθμός αναπτυσσόμενων ιχθύων	Αριθμός γεννητόρων (2)
α) Εκμεταλλεύσεις με γεννήτορες	2	2	50 (πρώτη επιθεώρηση) 75 (δεύτερη επιθεώρηση)	30 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση) 0 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση)
β) Εκμεταλλεύσεις μόνο με γεννήτορες	2	1	0	75 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση)
γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γεννήτορες	2	2	75 (3) (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση)	0

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 10

(1) Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται το νωρίτερο τρεις εβδομάδες μετά τη μεταφορά των ιχθύων από γλυκό σε θαλασσινό νερό.

(2) Ωοθηκικό ή σπερματικό υγρό των γεννητόρων συλλέγεται κατά τον χρόνο ωρίμανσης, σε συνάρτηση με την αφαίρεση των αυγών.

(3) Πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από αριθμό ιχθύων ικανό να διασφαλίσει την ανίχνευση VHSV ή IHNV με ποσοστό εμπιστοσύνης 95 % εάν ο ονομαστικός επιπολασμός είναι 5 %.

Πίνακας 1.B

Σύστημα εποπτείας με περιορισμένο μέγεθος δείγματος για την αναφερόμενη στο σημείο I.2.1 στοιχείο α) σημείο ii) τετραετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για τη VHS ή την IHN

Είδος εκμετάλλευσης	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός δειγματοληψιών ανά έτος	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα (1)	
			Αριθμός αναπτυσσόμενων ιχθύων	Αριθμός γεννητόρων (2)
Πρώτα δύο έτη της περιόδου επιτήρησης				
α) Εκμεταλλεύσεις με γεννήτορες	2	1	0 (πρώτη επιθεώρηση) 30 (δεύτερη επιθεώρηση)	0 (πρώτη επιθεώρηση) 0 (δεύτερη επιθεώρηση)
β) Εκμεταλλεύσεις μόνο με γεννήτορες	2	1	0	30 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση)
γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γεννήτορες	2	1	30 (3) (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση)	0
Τελευταία δύο έτη της περιόδου επιτήρησης				
α) Εκμεταλλεύσεις με γεννήτορες	2	2	30 (πρώτη επιθεώρηση) 0 (δεύτερη επιθεώρηση)	0 (πρώτη επιθεώρηση) 30 (δεύτερη επιθεώρηση)

Είδος εκμετάλλευσης	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός δειγματοληψιών ανά έτος	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα ⁽¹⁾	
			Αριθμός αναπτυσσόμενων ιχθύων	Αριθμός γεννητόρων ⁽²⁾
β) Εκμεταλλεύσεις μόνο με γεννητόρες	2	2		30 (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση)
γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γεννητόρες	2	2	30 ⁽³⁾ (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση)	

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 10

⁽¹⁾ Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται το νωρίτερο τρεις εβδομάδες μετά τη μεταφορά των ιχθύων από γλυκό σε θαλασσινό νερό.

⁽²⁾ Ωθητικό ή σπερματικό υγρό των γεννητόρων συλλέγεται κατά τον χρόνο ωρίμανσης, σε συνάρτηση με την αφαίρεση των αυγών.

⁽³⁾ Πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από αριθμό ιχθύων ικανό να διασφαλίσει την ανίχνευση VHSV ή IHNV με ποσοστό εμπιστοσύνης 95 % εάν ο ονομαστικός επιπολασμός είναι 10 %.

Πίνακας 1.Γ

Συστήματα εποπτείας ζωνών ή διαμερισμάτων για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για τη VHS ή την IHN όπως αναφέρεται στο σημείο I.3

Επίπεδο κινδύνου	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα ⁽³⁾
Υψηλό	2 ανά έτος	30 ⁽¹⁾ ⁽²⁾
Μεσαίο	1 ανά έτος	30 ⁽¹⁾
Χαμηλό	1 ανά διετία	30 ⁽¹⁾

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 10

⁽¹⁾ Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται το νωρίτερο τρεις εβδομάδες μετά τη μεταφορά των ιχθύων από γλυκό σε θαλασσινό νερό.

⁽²⁾ Πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από αριθμό ιχθύων ικανό να διασφαλίσει την ανίχνευση VHSV ή IHNV με ποσοστό εμπιστοσύνης 95 % εάν ο ονομαστικός επιπολασμός είναι 10 %.

⁽³⁾ Σε κάθε υγειονομική επιθεώρηση υπάρχει τουλάχιστον ένα δείγμα.

ΜΕΡΟΣ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΕΡΠΗΤΑ ΤΟΥ ΨΑΡΙΟΥ ΣΑΖΑΝΙ (KHVD)

I. Απαιτήσεις σχετικά με τα προγράμματα επιτήρησης και εξάλειψης για την απόκτηση και διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από τη νόσο KHVD και για την περιστατική λοίμωξη με τον ιό του έρπητα του ψαριού σαζάνι (KHV)

I.1. Γενικές απαιτήσεις

Όταν απαιτείται στοχευμένη επιτήρηση άγριων πληθυσμών σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, ο αριθμός και η γεωγραφική κατανομή των σημείων δειγματοληψίας καθορίζονται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται εύλογη κάλυψη του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερισματος. Τα σημεία δειγματοληψίας είναι επίσης αντιπροσωπευτικά των διαφορετικών οικοσυστημάτων όπου βρίσκονται οι άγριοι πληθυσμοί ευπαθών ειδών, και ειδικότερα των ποτάμιων συστημάτων και των λιμνών.

Η στοχοδετημένη επιτήρηση βασίζεται στην τακτική παρακολούθηση τόπων όπου συγκεντρώνονται ευπαθή είδη. Οι τόποι αυτοί παρακολουθούνται όταν η θερμοκρασία του νερού έχει φθάσει σε επίπεδα που επιτρέπουν την ανάπτυξη της ασθένειας (> 15 °C) και το νωρίτερο δύο εβδομάδες μετά την ημερομηνία κατά την οποία καταγράφεται η εν λόγω θερμοκρασία. Λαμβάνονται δείγματα και πραγματοποιούνται δοκιμές σε ιχθύς που εμφανίζουν ασθένεια ή ασυνήθη συμπεριφορά στην εκάστοτε τοποθεσία.

Εάν είναι δυνατόν, γίνεται δειγματοληψία από ιχθύς που έχουν διατηρηθεί για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στο επιτρεπτό εύρος θερμοκρασίας του ιού, ήτοι δύο έως τρεις εβδομάδες στους 15 °C έως 26 °C. Ωστόσο, μπορεί να γίνει δεκτή η ακόλουθη προσέγγιση:

- α) συγκέντρωση υποπληθυσμού κατά τη μεταφορά από χειμερινές σε θερινές δεξαμενές και διατήρηση των ιχθύων στην ίδια υδάτινη μάζα όπως στη θερινή δεξαμενή έως ότου η θερμοκρασία φθάσει στα ελάχιστα απαιτούμενα επίπεδα, ή
- β) συλλογή δειγμάτων κατά τη συγκομιδή ή άλλη δραστηριότητα διακίνησης ιχθύων ως μέρος συνήθων πρακτικών διαχείρισης. Εάν είναι δυνατόν, τα δείγματα συλλέγονται 24 έως 72 ώρες μετά την εφαρμογή των εν λόγω πρακτικών διαχείρισης ώστε να ενισχυθεί η πιθανότητα ανίχνευσης του KHV.

Όταν οι εκμεταλλεύσεις ή οι άγριοι πληθυσμοί πρέπει να υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις ή δειγματοληψίες περισσότερες από μία φορές ανά έτος, τα διαστήματα μεταξύ των υγειονομικών επιθεωρήσεων ή της συλλογής δειγμάτων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερα κατά την εποχή που η θερμοκρασία του νερού είναι πιθανότερο να φθάσει τα υψηλότερα ετήσια επίπεδα χωρίς να υπερβαίνει το όριο των 28 °C.

Όλες οι μονάδες παραγωγής, όπως τεχνητές λίμνες και δεξαμενές, πρέπει να υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν παρουσία ιχθύων νεκρών, αδύναμων ή με ασυνήθη συμπεριφορά.

Ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) και τα υβρίδιά του (π.χ. *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*), συλλέγονται προς δειγματοληψία όταν υπάρχουν στην εκμετάλλευση.

Οι ιχθύες που συλλέγονται για δειγματοληψία επιλέγονται ως εξής:

- i) εάν υπάρχουν ιχθύες αδύναμοι, με ασυνήθη συμπεριφορά, ή πρόσφατα νεκροί (αλλά όχι σε αποσύνθεση), πρέπει να επιλέγονται τέτοιου είδους ιχθύες·
- ii) εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία πηγές νερού για την παραγωγή ιχθύων, στο δείγμα πρέπει να περιλαμβάνονται ιχθύες που αντιπροσωπεύουν όλες τις πηγές νερού·
- iii) στους επιλεγόμενους ιχθύς πρέπει να περιλαμβάνονται ιχθύες που έχουν συλλεχθεί κατά τρόπο ώστε στο δείγμα να αντιπροσωπεύονται κατ' αναλογία όλα τα τμήματα της εκμετάλλευσης, καθώς και όλες οι ηλικιακές κλάσεις.

I.2. Ειδικές απαιτήσεις για την απόκτηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες (κατηγορία I) όσον αφορά την KHVD

I.2.1. Προγράμματα επιτήρησης

α) ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά την KHVD, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος συμμορφώνονται με τις απαιτήσεις σχετικά με το καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες που προβλέπονται στο παράρτημα V της εν λόγω οδηγίας και όλες αυτές οι εκμεταλλεύσεις και, όταν απαιτείται βάσει του παραρτήματος V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της εν λόγω οδηγίας, τα σημεία δειγματοληψίας σε άγριους πληθυσμούς που επιλέγονται σύμφωνα με το εν λόγω μέρος, υπόκεινται σε ένα από τα ακόλουθα προγράμματα επιτήρησης:

- i) υπόδειγμα A — διετές πρόγραμμα επιτήρησης:

Οι εκμεταλλεύσεις ή τα σημεία δειγματοληψίας πρέπει να έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο δύο συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 2.A που παρατίθεται στο τμήμα III.

Κατά τη διάρκεια της εν λόγω διετούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 πρέπει να έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά τον ιό KHV και οποιαδήποτε υπόνοια για KHVD πρέπει να έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο III.2.

ii) υπόδειγμα Β — τετραετές πρόγραμμα επιτήρησης με μειωμένο μέγεθος δείγματος:

Οι εκμεταλλεύσεις ή τα σημεία δειγματοληψίας πρέπει να έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο τεσσάρων συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 2.Β που παρατίθεται στο τμήμα ΙΙΙ.

Κατά τη διάρκεια της εν λόγω τετραετούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο ΙΙ.2 πρέπει να έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα για ΚΗV και οποιαδήποτε υπόνοια για ΚΗVΔ πρέπει να έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο ΙΙΙ.2.

β) εάν κατά τη διάρκεια εφαρμογής του τετραετούς προγράμματος επιτήρησης που αναφέρεται στο στοιχείο α) επιβεβαιωθεί λοίμωξη από τον ιό ΚΗV σε εκμετάλλευση η οποία περιλαμβάνεται στο εν λόγω πρόγραμμα επιτήρησης, και ως εκ τούτου ανακληθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας ΙΙ της εκμετάλλευσης, η εν λόγω εκμετάλλευση δύναται να επανακτήσει αμέσως το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας ΙΙ και να συνεχίσει την εφαρμογή του προγράμματος επιτήρησης προκειμένου να αποκτήσει καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες χωρίς να εφαρμόσει πρόγραμμα εξάλειψης όπως περιγράφεται στο σημείο Ι.2.2, υπό τον όρο ότι η εκμετάλλευση πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- i) είναι ηπειρωτική εκμετάλλευση της οποίας το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά την ΚΗVΔ είναι ανεξάρτητο από το υγειονομικό καθεστώς των πληθυσμών υδρόβιων ζώων στα φυσικά ύδατα που την περιβάλλουν όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος ΙΙ σημείο 3 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ.
- ii) η εκμετάλλευση έχει εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση· η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων.
- iii) επαναπληρώθηκε με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας Ι όσον αφορά την ΚΗVΔ.

Ι.2.2. Προγράμματα εξάλειψης

Ι.2.2.1. Γενικές απαιτήσεις

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά την ΚΗVΔ, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας Ι όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος ΙΙ του παραρτήματος ΙV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος έχουν υποβληθεί τουλάχιστον στο ακόλουθο πρόγραμμα εξάλειψης:

α) τα ελάχιστα μέτρα ελέγχου που προβλέπονται στο τμήμα 4 του κεφαλαίου V της οδηγίας 2006/88/ΕΚ έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά και έχει οριστεί περιοχή περιστολής, όπως αναφέρεται στο άρθρο 32 στοιχείο β) της εν λόγω οδηγίας, συμπεριλαμβανομένης ζώνης προστασίας και ζώνης επίβλεψης περίεξ της εκμετάλλευσης ή των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με ΚΗV.

Η περιοχή περιστολής πρέπει να έχει οριστεί κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη παραγόντων που επηρεάζουν τους κινδύνους διάδοσης της ΚΗVΔ στους εκτρεφόμενους ιχθύς και στους άγριους πληθυσμούς, όπως: ο αριθμός, η αναλογία και η κατανομή των κρουσμάτων θανάτου ιχθύων στην εκμετάλλευση που έχει μολυνθεί με ΚΗV· η απόσταση από τις γειτονικές εκμεταλλεύσεις και η πυκνότητα των τελευταίων· η εγγύτητα σε σφαγεία· οι εφαπτόμενες εκμεταλλεύσεις· τα είδη που φιλοξενούν οι εκμεταλλεύσεις· οι πρακτικές καλλιέργειας που εφαρμόζονται στις πληγείσες και σε γειτονικές εκμεταλλεύσεις· οι υδροδυναμικές συνθήκες και άλλοι σημαντικοί από επιδημιολογική άποψη παράγοντες.

Για τον καθορισμό των ζωνών προστασίας και επίβλεψης ισχύουν οι ακόλουθες ελάχιστες απαιτήσεις όσον αφορά τη γεωγραφική οριοθέτηση των εν λόγω ζωνών:

- i) η ζώνη προστασίας ορίζεται σε άμεση γειτνίαση με την εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με ΚΗV και αντιστοιχεί σε ολόκληρη τη λεκάνη απορροής της εκμετάλλευσης που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με ΚΗV· η αρμόδια αρχή δύναται να περιορίσει την επέκταση της ζώνης σε τμήματα της λεκάνης απορροής, υπό τον όρο ότι δεν τίθεται σε κίνδυνο η πρόληψη της διάδοσης της ΚΗVΔ.
- ii) η ζώνη επίβλεψης ορίζεται εξωτερικά της ζώνης προστασίας και αντιστοιχεί σε εκτεταμένη ζώνη περίεξ της καθορισθείσας ζώνης προστασίας.

- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός της ζώνης προστασίας και οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με KHV υπόκεινται σε εντεταλμένη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:
- i) συλλογή δειγμάτων προς εξέταση, τα οποία περιλαμβάνουν 10 ιχθύς όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε KHVD, ή 30 ιχθύς όταν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα·
 - ii) μία υγειονομική επιθεώρηση· στις εκμεταλλεύσεις όπου έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα από τις εξετάσεις που αναφέρονται στο σημείο III.2· οι υγειονομικές επιθεωρήσεις συνεχίζονται μία φορά ανά μήνα κατά τη διάρκεια της εποχής του έτους όπου η θερμοκρασία του νερού είναι πιθανότερο να φθάσει τους > 15 °C, έως την ανάκληση της ζώνης προστασίας σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ)·
- γ) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με KHV εκκενώνονται, καθαρίζονται, απολυμνούνται και τίθενται σε ανάπαυση. Η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων. Όταν εκκενωθούν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες εντός της ίδιας ζώνης προστασίας, εφαρμόζεται συγχρονισμένη ανάπαυση διάρκειας τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Η παρούσα παράγραφος εφαρμόζεται επίσης στην περίπτωση νέων εκμεταλλεύσεων που χαρακτηρίζονται επισήμως ως μολυσμένες κατά τη διάρκεια της εφαρμογής του προγράμματος εξάλειψης.
- Όταν τίθενται σε ανάπαυση οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες, οι ζώνες προστασίας μετατρέπονται σε ζώνες επίβλεψης.
- Η αρμόδια αρχή δύναται να αποφασίσει να ζητήσει την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση και άλλων εκμεταλλεύσεων εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης. Η διάρκεια της περιόδου ανάπαυσης καθορίζεται από την αρμόδια αρχή κατόπιν εκτίμησης του κινδύνου κατά περίπτωση.
- δ) Όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με KHV και όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν τεθεί σε ανάπαυση εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης επαναπληρώνονται:
- i) με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την KHVD· ή
 - ii) για μεταβατική περίοδο έως τις 31 Δεκεμβρίου 2020, με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με εγκεκριμένο πρόγραμμα επιτήρησης της KHVD.
- Η επανεισαγωγή των πληθυσμών ιχθύων πραγματοποιείται μόνον όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με KHV έχουν εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ)·
- ε) Όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος που καλύπτεται από το πρόγραμμα εξάλειψης και, όταν απαιτείται επιτήρηση άγριων πληθυσμών, τα σημεία δειγματοληψίας που επιλέγονται σύμφωνα με το σημείο I.1, υπόκεινται στη συνέχεια τουλάχιστον στο πρόγραμμα επιτήρησης που προβλέπεται στο σημείο I.2.1.

I.2.2.2. Απαιτήσεις όσον αφορά την αποκατάσταση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για ηπειρωτικά διαμερίσματα που περιλαμβάνουν μία και μόνο εκμετάλλευση η οποία προηγουμένως είχε χαρακτηριστεί ως απαλλαγμένη από KHVD

Ένα ηπειρωτικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει μία και μόνο εκμετάλλευση με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την KHVD και του οποίου το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά την KHVD είναι ανεξάρτητο από τα φυσικά ύδατα που το περιβάλλουν σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος II σημείο 3 της οδηγίας 2006/88/EK, και του οποίου το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I έχει ανακληθεί σύμφωνα με το άρθρο 53 παράγραφος 3 της εν λόγω οδηγίας, δύναται να επανακτήσει το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την KHVD αμέσως μόλις η αρμόδια αρχή επιβεβαιώσει ότι πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- α) έχει εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση· η περίοδος ανάπαυσης πρέπει να είχε διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων·
- β) επαναπληρώθηκε με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I ή διαμερίσματα με εγκεκριμένο πρόγραμμα επιτήρησης της KHVD (υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας II).

I.3. Ειδικές απαιτήσεις για τη διατήρηση του υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας I όσον αφορά την KHVD

Όταν απαιτείται στοχοθετημένη επιτήρηση προκειμένου να διατηρηθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, όπως προβλέπεται στο άρθρο 52 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας, εντός του οικείου κράτους μέλους, ζώνης ή διαμερίσματος, υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και διενεργείται δειγματοληψία σύμφωνα με τον πίνακα 2.B που παρατίθεται στο τμήμα III του παρόντος μέρους, λαμβανομένου υπόψη του επιπέδου κινδύνου της εκμετάλλευσης για λοίμωξη με KHV.

Η συχνότητα των υγειονομικών επιθεωρήσεων στα διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την KHVD τα οποία βρίσκονται σε ηπειρωτικές περιοχές και περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες εκμεταλλεύσεις των οποίων το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά την KHVD εξαρτάται από το υγειονομικό καθεστώς των φυσικών υδάτων που τις περιβάλλουν ως προς την εν λόγω ασθένεια, σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος II σημείο 2 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, καθορίζεται με βάση τον αριθμό που προβλέπεται για το υψηλό επίπεδο κινδύνου στον πίνακα 2.Γ.

Σε κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα όπου ο αριθμός των εκμεταλλεύσεων είναι περιορισμένος και η στοχοθετημένη επιτήρηση των εν λόγω εκμεταλλεύσεων δεν παρέχει επαρκή επιδημιολογικά δεδομένα, τα συστήματα εποπτείας για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες περιλαμβάνουν σημεία δειγματοληψίας που επιλέγονται σύμφωνα με τις απαιτήσεις που προβλέπονται στο σημείο I.1.

Η εποπτεία και η δειγματοληψία στα εν λόγω σημεία πραγματοποιείται εκ περιτροπής στο 50 % των σημείων δειγματοληψίας κάθε έτος. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σύμφωνα με τον πίνακα 2.Γ. που παρατίθεται στο τμήμα III. Τα δείγματα επιλέγονται, προετοιμάζονται και εξετάζονται κατά τον τρόπο που περιγράφεται στο τμήμα II και από τις εργαστηριακές εξετάσεις πρέπει να προκύπτουν αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά την παρουσία του παθογόνου παράγοντα της KHVD.

Το καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες διατηρείται μόνον εφόσον για όλα τα δείγματα που θα ελεγχθούν με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 προκύπτουν αρνητικά αποτελέσματα για KHVD και πρέπει να αποκλειστεί οποιαδήποτε υπόνοια για KHVD σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο III.2.

I.4. Ειδικές απαιτήσεις για την άρση των μέτρων περιστολής που προβλέπονται στο άρθρο 39 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ με σκοπό την απόκτηση υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας III όσον αφορά την KHVD σε κράτη μέλη, διαμερίσματα ή ζώνες με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V.

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά την KHVD δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο, υπό την προϋπόθεση ότι:

- α) πληρούνται οι απαιτήσεις που προβλέπονται στο σημείο I.2.2.1 στοιχεία α), β) και γ). Σε περίπτωση που η θέση σε ανάπαυση δεν είναι τεχνικώς εφικτή, οι εμπλεκόμενες εκμεταλλεύσεις υπόκεινται σε εναλλακτικό μέτρο που παρέχει σχεδόν παρόμοια εγγύηση εξάλειψης του KHV από το περιβάλλον της εκμετάλλευσης·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες και όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν τεθεί σε ανάπαυση/έχουν υποβληθεί σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης έχουν επαναπληρωθεί με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, II ή III όσον αφορά την KHVD·
- γ) η επαναπλήρωση έχει λάβει χώρα μόνο μετά την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση/υποβολή σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) όλων των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες.

II. **Μέθοδοι διάγνωσης και δειγματοληψίας για επιτήρηση με σκοπό την απόκτηση και διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια KHVD**

II.1. Δείγματα

Το ιστολογικό υλικό προς εξέταση είναι τμήματα του βραγχίου και του νεφρού. Τμήματα οργάνων από δύο ιχθύς κατά το μέγιστο μπορούν να αποτελέσουν ένα ενοποιημένο δείγμα.

II.2. Διαγνωστικές μέθοδοι για επιτήρηση με σκοπό την απόκτηση και διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια KHVD

Η διαγνωστική μέθοδος για την απόκτηση ή διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια KHVD είναι η PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) σύμφωνα με τις αναλυτικές διαγνωστικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο παράρτημα II μέρος 2 σημείο II.

III. Μέθοδοι διάγνωσης και δειγματοληψίας για εντεταλμένη έρευνα με σκοπό την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της υπόνοιας ΚΗVD

III.1. Δείγματα

Το ιστολογικό υλικό προς εξέταση είναι τμήματα του βραγχίου και του νεφρού. Τμήματα οργάνων από δύο ιχθύς κατά μέγιστον μπορούν να αποτελέσουν ένα ενοποιημένο δείγμα.

III.2. Εντεταλμένη έρευνα και διαγνωστικές μέθοδοι για τον αποκλεισμό και την επιβεβαίωση της παρουσίας λοίμωξης από τον ιό ΚΗV

Όταν απαιτείται η επιβεβαίωση ή ο αποκλεισμός υπόνοιας ΚΗVD σύμφωνα με το άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, τηρούνται οι ακόλουθες διαδικασίες επιθεώρησης, δειγματοληψίας και δοκιμής:

α) η εντεταλμένη έρευνα περιλαμβάνει τουλάχιστον μία υγειονομική επιθεώρηση και μία συλλογή δείγματος 10 ιχθύων όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε λοίμωξη από τον ιό ΚΗV, ή τουλάχιστον 30 ιχθύων όταν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα. Τα δείγματα εξετάζονται με τη χρήση της διαγνωστικής μεθόδου που προβλέπεται στο στοιχείο β) σύμφωνα με τις λεπτομερείς διαγνωστικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο παράρτημα II μέρος 2 σημείο II·

β) η παρουσία της λοίμωξης με τον ιό ΚΗV θεωρείται επιβεβαιωμένη εάν ο ΚΗV ανιχνευθεί μέσω PCR·

η υπόνοια ΚΗVD μπορεί να αποκλειστεί εάν από την εν λόγω δοκιμή δεν προκύψουν περαιτέρω αποδείξεις της παρουσίας ΚΗV.

Πίνακας 2.A

Σύστημα εποπτείας ζωνών και διαμερισμάτων για τη διετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΚΗVD όπως αναφέρεται στο σημείο I.2.1.

		Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ανά έτος (δύο έτη)	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος (δύο έτη)	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα
Εκμεταλλεύσεις/σημεία δειγματοληψίας	Πρώτα δύο έτη της περιόδου επιτήρησης	2	2	75 ⁽¹⁾
	Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 2			

⁽¹⁾ Πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από αριθμό ιχθύων ικανό να διασφαλίσει την ανίχνευση ΚΗV με ποσοστό εμπιστοσύνης 95 % εάν ο ονομαστικός επιπολασμός είναι 5 %.

Πίνακας 2.B

Σύστημα εποπτείας ζωνών και διαμερισμάτων για την τετραετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΚΗVD όπως αναφέρεται στο σημείο I.2.1

		Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα
Εκμεταλλεύσεις/σημεία δειγματοληψίας	Πρώτα δύο έτη της περιόδου επιτήρησης	1	1	30
Εκμεταλλεύσεις/σημεία δειγματοληψίας	Τελευταία δύο έτη της περιόδου επιτήρησης	2	2	30
	Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 2			

Πίνακας 2.Γ

Συστήματα εποπτείας ζωνών ή διαμερισμάτων για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΚΗVD όπως αναφέρεται στο σημείο I.3

Επίπεδο κινδύνου	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα
Υψηλό	δύο του έτους	30
Μεσαίο	1 ανά έτος	30
Χαμηλό	1 ανά διαιτία	30

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 2

Πίνακας 2 Δ

Σύστημα εποπτείας για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΚΗVD σε κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα όπου ο αριθμός των εκμεταλλεύσεων είναι περιορισμένος και η στοχοθετημένη επιτήρηση των εν λόγω εκμεταλλεύσεων δεν παρέχει επαρκή επιδημιολογικά δεδομένα, όπως αναφέρεται στο σημείο I.3

	Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος	Αριθμός ιχθύων στο δείγμα
Σημεία δειγματοληψίας	1 ανά διαιτία	1 ανά διαιτία	30

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 2

ΜΕΡΟΣ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΛΟΙΜΩΔΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΤΟΥ ΣΟΛΟΜΟΥ (ΛΑΣ)

I. Απαιτήσεις σχετικά με τα προγράμματα επιτήρησης και εξάλειψης για την απόκτηση και διατήρηση υγειονομικού καθεστώτος απαλλαγής από τη ΛΑΣ και για την περιστολή λοίμωξης με ISAV απαλειμμένου HPR

I.1. Γενικές απαιτήσεις

Όταν οι υγειονομικές επιθεωρήσεις και οι δειγματοληψίες στις εκμεταλλεύσεις σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της οδηγίας 2006/88/ΕΚ πρέπει να διεξάγονται περισσότερες από μία φορές ανά έτος, τα διαστήματα μεταξύ των υγειονομικών επιθεωρήσεων ή της συλλογής δειγμάτων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερα.

Όταν απαιτείται στοχευμένη επιτήρηση άγριων πληθυσμών σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, ο αριθμός και η γεωγραφική κατανομή των σημείων δειγματοληψίας καθορίζονται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται εύλογη κάλυψη του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος. Τα σημεία δειγματοληψίας είναι επίσης αντιπροσωπευτικά των διαφορετικών οικοσυστημάτων όπου βρίσκονται οι άγριοι πληθυσμοί ευπαθών ειδών.

Οι υγειονομικές επιθεωρήσεις διενεργούνται σε όλες τις μονάδες παραγωγής, όπως τεχνητές λίμνες, δεξαμενές και δικτυοκλωβούς, προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν παρουσία ιχθύων νεκρών, αδύναμων ή με ασυνήθη συμπεριφορά. Δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στο σημείο απορροής του νερού όπου τείνουν να συγκεντρώνονται αδύναμοι ιχθύες λόγω του υδατικού ρεύματος.

Οι ιχθύες που συλλέγονται για δειγματοληψία επιλέγονται ως εξής:

- α) επιλέγονται μόνο ετοιμοθάνατοι ή προσφάτως νεκροί ιχθύες, αλλά όχι σε αποσύνθεση· ειδικότερα συλλέγονται κατά προτεραιότητα ιχθύες που παρουσιάζουν αναιμία, αιμορραγία ή άλλα κλινικά σημεία που υποδηλώνουν διαταραχές της κυκλοφορίας του αίματος·
- β) εάν μεταξύ των ευπαθών ειδών στον εκάστοτε τόπο δειγματοληψίας περιλαμβάνεται σολομός του Ατλαντικού, δείγματα αυτού συλλέγονται κατά προτεραιότητα. Εάν δεν υπάρχουν σολομοί του Ατλαντικού στην ιχθυοεκμετάλλευση, πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από άλλα ευπαθή είδη·
- γ) εάν για την παραγωγή ιχθύων χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία πηγές νερού, στο δείγμα συμπεριλαμβάνονται ιχθύες που αντιπροσωπεύουν όλες τις πηγές νερού·
- δ) οι ιχθύες που επιλέγονται περιλαμβάνουν ιχθύς που έχουν συλλεχθεί κατά τρόπο ώστε στο δείγμα να αντιπροσωπεύονται κατ' αναλογία όλες οι μονάδες παραγωγής, όπως δικτυοκλωβοί, δεξαμενές και τεχνητές λίμνες, καθώς και όλες οι ηλικιακές κλάσεις.

1.2. Ειδικές απαιτήσεις για την απόκτηση υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας I όσον αφορά τη ΛΑΣ

1.2.1. Προγράμματα επιτήρησης

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III, σύμφωνα με το μέρος Β του παραρτήματος III της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, όσον αφορά τη ΛΑΣ, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος συμμορφώνονται με τις σχετικές απαιτήσεις που προβλέπονται στο παράρτημα V της εν λόγω οδηγίας και όλες αυτές οι εκμεταλλεύσεις και, όταν απαιτείται βάσει του παραρτήματος V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της εν λόγω οδηγίας, τα σημεία δειγματοληψίας σε άγριους πληθυσμούς που επιλέγονται σύμφωνα με το εν λόγω σημείο 2, υπόκεινται στο ακόλουθο πρόγραμμα επιτήρησης:

- α) οι εκμεταλλεύσεις ή τα σημεία δειγματοληψίας έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο δύο συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 3.Α που παρατίθεται στο τμήμα II·
- β) κατά τη διάρκεια της εν λόγω διετούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 πρέπει να έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά τον ISAV απαλειμμένου HPR και οποιαδήποτε υπόνοια για ΛΑΣ πρέπει να έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3·
- γ) εάν κατά τη διάρκεια εφαρμογής του προγράμματος επιτήρησης έχει επιβεβαιωθεί ΛΑΣ σε εκμετάλλευση η οποία περιλαμβάνεται στο εν λόγω πρόγραμμα επιτήρησης, και ως εκ τούτου έχει ανακληθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας II της εκμετάλλευσης, πρέπει να έχει εφαρμοστεί πρόγραμμα εξάλειψης σύμφωνα με το σημείο 1.2.2.

1.2.2. Προγράμματα εξάλειψης

1.2.2.1. Γενικές απαιτήσεις

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά τη ΛΑΣ, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος έχουν υποβληθεί σε πρόγραμμα εξάλειψης που πληροί τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία α) έως ε):

- α) τα ελάχιστα μέτρα ελέγχου που προβλέπονται στο τμήμα 3 του κεφαλαίου V της οδηγίας 2006/88/ΕΚ έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά, και ειδικότερα έχει οριστεί περιοχή περιστολής, όπως αναφέρεται στο άρθρο 32 στοιχείο β) της εν λόγω οδηγίας, συμπεριλαμβανομένης ζώνης προστασίας και ζώνης επίβλεψης περίεξ της εκμετάλλευσης ή των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με ISAV απαλειμμένου HPR ή επιβεβαιωμένη ΛΑΣ.

Η περιοχή περιστολής πρέπει να έχει οριστεί κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη παραγόντων που επηρεάζουν τους κινδύνους διάδοσης της ΛΑΣ στους εκτρεφόμενους ιχθύς ή στους άγριους πληθυσμούς, όπως: ο αριθμός, η αναλογία και η κατανομή των κρουσμάτων θανάτου ιχθύων στην εκμετάλλευση που έχει μολυνθεί με ISAV απαλειμμένου HPR ή επιβεβαιωμένη ΛΑΣ· η απόσταση από τις γειτονικές εκμεταλλεύσεις και η πυκνότητα των τελευταίων· η εγγύτητα σε σφαγεία· οι εφαπτόμενες εκμεταλλεύσεις· τα είδη που φιλοξενούν οι εκμεταλλεύσεις· οι πρακτικές καλλιέργειας που εφαρμόζονται στις πληγείσες και σε γειτονικές εκμεταλλεύσεις· οι υδροδυναμικές συνθήκες και άλλοι σημαντικοί από επιδημιολογική άποψη παράγοντες.

Για τον καθορισμό των ζωνών προστασίας και επίβλεψης ισχύουν οι ακόλουθες ελάχιστες απαιτήσεις όσον αφορά τη γεωγραφική οριοθέτηση των εν λόγω ζωνών:

i) η ζώνη προστασίας ορίζεται σε άμεση γειτνίαση με την εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με ΛΑΣ και αντιστοιχεί:

(1) σε παράκτιες περιοχές: σε ζώνη που περιέχεται σε κύκλο ακτίνας τουλάχιστον ίσης με την απόσταση μετακίνησης της παλίρροιας ή τουλάχιστον 5 χιλιομέτρων, όποια είναι μεγαλύτερη, με κέντρο την εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με ΛΑΣ, ή ισοδύναμη ζώνη που καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων·

(2) σε περιοχές της ενδοχώρας: σε ολόκληρη τη λεκάνη απορροής της εκμετάλλευσης που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με ΛΑΣ· η αρμόδια αρχή δύναται να περιορίσει την επέκταση της ζώνης σε τμήματα της λεκάνης απορροής, υπό τον όρο ότι δεν τίθεται σε κίνδυνο η πρόληψη της διάδοσης της ΛΑΣ·

ii) η ζώνη επίβλεψης ορίζεται εξωτερικά της ζώνης προστασίας και αντιστοιχεί:

(1) σε παράκτιες περιοχές: σε ζώνη η οποία, περιβάλλοντας τη ζώνη προστασίας, επικαλύπτει τις ζώνες μετακίνησης της παλίρροιας· ή σε ζώνη η οποία περιβάλλει τη ζώνη προστασίας και περιέχεται σε κύκλο ακτίνας 10 km από το κέντρο της ζώνης προστασίας· ή σε ισοδύναμη ζώνη που έχει καθοριστεί βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων· ή

(2) σε περιοχές της ενδοχώρας: σε εκτεταμένη ζώνη εκτός της καθορισθείσας ζώνης προστασίας·

β) όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός της ζώνης προστασίας και οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με ΛΑΣ υπόκεινται σε εντεταλμένη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

i) συλλογή δειγμάτων προς εξέταση, τα οποία περιλαμβάνουν τουλάχιστον 10 ετοιμοθάνατους ιχθύς όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε ΛΑΣ, ή τουλάχιστον 30 ιχθύς όταν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα·

ii) μία υγειονομική επιθεώρηση· στις εκμεταλλεύσεις στις οποίες έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα από την εξέταση που αναφέρεται στο σημείο i), οι υγειονομικές επιθεωρήσεις συνεχίζονται μία φορά ανά μήνα έως την ανάκληση της ζώνης προστασίας σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ)·

γ) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με ISAV απαλειμμένου HPR ή επιβεβαιωμένη ΛΑΣ εκκενώνονται, καθαρίζονται, απολυμνούνται και τίθενται σε ανάπαυση για περίοδο τουλάχιστον τριών μηνών. Οι ζώνες προστασίας και επίβλεψης μπορούν να ανακληθούν όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις εντός της ζώνης προστασίας εκκενωθούν, καθαριστούν, απολυμανθούν και ακολουθήσει περίοδος συγχρονισμένης ανάπαυσης τουλάχιστον έξι εβδομάδων.

Όταν τίθενται σε ανάπαυση οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες, οι ζώνες προστασίας μετατρέπονται σε ζώνες επίβλεψης.

Η αρμόδια αρχή δύναται να αποφασίσει να ζητήσει την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση και άλλων εκμεταλλεύσεων εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης. Η διάρκεια της περιόδου ανάπαυσης για τις εν λόγω εκμεταλλεύσεις καθορίζεται από την αρμόδια αρχή κατόπιν εκτίμησης του κινδύνου κατά περίπτωση.

δ) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με ISAV απαλειμμένου HPR ή επιβεβαιωμένη ΛΑΣ και όλες οι λοιπές εκμεταλλεύσεις που εκκενώνονται εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης επαναπληρούνται με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη ΛΑΣ.

Η επανεισαγωγή των πληθυσμών ιχθύων πραγματοποιείται μόνον όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες έχουν εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ)·

ε) όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος που καλύπτεται από το πρόγραμμα εξάλειψης και, όταν απαιτείται επιτήρηση άγριων πληθυσμών, τα σημεία δειγματοληψίας που επιλέγονται σύμφωνα με το σημείο I.1, υπόκεινται στη συνέχεια στο σύστημα εποπτείας που προβλέπεται στο σημείο I.2.1.

- I.2.2.2. Απαιτήσεις όσον αφορά την αποκατάσταση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για ηπειρωτικά διαμερίσματα που περιλαμβάνουν μία και μόνο εκμετάλλευση η οποία προηγουμένως τελούσε υπό υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I

Ένα ηπειρωτικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει μία και μόνο εκμετάλλευση με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη ΛΑΣ και του οποίου το υγειονομικό καθεστώς είναι ανεξάρτητο από τα φυσικά ύδατα που το περιβάλλουν σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος II σημείο 3 της οδηγίας 2006/88/EK, και του οποίου το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I έχει ανακληθεί σύμφωνα με το άρθρο 53 παράγραφος 3 της εν λόγω οδηγίας, δύναται να επανακτήσει το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I αμέσως μόλις η αρμόδια αρχή επιβεβαιώσει ότι πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- α) έχει εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση· η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων·
- β) έχει επαναπληρωθεί με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη ΛΑΣ.

- I.3. Ελάχιστα μέτρα ελέγχου για τη διατήρηση του υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας I όσον αφορά τη ΛΑΣ

Όταν απαιτείται στοχοθετημένη επιτήρηση προκειμένου να διατηρηθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, όπως προβλέπεται στο άρθρο 52 της οδηγίας 2006/88/EK, όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας, εντός του οικείου κράτους μέλους, ζώνης ή διαμερίσματος, υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και διενεργείται δειγματοληψία σύμφωνα με τον πίνακα 3.B⁽¹⁾ που παρατίθεται στο τμήμα II του παρόντος μέρους, λαμβανομένου υπόψη του επιπέδου κινδύνου της εκμετάλλευσης για λοίμωξη με ΛΑΣ.

Κατά τον προσδιορισμό της συχνότητας των υγειονομικών επιθεωρήσεων για το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη ΛΑΣ σε διαμερίσματα τα οποία βρίσκονται σε ηπειρωτικές περιοχές και στα οποία το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά τη ΛΑΣ εξαρτάται από το υγειονομικό καθεστώς φυσικών υδάτων που περιβάλλουν τα εν λόγω διαμερίσματα και φιλοξενούν σολομούς του Ατλαντικού (*Salmo salar*), ο κίνδυνος λοίμωξης με ΛΑΣ θεωρείται υψηλός.

Το καθεστώς απαλλαγής από την ασθένεια ΛΑΣ μπορεί να διατηρηθεί μόνον εφόσον για όλα τα δείγματα που θα ελεγχθούν με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 προκύψουν αρνητικά αποτελέσματα για ISAV απαλειμμένου HPR και έχει αποκλειστεί οποιαδήποτε υπόνοια για ΛΑΣ σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3.

- I.4. Ειδικές απαιτήσεις για την απόκτηση υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας III όσον αφορά τον ιό ISAV απαλειμμένου HPR σε κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα τα οποία τελούσαν προηγουμένως υπό υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V.

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά τη ΛΑΣ δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III εφόσον:

- α) πληρούνται οι απαιτήσεις που προβλέπονται στο σημείο I.2.2.1 στοιχεία α), β) και γ). Σε περίπτωση που η θέση σε ανάπαυση δεν είναι τεχνικά εφικτή, οι εκμεταλλεύσεις υπόκεινται σε εναλλακτικό μέτρο που παρέχει σχεδόν παρόμοια εγγύηση εξάλειψης του ISAV από το περιβάλλον της εκμετάλλευσης·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επίσημα ως μολυσμένες και όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν τεθεί σε ανάπαυση ή έχουν υποβληθεί σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης έχουν επαναπληρωθεί με ιχθύς προερχόμενους από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, II ή III όσον αφορά τη ΛΑΣ·
- γ) η εν λόγω επαναπλήρωση έχει λάβει χώρα μόνο μετά την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση/υποβολή σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) όλων των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επίσημα ως μολυσμένες.
- δ) δεν έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία ISAV απαλειμμένου HPR κατά τη διάρκεια της διετούς περιόδου που ακολουθεί την ολοκλήρωση των μέτρων που αναφέρονται στα στοιχεία α), β) και γ), και έχουν αποκλειστεί οι υπόνοιες κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου σύμφωνα με τις διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο II.3.

⁽¹⁾ Δεν ισχύει για εκμεταλλεύσεις στις οποίες εκτρέφονται ιριδιζουσες πέστροφες (*Oncorhynchus mykiss*) ή κοινές πέστροφες (*Salmo trutta*) ή και τα δύο είδη, και στις οποίες η παροχή νερού βασίζεται αποκλειστικά σε πηγές γλυκού νερού που δεν φιλοξενούν σολομούς του Ατλαντικού (*Salmo salar*).

II. Διαγνωστικές μέθοδοι και εντεταλμένες έρευνες

II.1. Δείγματα

Το ιστολογικό υλικό προς εξέταση είναι:

- α) Ιστολογία: κεφαλικός νεφρός, ήπαρ, καρδιά, πάγκρεας, έντερο, σπλήνας και βράγχιο·
- β) Ανοσοϊστοχημεία: μεσόνεφρο και καρδιά, συμπεριλαμβανομένων των βαλβίδων και του αορτικού βολβού (*bulbus arteriosus*)·
- γ) ανάλυση RT-qPCR: μεσόνεφρο και καρδιά·
- δ) Καλλιέργεια ιού: μεσόνεφρο, καρδιά, ήπαρ και σπλήνας.

Τμήματα οργάνων από πέντε ιχθύς κατά το μέγιστο μπορούν να αποτελέσουν ένα ενοποιημένο δείγμα.

II.2. Διαγνωστικές μέθοδοι για την απόκτηση ή διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΛΑΣ

Η διαγνωστική μέθοδος που πρέπει να χρησιμοποιείται για την απόκτηση ή τη διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΛΑΣ σύμφωνα με τα σημεία I.2 και I.3 είναι η RT-qPCR, ακολουθούμενη από προσδιορισμό της αλληλουχίας θετικών δειγμάτων σύμφωνα με τις αναλυτικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο μέρος 3 του παραρτήματος II.

Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος της RT-qPCR, εξετάζονται περισσότερα δείγματα πριν από την εφαρμογή των αρχικών μέτρων ελέγχου που προβλέπονται στο άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/EK.

Τα εν λόγω δείγματα εξετάζονται ως ακολούθως σύμφωνα με τις αναλυτικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο μέρος 3 του παραρτήματος II:

- α) έλεγχος των δειγμάτων μέσω RT-qPCR, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου-HE (αιμοσυγκολλητίνης-εστεράσης) για την εξακρίβωση της απαλοιφής του HPR·
και
- β) εξέταση στα παρασκευάσματα ιστού με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων κατά του ISAV (δηλαδή IHC σε σταθερά τμήματα ή IFAT σε ιστικά αποτυπώματα)· ή
- γ) απομόνωση και ταυτοποίηση του ISAV σε κυτταρική καλλιέργεια τουλάχιστον ενός δείγματος από οποιοδήποτε είδος ιχθύων της εκμετάλλευσης.

II.3. Εντεταλμένη έρευνα και διαγνωστικές μέθοδοι για τον αποκλεισμό ή την επιβεβαίωση της παρουσίας ΛΑΣ

Για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό υπόνοιας ΛΑΣ σύμφωνα με το άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/EK, τηρούνται οι ακόλουθες διαδικασίες επιθεώρησης, δειγματοληψίας και δοκιμής:

- α) εντεταλμένη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον μία υγειονομική επιθεώρηση και μία δειγματοληψία 10 ετοιμοθάνατων ιχθύων, όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε ΛΑΣ. Εάν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε ΛΑΣ, μετά την υγειονομική επιθεώρηση ακολουθεί στοχοθετημένη δειγματοληψία τουλάχιστον 30 ετοιμοθάνατων ιχθύων ή προσφάτως θανατωθέντων ιχθύων κανονικής σύστασης σύμφωνα με το σημείο I.1. Τα δείγματα εξετάζονται σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο στοιχείο β)·
- β) σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος της RT-qPCR για ISAV απαλειμμένου HPR, εξετάζονται περισσότερα δείγματα πριν από την εφαρμογή των αρχικών μέτρων ελέγχου που προβλέπονται στο άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/EK. Υποπτο κρούσμα λοίμωξης με ΛΑΣ επιβεβαιώνεται σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια με τη χρήση των αναλυτικών μεθόδων και διαδικασιών που προβλέπονται στο μέρος 3 του παραρτήματος II:
 - i) Ανίχνευση του ISAV μέσω RT-qPCR, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου-HE για την εξακρίβωση της απαλοιφής του HPR και ανίχνευση ISAV στα παρασκευάσματα ιστού, με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων κατά του ISAV (δηλαδή IHC σε σταθερά τμήματα ή IFAT σε ιστικά αποτυπώματα)

ή

ii) ανίχνευση του ISAV μέσω RT-qPCR, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου-HE για την εξακρίβωση της απαλοιφής του HPR, και

απομόνωση και ταυτοποίηση του ISAV σε κυτταρική καλλιέργεια τουλάχιστον ενός δείγματος από οποιοδήποτε είδος ιχθύων της εκμετάλλευσης·

γ) σε περίπτωση που παρατηρηθεί η ύπαρξη κλινικών, μακροσκοπικών παθολογικοανατομικών μεταβολών ή ιστοπαθολογικών ευρημάτων που παραπέμπουν σε ΛΑΣ, τα ευρήματα πρέπει να επιβεβαιωθούν με ανίχνευση του ιού μέσω δύο διαγνωστικών μεθόδων με ανεξάρτητες αρχές ανίχνευσης, όπως η RT-qPCR και η IHC, σύμφωνα με το μέρος 3 του παραρτήματος II.

Η υπόνοια ΛΑΣ μπορεί να αποκλειστεί εάν οι δοκιμές και οι επιθεωρήσεις στη διάρκεια περιόδου 12 μηνών από την ημερομηνία εκδήλωσης της υπόνοιας δεν αποκαλύψουν περαιτέρω ενδείξεις παρουσίας ΛΑΣ.

Πίνακας 3.A

Σύστημα εποπτείας ζωνών και διαμερισμάτων για τη διετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΛΑΣ όπως αναφέρεται στο σημείο I.2.1

Έτος επιτήρησης	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων ανά έτος (δύο έτη)	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος (δύο έτη)	Αριθμός ιχθύων που περιλαμβάνονται στις δειγματοληψίες ανά έτος
Έτος 1	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾
Έτος 2	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται, να αποθηκεύονται και να εξετάζονται κατά τη διάρκεια δύο περιόδων δοκιμών διάρκειας ενός μηνός (άνοιξη και φθινόπωρο) ή όταν κρίνεται σκόπιμο για πρακτικούς λόγους.

⁽²⁾ Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ενοποιημένο δείγμα: 5.

Πίνακας 3.B

Συστήματα εποπτείας ζωνών ή διαμερισμάτων για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια ΛΑΣ όπως αναφέρεται στο σημείο I.3 ⁽²⁾

Επίπεδο κινδύνου	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος	Αριθμός ιχθύων που περιλαμβάνονται στις δειγματοληψίες ανά έτος
Υψηλό	2	2 ⁽¹⁾	2 * 30
Μεσαίο	1	1 ⁽¹⁾	30
Χαμηλό	1 ανά διατήρηση	1 ανά διατήρηση	30 ανά διατήρηση

⁽¹⁾ Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται και να εξετάζονται κατά τη διάρκεια δύο περιόδων δοκιμών διάρκειας ενός μηνός (άνοιξη και φθινόπωρο) ή όταν κρίνεται σκόπιμο για πρακτικούς λόγους.

⁽²⁾ Δεν ισχύει για εκμεταλλεύσεις στις οποίες εκτρέφονται ιριδιζούσες πέστροφες (*Oncorhynchus mykiss*) ή κοινές πέστροφες (*Salmo trutta*) ή και τα δύο είδη, και στις οποίες η παροχή νερού βασίζεται αποκλειστικά σε πηγές γλυκού νερού που δεν φιλοξενούν σολομούς του Ατλαντικού (*Salmo salar*).

ΜΕΡΟΣ 4

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΛΟΙΜΩΞΗ ΜΕ *MARTEILIA REFRINGENS*

I. Απαιτήσεις σχετικά με τα προγράμματα επιτήρησης και εξάλειψης για την απόκτηση και διατήρηση υγειονομικού καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά λοίμωξη από *Marteilia refringens*

I.1. Γενικές απαιτήσεις

Οι υγειονομικές επιθεωρήσεις και, όπου κρίνεται σκόπιμο, η δειγματοληψία για εργαστηριακή εξέταση διεξάγονται κατά την περίοδο του έτους που είναι γνωστό ότι ο επιπολασμός του παρασίτου στο κράτος μέλος, στη ζώνη ή στο διαμέρισμα μεγιστοποιείται. Όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμα σχετικά δεδομένα, η δειγματοληψία διεξάγεται αμέσως μόλις η θερμοκρασία του νερού υπερβεί τους 17 °C.

Όταν πρόκειται να γίνει δειγματοληψία σε μαλάκια σύμφωνα με τις απαιτήσεις του μέρους 4, εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) εάν υπάρχουν *Ostrea* spp. και *Mytilus* spp. στις μονάδες παραγωγής ή στον χώρο παραγωγής, λαμβάνεται δείγμα του ίδιου μεγέθους από αμφότερα τα γένη. Εάν υπάρχει μόνο ένα από αυτά τα γένη, πραγματοποιείται δειγματοληψία από το συγκεκριμένο γένος. Εάν δεν υπάρχει ούτε το γένος *Ostrea* ούτε το γένος *Mytilus*, το δείγμα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό όλων των υπόλοιπων ευπαθών ειδών που υπάρχουν·
- β) εάν υπάρχουν αδύναμα, ανοικτά ή πρόσφατα νεκρά (αλλά όχι σε αποσύνθεση) μαλάκια στις μονάδες παραγωγής, αυτά τα μαλάκια επιλέγονται πρώτα. Εάν δεν υπάρχουν τέτοιου είδους μαλάκια, στα μαλάκια που συλλέγονται περιλαμβάνονται τα μεγαλύτερα σε ηλικία, υγιή μαλάκια.
- γ) κατά τη δειγματοληψία σε εκμεταλλεύσεις καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία πηγές νερού για την παραγωγή μαλακίων, στο δείγμα περιλαμβάνονται μαλάκια από όλες τις πηγές νερού έτσι ώστε όλα τα μέρη της εκμετάλλευσης να αντιπροσωπεύονται αναλογικά στο δείγμα·
- δ) κατά τη δειγματοληψία σε περιοχές καλλιέργειας μαλακίων, στο δείγμα περιλαμβάνονται μαλάκια από επαρκή αριθμό σημείων δειγματοληψίας έτσι ώστε όλα τα μέρη της περιοχής καλλιέργειας μαλακίων να αντιπροσωπεύονται αναλογικά στο δείγμα· Οι βασικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή των σημείων δειγματοληψίας είναι τα προηγούμενα σημεία δειγματοληψίας όπου εντοπίστηκε *Marteilia refringens*, η ιχθυοφόρτιση, η ροή υδάτων, η παρουσία ευπαθών ειδών, η παρουσία ειδών-φορέων, η βαθυμετρία και οι πρακτικές διαχείρισης. Στο δείγμα περιλαμβάνονται φυσικοί χώροι ανάπτυξης.

I.2. Ειδικές απαιτήσεις για την απόκτηση υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας I όσον αφορά το *Marteilia refringens*

I.2.1. Προγράμματα επιτήρησης

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά τη λοίμωξη με *Marteilia refringens*, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος έχουν υποβληθεί τουλάχιστον στο ακόλουθο πρόγραμμα επιτήρησης που περιλαμβάνει υγειονομικές επιθεωρήσεις και τη συλλογή δειγμάτων προς εξέταση.

Διετές πρόγραμμα επιτήρησης:

- α) οι εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο δύο συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 4.A που παρατίθεται στο τμήμα II·
- β) κατά τη διάρκεια της εν λόγω διετούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα για *Marteilia refringens* και οποιαδήποτε υπόνοια για *Marteilia refringens* έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3·
- γ) σε περίπτωση που πρέπει να συμπεριληφθούν στο δείγμα *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* ή *Mytilus galloprovincialis* προερχόμενα από κράτος μέλος, ζώνη ή διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, πρέπει να έχουν εισαχθεί σε εκμετάλλευση ή σε περιοχή καλλιέργειας μαλακίων τουλάχιστον την άνοιξη πριν από την περίοδο κατά την οποία διεξάγεται το πρόγραμμα επιτήρησης.

I.2.2. Προγράμματα εξάλειψης

Η εξάλειψη του *Marteilia refringens* θεωρείται αδύνατη στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως όταν το κράτος μέλος κρίνει ότι είναι εφικτό, εφαρμόζεται το ακόλουθο πρότυπο προγράμματος εξάλειψης.

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά τη λοίμωξη με *Marteilia refringens*, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος έχουν υποβληθεί τουλάχιστον στο ακόλουθο πρόγραμμα εξάλειψης:

- α) τα μέτρα που προβλέπονται στο τμήμα 3 του κεφαλαίου V της οδηγίας 2006/88/EK έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά, και ειδικότερα έχει οριστεί περιοχή περιστολής, όπως αναφέρεται στο άρθρο 32 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/EK, συμπεριλαμβανομένης ζώνης προστασίας και ζώνης επίβλεψης περίεξ των εκμεταλλεύσεων ή των περιοχών καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επίσημως ως μολυσμένες με *Marteilia refringens*.

Η περιοχή περιστολής ορίζεται κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη παραγόντων που επηρεάζουν τους κινδύνους διάδοσης του *Marteilia refringens*, όπως: ο αριθμός, η ηλικία, το ποσοστό και η κατανομή των κρουσμάτων θανάτου μαλακίων στην εκμετάλλευση ή στην περιοχή καλλιέργειας μαλακίων που έχει μολυνθεί με *Marteilia refringens*, συμπεριλαμβανομένων των άγριων μαλακίων· η απόσταση και η ιχθυοφόρτιση των γειτονικών εκμεταλλεύσεων ή περιοχών καλλιέργειας μαλακίων, συμπεριλαμβανομένων των άγριων μαλακίων· η εγγύτητα με εγκαταστάσεις μεταποίησης, εφαπτόμενες εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων· τα είδη, τα ιδιαίτερα ευπαθή είδη και τα είδη-φορείς που υπάρχουν στις εκμεταλλεύσεις ή στις περιοχές καλλιέργειας μαλακίων· οι γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις πληγείσες και γειτονικές εκμεταλλεύσεις και περιοχές καλλιέργειας μαλακίων· οι υδροδυναμικές συνθήκες και άλλοι σημαντικοί από επιδημιολογική άποψη παράγοντες.

Για τον καθορισμό των ζωνών προστασίας και επίβλεψης ισχύουν οι ακόλουθες ελάχιστες απαιτήσεις:

- i) η ζώνη προστασίας ορίζεται σε άμεση γειτνίαση με την εκμετάλλευση ή περιοχή καλλιέργειας μαλακίων που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με *Marteilia refringens* και αντιστοιχεί σε ζώνη που καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων·
 - ii) η ζώνη επίβλεψης ορίζεται εξωτερικά της ζώνης προστασίας και αντιστοιχεί σε ζώνη η οποία περιβάλλει τη ζώνη προστασίας και καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός της ζώνης προστασίας και οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με *Marteilia refringens* υπόκεινται σε εντεταλμένη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον τη συλλογή δειγμάτων για την εξέταση 150 μαλακίων μετά την έναρξη της περιόδου μετάδοσης του *Marteilia refringens*. Όταν η περίοδος μετάδοσης δεν είναι γνωστή, η δειγματοληψία αρχίζει μετά την περίοδο όπου η θερμοκρασία του νερού υπερβαίνει τους 17 °C·
- γ) όλες οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές εκμετάλλευσης μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με *Marteilia refringens* εκκενώνονται, τίθενται σε ανάπαυση και, εάν είναι δυνατόν, καθαρίζονται και απολυμαίνονται.

Η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον:

- i) δύο μηνών σε περίπτωση εκμεταλλεύσεων και περιοχών καλλιέργειας μαλακίων με περιορισμένες συνδέσεις με τα περιβάλλοντα ύδατα, όπως εκκολαπτήρια και ιχθυογεννητικούς σταθμούς·
- ii) δύο μηνών σε περίπτωση εκμεταλλεύσεων και περιοχών καλλιέργειας μαλακίων με περιορισμένες συνδέσεις με τα περιβάλλοντα ύδατα, υπό τον όρο ότι τα μολυσμένα μαλάκια των ευπαθών ειδών και τα μαλάκια των ευπαθών ειδών με επιδημιολογικές συνδέσεις με τη μολυσμένη εκμετάλλευση ή την περιοχή καλλιέργειας μαλακίων έχουν συλλεχθεί και απομακρυνθεί πριν από την περίοδο του έτους που είναι γνωστό ότι ο επιπολασμός του *Marteilia refringens* μεγιστοποιείται ή, όταν η εν λόγω περίοδος δεν είναι γνωστή, πριν από την περίοδο όπου η θερμοκρασία των υδάτων υπερβαίνει τους 17 °C·
- iii) δεκατεσσάρων μηνών στην περίπτωση εκμεταλλεύσεων με περιορισμένες συνδέσεις με τα περιβάλλοντα ύδατα και σε περιοχές καλλιέργειας μαλακίων, υπό τον όρο ότι τα μολυσμένα μαλάκια των ευπαθών ειδών και τα μαλάκια των ευπαθών ειδών με επιδημιολογικές συνδέσεις με τη μολυσμένη εκμετάλλευση ή περιοχή καλλιέργειας μαλακίων έχουν συλλεχθεί και απομακρυνθεί πριν από την περίοδο του έτους που είναι γνωστό ότι ο επιπολασμός του *Marteilia refringens* μεγιστοποιείται ή, όταν η εν λόγω περίοδος δεν είναι γνωστή, πριν από την περίοδο όπου η θερμοκρασία των υδάτων υπερβαίνει τους 17 °C·

Όταν εκκενωθούν όλες οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες, εφαρμόζεται συγχρονισμένη ανάπαυση διάρκειας τουλάχιστον τεσσάρων εβδομάδων.

Η αρμόδια αρχή δύναται να αποφασίσει να ζητήσει την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση και άλλων εκμεταλλεύσεων ή περιοχών καλλιέργειας μαλακίων, κατά περίπτωση, εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης. Η διάρκεια της περιόδου ανάπαυσης καθορίζεται από την αρμόδια αρχή κατόπιν εκτίμησης του κινδύνου κατά περίπτωση.

- δ) όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες και όλες οι λοιπές εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που εκκενώνονται εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης επαναπληρούνται με μαλάκια προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγιονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη λοίμωξη από *Marteilia refringens*.

Η επαναπλήρωση πραγματοποιείται μόνον όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες έχουν εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση σύμφωνα με το σημείο I.2.2 στοιχείο γ).

- ε) όλες οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ εντός του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος που καλύπτεται από το πρόγραμμα εξάλειψης, υπόκεινται στη συνέχεια στο σύστημα εποπτείας που προβλέπεται στο σημείο I.2.1 του παρόντος μέρους.

I.3. Ειδικές απαιτήσεις για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες (κατηγορία I) όσον αφορά τη λοίμωξη από *Marteilia refringens*

Όταν απαιτείται στοχοθετημένη επιτήρηση προκειμένου να διατηρηθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, όπως προβλέπεται στο άρθρο 52 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, εντός του οικείου κράτους μέλους, ζώνης ή διαμερίσματος, υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και διενεργείται δειγματοληψία σύμφωνα με τον πίνακα 4.B που παρατίθεται στο τμήμα II, λαμβανομένου υπόψη του επιπέδου κινδύνου της εκμετάλλευσης ή της περιοχής καλλιέργειας μαλακίων για μόλυνση με *Marteilia refringens*.

Το καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες μπορεί να διατηρηθεί μόνον εφόσον για όλα τα δείγματα που θα ελεγχθούν με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 προκύψουν αρνητικά αποτελέσματα για *Marteilia refringens* και αποκλεισθεί οποιαδήποτε υπόνοια για *Marteilia refringens* σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3.

I.4. Απαιτήσεις σχετικά με την άρση των μέτρων περιστολής που προβλέπονται στο άρθρο 39 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ (μετάβαση από το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V στο υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III) όσον αφορά τη λοίμωξη από *Marteilia refringens*.

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά τη λοίμωξη από *Marteilia refringens* δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο, υπό την προϋπόθεση ότι:

- α) πληρούνται οι απαιτήσεις που ορίζονται στο σημείο I.2.2 στοιχεία α), β) και γ). Σε περίπτωση που η θέση σε ανάπαυση δεν είναι τεχνικώς εφικτή, οι εκμεταλλεύσεις υπόκεινται σε εναλλακτικό μέτρο που παρέχει σχεδόν παρόμοια εγγύηση εξάλειψης του *Marteilia refringens* από το περιβάλλον της εκμετάλλευσης·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες και όλες οι λοιπές εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που εκκενώνονται/υποβάλλονται σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης έχουν επαναπληρωθεί με μαλάκια προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνη ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, II ή III όσον αφορά τη λοίμωξη από *Marteilia refringens*·
- γ) η επαναπλήρωση έχει πραγματοποιηθεί μόνο μετά την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση ή υποβολή σε εναλλακτικά μέτρα, σύμφωνα με το στοιχείο α), όλων των εκμεταλλεύσεων ή των περιοχών καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες·
- δ) δεν έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία λοίμωξης από *Marteilia refringens* κατά τη διάρκεια της διετούς περιόδου που ακολουθεί την ολοκλήρωση των μέτρων που αναφέρονται στα στοιχεία α), β) και γ), και έχουν αποκλειστεί οι υπόνοιες κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου σύμφωνα με τις διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο II.3.

II. Διαγνωστικές μέθοδοι και εντεταλμένες έρευνες

II.1. Δείγματα

Ολόκληρο το ζώο υποβάλλεται στο εργαστήριο για τη διενέργεια των διαγνωστικών εξετάσεων που προβλέπονται στα σημεία II.2 και II.3.

II.2. Διαγνωστικές μέθοδοι για την απόκτηση ή διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για λοίμωξη από *Marteilia refringens*

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την απόκτηση ή τη διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για λοίμωξη από *Marteilia refringens* σύμφωνα με τις λεπτομερείς διαγνωστικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο μέρος 4 του παραρτήματος II, είναι η ιστοπαθολογική εξέταση, τα ιστικά αποτυπώματα ή η PCR.

II.3. Εντεταλμένη έρευνα και διαγνωστικές μέθοδοι για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή τον αποκλεισμό της υπόνοιας για λοίμωξη από *Marteilia refringens*

Όταν απαιτείται η επιβεβαίωση ή ο αποκλεισμός υπόνοιας για λοίμωξη από *Marteilia refringens* σύμφωνα με το άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, τηρείται η ακόλουθη διαδικασία επιθεώρησης, δειγματοληψίας και δοκιμής:

- α) η εντεταλμένη έρευνα περιλαμβάνει τουλάχιστον μία δειγματοληψία 30 μαλακίων ύποπτων ειδών εάν η υπόνοια βασίζεται σε έκθεση για τη θνησιμότητα ή, σε διαφορετική περίπτωση, 150 μαλακίων ύποπτων ειδών μετά την έναρξη της περιόδου μετάδοσης του *Marteilia refringens*. Όταν η περίοδος μετάδοσης δεν είναι γνωστή, η δειγματοληψία αρχίζει μετά την περίοδο όπου η θερμοκρασία του νερού υπερβαίνει τους 17 °C.
- β) Τα δείγματα εξετάζονται με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο i) σύμφωνα με τις λεπτομερείς διαγνωστικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο παράρτημα II μέρος 4 τμήμα I:
- i) η παρουσία *Marteilia refringens* θεωρείται επιβεβαιωμένη όταν ένα θετικό αποτέλεσμα βάσει ιστοπαθολογικής εξέτασης, ιστικών αποτυπωμάτων ή *in situ* υβριδισμού συνδυάζεται με PCR με θετικό αποτέλεσμα, το οποίο συμπληρώνεται με προσδιορισμό της αλληλουχίας.
- ii) η υπόνοια για λοίμωξη από *Marteilia refringens* μπορεί να αποκλειστεί εάν από τις δοκιμές που αναφέρονται στο σημείο i) δεν προκύψουν περαιτέρω ενδείξεις παρουσίας *Marteilia refringens*.

Πίνακας 4.A

Σύστημα εποπτείας κρατών μελών, ζωνών ή διαμερισμάτων για την περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για το *Marteilia refringens*, όπως αναφέρεται στο σημείο I.2.1

	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος	Αριθμός μαλακίων στο δείγμα
Εκμεταλλεύσεις/περιοχές καλλιέργειας μαλακίων	1	1	150

Πίνακας 4.B

Συστήματα εποπτείας κρατών μελών, ζωνών ή διαμερισμάτων για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά τη λοίμωξη από *Marteilia refringens* όπως αναφέρεται στο σημείο I.3

Επίπεδο κινδύνου	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων	Αριθμός μαλακίων στο δείγμα
Υψηλό	1 ανά έτος	1 ανά διημέρα	150
Μεσαίο	1 ανά διημέρα	1 ανά διημέρα	150
Χαμηλό	1 ανά διημέρα	1 ανά τετραημέρα	150

ΜΕΡΟΣ 5

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ *BONAMIA OSTREAE*

I. Απαιτήσεις σχετικά με τα προγράμματα επιτήρησης ή εξάλειψης για την απόκτηση και διατήρηση υγειονομικού καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά λοίμωξη από *Bonamia ostreae*

I.1. Γενικές απαιτήσεις

Οι υγειονομικές επιθεωρήσεις και, όπου κρίνεται σκόπιμο, η δειγματοληψία στις μονάδες παραγωγής διεξάγονται κατά την περίοδο του έτους που είναι γνωστό ότι ο επιπολασμός του *Bonamia ostreae* στο κράτος μέλος, στη ζώνη ή στο διαμέρισμα μεγιστοποιείται. Όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμα σχετικά δεδομένα, η δειγματοληψία διεξάγεται τον χειμώνα ή στις αρχές της άνοιξης.

Όταν πρόκειται να γίνει δειγματοληψία σε μαλάκια σύμφωνα με τις απαιτήσεις του μέρους 5, εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) εφόσον υπάρχουν *Ostrea edulis*, πρέπει να επιλέγονται για δειγματοληψία μόνο στρείδια του εν λόγω είδους. εάν δεν υπάρχουν *Ostrea edulis*, το δείγμα είναι αντιπροσωπευτικό όλων των λοιπών ευπαθών ειδών που υπάρχουν·
- β) εάν υπάρχουν αδύναμα, ανοικτά ή πρόσφατα νεκρά (αλλά όχι σε αποσύνθεση) μαλάκια, αυτά τα μαλάκια επιλέγονται πρώτα. Εάν δεν υπάρχουν τέτοια μαλάκια, τα μαλάκια που επιλέγονται περιλαμβάνουν τα μεγαλύτερα σε ηλικία, υγιή μαλάκια·
- γ) κατά τη δειγματοληψία σε εκμεταλλεύσεις στις οποίες χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία πηγές νερού για την παραγωγή μαλακίων, στο δείγμα περιλαμβάνονται μαλάκια από όλες τις πηγές νερού έτσι ώστε όλα τα μέρη της εκμετάλλευσης να αντιπροσωπεύονται αναλογικά στο δείγμα·
- δ) κατά τη δειγματοληψία σε περιοχές καλλιέργειας μαλακίων, στο δείγμα περιλαμβάνονται μαλάκια από επαρκή αριθμό σημείων δειγματοληψίας. Οι βασικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή των εν λόγω σημείων δειγματοληψίας είναι τα προηγούμενα σημεία όπου εντοπίστηκε *Bonamia ostreae*, η ιχθυοφόρτιση, η ροή υδάτων, η παρουσία ευπαθών ειδών, η παρουσία ειδών-φορέων, η βιθιμετρία και οι πρακτικές διαχείρισης. Στο δείγμα περιλαμβάνονται οι φυσικοί χώροι ανάπτυξης που βρίσκονται εντός ή πλησίον των περιοχών καλλιέργειας.

I.2. Ειδικές απαιτήσεις για την απόκτηση υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας I όσον αφορά το *Bonamia ostreae*

I.2.1. Προγράμματα επιτήρησης

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά το *Bonamia ostreae* δύναται να αποκτήσει εκ νέου υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος έχουν υποβληθεί τουλάχιστον στο ακόλουθο πρόγραμμα επιτήρησης που περιλαμβάνει υγειονομικές επιθεωρήσεις και τη συλλογή δειγμάτων προς εξέταση.

Διαιτηές πρόγραμμα επιτήρησης:

- α) οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο δύο συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 5.A. που παρατίθεται στο παρόν μέρος·
- β) κατά τη διάρκεια της εν λόγω διαιτηούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 προέκυψαν αρνητικά αποτελέσματα για *Bonamia ostreae* και οποιαδήποτε υπόνοια για *Bonamia ostreae* έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3·
- γ) σε περίπτωση που πρέπει να συμπεριληφθούν στο δείγμα *Ostrea edulis* προερχόμενα από κράτος μέλος, ζώνη ή διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, πρέπει να έχουν εισαχθεί στην εκμετάλλευση ή στην περιοχή καλλιέργειας μαλακίων τουλάχιστον το φθινόπωρο αμέσως πριν από την περίοδο κατά την οποία διεξάγεται το πρόγραμμα επιτήρησης.

I.2.2. Προγράμματα εξάλειψης

Η εξάλειψη του *Bonamia ostreae* θεωρείται αδύνατη στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως όταν το κράτος μέλος κρίνει ότι είναι εφικτό, εφαρμόζεται το ακόλουθο πρότυπο προγράμματος εξάλειψης.

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά τη λοίμωξη με *Bonamia ostreae*, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος έχουν υποβληθεί τουλάχιστον στο ακόλουθο πρόγραμμα εξάλειψης:

- α) τα μέτρα που προβλέπονται στο τμήμα 3 του κεφαλαίου V της οδηγίας 2006/88/EK έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά, και ειδικότερα έχει οριστεί περιοχή περιστολής, όπως αναφέρεται στο άρθρο 32 στοιχείο β) της εν λόγω οδηγίας, συμπεριλαμβανομένης ζώνης προστασίας και ζώνης επίβλεψης περίξ των εκμεταλλεύσεων ή των περιοχών καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επίσημως ως μολυσμένες με *Bonamia ostreae*.

Η περιοχή περιστολής ορίζεται κατά περίπτωση ανάλυσης, λαμβανομένων υπόψη παραγόντων που επηρεάζουν τους κινδύνους διάδοσης της εν λόγω ασθένειας που περιλαμβάνεται στον κατάλογο, όπως: ο αριθμός, το ποσοστό, η ηλικία και η κατανομή των κρουσμάτων θανάτου μαλακίων στην εκμετάλλευση ή στην περιοχή καλλιέργειας μαλακίων που έχει μολυνθεί με *Bonamia ostreae*, συμπεριλαμβανομένων των άγριων μαλακίων· η απόσταση και η ιχθυοφόρτιση των γειτονικών εκμεταλλεύσεων ή περιοχών καλλιέργειας μαλακίων, συμπεριλαμβανομένων των άγριων μαλακίων· η εγγύτητα με εγκαταστάσεις μεταποίησης, εφαπτόμενες εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων· τα είδη που υπάρχουν στις εκμεταλλεύσεις ή στις περιοχές καλλιέργειας μαλακίων, και ιδίως τα ευπαθή είδη και τα είδη-φορείς-γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις πληγείσες και γειτονικές εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων· υδροδυναμικές συνθήκες και άλλοι σημαντικοί από επιδημιολογική άποψη παράγοντες.

Για τον καθορισμό των ζωνών προστασίας και επίβλεψης ισχύουν οι ακόλουθες ελάχιστες απαιτήσεις:

- i) η ζώνη προστασίας ορίζεται σε άμεση γειτνίαση με την εκμετάλλευση ή περιοχή καλλιέργειας μαλακίων που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με *Bonamia ostreae* και αντιστοιχεί σε ζώνη που καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων·
 - ii) η ζώνη επίβλεψης ορίζεται εξωτερικά της ζώνης προστασίας και αντιστοιχεί σε ζώνη η οποία περιβάλλει τη ζώνη προστασίας και καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ εντός της ζώνης προστασίας και οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με *Bonamia ostreae* υπόκεινται σε εντεταλμένη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον τη συλλογή δειγμάτων για την εξέταση 150 μαλακίων ευπαθών ειδών μετά την έναρξη της περιόδου μετάδοσης του *Bonamia ostreae*. Όταν η περίοδος μετάδοσης δεν είναι γνωστή, η δειγματοληψία αρχίζει τον χειμώνα ή στις αρχές της άνοιξης·
- γ) όλες οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές εκμετάλλευσης μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με *Bonamia ostreae* εκκενώνονται, τίθενται σε ανάπαυση και, εάν είναι δυνατόν, καθαρίζονται και απολυμαίνονται. Η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι μηνών.

Όταν εκκενωθούν όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες, εφαρμόζεται συγχρονισμένη ανάπαυση διάρκειας τουλάχιστον τεσσάρων εβδομάδων.

Η αρμόδια αρχή δύναται να αποφασίσει να ζητήσει την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση και άλλων εκμεταλλεύσεων ή περιοχών καλλιέργειας μαλακίων, κατά περίπτωση, εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης. Η διάρκεια της περιόδου ανάπαυσης καθορίζεται από την αρμόδια αρχή κατόπιν εκτίμησης του κινδύνου κατά περίπτωση.

- δ) όλες οι εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες και όλες οι λοιπές εκμεταλλεύσεις ή περιοχές καλλιέργειας μαλακίων που εκκενώνονται εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης επαναπληρούνται με μαλακία προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά λοίμωξη από *Bonamia ostreae*. Η επαναπλήρωση πραγματοποιείται μόνον όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες έχουν εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση σύμφωνα με το σημείο I.2.2 στοιχείο γ)·
- ε) όλες οι εκμεταλλεύσεις και οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/ΕΚ εντός του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος που καλύπτεται από το πρόγραμμα εξάλειψης, πρέπει να υπόκεινται στη συνέχεια στο πρόγραμμα επιτήρησης που προβλέπεται στο σημείο I.2.

I.3. Ειδικές απαιτήσεις για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες (κατηγορία I) όσον αφορά λοίμωξη από *Bonamia ostreae*

Όταν απαιτείται στοχοθετημένη επιτήρηση προκειμένου να διατηρηθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, όπως προβλέπεται στο άρθρο 52 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, όλες οι εκμεταλλεύσεις ή οι περιοχές καλλιέργειας μαλακίων στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας, εντός του οικείου κράτους μέλους, ζώνης ή διαμερίσματος, υπόκεινται σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και διενεργείται δειγματοληψία σύμφωνα με τον πίνακα 5.B που παρατίθεται στο τμήμα II του παρόντος μέρους, λαμβανομένου υπόψη του επιπέδου κινδύνου της εκμετάλλευσης ή της περιοχής καλλιέργειας για λοίμωξη από *Bonamia ostreae*.

Το καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά λοίμωξη από *Bonamia ostreae* μπορεί να διατηρηθεί μόνον εφόσον για όλα τα δείγματα που θα ελεγχθούν με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 προκύψουν αρνητικά αποτελέσματα για *Bonamia ostreae* και έχει αποκλειστεί οποιαδήποτε υπόνοια για *Bonamia ostreae* σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3.

- I.4. Απαιτήσεις σχετικά με την άρση των μέτρων περιστολής που προβλέπονται στο άρθρο 39 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ (μετάβαση από το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V στο υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III) όσον αφορά λοίμωξη από *Bonamia ostreae*

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά λοίμωξη από *Bonamia ostreae* δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια, υπό την προϋπόθεση ότι:

- α) πληρούνται οι απαιτήσεις που ορίζονται στο σημείο I.2.2 στοιχεία α), β) και γ). Σε περίπτωση που η θύση σε ανάπαυση δεν είναι τεχνικώς εφικτή, οι εκμεταλλεύσεις υπόκεινται σε εναλλακτικό μέτρο που παρέχει σχεδόν παρόμοια εγγύηση εξάλειψης του *Bonamia ostreae* από το περιβάλλον της εκμετάλλευσης·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες και όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν τεθεί σε ανάπαυση/έχουν υποβληθεί σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης έχουν επαναπληρωθεί με μαλάκια προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, II ή III όσον αφορά λοίμωξη από *Bonamia ostreae*.
- γ) η επαναπλήρωση έχει πραγματοποιηθεί μόνο μετά την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θύση σε ανάπαυση/υποβολή σε εναλλακτικά μέτρα, σύμφωνα με το στοιχείο α), όλων των εκμεταλλεύσεων ή των περιοχών καλλιέργειας μαλακίων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες·
- δ) δεν έχει επιβεβαιωθεί η λοίμωξη από *Bonamia ostreae* κατά τη διάρκεια της διετούς περιόδου που ακολουθεί την ολοκλήρωση των μέτρων που αναφέρονται στα στοιχεία α), β) και γ), και έχουν αποκλειστεί οι υπόνοιες κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου σύμφωνα με τις διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο II.3.

II. Διαγνωστικές μέθοδοι και διαγνωστικά κριτήρια

II.1. Δείγματα

Ολόκληρο το ζώο υποβάλλεται στο εργαστήριο για τη διενέργεια των διαγνωστικών εξετάσεων που προβλέπονται στα σημεία II.2 και II.3.

II.2. Διαγνωστικές μέθοδοι για την απόκτηση ή διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής για λοίμωξη από *Bonamia ostreae*

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την απόκτηση ή τη διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για λοίμωξη από *Bonamia ostreae* είναι η ιστοπαθολογική εξέταση, τα ιστικά αποτυπώματα ή η PCR. Κατά την εφαρμογή των εν λόγω διαγνωστικών μεθόδων ακολουθούνται οι αντίστοιχες λεπτομερείς μέθοδοι και διαδικασίες που προβλέπονται στο μέρος 5 του παραρτήματος II.

II.3. Διαγνωστικά κριτήρια για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή τον αποκλεισμό της υπόνοιας για λοίμωξη από *Bonamia ostreae*

Όταν απαιτείται η επιβεβαίωση ή ο αποκλεισμός υπόνοιας λοίμωξης από *Bonamia ostreae* σύμφωνα με το άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, τηρούνται οι ακόλουθες διαδικασίες επιθεώρησης, δειγματοληψίας και δοκιμής:

Η εντεταλμένη έρευνα περιλαμβάνει τουλάχιστον μία δειγματοληψία 30 μαλακίων ύποπτων ειδών εάν η υπόνοια βασίζεται σε έκθεση για τη θνησιμότητα ή, εάν όχι, 150 μαλακίων ύποπτων ειδών μετά την έναρξη της περιόδου μετάδοσης του *Bonamia ostreae*. Όταν η περίοδος μετάδοσης δεν είναι γνωστή, η δειγματοληψία αρχίζει τον χειμώνα ή στις αρχές της άνοιξης. Τα δείγματα εξετάζονται με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο i) σύμφωνα με τις λεπτομερείς διαγνωστικές μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο παράρτημα II μέρος 5 τμήμα I.

- i) η παρουσία του *Bonamia ostreae* θεωρείται επιβεβαιωμένη όταν ένα θετικό αποτέλεσμα βάσει ιστοπαθολογικής εξέτασης, ιστικών αποτυπωμάτων ή *in situ* υβριδισμού συνδυάζεται με θετικό αποτέλεσμα μέσω PCR, το οποίο συμπληρώνεται με προσδιορισμό της αλληλουχίας σύμφωνα με τις εγκεκριμένες μεθόδους και διαδικασίες που ορίζονται στο μέρος 5 του παραρτήματος II·
- ii) η υπόνοια λοίμωξης από *Bonamia ostreae* αποκλείεται, εάν από τις εν λόγω δοκιμές δεν προκύψουν περαιτέρω ενδείξεις για παρουσία *Bonamia ostreae*.

Πίνακας 5.A

Σύστημα εποπτείας κρατών μελών, ζωνών ή διαμερισμάτων για την περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες για *Bonamia ostreae*, όπως αναφέρεται στο σημείο I.2.1

	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος	Αριθμός μαλακίων στο δείγμα
Εκμεταλλεύσεις/περιοχές καλλιέργειας μαλακίων	1	1	150

Πίνακας 5.B

Συστήματα εποπτείας κρατών μελών, ζωνών ή διαμερισμάτων για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά τη λοίμωξη από *Bonamia ostreae* όπως αναφέρεται στο σημείο I.3

Επίπεδο κινδύνου	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων	Αριθμός μαλακίων στο δείγμα
Υψηλό	1 ανά έτος	1 ανά διητία	150
Μεσαίο	1 ανά διητία	1 ανά διητία	150
Χαμηλό	1 ανά διητία	1 ανά τετραητία	150

ΜΕΡΟΣ 6

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΙΧΘΥΟΦΘΕΙΡΙΑΣΗΣ (WSD)

I. **Απαιτήσεις σχετικά με τα προγράμματα επιτήρησης και εξάλειψης για την απόκτηση και διατήρηση υγειονομικού καθεστώτος απαλλαγής όσον αφορά τη WSD και για την περισταλή λοίμωξης με WSSV**

I.1. Γενικές απαιτήσεις σχετικά με τις επιθεωρήσεις και τη δειγματοληψία

Η δειγματοληψία καρκινοειδών για εργαστηριακή εξέταση πραγματοποιείται όταν η θερμοκρασία του νερού είναι πιθανότερο να φθάσει το υψηλότερο ετήσιο επίπεδο. Η εν λόγω απαίτηση σχετικά με τη θερμοκρασία του νερού ισχύει επίσης για τις υγειονομικές επιθεωρήσεις, όταν αυτές είναι εφικτές και σκόπιμες.

Όταν πρόκειται να γίνει δειγματοληψία σε καλλιεργούμενα καρκινοειδή σύμφωνα με τις απαιτήσεις που ορίζονται στο παρόν μέρος, εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

α) εάν υπάρχουν αδύναμα ή ετοιμοθάνατα καρκινοειδή στις μονάδες παραγωγής, αυτά τα καρκινοειδή επιλέγονται πρώτα. Εάν δεν υπάρχουν τέτοιου είδους καρκινοειδή, σε εκείνα που επιλέγονται πρέπει να περιλαμβάνονται καρκινοειδή κοορτών διαφορετικού μεγέθους, και ειδικότερα νεαρά και ενήλικα, των επιλεγμένων ευπαθών ειδών, τα οποία θα αντιπροσωπεύονται αναλογικά στο δείγμα·

β) εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία πηγές νερού για την παραγωγή καρκινοειδών, στο δείγμα πρέπει να περιλαμβάνονται ευπαθή καρκινοειδή που αντιπροσωπεύουν όλες τις πηγές νερού·

Όταν απαιτείται στοχευμένη επιτήρηση άγριων πληθυσμών σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, ο αριθμός και η γεωγραφική κατανομή των σημείων δειγματοληψίας καθορίζονται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται εύλογη κάλυψη του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερισματος. Τα σημεία δειγματοληψίας είναι επίσης αντιπροσωπευτικά των διαφορετικών οικοσυστημάτων όπου βρίσκονται οι άγριοι πληθυσμοί ευπαθών ειδών, και ειδικότερα των θαλάσσιων συστημάτων, των εκβολών, των ποτάμιων συστημάτων και των λιμνών.

Όταν απαιτείται στοχευμένη επιτήρηση άγριων πληθυσμών σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της οδηγίας 2006/88/EK, τα καρκινοειδή από τα οποία πρόκειται να γίνει δειγματοληψία επιλέγονται ως εξής:

- i) σε περιοχές θαλάσσιων συστημάτων και εκβολών, επιλέγονται ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα είδη: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* ή γαρίδες της οικογένειας *Penaeidae* όπως *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Εάν δεν υπάρχουν τα εν λόγω είδη, το δείγμα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό όλων των λοιπών ευπαθών δεκάποδων ειδών που υπάρχουν. Δεδομένου του ευρέος φάσματος ευπαθών ξενιστών, οι ξενιστές μπορούν να επιλέγονται από γένη ή οικογένειες της τάξης των Decapoda όπου η ευπάθεια έχει τεκμηριωθεί πειραματικά ή εκ φύσεως.
- ii) σε ποτάμια συστήματα και λίμνες, πρέπει να επιλέγονται ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα είδη: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austrorotambolius pallipes* ή *Orconectes limosus*. Εάν δεν υπάρχουν τα εν λόγω είδη, το δείγμα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό όλων των λοιπών ευπαθών δεκάποδων ειδών που υπάρχουν. Δεδομένου του ευρέος φάσματος ευπαθών ξενιστών, οι ξενιστές μπορούν να επιλέγονται από γένη ή οικογένειες της τάξης των Decapoda όπου η ευπάθεια έχει τεκμηριωθεί πειραματικά ή εκ φύσεως.
- iii) Εάν υπάρχουν αδύναμα ή ετοιμοθάνατα καρκινοειδή, αυτά τα καρκινοειδή επιλέγονται πρώτα. Εάν δεν υπάρχουν τέτοια καρκινοειδή, σε εκείνα που επιλέγονται πρέπει να περιλαμβάνονται καρκινοειδή κοορτών διαφορετικού μεγέθους, και ειδικότερα ιχθύδια και ενήλικα, των επιλεγμένων ευπαθών ειδών, τα οποία θα αντιπροσωπεύονται αναλογικά στο δείγμα.

I.2. Ειδικές απαιτήσεις για την απόκτηση υγειονομικού καθεστώτος κατηγορίας I όσον αφορά τη WSD

I.2.1. Προγράμματα επιτήρησης

- a) ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά τη WSD, σύμφωνα με το παράρτημα III μέρος B της οδηγίας 2006/88/EK, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος συμμορφώνονται με τους σχετικούς όρους που προβλέπονται στο παράρτημα V της εν λόγω οδηγίας και όλες αυτές οι εκμεταλλεύσεις και, όταν απαιτείται βάσει του παραρτήματος V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο, τα σημεία δειγματοληψίας σε άγριους πληθυσμούς που επιλέγονται σύμφωνα με το εν λόγω σημείο 2, υπόκεινται στο ακόλουθο διετές πρόγραμμα επιτήρησης που περιλαμβάνει υγειονομικές επιθεωρήσεις και τη συλλογή δειγμάτων προς εξέταση.

Οι εκμεταλλεύσεις ή τα σημεία δειγματοληψίας έχουν υποβληθεί σε υγειονομικές επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες για ελάχιστη περίοδο δύο συνεχόμενων ετών, όπως προβλέπεται στον πίνακα 6.A που παρατίθεται στο τμήμα II.

Κατά τη διάρκεια της εν λόγω διετούς περιόδου, από την εξέταση όλων των δειγμάτων με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο σημείο II.2 έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα για λοίμωξη από WSD και οποιαδήποτε υπόνοια για WSD έχει αποκλειστεί σύμφωνα με τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3.

- β) εάν κατά τη διάρκεια εφαρμογής του προγράμματος επιτήρησης που αναφέρεται στο στοιχείο α) επιβεβαιωθεί λοίμωξη από WSSV σε εκμετάλλευση η οποία περιλαμβάνεται στο εν λόγω πρόγραμμα επιτήρησης και, ως εκ τούτου, ανακληθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας II της εκμετάλλευσης, η εν λόγω εκμετάλλευση δύναται να επανακτήσει αμέσως το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας II και να συνεχίσει την εφαρμογή του προγράμματος επιτήρησης προκειμένου να αποκτήσει καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες χωρίς να εφαρμόσει πρόγραμμα εξάλειψης ορίζεται στο σημείο I.2.2., υπό τον όρο ότι η εκμετάλλευση:
 - i) είναι ηπειρωτική και το υγειονομικό καθεστώς της όσον αφορά τη WSD είναι ανεξάρτητο από το υγειονομικό καθεστώς των φυσικών υδάτων που την περιβάλλουν όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος II σημείο 3 της οδηγίας 2006/88/EK.
 - ii) η εκμετάλλευση έχει εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση· η περίοδος ανάπαυσης πρέπει να έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων.
 - iii) έχει επαναπληρωθεί με καρκινοειδή προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη WSD.

I.2.2. Προγράμματα εξάλειψης

I.2.2.1. Γενικές απαιτήσεις

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά τη WSD, δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του οικείου κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερισματος έχουν υποβληθεί τουλάχιστον στο ακόλουθο πρόγραμμα εξάλειψης:

- α) τα ελάχιστα μέτρα ελέγχου που προβλέπονται στο τμήμα 4 του κεφαλαίου V της οδηγίας 2006/88/EK έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά και έχει οριστεί περιοχή περιστολής, όπως αναφέρεται στο άρθρο 32 στοιχείο β) της εν λόγω οδηγίας, συμπεριλαμβανομένης ζώνης προστασίας και ζώνης επίβλεψης περίεξ της εκμετάλλευσης ή των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με WSD.

Η περιοχή περιστολής πρέπει να έχει οριστεί κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη παραγόντων που επηρεάζουν τους κινδύνους διάδοσης της WSD στα καλλιεργούμενα και άγρια καρκινοειδή, όπως: ο αριθμός, η αναλογία και η κατανομή των κρουσμάτων θανάτου καρκινοειδών στην εκμετάλλευση που έχει μολυνθεί με WSD· η απόσταση από τις γειτονικές εκμεταλλεύσεις και η πυκνότητα των τελευταίων· οι εφαπτόμενες εκμεταλλεύσεις· τα είδη που φιλοξενούν οι εκμεταλλεύσεις· οι πρακτικές καλλιέργειας που εφαρμόζονται στις πληγείσες και σε γειτονικές εκμεταλλεύσεις· υδροδυναμικές συνθήκες και άλλοι σημαντικοί από επιδημιολογική άποψη παράγοντες.

Για τον καθορισμό των ζωνών προστασίας και επίβλεψης ισχύουν οι ακόλουθες ελάχιστες απαιτήσεις:

- i) η ζώνη προστασίας ορίζεται σε άμεση γειτνίαση με την εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με WSD και αντιστοιχεί:

- (3) σε θαλάσσιες περιοχές και εκβολές ποταμών: σε ζώνη που περιέχεται σε κύκλο ακτίνας τουλάχιστον ίσης με την απόσταση μετακίνησης της παλίρροιας ή τουλάχιστον 5 χιλιομέτρων, όποια είναι μεγαλύτερη, με κέντρο την εκμετάλλευση που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με WSD, ή ισοδύναμη ζώνη που καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων· ή
- (4) σε γλυκά ύδατα: σε ολόκληρη τη λεκάνη απορροής της εκμετάλλευσης που έχει χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένη με WSD· η αρμόδια αρχή δύναται να περιορίσει την επέκταση της ζώνης προστασίας σε τμήματα της λεκάνης απορροής, υπό τον όρο ότι δεν τίθεται σε κίνδυνο η πρόληψη της διάδοσης της WSD·

- ii) η ζώνη επίβλεψης ορίζεται εξωτερικά της ζώνης προστασίας και αντιστοιχεί:

- (5) σε θαλάσσιες περιοχές: σε ζώνη η οποία, περιβάλλοντας τη ζώνη προστασίας, επικαλύπτει τις ζώνες μετακίνησης της παλίρροιας· ή σε ζώνη η οποία περιβάλλει τη ζώνη προστασίας και περιέχεται σε κύκλο ακτίνας 10 χιλιομέτρων από το κέντρο της ζώνης προστασίας· ή σε ισοδύναμη ζώνη που έχει καθοριστεί βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων· ή

- (6) σε γλυκά ύδατα: σε εκτεταμένη ζώνη εκτός της καθορισθείσας ζώνης προστασίας·

- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός της ζώνης προστασίας και οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με WSD υπόκεινται σε εντεταλμένη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα:

- i) συλλογή δειγμάτων προς εξέταση, τα οποία περιλαμβάνουν 10 καρκινοειδή όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε WSD, ή 150 καρκινοειδή όταν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα· και

- ii) μία υγειονομική επιθεώρηση· στις εκμεταλλεύσεις στις οποίες έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα από τις εξετάσεις που αναφέρονται στο σημείο i), οι υγειονομικές επιθεωρήσεις συνεχίζονται μία φορά ανά μήνα κατά τη διάρκεια της εποχής του έτους όπου η θερμοκρασία του νερού είναι πιθανότερο να φθάσει τα υψηλότερα ετήσια επίπεδα, έως την ανάκληση της ζώνης προστασίας σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ).

- γ) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με WSD εκκενώνονται, καθαρίζονται, απολυμνούνται και τίθενται σε ανάπαυση. Η περίοδος ανάπαυσης έχει διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων. Όταν εκκενωθούν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες, εφαρμόζεται συγχρονισμένη ανάπαυση διάρκειας τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Η παρούσα παράγραφος εφαρμόζεται επίσης στην περίπτωση νέων εκμεταλλεύσεων που χαρακτηρίζονται επισήμως ως μολυσμένες κατά τη διάρκεια της εφαρμογής του προγράμματος εξάλειψης.

Όταν τίθενται σε ανάπαυση οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες, οι ζώνες προστασίας μετατρέπονται σε ζώνες επίβλεψης.

Η αρμόδια αρχή δύναται να αποφασίσει να ζητήσει την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση και άλλων εκμεταλλεύσεων εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης. Η διάρκεια αυτής της περιόδου ανάπαυσης καθορίζεται από την αρμόδια αρχή κατόπιν εκτίμησης του κινδύνου κατά περίπτωση.

- δ) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες και όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν τεθεί σε ανάπαυση εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης επαναπληρούνται:
- i) με καρκινοειδή προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη WSD· ή
 - ii) για μεταβατική περίοδο έως τις 31 Δεκεμβρίου 2020, με καρκινοειδή προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με εγκεκριμένο πρόγραμμα επιτήρησης της WSD.

Η επανεισαγωγή των πληθυσμών ιχθύων πραγματοποιείται μόνον όταν όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με WSD έχουν εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση σύμφωνα με το σημείο I.2.2.1 στοιχείο γ).

- ε) όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της οδηγίας 2006/88/EK εντός του κράτους μέλους, της ζώνης ή του διαμερίσματος που καλύπτεται από το πρόγραμμα εξάλειψης και, όταν απαιτείται επιτήρηση άγριων πληθυσμών, τα σημεία δειγματοληψίας που επιλέγονται σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος I σημείο 2 δεύτερο εδάφιο της εν λόγω οδηγίας υπόκεινται στη συνέχεια τουλάχιστον στο πρόγραμμα που προβλέπεται στο σημείο I.2.1.

I.2.2.2. Απαιτήσεις όσον αφορά την αποκατάσταση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά τη WSD για ηπειρωτικά διαμερίσματα που περιλαμβάνουν μία και μόνο εκμετάλλευση η οποία προηγουμένως είχε χαρακτηριστεί ως απαλλαγμένη από WSD

Ένα ηπειρωτικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει μία και μόνο εκμετάλλευση με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη WSD και του οποίου το υγειονομικό καθεστώς όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο είναι ανεξάρτητο από τα φυσικά ύδατα που το περιβάλλουν σύμφωνα με το παράρτημα V μέρος II σημείο 3 της οδηγίας 2006/88/EK, και του οποίου το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I έχει ανακληθεί σύμφωνα με το άρθρο 53 παράγραφος 3 της εν λόγω οδηγίας, δύναται να επανακτήσει το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I αμέσως μόλις η αρμόδια αρχή επιβεβαιώσει ότι πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

- α) η μολυσμένη με WSD εκμετάλλευση έχει εκκενωθεί, καθαριστεί, απολυμανθεί και τεθεί σε ανάπαυση· η περίοδος ανάπαυσης πρέπει να είχε διάρκεια τουλάχιστον έξι εβδομάδων·
- β) η μολυσμένη με WSD εκμετάλλευση έχει επαναπληρωθεί με καρκινοειδή προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I όσον αφορά τη WSD.

I.3. Ειδικές απαιτήσεις όσον αφορά τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες (κατηγορία I) όσον αφορά τη WSD

Όταν απαιτείται στοχοθετημένη επιτήρηση προκειμένου να διατηρηθεί το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, όπως ορίζεται στο άρθρο 52 της οδηγίας 2006/88/EK, όλες οι εκμεταλλεύσεις στις οποίες διατηρούνται ευπαθή είδη που περιλαμβάνονται στο μέρος II του παραρτήματος IV της εν λόγω οδηγίας, εντός του οικείου κράτους μέλους, ζώνης ή διαμερίσματος, υπόκεινται σε υγειονομική επιθεώρηση και διενεργείται δειγματοληψία σύμφωνα με τον πίνακα 6.B που παρατίθεται στο τμήμα II, λαμβανομένου υπόψη του επιπέδου κινδύνου της εκμετάλλευσης για μόλυνση με WSD.

Σε κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα όπου ο αριθμός των εκμεταλλεύσεων είναι περιορισμένος και η στοχοθετημένη επιτήρηση των εν λόγω εκμεταλλεύσεων δεν παρέχει επαρκή επιδημιολογικά δεδομένα, τα προγράμματα εποπτείας για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες περιλαμβάνουν σημεία δειγματοληψίας που επιλέγονται σύμφωνα με τις απαιτήσεις που ορίζονται στο σημείο I.1.

Η εποπτεία και η δειγματοληψία στα εν λόγω σημεία πραγματοποιείται εκ περιτροπής στο 50 % των σημείων δειγματοληψίας κάθε έτος. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σύμφωνα με τον πίνακα 6.B που παρατίθεται στο τμήμα II. Τα δείγματα επιλέγονται, προετοιμάζονται και εξετάζονται σύμφωνα με τις μεθόδους διάγνωσης και δειγματοληψίας που ορίζονται στο τμήμα II και από τις εργαστηριακές εξετάσεις πρέπει να έχουν προκύψει αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά τον παθογόνο παράγοντα της WSD.

Το καθεστώς απαλλαγής από ασθένειες διατηρείται μόνον εφόσον για όλα τα δείγματα που θα ελεγχθούν με τη χρήση των μεθόδων διάγνωσης και δειγματοληψίας που προβλέπονται στο σημείο II.2 προκύψουν αρνητικά αποτελέσματα για WSD και οποιαδήποτε υπόνοια για WSD έχει αποκλειστεί σύμφωνα με την εντεταλμένη έρευνα και τις διαγνωστικές μεθόδους που προβλέπονται στο σημείο II.3.

I.4. Απαιτήσεις σχετικά με την άρση των μέτρων περιστολής που προβλέπονται στο άρθρο 39 της οδηγίας 2006/88/EK, και (μετάβαση από το υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V στο υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III) όσον αφορά τη WSD

Ένα κράτος μέλος, μια ζώνη ή ένα διαμέρισμα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας V όσον αφορά την τη WSD δύναται να αποκτήσει υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας III όσον αφορά την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο, υπό την προϋπόθεση ότι:

- α) πληρούνται οι απαιτήσεις που προβλέπονται στο σημείο I.2.2.1 στοιχεία α), β) και γ). Σε περίπτωση που η θέση σε ανάπαυση δεν είναι τεχνικώς εφικτή, οι εκμεταλλεύσεις υπόκεινται σε εναλλακτικό μέτρο που παρέχει σχεδόν παρόμοια εγγύηση εξάλειψης του WSSV από το περιβάλλον της εκμετάλλευσης·
- β) όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με WSD και όλες οι εκμεταλλεύσεις που έχουν τεθεί σε ανάπαυση/έχουν υποβληθεί σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) εντός των καθορισμένων ζωνών προστασίας και επίβλεψης έχουν επαναπληρωθεί με καρκινοειδή προερχόμενα από κράτη μέλη, ζώνες ή διαμερίσματα με υγειονομικό καθεστώς κατηγορίας I, II ή III όσον αφορά τη WSD·
- γ) η επαναπλήρωση έχει πραγματοποιηθεί μόνο μετά την εκκένωση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και τη θέση σε ανάπαυση/υποβολή σε εναλλακτικά μέτρα σύμφωνα με το στοιχείο α) όλων των εκμεταλλεύσεων που έχουν χαρακτηριστεί επισήμως ως μολυσμένες με WSD·
- δ) δεν έχει ανιχνευτεί WSD κατά τη διάρκεια της διετούς περιόδου που ακολουθεί την ολοκλήρωση των μέτρων που αναφέρονται στα εδάφια α) και β) και έχουν αποκλειστεί οι υπόνοιες κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου σύμφωνα με τις διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο II.3.

II. Μέθοδοι δειγματοληψίας και διάγνωσης

II.1. Δείγματα

Δείγματα περιβλήματος, είτε διαχωρισμένα είτε περιεχόμενα σε άκρα βάνισης, πλεοποδίων, τμημάτων του στόματος ή βραχίων του ζώου που υποβάλλεται σε εξέταση σταθεροποιούνται σε 95 % αιθανόλη πριν από την προετοιμασία των δειγμάτων για PCR δύο βημάτων.

Άλλα δείγματα, σταθεροποιημένα για ιστολογική εξέταση και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, μπορούν σε συλλέγονται για την υποστήριξη των διαγνωστικών δεδομένων που προκύπτουν από την PCR.

II.2. Διαγνωστικές μέθοδοι για την απόκτηση ή διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά τη WSD

Η διαγνωστική μέθοδος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση ή τη διατήρηση καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά τη WSD σύμφωνα με τις λεπτομερείς μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο μέρος 6 του παραρτήματος II, είναι η PCR δύο βημάτων.

Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος της PCR δύο βημάτων, το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του αμπλικονίου πριν εφαρμοστούν τα αρχικά μέτρα ελέγχου που προβλέπονται στο άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/EK, ει δυνατόν υπό τις εκάστοτε συνθήκες μέσω της κατάδειξης παθολογικών σημείων WSD στους ευπαθείς ξενιστές που επιλέχθηκαν, μέσω ιστολογικής εξέτασης και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.

II.3. Εντεταλμένη έρευνα και διαγνωστικές μέθοδοι για τον αποκλεισμό της υπόνοιας ή την επιβεβαίωση της παρουσίας λοίμωξης από WSD

Όταν απαιτείται η επιβεβαίωση της παρουσίας λοίμωξης από WSD ή ο αποκλεισμός υπόνοιας λοίμωξης από την εν λόγω ασθένεια σύμφωνα με το άρθρο 28 της οδηγίας 2006/88/EK, τηρούνται οι ακόλουθες διαδικασίες επιθεώρησης, δειγματοληψίας και δοκιμής:

- α) η εντεταλμένη έρευνα περιλαμβάνει τουλάχιστον μία υγειονομική επιθεώρηση και μία συλλογή δείγματος 10 καρκινοειδών όταν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που παραπέμπουν σε λοίμωξη από WSD, ή τουλάχιστον 150 καρκινοειδών όταν δεν υπάρχουν κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα. Τα δείγματα ελέγχονται με τη χρήση της διαγνωστικής μεθόδου που ορίζεται στο σημείο II.2 (PCR δύο βημάτων)·

- β) η παρουσία WSD θεωρείται επιβεβαιωμένη όταν η PCR δύο βημάτων ακολουθούμενη από προσδιορισμό της αλληλουχίας, σύμφωνα με τις λεπτομερείς μεθόδους και διαδικασίες που προβλέπονται στο μέρος 6 του παραρτήματος II, είναι θετική για WSSV και όταν υπάρχουν σημεία WSD στους επιλεγμένους ξενιστές.

Η υπόνοια WSD μπορεί να αποκλειστεί εάν από τις δοκιμές δεν προκύψουν περαιτέρω ενδείξεις για παρουσία WSD.

Πίνακας 6.A

Σύστημα εποπτείας κρατών μελών, ζωνών και διαμερισμάτων για τη διετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της απόκτησης καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια WSD, όπως αναφέρεται στο σημείο I.2.1

	Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ανά έτος	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανά έτος	Αριθμός καρκινοειδών στο δείγμα
Εκμεταλλεύσεις/σημεία δειγματοληψίας	1	1	150

Πίνακας 6.B

Συστήματα εποπτείας κρατών μελών, ζωνών ή διαμερισμάτων για τη διατήρηση του καθεστώτος απαλλαγής από την ασθένεια WSD, όπως αναφέρεται στο σημείο I.3

Επίπεδο κινδύνου	Αριθμός υγειονομικών επιθεωρήσεων	Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων	Αριθμός καρκινοειδών στο δείγμα
Υψηλό	1 ανά έτος	1 ανά διητία	150
Μεσαίο	1 ανά διητία	1 ανά διητία	150
Χαμηλό	1 ανά διητία	1 ανά τετραετία	150

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

I. Εισαγωγή

Το παρόν παράρτημα ορίζει τις λεπτομερείς διαδικασίες για τις διαγνωστικές μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται στις εργαστηριακές εξετάσεις στο πλαίσιο προγραμμάτων εξάλειψης και επιτήρησης που ορίζονται στο παράρτημα Ι της παρούσας απόφασης, καθώς και για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της υπόνοιας παρουσίας των ακόλουθων μη εξωτικών ασθενειών που περιλαμβάνονται στο παράρτημα ΙV μέρος ΙΙ της οδηγίας 2006/88/ΕΚ («οι ασθένειες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο») σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της εν λόγω οδηγίας:

1.	Ιογενής αιμορραγική σηψαιμία (VHS)	Μέρος 1
2.	Λοιμώδης αιματοποιητική νέκρωση (IHN)	Μέρος 1
3.	Νόσος του έρπητα του ψαριού σαζάνι (νόσος KHV)	Μέρος 2
4.	Λοιμώδης αναμία του σολομού (ΛΑΣ)	Μέρος 3
5.	Λοίμωξη από <i>Marteilia refringens</i>	Μέρος 4
6.	Λοίμωξη από <i>Bonamia ostreae</i>	Μέρος 5
7.	Ιχθυοφθειρίαση (WSD)	Μέρος 6

II. Ορισμοί

Για τους σκοπούς του παρόντος παραρτήματος, «υπόστρωμα μεταφοράς» σημαίνει ένα υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας με 10 % ορό μόσχου και 200 iu πενικιλίνη, 200 μg στρεπτομυκίνη και 200 μg καναμυκίνη ανά χιλιοστόλιτρο (ml) ή με άλλα αντιβιοτικά αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας.

ΜΕΡΟΣ 1

ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΙHN ΚΑΙ ΤΗΣ VHS

I. Διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες για την επιτήρηση της VHS και της IHN

Κατά τη διενέργεια της δειγματοληψίας και των εργαστηριακών εξετάσεων για τους σκοπούς της απόκτησης ή της διατήρησης του καθεστώτος απαλλαγής από ασθένειες όσον αφορά την IHN ή τη VHS, όπως ορίζεται στο παράρτημα Ι μέρος 1 τμήμα Ι, με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο μέρος 1 σημεία ΙΙ.1 και ΙΙ.2 του εν λόγω παραρτήματος, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες που προβλέπονται στα ακόλουθα σημεία Ι.1 έως Ι.6.

I.1. Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων ιχθύων

I.1.1. Ιστοί για ιολογική εξέταση σε κυτταροκαλλιέργεια

Πριν από την αποστολή ή μεταφορά στο εργαστήριο, τμήματα οργάνων των ιχθύων αφαιρούνται προς εξέταση με αποστειρωμένα εργαλεία ανατομής και τοποθετούνται σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν υπόστρωμα μεταφοράς.

Η ποσότητα του υλικού ιχθύων που είναι κατάλληλο για ιολογική εξέταση σε κυτταροκαλλιέργεια και μέσω RT-qPCR εξαρτάται από το μέγεθος των ιχθύων. Επομένως, οι ιστοί που επιλέγονται προς δειγματοληψία είναι ολόκληρα ιχθύδια (μήκος σώματος < 4 cm), εντόσθια, συμπεριλαμβανομένου του νεφρού (4 cm < μήκος σώματος < 6 cm) ή, για ιχθύς μεγαλύτερου μεγέθους, το νεφρό, η σπλήνα, η καρδιά και/ή ο εγκέφαλος, καθώς και το ωθητικό υγρό από γεννιέστερες κατά τον χρόνο της αναπαραγωγής.

Ωθητικό ή σπερματικό υγρό ή τμήματα οργάνων από 10 ιχθύς κατ' ανώτατο όριο συλλέγονται σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα, ο οποίος περιέχει τουλάχιστον 4 ml υποστρώματος μεταφοράς, και αποτελούν ένα ενοποιημένο δείγμα. Σε κάθε δείγμα ο ιστός ζυγίζει τουλάχιστον 0,5 g.

Η ιολογική εξέταση σε κυτταροκαλλιέργεια ξεκινά το συντομότερο δυνατόν και οπωσδήποτε εντός 48 ωρών από τη συλλογή των δειγμάτων. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, η ιολογική εξέταση μπορεί να ξεκινήσει το αργότερο εντός 72 ωρών από τη συλλογή του υλικού, υπό τον όρο ότι το προς εξέταση υλικό προστατεύεται από υπόστρωμα μεταφοράς και ότι κατά τη διάρκεια της μεταφοράς μπορούν να τηρηθούν οι απαιτήσεις σχετικά με τη θερμοκρασία.

I.1.2. Δείγματα για ανάλυση αντίστροφης μεταγραφάσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR ή RT-qPCR)

Τα δείγματα λαμβάνονται από τους ιχθύς σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο I.1.1 με τη βοήθεια αποστειρωμένου εργαλείου και μεταφέρονται σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα που περιέχει υπόστρωμα μεταφοράς. Ιστός από 10 ιχθύς συλλέγεται σε έναν σωλήνα και αποτελεί ένα ενοποιημένο δείγμα. Ωστόσο, σε περίπτωση που η ποσότητα του ενοφθαλμίσματος είναι μικρή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ιστός από έως πέντε ιχθείς. Εναλλακτικά, τα δείγματα ενοποιούνται σε αντιδραστήρια σταθεροποίησης του RNA, για παράδειγμα 0,2 g ιστού/ml αντιδραστηρίου σύμφωνα με τη σύσταση των κατασκευαστών. Ωστόσο, κάθε ιχθύς υφίσταται επεξεργασία χωριστά και δεν ενοποιείται με άλλα δείγματα λόγω της μικρής ποσότητας υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή.

Είναι δυνατή επίσης η αποστολή ολόκληρων ιχθύων στο εργαστήριο.

I.2. Αποστολή δειγμάτων ιχθύων

Οι σωλήνες που περιέχουν ιστούς ιχθύων σε υπόστρωμα μεταφοράς για κυτταροκαλλιέργεια ή ανάλυση RT-PCR/RT-qPCR τοποθετούνται σε μονωμένους περιέκτες, π.χ. κιβώτια πολυστυρολίου με παχιά τοιχώματα, μαζί με αρκετό πάγο ή εναλλακτικό υπόστρωμα ψύξης με παρόμοια ψυκτική επίδραση για να εξασφαλιστεί, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς στο εργαστήριο, η ψύξη των δειγμάτων. Ωστόσο, αποφεύγεται η κατάψυξη των δειγμάτων. Η θερμοκρασία ενός δείγματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του δεν πρέπει ποτέ να υπερβαίνει τους 10 °C και τα δοχεία μεταφοράς κατά την παραλαβή τους πρέπει να περιέχουν ακόμη πάγο, ή μία ή περισσότερες παγοκολώνες πρέπει να είναι εν μέρει ή πλήρως παγωμένες.

Είναι δυνατή η αποστολή ολόκληρων ιχθύων στο εργαστήριο, εφόσον κατά τη μεταφορά είναι δυνατή η τήρηση των απαιτήσεων όσον αφορά τη θερμοκρασία που αναφέρονται στην πρώτη παράγραφο. Οι ολόκληροι ιχθείς τυλίγονται σε απορροφητικό χαρτί και τελικά αποστέλλονται σε πλαστική σακούλα. Είναι δυνατή επίσης η αποστολή ζωντανών ιχθύων.

I.3. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού

Με την έγκριση του διαγνωστικού εργαστηρίου, μπορούν να ληφθούν και άλλοι ιστοί ιχθύων και να υποστούν προπαρασκευή για συμπληρωματικές εξετάσεις.

I.4. Προετοιμασία των δειγμάτων για εξέταση κυτταροκαλλιέργειας και RT-qPCR

I.4.1. Κατάψυξη σε εξαιρετικές περιπτώσεις

Εάν προκύψουν πρακτικές δυσκολίες που καθιστούν αδύνατη την επεξεργασία των δειγμάτων εντός 48 ωρών από τη συλλογή των ιστών ιχθύων, μπορεί να γίνει αποδεκτή η κατάψυξη των δειγμάτων ιστού σε υπόστρωμα μεταφοράς στους -20 °C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία και η διεξαγωγή της ιολογικής εξέτασης εντός 14 ημερών. Ωστόσο, ο ιστός ιχθύων επιτρέπεται να καταψυχθεί και να αποψυχθεί μόνο μία φορά πριν από την εξέταση. Πρέπει να τηρούνται αρχεία με λεπτομερή στοιχεία για τους λόγους που επέβαλαν κάθε κατάψυξη των δειγμάτων των ιστών ιχθύων.

I.4.2. Ομογενοποίηση των οργάνων

Στο εργαστήριο ομογενοποιούνται πλήρως, με χωνευτήρα, αναμεικτή ή ιγδίο με αποστειρωμένη άμμο, οι ιστοί των ιχθύων που βρίσκονται στους σωλήνες και στη συνέχεια τοποθετούνται σε μορφή εναιωρήματος στο αρχικό υπόστρωμα μεταφοράς.

Εάν το δείγμα αποτελείται από ολόκληρο ιχθύ μικρότερο από 4 cm, αυτός τεμαχίζεται με αποστειρωμένο ψαλίδι ή νυστέρι μετά την αφαίρεση του σώματος που βρίσκεται όπισθεν του ανοίγματος των εντοσθίων. Εάν το δείγμα αποτελείται από ολόκληρο ιχθύ με μήκος σώματος μεταξύ 4 και 6 cm, συλλέγονται τα εντόσθια, συμπεριλαμβανομένου του νεφρού. Εάν το δείγμα αποτελείται από ολόκληρο ιχθύ μήκους άνω των 6 cm, τα δείγματα ιστών συλλέγονται όπως περιγράφεται στο σημείο I.1. Τα δείγματα ιστών τεμαχίζονται με αποστειρωμένο ψαλίδι ή νυστέρι, ομογενοποιούνται όπως περιγράφεται στην πρώτη παράγραφο του παρόντος σημείου και τοποθετούνται σε μορφή εναιωρήματος στο υπόστρωμα μεταφοράς.

Η τελική αναλογία μεταξύ του ιστολογικού υλικού και του υποστρώματος μεταφοράς προσαρμόζεται στο εργαστήριο σε 1:10.

I.4.3. Φυγοκέντρηση του πολτού

Ο πολτός φυγοκεντρείται σε καταψυχόμενο φυγόκεντρο στους 2 °C έως 5 °C στα 2 000 έως 4 000 × g επί 15 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται και μπορεί να εκτεθεί σε αντιβιοτικά είτε επί 4 ώρες στους 15 °C είτε ολόκληρη τη νύχτα στους 4 °C έως 8 °C. Εάν η αποστολή του δείγματος έγινε μέσα σε υπόστρωμα μεταφοράς, το υπερκείμενο υγρό δεν χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία με αντιβιοτικά.

Εάν προκύψουν πρακτικές δυσκολίες, όπως βλάβη του επωαστή ή προβλήματα στις κυτταροκαλλιέργειες, που καθιστούν αδύνατο τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων εντός 48 ωρών από τη δειγματοληψία των ιστών ιχθύων, επιτρέπεται η κατάψυξη του υπερκείμενου υγρού στους -80 °C, αλλά θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ιολογική εξέταση εντός 14 ημερών.

Εάν το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε αποθηκευτεί στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ εντός 48 ωρών από τη δειγματοληψία, μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί μία μόνο φορά για ιολογική εξέταση.

Πριν από τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων, το υπερκείμενο υγρό αναμειγνύεται με ίσα μέρη μιας κατάλληλα αραιωμένης ομάδας αντιορών στους ενδογενείς ορότυπους του ιού της λοιμώδους παγκρεατικής νέκρωσης (IPN), και επωάζεται κατ' αυτόν τον τρόπο επί τουλάχιστον μία ώρα στους $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή το πολύ επί 18 ώρες στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ο τίτλος του αντιορού είναι τουλάχιστον $1/2\ 000$ σε δοκιμή εξουδετέρωσης 50% της επιφανειακής πλάκας.

Η επεξεργασία όλων των ενοφθαλμισμάτων με τον αντιορό στον ιό IPN αποσκοπεί στην αποτροπή ανάπτυξης του κυτταροπαθολογικού φαινομένου (ΚΠΦ), οφειλόμενου στον ιό IPN, σε ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες. Αυτό θα μειώσει τη διάρκεια των ιολογικών εξετάσεων, καθώς και τον αριθμό των περιπτώσεων στις οποίες η εμφάνιση του ΚΠΦ θα θεωρείται εν δυνάμει ενδεικτική για VHSV ή IHNV.

Όταν τα δείγματα προέρχονται από μονάδες παραγωγής που θεωρούνται ως μη προσβληθείσες από IPN, είναι δυνατόν να παραλειφθεί η επεξεργασία των ενοφθαλμισμάτων με τον αντιορό στον ιό IPN.

I.4.4. Προετοιμασία του δείγματος για προγράμματα επιτήρησης βασισμένα σε RT-PCR και RT-qPCR

Εάν η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε υπόστρωμα μεταφοράς, διεξάγεται η διαδικασία που ορίζεται στα σημεία I.4.2 και I.4.3. Μετά τη φυγοκέντρηση, συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό και πραγματοποιείται εξαγωγή του RNA. Εφόσον δεν πρόκειται να διεξαχθεί περαιτέρω εξέταση αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση, τα δείγματα καταψύχονται αμέσως σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή χαμηλότερη.

Για ανάλυση των ιστών ιχθύων που διατηρούνται σε αντιδραστήριο σταθεροποίησης του RNA, διεξάγονται οι επακόλουθες εργασίες εντός των παρακάτω χρονικών ορίων για τα δείγματα που φυλάσσονται στις διάφορες θερμοκρασίες.

δείγματα που φυλάσσονται στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: μία ημέρα,

δείγματα που φυλάσσονται στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$: μία εβδομάδα,

δείγματα που φυλάσσονται στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: ένας μήνας,

δείγματα που φυλάσσονται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: επ' αόριστον

Τα δείγματα που έχουν ενοποιηθεί σε αντιδραστήριο σταθεροποίησης του RNA αντιμετωπίζονται ως μεμονωμένα δείγματα σε αντιδραστήριο σταθεροποίησης του RNA. Για τα δείγματα που έχουν ενοποιηθεί σε αντιδραστήριο σταθεροποίησης του RNA, η ποσότητα δείγματος δεν υπερβαίνει την ποσότητα που συνιστάται από τον κατασκευαστή για την εξαγωγή με κιτ RNA, όπως τα κιτ RNeasy Mini (Qiagen) ή παρόμοια κιτ. Εάν έχουν ενοποιηθεί μεγαλύτερα δείγματα, τα κιτ ή οι μέθοδοι εξαγωγής πρέπει να ανταποκρίνονται σε αυτή την ενοποίηση.

Τα δείγματα που συλλέγονται σε αντιδραστήρια σταθεροποίησης του RNA δεν χρησιμοποιούνται για κυτταροκαλλιέργειες.

I.4.5. Ενοποίηση δειγμάτων για RT-qPCR

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα πρωτόκολλα RT-qPCR που παρέχονται είναι παρόμοιας ή υψηλότερης ευαισθησίας από τις μεθόδους κυτταροκαλλιέργειας, για την ανάλυση PCR μπορεί να είναι αποδεκτή η χρήση υπερκείμενου υγρού από ομογενοποιημένο ιστολογικό υλικό ιχθύων που προέρχεται από ενοποιημένα όργανα από έως 10 ιχθύς σε υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας. Ωστόσο, δεδομένου ότι το ενοφθαλμισμα που χρησιμοποιείται για την PCR είναι πολύ μικρότερο σε σύγκριση με αυτό της κυτταροκαλλιέργειας, γίνεται προσεκτική ομογενοποίηση όλων των ιστών ιχθύων πριν από την αντιπαραβολή του υλικού για εξαγωγή.

Η ίδια αρχή ισχύει και για δείγματα που συλλέγονται σε αντιδραστήρια σταθεροποίησης του RNA. Εντούτοις, στην περίπτωση αυτή συχνά είναι δύσκολο να συλλεχθεί αντιπροσωπευτικό υλικό από έως 10 ιχθύς σε έναν σωλήνα και επομένως ο αριθμός των ιχθύων ανά ομάδα μειώνεται σε 2 έως 5.

I.5. Ιολογική εξέταση σε κυτταροκαλλιέργεια

I.5.1. Κυτταροκαλλιέργειες και υποστρώματα

Η κυτταρική σειρά BF-2 (Bluegill fry -2) ή RTG-2 (Rainbow trout gonad -2) και κύτταρα είτε EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) είτε FHM (Fathead minnow) αναπτύσσονται στους 20 έως $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε κατάλληλο υπόστρωμα, δηλαδή σε θρεπτικό υλικό ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων Eagle (Eagle's Minimum essential medium — MEM) ή τροποποιήσεις αυτού, με συμπλήρωμα 10% βοείου εμβρυακού ορού και αντιβιοτικών σε τυποποιημένες συγκεντρώσεις.

Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κλειστά φιαλίδια, το υπόστρωμα ρυθμίζεται με διττανθρακικό. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για καλλιέργεια κυττάρων σε ανοικτές μονάδες πρέπει να ρυθμίζεται με τρεις (υδροξυμεθυλο) αμινομεθάνιο-HCl (Tris-HCl) (23 mM) και διττανθρακικό νάτριο (6 mM). Το pH πρέπει να είναι $7,6 \pm 0,2$.

Οι κυτταροκαλλιέργειες που θα χρησιμοποιηθούν για τον ενοφθαλμισμό με ιστολογικό υλικό ιχθύων θα είναι νέες, κατά κανόνα, μονοστιβάδες κυτταροκαλλιέργειες μιας ημέρας, όπου είναι δυνατό. Ωστόσο, είναι αποδεκτό ένα εύρος ηλικίας από 4 έως 48 ώρες. Τα κύτταρα πρέπει να αναπτύσσονται ενεργά κατά τον ενοφθαλμισμό.

I.5.2. Ενοφθαλμισμός κυτταροκαλλιεργειών

Ενοφθαλμίζεται εναιώρημα οργάνου επεξεργασμένο με αντιβιοτικά μέσα σε κυτταροκαλλιέργειες σε δύο αραιώσεις, δηλαδή το αρχικό διάλυμα και, επιπρόσθετα, μια αραιώση 1:10 αυτού, η οποία δίνει αντίστοιχα τελικές αραιώσεις του ιστολογικού υλικού στο υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας 1:100 και 1:1 000 αντίστοιχα, για να αποφευχθεί ομόλογη αλληλεπίδραση. Ενοφθαλμίζονται τουλάχιστον δύο κυτταρικές σειρές, όπως αναφέρεται στο σημείο I.5.1. Η αναλογία μεγέθους ενοφθαλμίσματος και όγκου υποστρώματος κυτταροκαλλιέργειας πρέπει να είναι περίπου 1:10.

Για κάθε αραιώση και για κάθε κυτταρική σειρά, χρησιμοποιείται ελάχιστη κυτταρική επιφάνεια περίπου 2 cm², η οποία αντιστοιχεί σε μια κοιλότητα του δίσκου κυτταροκαλλιέργειας 24 κοιλότητων. Χρησιμοποιούνται δίσκοι κυτταροκαλλιέργειας όπου είναι δυνατόν.

I.5.3. Επώαση των κυτταροκαλλιεργειών

Οι ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες επωάζονται στους 15 °C επί επτά έως δέκα ημέρες. Εάν το χρώμα του υποστρώματος της κυτταροκαλλιέργειας αλλάξει από κόκκινο σε κίτρινο, υποδηλώνοντας οξίνιση του υποστρώματος, πραγματοποιείται προσαρμογή του pH με αποστειρωμένο διάλυμα διττανθρακικού ή ισοδύναμες ουσίες, προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιδεκτικότητα των κυττάρων στη μόλυνση από τον ιό.

Ανά έξι μήνες τουλάχιστον, ή εφόσον υπάρχει υπόνοια μειωμένης επιδεκτικότητας των κυττάρων, πραγματοποιείται τιτλοδότηση κατεψυγμένων αποθεμάτων των VHSV και IHNV για να επαληθευτεί η επιδεκτικότητα των κυτταροκαλλιεργειών στη μόλυνση. Χρησιμοποιείται η διαδικασία που ορίζεται στο τμήμα III, εάν είναι δυνατόν.

I.5.4. Μικροσκοπική εξέταση

Οι ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες επιθεωρούνται τακτικά, τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα, ως προς την εμφάνιση ΚΠΦ σε μεγέθυνση κατά 40 έως 150 φορές. Εάν παρατηρηθεί εμφανές ΚΠΦ, αρχίζουν αμέσως οι διαδικασίες ταυτοποίησης ιού σύμφωνα με το σημείο I.6.

I.5.5. Υποκαλλιέργεια

Εάν δεν έχει αναπτυχθεί ΚΠΦ μετά την αρχική επώαση επί 7 έως 10 ημέρες, πραγματοποιείται υποκαλλιέργεια σε πρόσφατες κυτταροκαλλιέργειες με τη χρήση κυτταρικής επιφάνειας παρόμοιας με αυτήν της αρχικής καλλιέργειας.

Υποπολλαπλάσια του υποστρώματος (υπερκείμενου υγρού) από όλες τις καλλιέργειες ή κοιλότητες που συνιστούν την αρχική καλλιέργεια ενοποιούνται, σύμφωνα με την κυτταρική σειρά, 7 έως 10 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Στη συνέχεια, οι ομάδες ενοφθαλμίζονται σε ομόλογες κυτταροκαλλιέργειες, μη αραιωμένες και σε αραιώση 1:10 (δίνοντας τελικές αραιώσεις του υπερκείμενου υγρού 1:10 και 1:100 αντίστοιχα), όπως περιγράφεται στο σημείο I.5.2. Εναλλακτικά, υποπολλαπλάσια της τάξης του 10 % του υποστρώματος, που αποτελούν την αρχική καλλιέργεια, ενοφθαλμίζονται απευθείας σε μια κοιλότητα με πρόσφατη κυτταροκαλλιέργεια (δηλαδή υποκαλλιέργεια κοιλότητας προς κοιλότητα). Πριν από τον ενοφθαλμισμό μπορεί να προηγηθεί προεπώαση των αραιώσεων με αντιγόνο στον ιό IPN σε κατάλληλη αραιώση, όπως περιγράφεται στο σημείο I.4.3.

Στη συνέχεια, οι ενοφθαλμισμένες καλλιέργειες επωάζονται επί 7 έως 10 ημέρες στους 15 °C υπό παρακολούθηση σύμφωνα με το σημείο I.5.4.

Εάν παρατηρηθεί τοξικό ΚΠΦ κατά τις τρεις πρώτες ημέρες της επώασης, πραγματοποιείται σε αυτό το στάδιο υποκαλλιέργεια, αλλά στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται επί επτά ημέρες και πραγματοποιείται ξανά υποκαλλιέργεια, ακολουθούμενη από άλλες επτά ημέρες επώασης. Όταν παρατηρείται τοξικό ΚΠΦ μετά τις τρεις ημέρες, τα κύτταρα γίνονται δεκτά μία φορά και επωάζονται, προκειμένου να συμπληρώσουν συνολικά 14 ημέρες από τον αρχικό ενοφθαλμισμό. Δεν θα πρέπει να παρατηρηθούν ενδείξεις τοξικότητας κατά τη διάρκεια των επτά τελευταίων ημερών επώασης.

Εάν, παρά την αγωγή με αντιβιοτικά, παρουσιαστεί βακτηριακή μόλυνση, πριν από την υποκαλλιέργεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 2 000 έως 4 000 × g επί 15 έως 30 λεπτά στους 2 έως 5 °C ή διήθηση του υπερκείμενου υγρού μέσω φίλτρου 0,45 μm ή και τα δύο (χαμηλή πρωτεϊνική σταθεροποίηση της μεμβράνης). Επιπροσθέτως αυτής της διαδικασίας, για την υποκαλλιέργεια ακολουθούνται οι ίδιες διαδικασίες με αυτές που περιγράφονται για το τοξικό ΚΠΦ στο τέταρτο εδάφιο του παρόντος σημείου.

Εάν δεν προκύψει ΚΠΦ, η δοκιμή μπορεί να θεωρηθεί αρνητική.

I.6. Ταυτοποίηση του ιού

Εάν παρατηρηθούν ενδείξεις ΚΠΦ σε μια κυτταροκαλλιέργεια, το υπόστρωμα (υπερκείμενο υγρό) συλλέγεται και εξετάζεται σύμφωνα με μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες τεχνικές: ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA), ανοσοφθορισμός (IF), εξουδετέρωση, RT-PCR ή RT-qPCR. Εφόσον οι δοκιμές αυτές δεν επιτρέψουν την οριστική ταυτοποίηση του ιού εντός μιας εβδομάδας, το υπερκείμενο υγρό αποστέλλεται για άμεση ταυτοποίηση στο εθνικό εργαστήριο αναφοράς ή στο εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ για ασθένειες ιχθύων που αναφέρεται στο παράρτημα VI της οδηγίας 2006/88/ΕΚ.

I.6.1. Δοκιμή ELISA

Πραγματοποιείται δοκιμή ELISA τύπου σάντουιτς με χρήση διπλού αντισώματος προκειμένου να ταυτοποιηθεί το απομόνωμα ιού. Επιστρώνονται τρυβλία μικροτιτλοδότησης με 50 μl/κοιλότητα (0,9 μg) ανοσοσφαιρίνης (Ig) καθαρισμένης με πρωτεΐνη Α και αποδεδειγμένης ποιότητας που προέρχεται από αντιορό κουνελιού έναντι του ΙΗΝV ή του VHSV, η οποία έχει αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών (pH 9,6) που περιέχει 15 mM νατραζιδίου, και επωάζονται επί 18 ώρες έως 2 εβδομάδες στους 4 °C.

Σε ένα τρυβλίο αραιώσης, κάθε δείγμα που περιέχει 1 % Triton X-100 καθώς και οι θετικοί μάρτυρες υποβάλλονται σε τετραπλή αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα (ήτοι ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) ως εξής: χωρίς αραιώση, 1:4, 1:16, 1:64. Τα τρυβλία ELISA εκπλένονται σε PBS που περιέχει 0,05 % Tween-20 (PBS-T) και μεταφέρονται 50 μl κάθε αραιώσης από το τρυβλίο αραιώσης στο πλυμένο και επιστρωμένο τρυβλίο ELISA.

Κατόπιν, τα τρυβλία ELISA επωάζονται επί 30 λεπτά στους 37 °C και, στη συνέχεια, εκπλένονται και επωάζονται επί 30 λεπτά στους 37 °C με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα (ήτοι τα MAb IP5B11 για την ταυτοποίηση του VHSV και τα Hyb 136-3 για την ταυτοποίηση του ΙΗΝV, αντίστοιχα). Στο τρυβλίο ELISA μεταφέρονται 50μl αντισωμάτων κουνελιού έναντι του ορού ποντικού συζευγμένα με υπεροξειδάση (HRP) αφού προηγουμένως αραιωθούν σε PBS-T-BSA σε αναλογία 1:1 000.

Τέλος, ακολουθεί ένας νέος κύκλος έκπλυσης και, στη συνέχεια, οι αντιδράσεις αναπτύσσονται με την προσθήκη 50 μl ορθο-φαινυλενοδιαμίνης (OPD) σε κάθε κοιλότητα. Τα τρυβλία ELISA επωάζονται επί 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 100 μl H₂SO₄ 0,5 M σε κάθε κοιλότητα.

Η απορρόφηση παρακολουθείται σε μήκος κύματος 492 και 620 nm σε συσκευή ανάγνωσης ELISA. Τα δείγματα χαρακτηρίζονται ως θετικά ή αρνητικά κατόπιν σύγκρισης των αποτελεσμάτων της δοκιμής με τις τιμές απορρόφησης των θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Γενικά, τα δείγματα με συνδυασμένη απορρόφηση (A) < 0,5 για υλικό χωρίς αραιώση θεωρούνται αρνητικά, τα δείγματα με τιμές A μεταξύ 0,5 και 1,0 θεωρούνται ύποπτα και τα δείγματα με τιμές A > 1,0 θεωρούνται θετικά.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες εκδοχές ELISA αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας αντί αυτών που αναφέρονται στο παρόν σημείο.

I.6.2. Ανοσοφθορισμός — IF

Η ταυτοποίηση των παθογόνων VHSV και ΙΗΝV που περιλαμβάνονται στον κατάλογο πραγματοποιείται μέσω επιμόλυνσης κυττάρων σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων «Black», σε συμβατικά τρυβλία 24 κοιλοτήτων ή σε καλυπτρίδες μέσα σε τρυβλία 24 κοιλοτήτων. Όταν γίνεται ταυτοποίηση του ΙΗΝV, του VHSV ή και των δύο μέσω της επιμόλυνσης κυττάρων σε καλυπτρίδες, εφαρμόζεται το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- α) Οι καλυπτρίδες επικαλύπτονται με κύτταρα σε πυκνότητα που αποβαίνει σε συρροή περίπου 60 % και 90 % μετά από 24 ώρες καλλιέργειας. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται κύτταρα EPC, όπου είναι δυνατόν, λόγω της ισχυρής προσκόλλησής τους σε γυάλινες επιφάνειες. Δύναται όμως να χρησιμοποιηθούν και άλλες κυτταρικές σειρές, όπως η BF-2, η RTG-2 ή η FHM. Ενοφθαλμίζονται 150 μl από το υπερκείμενο υγρό της κυτταροκαλλιέργειας σε δύο διαφορετικές αραιώσεις (1:10 και 1:1 000) εις διπλούν σε μονοστιβάδες μιας ημέρας και ακολουθεί επώαση στους 15 °C επί 24 ώρες.
- β) Στη συνέχεια, απομακρύνεται το υπόστρωμα της κυτταροκαλλιέργειας και οι επιμολυσμένες μονοστιβάδες κυττάρων σταθεροποιούνται σε 0,5 ml παγωμένου υδατικού διαλύματος ακετόνης (80 % vol:vol). Η σταθεροποίηση πραγματοποιείται μέσα σε συλλέκτη καπνών επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, κατόπιν απομακρύνεται το διάλυμα ακετόνης και οι καλυπτρίδες ξηραίνονται δι' αέρος για τουλάχιστον 30 λεπτά. Στο στάδιο αυτό, τα τρυβλία είτε υφίστανται επεξεργασία άμεσα είτε φυλάσσονται στους - 20 °C για περαιτέρω χρήση.
- γ) Τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα (ήτοι τα MAb IP5B11 για την ταυτοποίηση του VHSV και τα Hyb 136-3 για την ταυτοποίηση του ΙΗΝV, αντίστοιχα) αραιώνονται σε 0,01 M PBST, pH 7,2 στην αναλογία που συνιστάται από τον προμηθευτή των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Προστίθενται 50 έως 100 μl/κοιλότητα στη σταθεροποιημένη μονοστιβάδα και τα τρυβλία επωάζονται επί μία ώρα στους 37 °C μέσα σε υγρό θάλαμο.

δ) Οι καλυπτρίδες πλένονται απαλά τρεις φορές με PBS που περιέχει 0,05 % Tween-20 (PBS-T) και το ρυθμιστικό διάλυμα απομακρύνεται πλήρως μετά την τελευταία έκπλυση. Κατόπιν, τα κύτταρα επωάζονται επί μία ώρα στους 37 °C με αντισώματα συζευγμένα με ισοθειοκυανιούχο φλουορεσκείνη (FITC) —ή ισοθειοκυανική τετραμεθυλρο-δαμίνη-5-(και-6) (TRITC) έναντι ανοσοσφαιρίνης ποντικού χρησιμοποιούμενη ως κύριο αντίσωμα, αραιώνονται σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή, εκπλένονται ξανά σε PBS-T και ξηραίνονται. Οι χρωσμένες καλλιέργειες στερεώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες χρησιμοποιώντας αλατούχο γλυκερίνη και εξετάζονται υπό προσπίπτον υπεριώδες φως (UV). Χρησιμοποιούνται προσοφθάλμιοι των 10 × ή 12 × και αντικειμενικός φακός των × 25 ή × 40 με αριθμητικό άνοιγμα > 0,7 και > 1,3, αντίστοιχα.

Αντ' αυτής μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες τεχνικές IF, όσον αφορά τις κυτταροκαλλιέργειες, τη σταθεροποίηση και τα αντισώματα ποιότητας αναφοράς, αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

I.6.3. Εξουδετέρωση

Τα κύτταρα από το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (2 000 έως 4 000 × g) ή διήθηση μέσω μεμβράνης (0,45 μm) με χαμηλή πρωτεϊνική σταθεροποίηση της μεμβράνης και, στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται κατά 1:100 και 1:10 000 με το υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας.

Αναμειγνύονται υποπολλαπλάσια τουλάχιστον δύο αραιώσεων του υπερκείμενου υγρού και επωάζονται επί 60 λεπτά στους 15 °C μαζί με ίσα μέρη των ακόλουθων αντιδραστηρίων μεμονωμένα:

- α) ορός που περιέχει κατά ομάδα ειδικό αντίσωμα έναντι του VHSV σε αραιώση 1:50 (vol:vol),
- β) ορός που περιέχει κατά ομάδα ειδικό αντίσωμα έναντι του IHNV σε αραιώση 1:50 (vol:vol),
- γ) ομάδα αντιορών κατά των ενδογενών οροτύπων IPNV σε αραιώση 1:50 (vol:vol),
- δ) μόνο υπόστρωμα (θετικός μάρτυρας).

Τουλάχιστον δύο κυτταροκαλλιέργειες ενοφθαλμίζονται με 50 μl καθεμία από κάθε μείγμα υπερκείμενου υγρού ιού-ορού και μετά επωάζονται στους 15 °C. Ελέγχεται η ανάπτυξη του ΚΠΦ, όπως περιγράφεται στο σημείο I.5.4.

Τα στελέχη και τα απομονώματα VHSV που δεν αντιδρούν στις δοκιμές εξουδετέρωσης ταυτοποιούνται μέσω IF ή ELISA.

Αντ' αυτής μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες δοκιμές εξουδετέρωσης αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Προετοιμασία του ιικού RNA

Όλες οι εργασίες με RNA διεξάγονται πάνω σε πάγο με τη χρήση γαντιών.

Η εξαγωγή του RNA πραγματοποιείται με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου ή μέσω στηλών φυγοκέντρησης με συγγένεια RNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά διαθέσιμα κιτ εξαγωγής RNA που παράγουν RNA υψηλής ποιότητας κατάλληλο για χρήση με τα πρωτόκολλα RT-PCR, τα οποία περιγράφονται λεπτομερώς στα παρακάτω σημεία.

Πραγματοποιείται επανεναιώρηση του RNA σε αποσταγμένο νερό απαλλαγμένο από RNAάση, (ήτοι νερό που έχει υποστεί επεξεργασία με 0,1 % πυροκαρβονικό διαιθύλιο) ή κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.

I.6.4.2. RT-PCR

Για την ανίχνευση του IHNV χρησιμοποιούνται οι εξής εκκινητές:

Πρόσθιος εκκινητής 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3',

Αντίστροφος εκκινητής 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι κύκλοι (RT-PCR ενός βήματος): 1 κύκλος: 50 °C επί 30 λεπτά, 1 κύκλος: 95 °C επί 2 λεπτά, 30 κύκλοι: 95 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 50 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 72 °C επί 60 δευτερόλεπτα, 1 κύκλος: 72 °C επί 7 λεπτά και εμποτισμός στους 4 °C.

Για την ανίχνευση του VHSV χρησιμοποιούνται οι εξής εκκινητές:

Πρόσθιος εκκινητής VN 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3',

Αντίστροφος εκκινητής VN 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3'.

Χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι κύκλοι (RT-PCR ενός βήματος): 50 °C επί 30 λεπτά, 95 °C επί 15 λεπτά, 35 κύκλοι στους 94 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 55 °C επί 30 δευτερόλεπτα και 68 °C επί 60 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, η αντίδραση διατηρείται στους 68 °C επί 7 λεπτά.

Οι αντιδράσεις RT-PCR αξιολογούνται ως προς την ποσότητα του προϊόντος και την ειδικότητά τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική χρησιμοποιώντας 1,5 % πηκτική αгарόζης με βρωμιούχο αιθίδιο και η εμφάνιση πραγματοποιείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Για τον IHNV, το αμπλικόνιο της PCR έχει μέγεθος 693 bp. Για τον VHSV, το μέγεθος είναι 505 bp.

Τα αποτελέσματα της PCR ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτή εκτελείται, δηλαδή τα πρωτόκολλα των θερμικών κύκλων μπορεί να απαιτούν βελτιστοποίηση, ανάλογα με τον θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω πρόδεσης ψευδούς εκκινητή ή εργαστηριακής επιμόλυνσης. Συνεπώς, συμπεριλαμβάνονται επαρκείς θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, καθώς και αμπλικόνια της αλληλουχίας για την αποφυγή κάθε αμφιβολίας. Για τους εκκινητές του VHSV, επιδεικνύεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση κυττάρων BF-2, επειδή οι εκκινητές μπορεί να αντιδράσουν με τη DNA/RNA κυτταρική σειρά, με αποτέλεσμα την παραγωγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων παρόμοιου μεγέθους. Κατά τη δοκιμή υπερκείμενου υγρού από κύτταρα BF-2, θα προσδιορίζεται η αλληλουχία όλων των ενισχυμένων θραυσμάτων της PCR.

I.6.4.3. RT-qPCR για τον VHSV

Για τον VHSV, η αντίδραση ενίσχυσης πραγματοποιείται με τους εκκινητές και τον ανιχνευτή που παρατίθενται παρακάτω:

Πρόσδιος εκκινητής: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3',

Αντίστροφος εκκινητής: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3'

και ανιχνευτής: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

RT-qPCR ενός βήματος:

Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Συνθήκες των κύκλων: 50 °C επί 30 λεπτά, 95 °C επί 15 λεπτά, 40 κύκλοι στους 94 °C επί 15 δευτερόλεπτα, 60 °C επί 40 δευτερόλεπτα, 72 °C επί 20 δευτερόλεπτα. Γίνεται προσαρμογή, εφόσον είναι απαραίτητη. Αντ' αυτής μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες εκδοχές RT-PCR ή RT-qPCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

I.6.4.4. RT-qPCR για τον IHNV

Για τον IHNV, η αντίδραση ενίσχυσης πραγματοποιείται με τους εκκινητές και τον ανιχνευτή που παρατίθενται παρακάτω:

Πρόσδιος εκκινητής: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3',

Αντίστροφος εκκινητής: 5'-TTCTTTGCGGCTTGGTTGA — 3'

και ανιχνευτής: 5' 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

RT-qPCR δύο βημάτων:

Επειδή η παρακάτω δοκιμασία βασίζεται σε ενίσχυση δύο βημάτων, επιδεικνύεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τον χειρισμό των σωλήνων μεταξύ των αντιδράσεων για την αποφυγή επιμόλυνσης.

Συνθήκες των κύκλων (μετά το βήμα RT): 50 °C επί 2 λεπτά, 95 °C επί 10 λεπτά, ακολουθούν 40 κύκλοι στους 95 °C επί 15 δευτερόλεπτα και στους 60 °C επί 1 λεπτό. Γίνονται προσαρμογές, εφόσον είναι απαραίτητες.

Αντ' αυτής μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες εκδοχές RT-PCR ή RT-qPCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

II. Λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της υπόνοιας για VHS ή IHN ή αμφότερες σε περιπτώσεις υποψίας εκδήλωσης ασθένειας

Όταν απαιτείται εργαστηριακή εξέταση για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της παρουσίας IHN ή VHS ή και των δύο σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/ΕΚ με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που ορίζονται στο παράρτημα Ι μέρος 1 σημείο II.3, εφαρμόζονται οι παρακάτω διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες:

- α) συμβατική απομόνωση του ιού, ακολουθούμενη από ταυτοποίηση του ιού με οροεξουδετέρωση, ανοσοχημική τεχνική ή μοριακή τεχνική,
- β) ανίχνευση ιού με RT-PCR ή RT-qPCR,
- γ) άλλες διαγνωστικές τεχνικές, όπως IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

- II.1. Συμβατική απομόνωση του ιού, ακολουθούμενη από ταυτοποίηση του ιού
- II.1.1. Επιλογή δειγμάτων
Επιλέγονται προς εξέταση τουλάχιστον 10 ιχθείς που εμφανίζουν τυπικά συμπτώματα IHN ή VHS.
- II.1.2. Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων ιχθύων
Για την προετοιμασία και την αποστολή για τους σκοπούς της συμβατικής απομόνωσης του ιού, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.2.
- II.1.3. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού
Για τη συλλογή συμπληρωματικού υλικού για τους σκοπούς της συμβατικής απομόνωσης του ιού, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.3.
- II.1.4. Προετοιμασία των δειγμάτων για εξέταση κυτταροκαλλιέργειας
Για την προετοιμασία των δειγμάτων προς εξέταση κυτταροκαλλιέργειας για τους σκοπούς της συμβατικής απομόνωσης του ιού, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.4.
- II.1.5. Ιολογική εξέταση σε κυτταροκαλλιέργεια
Για την ιολογική εξέταση για τους σκοπούς της συμβατικής απομόνωσης του ιού, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.5.
- II.1.6. Ταυτοποίηση του ιού
Για την ταυτοποίηση του ιού για τους σκοπούς της συμβατικής απομόνωσης του ιού, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.6.
- II.2. Ανίχνευση ιού με RT-qPCR
- II.2.1. Επιλογή δειγμάτων
Για την επιλογή των δειγμάτων για τους σκοπούς της ανίχνευσης του ιού με RT-qPCR, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.1.2.
- II.2.2. Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων ιχθύων
Για την προετοιμασία και την αποστολή για τους σκοπούς της ανίχνευσης του ιού με RT-qPCR, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.2.
- II.2.3. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού
Για τη συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού για τους σκοπούς της ανίχνευσης του ιού με RT-qPCR, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.3.
- II.2.4. Προετοιμασία του δείγματος για RT-qPCR
Για την προετοιμασία του δείγματος για τους σκοπούς της ανίχνευσης του ιού με RT-qPCR, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στο σημείο I.6.4.1.
- II.2.5. RT-qPCR
Για την ανίχνευση του ιού με RT-qPCR, ακολουθούνται οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που προβλέπονται στα σημεία I.6.4.1, I.6.4.3 και I.6.4.4.
- II.3. Λοιπές διαγνωστικές τεχνικές
Το υπερκείμενο υγρό που έχει προετοιμαστεί όπως περιγράφεται στο σημείο I.4.3 μπορεί να υποβληθεί σε ELISA, δοκιμή έμμεσα φθορίζοντων αντισωμάτων (IFAT) ή RT-PCR σύμφωνα με το σημείο I.6.1, το σημείο I.6.2 ή το σημείο I.6.4, αντίστοιχα. Το ιστολογικό υλικό μπορεί να υποβληθεί και σε άλλες διαγνωστικές τεχνικές, όπως στην IFAT επί κατεψυγμένων στοιχείων ή την ανοσοϊστοχημία επί ιστολογικού υλικού σταθεροποιημένου με φορμαλίνη. Οι ταχείες αυτές τεχνικές συμπληρώνονται με μια ιολογική εξέταση σύμφωνα με το σημείο II α) ή το σημείο II β) εντός 48 ωρών μετά τη δειγματοληψία, εάν:
- α) το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ή
- β) προκύψει θετικό αποτέλεσμα με υλικό που αντιπροσωπεύει την πρώτη περίπτωση IHN ή VHS.

III. Διαδικασία τιτλοδότησης για την επαλήθευση της επιδεκτικότητας των κυτταροκαλλιιεργειών στη μόλυνση

Όταν διεξάγεται τιτλοδότηση για την επαλήθευση της επιδεκτικότητας των κυτταροκαλλιιεργειών στη μόλυνση, όπως αναφέρεται στο σημείο I.5.3., ακολουθούνται οι διαδικασίες που ορίζονται στις ακόλουθες παραγράφους του παρόντος σημείου.

Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο απομονώματα του VHSV και ένα απομόνωμα του IHNV. Τα απομονώματα αντιπροσωπεύουν τη σημαντικότερη ομάδα ιών στην Ευρωπαϊκή Ένωση, δηλαδή για τον VHSV, ένα παθογενές απομόνωμα από την ιριδοειδή πέστροφα γλυκών υδάτων και ένα θαλάσσιο παθογενές απομόνωμα για το καλκάνι, και για τον IHNV, ένα παθογενές στέλεχος ιριδοειδούς πέστροφας από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Χρησιμοποιούνται σαφώς καθορισμένα απομονώματα από τα κράτη μέλη. Παρτίδες ιών από ασυνεχείς καλλιέργειες με χαμηλό αριθμό κυτταροκαλλιιεργειών πολλαπλασιάζονται μέσα σε φιάλες κυτταροκαλλιιεργειας, σε κύτταρα BF-2 ή RTG-2, προκειμένου για τον VHSV, και EPC ή FHM, προκειμένου για τον IHNV. Χρησιμοποιείται υπόστρωμα κυτταροκαλλιιεργειας με ρυθμιστικό διάλυμα περιεκτικότητας σε ορό τουλάχιστον 10 %. Για τον ενοφθαλμισμό χρησιμοποιείται χαμηλή τιμή MOI (< 1).

Όταν επιτευχθεί το συνολικό ΚΠΦ, ο ιός συλλέγεται με φυγοκέντρηση του υπερκείμενου υγρού της κυτταροκαλλιιεργειας στα $2\ 000 \times g$ επί 15 λεπτά, αποστειρώνεται με διήθηση μέσω διηθητικής μεμβράνης των 0,45 μm και κατανέμεται σε κρουσώληνες με την κατάλληλη επισήμανση. Ο ιός φυλάσσεται σε θερμοκρασία $-80\ ^\circ\text{C}$.

Μία εβδομάδα μετά την κατάψυξη, τρία φιαλίδια για κάθε ιό υποβάλλονται σε απόψυξη με κρύο νερό και τιτλοδότηση έναντι των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών. Τουλάχιστον κάθε έξι μήνες ή εφόσον υπάρχει υπόνοια μειωμένης επιδεκτικότητας μιας κυτταρικής σειράς, για κάθε απομόνωμα ιού πραγματοποιείται απόψυξη και τιτλοδότηση.

Οι διαδικασίες τιτλοδότησης πρέπει να περιγράφονται λεπτομερώς και κάθε φορά πρέπει να ακολουθείται η ίδια διαδικασία.

Η τιτλοδότηση με αραιώση μέχρι τελικού σημείου περιλαμβάνει τουλάχιστον έξι δείγματα σε κάθε στάδιο της αραιώσης. Οι τίτλοι συγκρίνονται με τίτλους που ελήφθησαν προηγουμένως. Εάν ο τίτλος οποιουδήποτε από τα τρία απομονώματα ιού μειωθεί σε σχέση με τον αρχικό τίτλο, με συντελεστή $2 \log$ ή περισσότερο, τότε η κυτταρική σειρά δεν πρέπει να χρησιμοποιείται πλέον για σκοπούς επιτήρησης.

Εάν στο εργαστήριο διατηρούνται διαφορετικές κυτταρικές σειρές, πρέπει να εξετάζεται κάθε μία ξεχωριστά.

Τα αρχεία φυλάσσονται για μια περίοδο τουλάχιστον 10 ετών.

ΜΕΡΟΣ 2

ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΗV (ΚΗVΔ)

I. Λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή τον αποκλεισμό της υπόνοιας για ΚΗVΔ

Όταν απαιτείται εργαστηριακή εξέταση για τους σκοπούς της επιβεβαίωσης της παρουσίας ή του αποκλεισμού της υπόνοιας για ΚΗVΔ σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/ΕΚ με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που ορίζονται στο παράρτημα I μέρος 2 τμήμα III, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες που ορίζονται στα σημεία I.1 — I.2 του παρόντος μέρους.

I.1. Προετοιμασία δειγμάτων ιχθύων

Για διαγνωστικούς σκοπούς, οι ιχθύες (που αποστέλλονται ζωντανοί ή θανατώνονται και συσκευάζονται χωριστά σε σφραγισμένους άσηπτους περιέκτες) ή, εναλλακτικά, κατεψυγμένα όργανα ή τμήματα οργάνων διατηρημένα σε 80 % απόλυτη αιθανόλη ή υπόστρωμα μεταφοράς ιών (προς επεξεργασία εντός 48 ωρών από τη συλλογή) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξέταση με συμβατικές μεθόδους που βασίζονται σε PCR ή qPCR.

Για την ανίχνευση του ΚΗV, συλλέγεται δείγμα βραγχίου και νεφρού. Επιπρόσθετα, μπορεί να συμπεριληφθεί η σπλήνα, ο εγκέφαλος και το έντερο ως πρόσθετο ξεχωριστό δείγμα. Σε σοβαρές περιπτώσεις, μπορεί να ενοποιηθεί ιστολογικό υλικό από έως πέντε ιχθύς.

Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη θανατηφόρα δείγματα, όπως αίμα, βραγχιακό επίχρισμα σε μάκτρο, βιοψία βραγχίου, επίχρισμα βλέννας (ήτοι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ιδιαίτερα πολύτιμοι ιχθύες σε περίπτωση υπόνοιας για την παρουσία του ΚΗV).

I.1.1. Εξαγωγή DNA

Το DNA εξάγεται σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά διαθέσιμα κιτ εξαγωγής DNA που παράγουν DNA υψηλής ποιότητας κατάλληλο για χρήση με τα πρωτόκολλα PCR, τα οποία αναφέρονται στο σημείο I.2.

I.2. Ανίχνευση του παράγοντα και ταυτοποίηση με μεθόδους που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

I.2.1. qPCR για ανίχνευση του KHV

Για την ανίχνευση του KHV με qPCR, χρησιμοποιείται η ακόλουθη δοκιμασία qPCR:

Πρόσθιος εκκινητής (KHV-86f): 5'-GACGCCGGAGACCTTGTG-3',

Αντίστροφος εκκινητής (KHV-163r): 5'-CGGGTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3'

και ανιχνευτής (KHV-109p): 5'-FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-3'.

Συνθήκες των κύκλων: ένας κύκλος στους 95 °C επί 15 λεπτά, ακολουθούμενος από 40 κύκλους στους 94 °C επί 15 δευτερόλεπτα και στους 60 °C επί 60 δευτερόλεπτα. Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Ωστόσο, αντ' αυτής μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες εκδοχές qPCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

I.2.2. Συμβατική PCR για ανίχνευση του KHV

Χρησιμοποιείται η δοκιμασία που περιγράφεται στο παρόν σημείο, η οποία στοχεύει το γονίδιο κινάσης της θυμιδίνης (TK) του KHV. Ωστόσο, αντ' αυτού μπορούν να εφαρμόζονται άλλες δοκιμασίες PCR με τεκμηριωμένα παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τη δοκιμασία που περιγράφηκε.

Πρόσθιος εκκινητής (KHV-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3';

Αντίστροφος εκκινητής (KHV-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Συνθήκες των κύκλων: ένας κύκλος στους 95 °C επί 5 λεπτά, ακολουθούμενος από 35 κύκλους στους 95 °C επί 30 δευτερόλεπτα, στους 52 °C επί 30 δευτερόλεπτα, στους 72 °C επί ένα λεπτό και ένας κύκλος στους 72 °C επί 10 λεπτά. Το μέγεθος του προϊόντος πρέπει να είναι 409 bp.

Τα αποτελέσματα της PCR ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτή εκτελείται, δηλαδή τα πρωτόκολλα των θερμικών κύκλων μπορεί να απαιτούν βελτιστοποίηση, ανάλογα με τον θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω πρόσδεσης ψευδούς εκκινητή ή επιμόλυνσης. Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Ωστόσο, αντ' αυτής μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες εκδοχές PCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

Η πρώτη ανίχνευση σε μια περιοχή επιβεβαιώνεται μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας ή αποστέλλεται για άμεση ταυτοποίηση σε ένα εθνικό εργαστήριο αναφοράς ή στο εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ για ασθένειες ιχθύων που αναφέρεται στο παράρτημα VI της οδηγίας 2006/88/ΕΚ.

II. Λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες για την επιτήρηση της KHVD

Κατά τη διενέργεια της δειγματοληψίας και των εργαστηριακών εξετάσεων για τους σκοπούς της απόκτησης ή διατήρησης ορισμένων υγειονομικών καθεστώτων όσον αφορά την KHVD, όπως ορίζεται στο παράρτημα I μέρος 2 τμήμα I, με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο μέρος 2 τμήματα II ή III του εν λόγω παραρτήματος, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες που προβλέπονται στα ακόλουθα σημεία II.1 και I.2 του παρόντος μέρους.

II.1. Προετοιμασία δειγμάτων ιχθύων

Εάν είναι δυνατόν, θα γίνει δειγματοληψία από ιχθύς που έχουν διατηρηθεί για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στο επιτρεπτό εύρος θερμοκρασίας του ιού (ήτοι δύο έως τρεις εβδομάδες στους 15 °C έως 26 °C). Εάν είναι δυνατόν, τα δείγματα συλλέγονται 24 ώρες, και το αργότερο 72 ώρες, μετά την εφαρμογή πρακτικών διαχείρισης που μπορεί να αναζωπυρώσουν τον ιό σε ιχθύς που είναι φορείς, όπως η σύλληψη με δίχτυ ή η μεταφορά, προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες ανίχνευσης του KHV.

Για τους σκοπούς επιτήρησης της KHVD, οι ιχθύες μπορούν να αποσταλούν ζωντανοί ή να έχουν θανατωθεί και συσκευαστεί χωριστά σε σφραγισμένους άσηπτους περιέκτες ή, εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατεψυγμένα όργανα ή τμήματα οργάνων διατηρημένα σε 80 % έως 100 % αλκοόλη ή υπόστρωμα μεταφοράς ιών (προς επεξεργασία εντός 48 ωρών από τη συλλογή) για εξέταση με συμβατικές μεθόδους που βασίζονται σε PCR. Για την επιτήρηση της KHVD, συλλέγεται ιστός βραγχίου και νεφρού.

Για τους σκοπούς επιτήρησης της KHVD, αποφεύγεται η ενοποίηση των δειγμάτων, όπου είναι δυνατόν. Εάν είναι απαραίτητη η ενοποίηση, μπορεί να γίνει ενοποίηση ιστολογικού υλικού από δύο ιχθύς το πολύ. Τα μεγαλύτερα δείγματα ομογενοποιούνται με τη χρήση ιγδίου ή ομογενοποιητή και γίνεται ανάκτηση των υποδειγμάτων για εξαγωγή DNA πριν από τη διαύγαση. Εναλλακτικά, μπορεί να συλλεχθούν υποδείγματα από κάθε ιστό που συμπεριλαμβάνεται στο δείγμα και να τοποθετηθούν σε «σωλήνες λύσης».

II.1.1. Εξαγωγή DNA

Το DNA εξάγεται σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά διαθέσιμα κιτ εξαγωγής DNA που παράγουν DNA υψηλής ποιότητας κατάλληλο για χρήση με τα πρωτόκολλα PCR, τα οποία ορίζονται στο σημείο II.2.

Η αποδεκτή αναλογία ιστού — υποστρώματος είναι 1:9 w/v. Στις δοκιμές συμπεριλαμβάνονται 20 έως 25 mg ιστολογικού υλικού.

II.2. Επιτήρηση της ΚΗVD με μεθόδους που βασίζονται στην PCR

Για την επιτήρηση του ΚΗV, χρησιμοποιείται qPCR. Εάν εμφανιστούν θετικά δείγματα σε μια περιοχή που δεν είχε επιβεβαιωθεί προηγουμένως ως θετική, τα αποτελέσματα της δοκιμής επιβεβαιώνονται με:

α) προσδιορισμό της ακολουθίας ενός προϊόντος PCR ή ένθετης PCR από τα δείγματα.

Η ληφθείσα καθαρή συναινετική αλληλουχία πρέπει να αντιστοιχεί (τουλάχιστον κατά 98 %) με τις εν λόγω αλληλουχίες αναφοράς.

β) ή, εναλλακτικά, με αποστολή των δειγμάτων σε εθνικό εργαστήριο αναφοράς για επιβεβαίωση.

II.2.1. qPCR για ανίχνευση του ΚΗV

Χρησιμοποιείται η qPCR που περιγράφεται παρακάτω:

Πρόσθιος εκκινητής (ΚΗV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3',

Αντίστροφος εκκινητής (ΚΗV-163r): 5'- CGGGTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3'

και ανιχνευτής (ΚΗV-109p): 5'-FAM- CTTCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Συνθήκες των κύκλων: ένας κύκλος στους 95 °C επί 15 λεπτά, ακολουθούμενος από 50 κύκλους στους 94 °C επί 15 δευτερόλεπτα και στους 60 °C επί 60 δευτερόλεπτα.

Τα αποτελέσματα της qPCR ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες υπό τις οποίες αυτή εκτελείται, δηλαδή τα πρωτόκολλα των θερμικών κύκλων μπορεί να απαιτούν βελτιστοποίηση, ανάλογα με τον θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω πρόσδεσης ψευδούς εκκινητή ή εργαστηριακής επιμόλυνσης. Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Ωστόσο, αντ' αυτής μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες εκδοχές qPCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

II.2.2. Συμβατική PCR για επιβεβαίωση της ανίχνευσης του ΚΗV

Για επιβεβαίωση της παρουσίας λοίμωξης από τον ΚΗV, χρησιμοποιείται η γενική ένθετη PCR που περιγράφεται στον πίνακα 2.1 παρακάτω, ακολουθούμενη από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του προϊόντος ενίσχυσης.

Πίνακας 2.1

Εκκινητές και συνθήκες για τη δοκιμασία ένθετης PCR που στοχεύει όλους τους ερπητοϊούς του κυπρίνου (CyHV-1, CyHV-2 και CyHV-3)

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Συνθήκες των κύκλων	Μέγεθος προϊόντος
CyHVpro1-πρόσθιος	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	Πρώτος γύρος της PCR 1 κύκλος: 95 °C επί 2 λεπτά 40 κύκλοι: 95 °C επί 30 δευτερόλεπτα 55 °C επί 30 δευτερόλεπτα 72 °C επί 45 δευτερόλεπτα	362 bp
CyHVpro1-αντίστροφος	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'		
		1 κύκλος: 72 °C επί 10 λεπτά	

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Συνθήκες των κύκλων	Μέγεθος προϊόντος
CyHVροΙ-εσωτερικός πρόσθιος	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	Δεύτερος γύρος της PCR 1 κύκλος: 95 °C επί 2 λεπτά	339 bp
CyHVροΙ-εσωτερικός αντίστροφος	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3'	40 κύκλοι: 95 °C επί 30 δευτερόλεπτα 55 °C επί 30 δευτερόλεπτα 72 °C επί 45 δευτερόλεπτα 1 κύκλος: 72 °C επί 10 λεπτά	

Τα αποτελέσματα της PCR ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτή εκτελείται, δηλαδή τα πρωτόκολλα των θερμικών κύκλων μπορεί να απαιτούν βελτιστοποίηση, ανάλογα με τον θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω πρόδεσης ψευδούς εκκινητή ή εργαστηριακής επιμόλυνσης. Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Αντ' αυτής μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες εκδοχές PCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μπορεί να διεξάγεται από το εργαστήριο ή από εξωτερικές εξειδικευμένες εταιρείες προσδιορισμού αλληλουχίας. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αλληλουχίας αναλύονται μέσω ευθυγράμμισης των αλληλουχιών με τις γνωστές αλληλουχίες αναφοράς του KHV (Αριθμοί πρόσβασης στην Gen Bank AP008984, DQ657948 και DQ177346). Η ληφθείσα καθαρή συναινετική αλληλουχία πρέπει να αντιστοιχεί κατά 98 % τουλάχιστον με τις εν λόγω αλληλουχίες αναφοράς.

ΜΕΡΟΣ 3

ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΛΟΙΜΩΔΟΥΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ ΤΟΥ ΣΟΛΟΜΟΥ (ΛΑΣ)

I. Διαδικασίες δειγματοληψίας για την επιτήρηση και τον έλεγχο της ΛΑΣ

Κατά τη διενέργεια της δειγματοληψίας και της εργαστηριακής εξέτασης για τους σκοπούς των προγραμμάτων επιτήρησης ή εξάλειψης που ορίζονται στο παράρτημα I μέρος 3 ή για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της παρουσίας ΛΑΣ σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς μέθοδοι και διαδικασίες που ορίζονται στα σημεία I.1, I.2 και I.3 του παρόντος τμήματος.

I.1. Προετοιμασία δειγμάτων ιχθύων

Για τους σκοπούς της εργαστηριακής εξέτασης για την παρουσία ΛΑΣ, τα δείγματα ιχθύων δεν ενοποιούνται, όπου είναι δυνατόν. Ωστόσο, για τους σκοπούς της επιτήρησης για ΛΑΣ, γίνεται αποδεκτή η ενοποίηση 2 έως 5 ιχθύων.

Δείγματα για ανάλυση RT-PCR (ανάστροφη μεταγραφάση — αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) λαμβάνονται από όλους τους ιχθύς που αποτέλεσαν αντικείμενο δειγματοληψίας. Αφαιρείται τεμάχιο μεσόνεφρου από τον ιχθύ, με τη βοήθεια αποστειρωμένου εργαλείου, και μεταφέρεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης που περιέχει 1 ml συντηρητικό διάλυμα του RNA, αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας. Ιστός από έως πέντε ιχθύς συλλέγεται σε ένα σωλήνα που περιέχει διάλυμα μεταφοράς και αποτελεί ένα ενοποιημένο δείγμα. Το βάρος του ιστού σε ένα δείγμα είναι 0,5 g. Όταν το μέγεθος των ιχθύων είναι τόσο μικρό ώστε να μην επιτρέπει τη λήψη δειγμάτων με το απαιτούμενο βάρος, είναι δυνατόν να ληφθούν τεμάχια νεφρού, καρδιάς, σπλήνας, ήπατος ή πυλωρικών τυφλών, με την ως άνω σειρά προτιμήσεως, ούτως ώστε να συμπληρωθούν τα 0,5 g.

Ο ιστός που προορίζεται για ιστολογική εξέταση λαμβάνεται κατ' αποκλειστικότητα από προσφάτως θανατωθέντες ιχθύς κανονικής σύστασης, με κλινικά σημεία ή μεταθανάτια ευρήματα που συνάδουν με την παρουσία ΛΑΣ. Λαμβάνεται δείγμα από τυχόν εξωτερικές ή εσωτερικές αλλοιώσεις και, οπωσδήποτε, αφαιρούνται δείγματα από το μεσόνεφρο, την καρδιά, το ήπαρ, το πάγκρεας, το έντερο, τα βράγχια και τον σπλήνα από κάθε ιχθύ, με τη βοήθεια νυστεριού, και μεταφέρονται σε φυσιολογικό ορό με ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 8 % έως 10 % (vol:vol). Η αναλογία σταθεροποιητικού παράγοντα/ιστού είναι τουλάχιστον 20:1, ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η ικανοποιητική διατήρηση των ιστών. Για ανοσοϊστοχημική (IHC) ανάλυση, λαμβάνονται δείγματα από το μεσόνεφρο και την καρδιά.

Ιστοί για ιολογική εξέταση σε κυτταροκαλλιέργεια λαμβάνονται από όλους τους δειγματοληπτούμενους ιχθύς. Τα τεμάχια ήπατος, πρόνεφρου ή μεσόνεφρου, καρδιάς και σπλήνα αφαιρούνται από τον ιχθύ με τη βοήθεια αποστειρωμένου εργαλείου και μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν 9 ml υποστρώματος μεταφοράς. Ιστός από έως πέντε ιχθύς συλλέγεται σε ένα σωλήνα που περιέχει διάλυμα μεταφοράς και αποτελεί ένα ενοποιημένο δείγμα. Το βάρος του ιστού σε ένα δείγμα πρέπει να είναι $1,0 \pm 0,5$ g.

I.2. Αποστολή δειγμάτων ιχθύων

Είναι δυνατή η μεταφορά ολόκληρων ιχθύων στο εργαστήριο, εφόσον πληρούνται οι θερμοκρασιακές απαιτήσεις κατά τη μεταφορά, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3 του παρόντος σημείου. Οι ολόκληροι ιχθύες τυλίγονται σε απορροφητικό χαρτί και μεταφέρονται σε πλαστική σακούλα, υπό ψύξη, όπως περιγράφεται στην εν λόγω παράγραφο.

Είναι δυνατή επίσης η αποστολή ζωντανών ιχθύων, μόνον όμως υπό την εποπτεία του εθνικού εργαστηρίου αναφοράς για ασθένειες ιχθύων και λαμβάνοντας υπόψη τα πρόσθετα ζητήματα που αφορούν την απολύμανση και τη βιοασφάλεια κατά τη μεταφορά ζωντανών ιχθύων.

Τα δείγματα αίματος και οι σωλήνες που περιέχουν ιστούς ιχθύων για ιολογική εξέταση ή ανάλυση RT-PCR (ανάστροφη μεταγραφάση — αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) τοποθετούνται σε μονωμένους περιέκτες, όπως κιβώτια πολυστυρολίου με παχιά τοιχώματα, μαζί με αρκετό πάγο ή παγοκολώνες, ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η ψύξη των δειγμάτων κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο. Αποφεύγεται η κατάψυξη, ενώ κατά την παραλαβή τους πρέπει να υπάρχει ακόμη πάγος στο κιβώτιο μεταφοράς ή μία ή περισσότερες παγοκολώνες πρέπει να είναι εν μέρει ή πλήρως παγωμένες. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, δείγματα RT-PCR και δείγματα για ιολογική εξέταση υφίστανται στιγμιαία κατάψυξη και μεταφέρονται στο εργαστήριο υπό θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή χαμηλότερη.

Για την ανάλυση RT-PCR των ιστών που διατηρήθηκαν σε ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), η εξαγωγή RNA διεξάγεται εντός των παρακάτω χρονικών πλαισίων ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία φυλάσσονται τα δείγματα:

δείγματα που φυλάσσονται στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: μία ημέρα,

δείγματα που φυλάσσονται στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$: μία εβδομάδα,

δείγματα που φυλάσσονται στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: ένας μήνας,

δείγματα που φυλάσσονται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: επ' αόριστον.

Σε περίπτωση μεταφοράς ιστών ιχθύων σε σταθεροποιητικό μέσο για ιστολογική εξέταση, αυτοί αποστέλλονται σε στεγανούς σωλήνες εντός ανθεκτικών στα κτυπήματα περιεκτών. Αποφεύγεται η κατάψυξη αυτών των δειγμάτων.

Η ιολογική εξέταση σε κυτταροκαλλιέργεια ξεκινά το συντομότερο δυνατόν και οπωσδήποτε εντός 48 ωρών από τη συλλογή των δειγμάτων. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, η ιολογική εξέταση μπορεί να ξεκινήσει το αργότερο εντός 72 ωρών από τη συλλογή του υλικού, υπό τον όρο ότι το προς εξέταση υλικό προστατεύεται από υπόστρωμα μεταφοράς και ότι κατά τη διάρκεια της μεταφοράς μπορούν να τηρηθούν οι απαιτήσεις σχετικά με τη θερμοκρασία.

I.3. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού

Κατόπιν έγκρισης του διαγνωστικού εργαστηρίου, μπορούν να συλλεχθούν και να προετοιμαστούν για συμπληρωματική εξέταση ιστοί ιχθύων άλλοι εκτός αυτών που αναφέρονται στο σημείο I.1.

II. Λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες για την επιτήρηση και την επιβεβαίωση της παρουσίας ή τον αποκλεισμό της υπόνοιας για ΛΑΣ

Κατά τη διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων για τους σκοπούς της απόκτησης ή διατήρησης ορισμένων υγειονομικών καθεστώτων όσον αφορά τη ΛΑΣ, όπως ορίζεται στο παράρτημα I μέρος 3 τμήμα I ή για τους σκοπούς της επιβεβαίωσης της παρουσίας ή του αποκλεισμού της υπόνοιας για ΛΑΣ σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο παράρτημα I μέρος 3 τμήμα II, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς μέθοδοι και διαδικασίες που προβλέπονται στα παρακάτω σημεία II.1 έως II.5.

II.1. Εξέταση δειγμάτων με RT-PCR (αναστροφή μεταγραφάσης — αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)

Η διαγνωστική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού της ΛΑΣ είναι η RT-qPCR. Επειδή τα αποτελέσματα της RT-qPCR μπορεί να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες υπό τις οποίες εκτελέστηκε, συμπεριλαμβάνονται επαρκείς θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, καθώς και αμπλικόνια της αλληλουχίας για την αποφυγή κάθε αμφιβολίας.

II.1.1. Εξαγωγή ολικού RNA

Όλες οι εργασίες με RNA διεξάγονται πάνω σε πάγο με τη χρήση γαντιών.

Η εξαγωγή του ολικού RNA πραγματοποιείται με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου ή μέσω στηλών φυγοκέντρησης με συγγένεια RNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πραγματοποιείται επανεναιώρηση του καθαρισμένου RNA σε αποσταγμένο νερό απαλλαγμένο από RNAάση, (ήτοι νερό που έχει υποστεί επεξεργασία με 0,1 % πυροκαρβονικό διαιθύλιο).

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA που εξήχθη εκτιμάται μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm και 280 nm. Μια εναλλακτική προσέγγιση μπορεί να είναι η συμπερίληψη εσωτερικών μαρτύρων που στοχεύουν έναντι του γονιδιώματος του ιού, όπως αναφέρεται στο σημείο II.1.3.

II.1.2. RT-PCR για την ανίχνευση του ιού της ΛΑΣ

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού της ΛΑΣ. Μπορεί να διεξαχθεί RT-PCR δύο βημάτων όπου τα βήματα της αντίδρασης RT και PCR εκτελούνται σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες. Ωστόσο, μπορεί επίσης να διεξαχθεί αντίδραση ενός βήματος, όπου οι δύο αντιδράσεις εκτελούνται στον ίδιο σωλήνα. Χρησιμοποιείται η μέθοδος ενός βήματος, όπου είναι δυνατόν, επειδή η δοκιμασία με ένα σωλήνα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης αφού δεν απαιτείται μεταφορά του περιεχομένου και θεωρείται το ίδιο ευαίσθητη με τη μέθοδο των δύο βημάτων.

Χρησιμοποιούνται οι εκκινητές και η δοκιμασία που περιγράφονται στο παρόν σημείο, ήτοι το ζεύγος εκκινητών ILA1 ή ILA2 που στοχεύει το τμήμα 8 και έχει βρεθεί κατάλληλο για την ανίχνευση του ιού της ΛΑΣ σε περιπτώσεις εκδήλωσης της ασθένειας και σε ιχθύς φορείς. Ο αντίστροφος εκκινητής ILA2 δεν ταιριάζει σε απομονώματα από τη Βόρεια Αμερική και σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται εναλλακτικό σετ εκκινητών.

Πρόσδιος εκκινητής (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3',

Αντίστροφος εκκινητής (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Συνθήκες των κύκλων: Ένας κύκλος στους 50 °C επί 30 λεπτά, ένας κύκλος στους 94 °C επί 15 λεπτά, 40 κύκλοι στους 94 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 55 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 72 °C επί 60 δευτερόλεπτα. Ένας κύκλος στους 72 °C επί 5 λεπτά. Μέγεθος προϊόντος 155 bp.

Τα αποτελέσματα της PCR ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτή εκτελείται, δηλαδή τα πρωτόκολλα των θερμικών κύκλων μπορεί να απαιτούν βελτιστοποίηση, ανάλογα με τον θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω πρόσδεσης ψευδούς εκκινητή ή εργαστηριακής επιμόλυνσης. Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Ωστόσο, αντ' αυτής μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες εκδοχές RT-PCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

II.1.3. RT-qPCR για ανίχνευση του ιού της ΛΑΣ

Η χρήση RT-qPCR μπορεί να αυξήσει την ειδικότητα και πιθανώς και την ευαισθησία. Η μέθοδος μπορεί να διεξαχθεί ταχύτερα επειδή δεν απαιτείται βήμα ηλεκτροφόρησης σε ηλεκτροφόρησης και επίσης μειώνει τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης επειδή είναι δυνατός ο υπολογισμός της ποσότητας του γονιδιωματικού RNA του ιού εντός του σωλήνα δείγματος. Μειονέκτημα της δοκιμασίας RT-qPCR αποτελεί το ότι συχνά δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων ενίσχυσης. Ωστόσο, σε περίπτωση που υπάρχει αμφιβολία σχετικά με την ειδικότητα του προϊόντος ενίσχυσης, πρέπει να εκτελεστεί μια άλλη δοκιμασία ειδική για τον ιό της ΛΑΣ για την επαλήθευση του αποτελέσματος.

Χρησιμοποιείται η δοκιμασία που περιγράφεται στο παρόν σημείο, η οποία είναι μια δοκιμασία που στοχεύει στο τμήμα 8. Η δοκιμασία αυτή καλύπτει τα απομονώματα από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, της Ευρωπαϊκής Ζώνης Ελευθέρων Συναλλαγών, καθώς και τη Βόρεια Αμερική. Χρησιμοποιείται η μέθοδος ενός βήματος, όπου είναι δυνατόν, επειδή η δοκιμασία με ένα σωλήνα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης.

Πρόσδιος εκκινητής: 5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3',

Αντίστροφος εκκινητής: 5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3'

και ανιχνευτής: 5'-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC—MGBNFQ-3'.

Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Συνθήκες των κύκλων: ένας κύκλος στους 50 °C επί 30 λεπτά, ένας κύκλος στους 95 °C επί 15 λεπτά, 40 κύκλοι στους 94 °C επί 15 δευτερόλεπτα, 60 °C επί 60 δευτερόλεπτα. Γίνονται προσαρμογές, εφόσον είναι απαραίτητες. Αντ' αυτής μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες εκδοχές RT-PCR ή RT-qPCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

II.1.4. Προσδιορισμός αλληλουχίας των ενισχυμένων προϊόντων PCR

Πρόσθιος εκκινητής (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3',

Αντίστροφος εκκινητής (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3'.

Σε κάθε ανάλυση τρυβλίου συμπεριλαμβάνονται αρνητικοί πρότυποι μάρτυρες και θετικοί μάρτυρες. Συνθήκες των κύκλων (RT-PCR ενός βήματος): ένας κύκλος στους 50 °C επί 30 λεπτά, ένας κύκλος στους 94 °C επί 15 λεπτά, 40 κύκλοι στους 94 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 55 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 72 °C επί 60 δευτερόλεπτα, ένας κύκλος στους 72 °C επί 5 λεπτά. Γίνονται προσαρμογές, εφόσον είναι απαραίτητες. Αντ' αυτής μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες εκδοχές RT-PCR ή RT-qPCR αποδεδειγμένης παρόμοιας αποτελεσματικότητας.

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ακόλουθη μέθοδος για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του HPR στο τμήμα 6:

Πρόσθιος εκκινητής: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3',

Αντίστροφος εκκινητής: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3',

Μέγεθος προϊόντος: 304 nt εάν είναι HPR0.

Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν δοκιμασίες RT-PCR με παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα με τις δοκιμασίες που περιγράφονται στο παρόν σημείο.

Η καθαρότητα του ενισχυμένου προϊόντος RT-PCR ελέγχεται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Εάν εμφανιστεί μόνο ένα καθαρό θραύσμα, πραγματοποιείται κάθαρση του απευθείας από την αντίδραση PCR. Εάν υπάρχουν πολλά ενισχυμένα θραύσματα, πραγματοποιείται κάθαρση του θραύσματος ενδιαφέροντος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Η κάθαρση των θραυσμάτων PCR από τα διαλύματα ή τις πηκτές αгарόζης πραγματοποιείται με τη χρήση στηλών φυγοκέντρωσης με συγγένεια προς το θραύσμα PCR σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας διεξάγεται με τη χρήση εκκινητών για την ενίσχυση σε εξωτερικές εξειδικευμένες εταιρείες προσδιορισμού αλληλουχίας. Τα αποτελέσματα αναλύονται με χρήση του εργαλείου αναζήτησης BLAST και οι αλληλουχίες συγκρίνονται με άλλες γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας των Η.Π.Α. (US National Centre for Biotechnical Information, NCBI).

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας πρέπει να εξαλείφει κάθε αμφιβολία σχετικά με την ειδικότητα ενός ενισχυμένου προϊόντος RT-PCR.

II.2. Απομόνωση του ιού της ΛΑΣ σε κυτταροκαλλιέργειες

II.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων

Ο ιστός μπορεί να διατηρείται στους -80 °C. Ο ιστός πρέπει να υποβάλλεται σε κατάψυξη και απόψυξη μόνο μία φορά πριν από την εξέταση. Για σκοπούς επιτήρησης και ελέγχου, η εξέταση διεξάγεται το ταχύτερο δυνατόν.

Κάθε δείγμα (ενοποιημένος ιστός στο διάλυμα μεταφοράς) ομογενοποιείται πλήρως με τη βοήθεια επικυρωμένου ομογενοποιητή, φυγοκεντρείται στα 2 000 έως 4 000 × g επί 15 λεπτά στους 0 έως 6 °C και το υπερκείμενο υγρό διηθείται (0,45 μm) και επωάζεται με ίσο όγκο κατάλληλα αραιωμένης ομάδας αντιορών στους ενδογενείς ορότυπους του ιού IPNV. Ο τίτλος του αντιορού πρέπει να είναι τουλάχιστον 1:2 000 σε δοκιμή εξουδετέρωσης πλακών 50 %. Το μείγμα επωάζεται επί μία ώρα στους 15 °C. Αυτό αντιπροσωπεύει το ενοφθάλμισμα.

Η επεξεργασία όλων των ενοφθαλμισμάτων με τον αντιορό στον ιό της λοιμώδους παγκρεατικής νέκρωσης (ένας ιός ο οποίος, σε ορισμένα μέρη της Ευρώπης, εμφανίζεται στο 50 % των δειγμάτων ιχθύων) αποσκοπεί στην αποτροπή ανάπτυξης του κυτταροπαθολογικού φαινομένου (ΚΠΦ) οφειλόμενου στον ιό IPN, σε ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες. Η εν λόγω επεξεργασία μπορεί να διεξαχθεί προκειμένου να μειωθεί η διάρκεια των ιολογικών εξετάσεων, καθώς και ο αριθμός των περιπτώσεων όπου η παρουσία του ΚΠΦ θα έπρεπε να θεωρηθεί δυνητική ένδειξη παρουσίας του ιού της ΛΑΣ. Όταν τα δείγματα προέρχονται από μονάδες παραγωγής που θεωρούνται μη προσβληθείσες από IPN, είναι δυνατόν να παραλειφθεί η επεξεργασία των ενοφθαλμισμάτων με τον αντιορό στον ιό IPN.

II.2.2. Ενοφθαλμισμός σε κυτταροκαλλιέργειες

Για την αρχική απομόνωση του ιού της ΛΑΣ χρησιμοποιούνται κύτταρα από το νεφρό του σολομού του Ατλαντικού (ASK). Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλλες κυτταρικές σειρές αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας και ευαισθησίας για την απομόνωση του ιού της ΛΑΣ, συνεκτιμώντας τη στελεχική διακύμανση και την κανότητα των διαφόρων στελεχών να αντιγράφονται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα ASK φαίνεται ότι υποστηρίζουν την απομόνωση και ανάπτυξη των μέχρι σήμερα γνωστών ικών απομονωμάτων, με την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιείται χαμηλό επίπεδο διέλευσης. Στα κύτταρα ASK μπορεί να παρουσιαστεί πιο σαφές κυτταροπαθολογικό φαινόμενο (ΚΠΦ) σε σχέση με άλλες επιδεκτικές κυτταρικές σειρές, όπως η SHK-1 (Salmon head kidney-1).

Τα κύτταρα ASK (επίπεδο διέλευσης 65 ή μικρότερο) αναπτύσσονται σε υπόστρωμα L-15 που περιέχει 10 % βόειο εμβρυακό ορό, 2 % (vol:vol) 200 mM L-γλουταμίνη και 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη σε πλάκες πολλαπλών κοιλοτήτων. Ενοφθαλμίζεται εναιώρημα οργάνου επεξεργασμένο με αντιορό σε νέες, ενεργώς αναπτυσσόμενες, κυτταροκαλλιέργειες, ώστε η τελική αραιώση του ιστολογικού υλικού προς το υπόστρωμα καλλιέργειας να είναι της τάξεως του 1:1 000. Για κάθε εναιώρημα οργάνου, προστίθενται 40 μl ενοφθαλμίσματος σε μία κοιλότητα που περιέχει 2 ml υποστρώματος καλλιέργειας. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος διασταυρούμενης μόλυνσης, χρησιμοποιούνται ξεχωριστά τρυβλία 12 ή 24 κοιλοτήτων για δείγματα από διαφορετικές ιχθυοσκευταλεύσεις.

Ένα τρυβλίο παραμένει χωρίς ενοφθαλμισμό ώστε να χρησιμεύσει ως αρνητικός μάρτυρας. Ενοφθαλμίζεται χωριστό τρυβλίο με απομόνωμα αναφοράς του ιού της ΛΑΣ, ως θετικός μάρτυρας, ως ακολούθως: 100 μl μητρικού παρασκευάσματος του ιού της ΛΑΣ (ελάχιστος τίτλος 10^7 μολυσματικής δόσης ιστοκαλλιέργειας στο 50 % τελικό σημείο ($TCID_{50} ml^{-1}$)) ενοφθαλμίζεται στην πρώτη κοιλότητα και αναμειγνύεται. Ποσότητα του εν λόγω υλικού μεταφέρεται από την πρώτη στη δεύτερη κοιλότητα για να προκύψει αραιώση 1:10 και αναμειγνύονται. Αυτό επαναλαμβάνεται σε ολόκληρο το τρυβλίο προκειμένου να ληφθούν έξι αραιώσεις 1:10. Το απόθεμα του ιού της ΛΑΣ μπορεί να αποθηκευθεί στους $-80^{\circ}C$ επί δύο τουλάχιστον έτη, αλλά όταν αποψυχθεί πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός τριών ημερών. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση τρυβλίων της δοκιμής με το υλικό του θετικού μάρτυρα. Για να αποτραπεί ο κίνδυνος αυτός, οι θετικοί μάρτυρες προετοιμάζονται και υφίστανται επεξεργασία ξεχωριστά από τα τρυβλία της δοκιμής. Η διεξαγωγή μιας δοκιμής ευαισθησίας ανά έξι μήνες των κυττάρων ASK ως προς απομονώματα του ιού της ΛΑΣ μπορεί να αντικαταστήσει τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε ενοφθαλμισμό.

Τα δείγματα επωάζονται σε $15 \pm 2^{\circ}C$ για διάστημα μικρότερο ή ίσο των 15 ημερών. Με τη βοήθεια μικροσκοπίου, οι κυτταροκαλλιέργειες εξετάζονται δύο φορές για ΚΠΦ, μεταξύ της 5ης και της 7ης ημέρας, καθώς και μεταξύ της 12ης και 14ης ημέρας από τον ενοφθαλμισμό. Εάν κάποια ομάδα παρουσιάσει ΚΠΦ, αρχίζουν αμέσως διαδικασίες ταυτοποίησης του ιού σύμφωνα με το σημείο II.2.4. Σε περίπτωση που δεν διαπιστωθεί ΚΠΦ μέχρι και τη 14η ημέρα, διενεργείται δοκιμή έμμεσα φθορίζοντων αντισωμάτων (IFAT), αιμοπροσρόφηση ή RT-PCR.

II.2.3. Υποκαλλιέργεια

Διενεργείται υποκαλλιέργεια μεταξύ της 13ης και της 15ης ημέρας. Προστίθεται υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας σε κοιλότητες που περιέχουν φρέσκα, ενεργώς αναπτυσσόμενα κύτταρα στην κατάλληλη αραιώση (1/10) σε τρυβλία πολλαπλών κοιλοτήτων και ακολουθεί επώαση στους $14 \pm 2^{\circ}C$ επί 18 ημέρες κατά μέγιστο όριο. Με τη βοήθεια μικροσκοπίου, οι κυτταροκαλλιέργειες εξετάζονται δύο φορές για ΚΠΦ, μεταξύ της 5ης και της 7ης ημέρας, καθώς και μεταξύ της 14ης και 18ης ημέρας από τον ενοφθαλμισμό. Εάν κάποια ομάδα παρουσιάσει ΚΠΦ, αρχίζουν αμέσως διαδικασίες ταυτοποίησης του ιού σύμφωνα με το σημείο II.2.4. Εάν δεν παρατηρηθεί ΚΠΦ μέχρι τη 14η και 18η ημέρα, διενεργείται δοκιμή αιμοπροσρόφησης ή RT-PCR.

Σε περίπτωση που εμφανιστεί κυτταροτοξικότητα εντός των πρώτων επτά ημερών της επώασης, διενεργείται υποκαλλιέργεια στο στάδιο εκείνο και τα κύτταρα επωάζονται επί 14 έως 18 ημέρες και υποβάλλονται εκ νέου σε υποκαλλιέργεια με περαιτέρω επώαση 14 έως 18 ημερών. Εάν η κυτταροτοξικότητα εμφανιστεί μετά από επτά ημέρες, διενεργείται υποκαλλιέργεια μία φορά και τα κύτταρα επωάζονται, προκειμένου να συμπληρώσουν συνολικά 28 έως 36 ημέρες από τον αρχικό ενοφθαλμισμό.

Εάν εκδηλωθεί βακτηριακή μόλυνση στην αρχική καλλιέργεια, η δοκιμή διεξάγεται εκ νέου με τους ομογενοποιημένους ιστούς που έχουν φυλαχτεί στους $-80^{\circ}C$. Πριν από τον ενοφθαλμισμό, ο ομογενοποιημένος ιστός φυγοκεντρείται στα $4\ 000 \times g$ επί 15 έως 30 λεπτά στους 0 έως $6^{\circ}C$ και το υπερκείμενο υγρό διηθείται σε φίλτρο των 0,22 μm. Εάν εκδηλωθεί βακτηριακή μόλυνση στο στάδιο της υποκαλλιέργειας, το υπερκείμενο υγρό διηθείται σε φίλτρο των 0,22 μm, ενοφθαλμίζεται σε φρέσκα κύτταρα και επωάζεται για ένα περαιτέρω διάστημα 14 έως 18 ημερών.

II.2.4. Δοκιμές ταυτοποίησης ιού

Εάν, σε οιοδήποτε στάδιο, παρατηρηθούν ενδείξεις ΚΠΦ, ή εάν κάποια δοκιμή αιμοπροσρόφησης είναι θετική, διενεργείται ταυτοποίηση ιού. Οι μέθοδοι επιλογής για την ταυτοποίηση του ιού της ΛΑΣ είναι η RT-PCR σύμφωνα με το σημείο II.1 και ο ανοσοφθορισμός (IF) σύμφωνα με το σημείο II.2.6. Εάν θεωρείται ενδεχόμενη η παρουσία άλλων ιών, διενεργούνται συμπληρωματικές δοκιμές ταυτοποίησης ιού. Εάν οι δοκιμές αυτές δεν καταλήξουν σε οριστική ταυτοποίηση του ιού εντός μιας εβδομάδας, το υπερκείμενο υγρό αποστέλλεται για άμεση ταυτοποίηση:

- α) στο εργαστήριο αναφοράς του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας των Ζώων (OIE) για τη ΛΑΣ ή
- β) σε ένα εθνικό εργαστήριο αναφοράς ή στο εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ για ασθένειες ιχθύων, όπως αναφέρεται στο παράρτημα VI της οδηγίας 2006/88/ΕΚ.

II.2.5. Αιμοπροσρόφηση

Επειδή η αντιγραφή του ιού της ΛΑΣ σε κυτταροκαλλιέργειες δεν οδηγεί πάντα σε ΚΠΦ, κάθε κοιλότητα υποβάλλεται σε δοκιμή RT-PCR ή δοκιμή αιμοπροσρόφησης σύμφωνα με το παρόν σημείο ή σε δοκιμή IF σύμφωνα με το σημείο II.2.6.

Αφαιρείται το υπόστρωμα των κυτταροκαλλιιεργειών από κάθε κοιλότητα, συμπεριλαμβανομένων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, και τοποθετείται σε επισημασμένους αποστειρωμένους σωλήνες. Σε κάθε κοιλότητα προστίθενται 500 μl εναιωρήματος 0,2 % (vol:vol) εκπλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων κουνελιού ή αλόγου ή εναιώρημα 0,05 % (vol:vol) εκπλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων ιριδίτσουσας πέστροφας ή σολομού του Ατλαντικού και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου επί 45 λεπτά. Απομακρύνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και κάθε κοιλότητα εκπλένεται δύο φορές με υπόστρωμα L-15. Εξετάζεται κάθε κοιλότητα με τη βοήθεια μικροσκοπίου.

Η παρουσία συμπλέγματος ερυθρών αιμοσφαιρίων προσκολλημένων στην επιφάνεια κυττάρων ASK συνιστά ένδειξη πιθανής λοίμωξης με ορθομυξοϊό. Εάν η δοκιμή αιμοπροσρόφησης είναι θετική, διενεργείται αμέσως δοκιμή ταυτοποίησης ιού σύμφωνα με το σημείο II.2.4.

II.2.6. Ανοσοφθορισμός (IF)

Κύτταρα ASK (επίπεδο διέλευσης 65 ή μικρότερο) καλλιεργούνται σε υπόστρωμα L-15 το οποίο περιέχει 10 % εμβρυακό βόειο ορό, 2 % (vol:vol) 200 mM L-γλουταμίνη και 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη σε τρυβλία πολλαπλών κοιλότητων και χρησιμοποιούνται με συμβολή μεγαλύτερη του 50 %. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν άλλες κυτταρικές σειρές ή υπόστρωμα ανάπτυξης αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας. Σε καθένα από δύο κοιλότητες προστίθενται 225 μl υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας για την οποία υπάρχουν υπόνοιες μόλυνσης από ιό, αναμειγνύονται και 225 μl μεταφέρονται σε δύο άλλες κοιλότητες, προκύπτει δηλαδή αραιώση 1:5. Δύο επιπλέον κοιλότητες παραμένουν χωρίς ενοφθαλμισμό, προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρες. Τα δείγματα από κάθε ιχθυοεκετάλλευση τυγχάνουν επεξεργασίας σε ξεχωριστά τρυβλία, όπως και ο έλεγχος για ιούς. Διενεργείται έλεγχος ιών με τη χρήση απομονώματος αναφοράς του ιού της ΛΑΣ.

Τα τρυβλία επωάζονται στους 14 ± 2 °C και εξετάζονται μικροσκοπικά μέσα σε διάστημα όχι μεγαλύτερο των επτά ημερών. Εάν παρατηρηθεί πρώιμο ΚΠΦ ή αν δεν παρατηρηθεί καθόλου ΚΠΦ εντός επτά ημερών, το επόμενο βήμα είναι η σταθεροποίηση. Οι κοιλότητες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) και σταθεροποιούνται μέσω επώασης με 80 % ακετόνη επί 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα τρυβλία ξηραίνονται δι' αέρος και υποβάλλονται αμέσως σε χρώση ή αποθηκεύονται στους 0 έως 6 °C, για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 24 ωρών, προτού υποβληθούν σε χρώση.

Οι εις διπλούν κοιλότητες υποβάλλονται σε χρώση με μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAb) 3H6F8 και 1OC9F5 έναντι του ιού της ΛΑΣ, ή με άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας και ειδικότητας, αραιώνονται σε PBS και επωάζονται στους 37 ± 4 °C επί 30 λεπτά. Αφαιρείται το μονοκλωνικό αντίσωμα και τα τρυβλία εκπλένονται τρεις φορές με 0,05 % Tween 20, σε PBS. Σε κάθε κοιλότητα προστίθεται σύμπλοκο ισοθειοκυανικής φλουορεΐσίνης και αντι-ανοσοσφαιρίνης G ποντικού (FITC) αραιωμένο σε PBS και ακολουθεί επώαση στους 37 ± 4 °C επί 30 λεπτά. Σε κάθε εργαστήριο προσδιορίζονται οι βέλτιστες αραιώσεις των διαφόρων παρτίδων μονοκλωνικών αντισωμάτων και συμπλόκου FITC. Απομακρύνονται τα αντισώματα και τα τρυβλία εκπλένονται τρεις φορές με 0,05 % Tween 20 σε PBS.

Οι κοιλότητες εξετάζονται αμέσως με τη χρήση ανεστραμμένου μικροσκοπίου κατάλληλου για μικροσκοπία ανοσοφθορισμού, με ειδικό φίλτρο διέγερσης του FITC. Το αποτέλεσμα της δοκιμής θεωρείται θετικό εάν παρατηρηθούν φθορίζοντα κύτταρα. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν θετικό αποτέλεσμα και οι αρνητικοί μάρτυρες αρνητικό αποτέλεσμα.

II.3. Εξέταση άλλων ιστών

Η τεχνική που αναφέρεται στο σημείο II.2.6 μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλους ιστούς ιχθύων, όπως το ήπαρ, ο σπλήνας και η καρδιά, εφόσον είναι δυνατή η εναπόθεση εύλογης ποσότητας ενδοθηλιακών κυττάρων, λευκοκυττάρων ή λεμφοκυττάρων στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η διαδικασία χρώσης παραμένει η ίδια για κάθε ιστό, μολονότι για ορισμένους ιστούς μπορεί να είναι προτιμότερο να παραλειφθεί η χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και η διαδικασία να βασιστεί στον φωτισμό φάσεως για τον προσδιορισμό των κυτταρικών τύπων που είναι παρόντες στο αποτύπωμα.

II.4. Ιστολογία

Τα εγκλεισμένα σε παραφίνη τμήματα κόβονται σε μέγεθος 5 μm και υφίστανται χρώση με αιματοξυλίνη και εωσίνη.

Οι ιστολογικές αλλαγές στον κλινικά νοσούντα σολομό του Ατλαντικού ποικίλλουν, αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν τις εξής:

- α) μεγάλο αριθμό ερυθροκυττάρων στον κεντρικό φλεβικό κόλπο και τα ελασματοειδή τριχοειδή των βραγχίων, όπου τα ερυθροκύτταρα ενδέχεται να σχηματίζουν και θρόμβους·
- β) πολυεστιακά έως συρρέοντα πετέχεια ή νέκρωση ηπατοκυττάρων ή και τα δύο σε κάποια απόσταση από τα μεγαλύτερα αγγεία του ήπατος, πολυεστιακή συσσώρευση ερυθροκυττάρων σε διεσταλμένα ηπατικά κολποειδή·

- γ) συσώρευση ερυθροκυττάρων σε αιμοφόρα αγγεία του εντερικού χορίου του βλεννογόνου και, εντέλει, αιμορραγία στο χόριο του βλεννογόνου·
- δ) διόγκωση του στρώματος του σπλήνα λόγω συσώρευσης ερυθροκυττάρων·
- ε) ελαφρώς πολυεστιακή έως εκτεταμένη διάχυτη εντερική αιμορραγία με σωληνοειδή νέκρωση στις περιοχές αιμορραγίας, συσώρευση ερυθροκυττάρων στα σπειράματα του νεφρού·
- στ) ερυθροφαγοκυττάρωση στο σπλήνα και δευτερογενείς αιμορραγίες στο ήπαρ και το νεφρό.

II.5. Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

Χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά αντισώματα έναντι νουκλεοπρωτεϊνών του ιού της ΛΑΣ σε τμήματα παραφίνης από ιστό σταθεροποιημένο σε φορμαλίνη. Τα όργανα που πρόκειται να εξεταστούν είναι ο μεσόνεφρος και η καρδιά (μεταβατική περιοχή που συμπεριλαμβάνει και τους τρεις θαλάμους καθώς και τις βαλβίδες). Υποπτες περιπτώσεις λόγω παθολογικών ενδείξεων επιβεβαιώνονται με θετικό έλεγχο IHC. Οι ιστολογικές τομές προετοιμάζονται σύμφωνα με τις τυπικές μεθόδους.

(2) Προετοιμασία των τμημάτων ιστών

Οι ιστοί σταθεροποιούνται σε ουδέτερο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΐδης 10 % για τουλάχιστον μία ημέρα, αφυδατώνονται σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης, υφίστανται διαύγαση σε ξυλόλιο και εγκλείονται σε παραφίνη, σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα. Τμήματα πάχους περίπου 5 μm (για IHC το δείγμα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με πολυ-L-λυσίνη) θερμαίνονται στους 56 °C έως 58 °C (μέγιστη θερμοκρασία 60 °C) επί 20 λεπτά, υφίστανται αποκρήωση σε ξυλόλιο, επανενυδατώνονται μέσω διαβαθμισμένης σειράς αιθανόλης και υφίστανται χρώση με αιματοξυλίνη και εωσίνη για έλεγχο των μορφολογικών αλλαγών λόγω παθολογικών καταστάσεων και της IHC σύμφωνα με το σημείο (2).

(3) Διαδικασία χρώσης για IHC

Όλες οι επώσεις διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου σε πλατφόρμα δόνησης, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά στην παρούσα απόφαση:

- α) η ανάκτηση αντιγόνου πραγματοποιείται με βρασμό των τμημάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,1 M, pH 6,0 επί 2 × 6 λεπτά και, στη συνέχεια, αποκλεισμό με 5 % αποξηραμένο γάλα χωρίς λίπος και ορό αίγας 2 % σε 50 mM TBS (TBS: Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) επί 20 λεπτά.
- β) Στη συνέχεια, τα τμήματα επωάζονται ολονυχτίς με το κύριο αντίσωμα (μονοειδικά αντισώματα κουνελιού έναντι νουκλεοπρωτεΐνης του ιού της ΛΑΣ) αραιωμένο σε TBS με 1 % αποξηραμένο γάλα χωρίς λίπος και ακολουθούν τρεις πλύσεις σε TBS με 0,1 % Tween 20.
- γ) Για την ανίχνευση των δεσμευμένων αντισωμάτων, τα τμήματα επωάζονται με αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρίνης G κουνελιού συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση επί 60 λεπτά. Μετά από μια τελική πλύση, προστίθενται Fast Red (1 mg ml⁻¹) και φωσφορική ναφθόλη AS-MX (0,2 mg ml⁻¹) με 1 mM λεβαμιζόλη σε 0,1 M TBS (pH 8,2) και η αντίδραση αναπτύσσεται επί 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα τμήματα εκπλένονται με νερό βρύσης και υφίστανται αντιχρώση με αιματοξυλίνη Harris και στερεώνονται σε υδατικό υπόστρωμα στερέωσης. Σε κάθε προετοιμασία συμπεριλαμβάνονται τμήματα ιστών θετικά για τον ιό της ΛΑΣ και αρνητικά για τον ιό της ΛΑΣ ως μάρτυρες.

(4) Ερμηνεία του αποτελέσματος της IHC

Η ερμηνεία του αποτελέσματος της δοκιμής IHC ορίζεται στα σημεία α) και β):

- α) Τα τμήματα του μάρτυρα θεωρούνται θετικά όταν η κυτταροπλασματική και ενδοπυρηνική χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία του ενδοκαρδίου στα τμήματα του μάρτυρα εμφανίζει σαφές κόκκινο (ερυθροπό) χρώμα. Ένα τμήμα του εξεταζόμενου δείγματος θα θεωρείται θετική μόνο εάν υπάρχει σαφής, ενδοπυρηνική κόκκινη χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- β) Τα τμήματα του μάρτυρα θεωρούνται αρνητικά αν δεν εμφανίζουν καμία σημαντική αντίδραση χρώσης.

Δεδομένου ότι η ενδοπυρηνική τοποθέτηση αφορά συγκεκριμένα τη νουκλεοπρωτεΐνη του ορθομυξοϊού κατά τη διάρκεια ενός σταδίου της ιικής αντιγραφής αλλά η ταυτόχρονη κυτταροπλασματική χρώση είναι συχνά επικρατούσα, η κυτταροπλασματική χρώση και άλλα μοτίβα χρώσης χωρίς ενδοπυρηνική τοποθέτηση θεωρούνται μη ειδικά ή μη καταληκτικά.

Οι πιο έντονες θετικές αντιδράσεις χρώσης συνήθως λαμβάνονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς και του νεφρού. Οι αντιδράσεις χρώσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε πολύ εκτεταμένες αιμορραγικές αλλοιώσεις ενδέχεται να είναι ασήμαντες ή να απουσιάζουν, πιθανώς λόγω της λύσης των προσβεβλημένων ενδοθηλιακών κυττάρων.

ΜΕΡΟΣ 4

ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ *MARTEILIA REFRINGENS*

I. Λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες για τη διάγνωση λοίμωξης από *Marteilia refringens*

Κατά τη διενέργεια της δειγματοληψίας και των εργαστηριακών εξετάσεων για τους σκοπούς της απόκτησης ή διατήρησης υγειονομικού καθεστώτος όσον αφορά τη λοίμωξη από *Marteilia refringens*, όπως ορίζεται στο παράρτημα I μέρος 4 τμήμα I ή για τους σκοπούς της επιβεβαίωσης ή του αποκλεισμού της παρουσίας της εν λόγω ασθένειας που περιλαμβάνεται στον κατάλογο σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/ΕΚ, με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο παράρτημα I μέρος 4 τμήμα II, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες που προβλέπονται στα σημεία I.1, I.2 και I.3 του παρόντος μέρους.

I.1. Τρόπος δειγματοληψίας

Λαμβάνεται δείγμα από ανοιχτά ή πρόσφατα νεκρωθέντα μαλάκια βάσει προτεραιότητας, προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα εύρεσης προσβεβλημένων ζώων.

Μετά τη δειγματοληψία, τα στρείδια ή τα μύδια διατηρούνται στους 4 °C ή στο ψυγείο επάνω σε πάγο για 24 ώρες το μέγιστο εάν τα δείγματα περιλαμβάνουν ανοιχτά μαλάκια και για έως 72 ώρες στην αντίθετη περίπτωση, μέσα σε πλαστική σακούλα που φέρει επισήμανση, η οποία περιλαμβάνει στοιχεία που αφορούν τη φύση και την προέλευση των στρειδιών ή των μυδιών. Τα ανοικτά ή πρόσφατα νεκρωθέντα μαλάκια διατηρούνται ξεχωριστά από άλλα μαλάκια.

Για τη διάγνωση του *Marteilia refringens* μέσω ιστολογικής ανάλυσης χρησιμοποιείται τμήμα ιστών πάχους 3 έως 5 mm που περιλαμβάνει βράγχια και καρδιακό ιστό. Ένα τμήμα του πεπτικού αδένου χρησιμοποιείται για μερικές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των αποτυπωμάτων και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

I.2. Τεχνικές μικροσκοπίου

I.2.1. Κυτταρολογία (κυτταρολογικό αποτύπωμα)

Μετά την ξήρανση των ιστών του πεπτικού αδένου σε απορροφητικό χαρτί, πραγματοποιούνται αρκετά αποτυπώματα σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξηραίνονται δι' αέρος, σταθεροποιούνται σε μεθανόλη ή απόλυτη αιθανόλη και υφίστανται χρώση με ένα εμπορικό διαδίσσιμο κιτ χρώσης του αίματος, όπως το Diff-Quik®/Hemacolor®, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την έκπλυση σε νερό βρύσης και την ξήρανση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύπτονται με μια καλυπτρίδα με τη χρήση κατάλληλης συνθετικής ρητίνης. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αρχικά εξετάζονται σε μεγέθυνση × 200 και, στη συνέχεια, σε μεγέθυνση × 1 000 με τη χρήση ελαίου κατάδυσης.

Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παρουσία κυττάρων με μέγεθος που κυμαίνεται από 30 έως 40 μm. Στο κυτταρόπλασμα εμφανίζονται χρωσμένα τα βασεόφιλα, ενώ στον πυρήνα τα ηωσινόφιλα. Παρατηρούνται ωχρά φωτοστέφανα γύρω από μεγάλα, έντονα χρωσμένα (διαθλαστικά) κοκκία και, σε μεγαλύτερα κύτταρα, παρατηρείται κύτταρο εντός κυτταρικών διαμορφώσεων.

Η τεχνική δεν παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος του παρασίτου.

I.2.2. Ιστολογία

Τμήματα ιστού που περιλαμβάνουν βράγχια, πεπτικό αδένου, μανδύα και γονάδες σταθεροποιούνται για τουλάχιστον 24 ώρες σε υλικό σταθεροποίησης Davidson και ακολουθεί η συνήθης επεξεργασία για ιστολογική εξέταση σε μπλοκ παραφίνης και χρώση, για παράδειγμα αιματοξυλίνη και εωσίνη. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιείται αυξάνοντας τη μεγέθυνση σταδιακά έως τη μεγέθυνση × 1 000.

Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παρουσία κυττάρων με μέγεθος που κυμαίνεται από 4 έως 40 μm. Τα αρχικά στάδια της λοίμωξης συνίστανται από σφαιρικά έως επιμηκυσμένα πολυπύρρηνα κύτταρα. Αυτά συναντώνται κυρίως στο επιθήλιο του οισοφάγου και του στομάχου, και μερικές φορές και στις χειλικές προσοακτρίδες. Η σπορογένεση περιλαμβάνει κυτταρικές διαιρέσεις εντός των κυττάρων και πραγματοποιείται στα σωληνάρια και τους πόρους του πεπτικού αδένου. Διαθλαστικά κοκκία εμφανίζονται στην πορεία της σπορογένεσης, ωστόσο δεν παρατηρούνται στα αρχικά στάδια. Στα προχωρημένα στάδια της λοίμωξης, παρατηρούνται ελεύθερα σποραγγεία στον αυλό του πεπτικού σωλήνα. Στο κυτταρόπλασμα εμφανίζονται χρωσμένα τα βασεόφιλα, ενώ στον πυρήνα τα ηωσινόφιλα. Το χρώμα των κοκκίων κυμαίνεται από βαθύ πορτοκαλί έως βαθύ κόκκινο.

Η τεχνική δεν παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος του παρασίτου.

I.3. Μοριακές τεχνικές

I.3.1. Εξαγωγή DNA

Το DNA εξάγεται σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κιτ εξαγωγής DNA, τα οποία διατίθενται στο εμπόριο και συνήθως παράγουν DNA υψηλής ποιότητας κατάλληλο για χρήση με τα πρωτόκολλα PCR που περιγράφονται στο σημείο I.3.2.

I.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Έχουν αναπτυχθεί και δημοσιευθεί αρκετά πρωτόκολλα PCR.

Χρησιμοποιούνται εκκινητές PCR που στοχεύουν την εσωτερική μεταγραφόμενη διαχωριστική περιοχή (ITS1) καθώς έχουν τη δυνατότητα να ενισχύουν μόνο το *M. refringens*.

Η PCR πραγματοποιείται σε όγκο 50 μ l. Τα μείγματα PCR αποτελούνται από ρυθμιστικό διάλυμα [500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 9,0 στους 25 °C) και 1 % Triton® X-100], 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM μείγματος dNTP, 1 μ M πρόσθιων και αντίστροφων εκκινητών, 0,02 μονάδες μ l⁻¹ Taq DNA πολυμεράση και 10 έως 100 ng του εξαχθέντος DNA. Μετά την αποδιάταξη του DNA στους 94 °C επί 5 λεπτά, εκτελούνται 30 κύκλοι ως εξής: αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτό, πρόσδεση των εκκινητών στους 55 °C για 1 λεπτό και επιμήκυνση στους 72 °C για 1 λεπτό ανά χίλια ζεύγη βάσεων (kbp). Εκτελείται ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης επί 10 λεπτά στους 72 °C. Για την ανίχνευση του *M. refringens*, η PCR πραγματοποιείται με εκκινητές που στοχεύουν την περιοχή ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' και 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Οι θετικοί μάρτυρες αποτελούνται από γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από έντονα μολυσμένο ξενιστή ή πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει την περιοχή-στόχο.

Οι αρνητικοί μάρτυρες αποτελούνται από γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από μη μολυσμένους ξενιστές και αντιδρώντα της PCR που δεν περιλαμβάνουν το DNA-στόχο.

Ένα θετικό αποτέλεσμα δίνει προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους (412 bp) κατά την ενίσχυση με PCR, ενώ όλοι οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα και όλοι οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν θετικό αποτέλεσμα.

I.3.3. In-situ υβριδισμός (ISH)

Έχουν αναπτυχθεί και δημοσιευθεί αρκετά πρωτόκολλα ISH.

Χρησιμοποιείται ανιχνευτής που στοχεύει τη μικρή υπομονάδα (SSU) του συμπλέγματος rRNA επειδή έχει επικυρωθεί ιστολογικά.

Τμήματα ιστού που περιλαμβάνουν βράγχια και πεπτικό αδένια σταθεροποιούνται για τουλάχιστον 24 ώρες σε υλικό σταθεροποίησης Davidson και ακολουθεί η συνήθης επεξεργασία για ιστολογική εξέταση σε μπλοκ παραφίνης. Τμήματα των 5 μ m κόβονται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με αμινοαλκυλοσιλάνιο, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετούνται σε φούρνο στους 40 °C ολονυχτίς. Τα τμήματα υφίστανται αποκήρωση μέσω εμβάπτισης σε ξυλόλιο επί 10 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία φορά και, στη συνέχεια, ο διαλύτης εξαλείφεται μέσω εμβάπτισης σε δύο διαδοχικά λουτρά απόλυτης αιθανόλης επί 10 λεπτά έκαστο. Κατόπιν, τα τμήματα επανενυδατώνονται μέσω εμβάπτισης σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης. Τα τμήματα υφίστανται επεξεργασία με πρωτεΐνωση K (100 μ g ml⁻¹) σε ρυθμιστικό διάλυμα TE [Tris (50 mM), EDTA (10 mM)], στους 37 °C επί 30 λεπτά. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφυδατώνονται μέσω εμβάπτισης σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης και, στη συνέχεια, ξηραίνονται δι' αέρος. Τα τμήματα επωάζονται με 100 μ l ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού [4 × SSC (standard saline citrate), 50 % φορμαμίδιο, 1 × διάλυμα Denhardt, 250 μ g ml⁻¹ tRNA ζυμομυκήτων, 10 % θειικό άλας δεξτρανών] που περιέχει 10 ng (1 μ l των αντιδρώντων PCR προετοιμάζεται όπως περιγράφεται στο σημείο I.3.2 με τη χρήση των εκκινητών CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG και TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) του επισημασμένου με διγοξigenίνη ανιχνευτή. Τα τμήματα σκεπάζονται με πλαστικές καλυπτρίδες in-situ και τοποθετούνται σε θερμικό μπλοκ στους 95 °C για 5 λεπτά. Κατόπιν, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ψύχονται σε πάγο για 1 λεπτό και ακολουθεί υβριδισμός ολονυχτίς στους 42 °C σε υγρό θάλαμο. Τα τμήματα εκπλένονται δύο φορές για 5 λεπτά σε 2 × SSC σε θερμοκρασία δωματίου και μία φορά για 10 λεπτά σε 0,4 × SSC στους 42 °C. Τα βήματα ανίχνευσης πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλένονται σε αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό (dH₂O). Τα τμήματα υφίστανται αντιχρώση με Bismarck Brown Yellow, εκπλένονται με dH₂O και τοποθετούνται καλυπτρίδες με τη χρήση υδατικού υποστρώματος στερέωσης.

Οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες θα είναι τμήματα που προέρχονται από γνωστούς μολυσμένους και μη μολυσμένους ξενιστές, αντίστοιχα.

Ένα θετικό αποτέλεσμα τεκμηριώνεται από τη μαύρη ιώδη χρώση των κυττάρων *M. refringens* στο πλαίσιο γνωστών ιστών-στόχων, ενώ όλοι οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα και όλοι οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν θετικό αποτέλεσμα.

I.3.4. Προσδιορισμός αλληλουχίας

Ο προσδιορισμός αλληλουχίας διεξάγεται ως ένα από τα τελικά βήματα των επιβεβαιωτικών διαγνωστικών διαδικασιών. Οι περιοχές-στόχοι είναι το SSU rDNA και η ITS1.

II. Λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες για την επιτήρηση και επιβεβαίωση λοίμωξης από *Marteilia refringens*

Για τους σκοπούς των προγραμμάτων επιτήρησης και για την επιβεβαίωση της παρουσίας λοίμωξης από *Marteilia refringens* ή για τον αποκλεισμό της υπόνοιας για την εν λόγω ασθένεια που περιλαμβάνεται στον κατάλογο, σύμφωνα με τις απαιτήσεις που προβλέπονται στο παράρτημα I μέρος 4 τμήμα II, οι διαγνωστικές μέθοδοι και οι αντίστοιχες διαδικασίες που θα χρησιμοποιηθούν είναι σύμφωνες με τις κατευθυντήριες γραμμές που προβλέπονται στον πίνακα 4.1, ως εξής:

Πίνακας 4.1

Κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων για τα προγράμματα επιτήρησης και για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό λοίμωξης από *Marteilia refringens*

Μέθοδος	Στοχευμένη επιτήρηση	Πιθανολογούμενη διάγνωση	Επιβεβαιωτική διάγνωση
Αποτυπώματα πεπτικού αδένου	X	X	X, ή
Ιστοπαθολογία	X		X, ή
<i>In situ</i> υβριδισμός			X, και
PCR	X	X	X, και
Προσδιορισμός αλληλουχίας			X

ΜΕΡΟΣ 5

ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ *BONAMIA OSTREAE*

I. Διαδικασίες για τη διάγνωση λοίμωξης από *Bonamia ostreae*

Κατά τη διενέργεια της δειγματοληψίας και των εργαστηριακών εξετάσεων για τους σκοπούς της απόκτησης ή διατήρησης ενός συγκεκριμένου υγειονομικού καθεστώτος όσον αφορά τις λοιμώξεις από *Bonamia ostreae*, όπως ορίζεται στο παράρτημα I μέρος 5 τμήμα I, ή για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της παρουσίας της εν λόγω ασθένειας που περιλαμβάνεται στον κατάλογο σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/EK, με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο παράρτημα I μέρος 5 τμήμα II, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες που προβλέπονται στα σημεία I.1, I.2 και I.3 αυτού του μέρους.

I.1. Επεξεργασία του δείγματος

Λαμβάνεται δείγμα από ανοιχτά ή πρόσφατα νεκρωθέντα μαλάκια βάσει προτεραιότητας, προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα εύρεσης προσβεβλημένων ζώων.

Μετά τη δειγματοληψία, τα στρείδια διατηρούνται στους 4 °C ή στο ψυγείο επάνω σε πάγο για 24 ώρες το μέγιστο εάν τα δείγματα περιλαμβάνουν ανοιχτά μαλάκια και για έως 72 ώρες στην αντίθετη περίπτωση, μέσα σε πλαστική σακούλα που φέρει επισήμανση, η οποία περιλαμβάνει στοιχεία που αφορούν τη φύση και την προέλευση των στρειδιών. Τα ανοικτά ή πρόσφατα νεκρωθέντα μαλάκια διατηρούνται ξεχωριστά από άλλα μαλάκια.

Για τη διάγνωση του *Bonamia ostreae* μέσω ιστολογικής ανάλυσης χρησιμοποιείται τμήμα ιστών πάχους 3 έως 5 mm που περιλαμβάνει βράγχια και καρδιακό ιστό. Ένα τμήμα του πεπτικού αδένου χρησιμοποιείται για μερικές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των αποτυπωμάτων και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

I.2. Τεχνικές μικροσκοπίου

I.2.1. Κυτταρολογία (κυτταρολογικό αποτύπωμα)

Μετά την ξήρανση των βραγχίων και των καρδιακών ιστών σε απορροφητικό χαρτί, πραγματοποιούνται αρκετά αποτυπώματα σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξηραίνονται δι' αέρος, σταθεροποιούνται σε μεθανόλη ή απόλυτη αιθανόλη και υφίστανται χρώση με ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ χρώσης του αίματος (όπως το Diff-Quik®/Hemacolor®), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την έκπλυση σε νερό βρύσης και την ξήρανση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύπτονται με μια καλυπτρίδα με τη χρήση κατάλληλης συνθετικής ρητίνης. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αρχικά εξετάζονται σε μεγέθυνση $\times 200$ και, στη συνέχεια, σε μεγέθυνση $\times 1\ 000$ με τη χρήση ελαίου κατάδυσης.

Ένα θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παρουσία μικρών σφαιρικών ή ωοειδών οργανισμών (πλάτους 2 έως 5 μm) εντός των αιμοκυττάρων. Ωστόσο, το παράσιτο μπορεί να βρίσκεται και στην εξωκυττάρια περιοχή. Οι οργανισμοί αυτοί διαθέτουν βασόφιλο κυτταρόπλασμα και ηωσινόφιλο πυρήνα (τα χρώματα ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με τη χρώση που χρησιμοποιείται) και, επειδή απλώνονται στην αντικειμενοφόρο πλάκα, μπορεί να εμφανίζονται με μεγαλύτερο πλάτος στα αποτυπώματα απ' ό,τι στην ιστολογική εξέταση. Μπορεί να παρατηρηθούν πολυπύρηνια κύτταρα. Η τεχνική δεν παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος του παρασίτου.

I.2.2. Ιστολογία

Τμήματα ιστού που περιλαμβάνουν βράγχια και πεπτικό αδένια σταθεροποιούνται για διάστημα τουλάχιστον 24 ωρών σε υλικό σταθεροποίησης Davidson και ακολουθεί η συνηθής επεξεργασία για ιστολογική εξέταση σε μπλοκ παραφίνης και χρώση, για παράδειγμα αιματοξυλίνη και εωσίνη. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιείται αυξάνοντας τη μεγέθυνση σταδιακά έως τη μεγέθυνση $\times 1\ 000$.

Ένα θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παρουσία παρασίτων ως πολύ μικρά κύτταρα πλάτους 2 έως 5 μm εντός των αιμοκυττάρων ή ελεύθερα εντός του συνδετικού ιστού ή των κόλπων του βραγχίου, του εντέρου και του επιθηλίου του μανδύα, και συχνά σχετίζονται με έντονη φλεγμονώδη αντίδραση. Για την αποφυγή κάθε αμφιβολίας, γίνεται παρατήρηση για την παρουσία του παρασίτου εντός των αιμοκυττάρων για θετική διάγνωση. Η τεχνική δεν παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος των παρασίτων.

I.3. Μοριακές τεχνικές

I.3.1. Εξαγωγή DNA

Το DNA εξάγεται σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κιτ εξαγωγής DNA, τα οποία διατίθενται στο εμπόριο και συνήθως παράγουν DNA υψηλής ποιότητας κατάλληλο για χρήση με τα πρωτόκολλα PCR όπως περιγράφονται κατωτέρω.

I.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Έχουν αναπτυχθεί και δημοσιευθεί αρκετά πρωτόκολλα PCR.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο πρωτόκολλα PCR που στοχεύουν τη μικρή υπομονάδα (SSU) του rDNA:

α) το πρώτο είναι μια συμβατική PCR που ενισχύει ορισμένα μέλη της οικογένειας των *Haplosporidia* συμπεριλαμβανομένου του *Bonatia* spp. Οι εκκινητές με το χαρακτηρισμό Bo-Boas είναι οι 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' και 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' αντίστοιχα, και ενισχύουν ένα προϊόν μεγέθους 300 bp. Τα μείγματα PCR αποτελούνται από ρυθμιστικό διάλυμα [500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 9,0 στους 25 °C) και 1 % Triton® X-100], 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM μείγματος dNTP, 1 μM πρόσθιων και αντίστροφων εκκινητών, 0,02 μονάδες μl^{-1} Taq DNA πολυμεράση και 0,2 ng μl^{-1} του εκμαγείου DNA συνολικού όγκου 50 μl . Τα δείγματα αποδιατάσσονται σε θερμικό κυκλοποιητή επί 5 λεπτά στους 94 °C, στη συνέχεια υποβάλλονται σε 30 κύκλους (94 °C επί 1 λεπτό, 55 °C επί 1 λεπτό, 72 °C επί 1 λεπτό) και ακολουθεί τελική επιμήκυνση επί 10 λεπτά στους 72 °C.

Οι θετικοί μάρτυρες αποτελούνται από γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από έντονα μολυσμένο ξενιστή ή πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει την περιοχή-στόχο.

Οι αρνητικοί μάρτυρες αποτελούνται από γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από μη μολυσμένους ξενιστές και αντιδράντα της PCR που δεν περιλαμβάνουν το DNA-στόχο.

Ένα θετικό αποτέλεσμα δίνει προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους (δηλαδή 300 bp) κατά την ενίσχυση με PCR, ενώ όλοι οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα και όλοι οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν θετικό αποτέλεσμα.

- β) το δεύτερο πρωτόκολλο PCR είναι μια δοκιμασία PCR σε πραγματικό χρόνο SYBR® Green. Επιτρέπει την ειδική ανίχνευση του *B. ostreae* (περιγράφεται κατωτέρω) και μπορεί να συνδυαστεί με δοκιμασία PCR σε πραγματικό χρόνο SYBR® Green ώστε να είναι δυνατή η ειδική ανίχνευση του *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Οι εκκινητές BOSTRE-F (5'- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') και BOSTRE-R (5'- TCGCGGTTGAATTTATATCGT-3') ενισχύουν ένα προϊόν μεγέθους 208 bp. Τα μείγματα PCR αποτελούνται από SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 mM πρόσθιων και αντίστροφων εκκινητών και 200 ng του εξαχθέντος DNA. Τα δείγματα αποδιατάσσονται σε σύστημα ανίχνευσης πραγματικού χρόνου επί 10 λεπτά στους 95 °C και, στη συνέχεια, υποβάλλονται σε 35 κύκλους (95 °C επί 30 δευτερόλεπτα, 55 °C επί 45 δευτερόλεπτα και 72 °C επί 1 λεπτό). Η ανάλυση της καμπύλης θερμοκρασίας αποδιάταξης διεξάγεται με αυξήσεις της θερμοκρασίας των 0,5 °C, ξεκινώντας από τους 55 °C και φθάνοντας στους 95 °C, ενώ γίνεται καταγραφή του φθορισμού σε κάθε θερμοκρασιακή αλλαγή.

Οι θετικοί μάρτυρες αποτελούνται από γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από έντονα μολυσμένο ξενιστή ή πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει την περιοχή-στόχο.

Οι αρνητικοί μάρτυρες αποτελούνται από γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από μη μολυσμένους ξενιστές και αντιδρώντα της PCR που δεν περιλαμβάνουν το DNA-στόχο.

Ένα θετικό αποτέλεσμα δίνει προϊόν ενίσχυσης με PCR το οποίο θα χαρακτηρίζεται από μια μοναδική μέγιστη θερμοκρασία αποδιάταξης ($78,25 \pm 0,25$ °C υπό τις συνθήκες που δημοσιεύτηκαν από τους Ramilo et al. 2013), ενώ όλοι οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα και όλοι οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν θετικό αποτέλεσμα.

I.3.3. In-situ υβριδισμός (ISH)

Έχουν αναπτυχθεί και δημοσιευθεί αρκετά πρωτόκολλα ISH.

Χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής που στοχεύει την SSU του συμπλέγματος rDNA παρότι βρέθηκε ότι παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα μέλη της οικογένειας των *Harposporidia*.

Τμήματα ιστού που περιλαμβάνουν βράγχια και πεπτικό αδένια σταθεροποιούνται για διάστημα τουλάχιστον 24 ωρών σε υλικό σταθεροποίησης Davidson και ακολουθεί η συνήθης επεξεργασία για ιστολογική εξέταση σε μπλοκ παραφίνης. Τμήματα των 5 μm κόβονται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με αμινοαλκυλοσιλάνιο, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετούνται σε φούρνο στους 40 °C ολονυχτίς. Τα τμήματα υφίστανται αποκήρωση μέσω εμβάπτισης σε ξυλόλιο επί 10 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία φορά και, στη συνέχεια, ο διαλύτης εξαλείφεται μέσω εμβάπτισης σε δύο διαδοχικά λουτρά απόλυτης αιθανόλης επί 10 λεπτά έκαστο. Κατόπιν, τα τμήματα επανενυδατώνονται μέσω εμβάπτισης σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης. Τα τμήματα υφίστανται επεξεργασία με πρωτεΐνωση K (100 μg ml⁻¹) σε ρυθμιστικό διάλυμα TE [Tris (50 mM), EDTA (10 mM)], στους 37 °C επί 30 λεπτά. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφυδατώνονται μέσω εμβάπτισης σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης και, στη συνέχεια, ξηραίνονται δι' αέρος. Τα τμήματα επωάζονται με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού [4 × SSC (standard saline citrate), 50 % φορμαμίδιο, 1 × διάλυμα Denhardt, 250 μg ml⁻¹ tRNA ζυμομοικήτων, 10 % θειικό άλας δεξτρανών] που περιέχει 20 ng (2 μl του μείγματος αντίδρασης PCR προετοιμάζεται όπως περιγράφεται στο σημείο 1.3.2 με τη χρήση εκκινητών Bo και Boas) του επισημασμένου με διγοξιγενίνη ανιχνευτή. Τα τμήματα σκεπάζονται με πλαστικές καλυπτρίδες in-situ και τοποθετούνται σε θερμικό μπλοκ στους 95 °C για 5 λεπτά. Κατόπιν, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ψύχονται σε πάγο για 1 λεπτό και ακολουθεί υβριδισμός ολονυχτίς στους 42 °C σε υγρό θάλαμο. Τα τμήματα εκπλένονται δύο φορές για 5 λεπτά σε 2 × SSC σε θερμοκρασία δωματίου και μία φορά για 10 λεπτά σε 0,4 × SSC στους 42 °C. Τα βήματα ανίχνευσης πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλένονται σε αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό (dH₂O). Τα τμήματα υφίστανται αντιχρώση με Bismarck Brown Yellow, εκπλένονται με dH₂O και τοποθετούνται καλυπτρίδες με τη χρήση υδατικού υποστρώματος στερέωσης.

Οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες θα είναι τμήματα που προέρχονται από γνωστούς μολυσμένους και μη μολυσμένους ξενιστές, αντίστοιχα.

Ένα θετικό αποτέλεσμα αντιστοιχεί στην παρουσία επισημασμένων παρασίτων εντός των αιμοκυττάρων, ενώ όλοι οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα και όλοι οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν θετικό αποτέλεσμα.

I.3.4. Προσδιορισμός αλληλουχίας

Ο προσδιορισμός αλληλουχίας διεξάγεται ως ένα από τα τελικά βήματα των επιβεβαιωτικών διαγνωστικών διαδικασιών. Οι περιοχές-στόχοι είναι το SSU rDNA και η ITS1.

II. Διαδικασίες για την επιτήρηση και επιβεβαίωση λοίμωξης από *Bonamia ostreae*

Για τους σκοπούς επιτήρησης και επιβεβαίωσης της παρουσίας ή αποκλεισμού της υπόνοιας για λοίμωξη από *Bonamia ostreae* σύμφωνα με τις απαιτήσεις που προβλέπονται στο παράρτημα I μέρος 5 τμήμα II, οι διαγνωστικές μέθοδοι και οι αντίστοιχες διαδικασίες που θα χρησιμοποιηθούν είναι σύμφωνες με τις κατευθυντήριες γραμμές που προβλέπονται στον πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1

Κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων για τα προγράμματα επιτήρησης και για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό λοίμωξης από *Bonamia ostreae*

Μέθοδος	Στοχευμένη επιτήρηση	Πιθανολογούμενη διάγνωση	Επιβεβαιωτική διάγνωση
Αποτυπώματα καρδιάς ή βραγχίων	X	X	X, ή
Ιστοπαθολογία	X		X, ή
<i>In situ</i> υβριδισμός			X, και
PCR	X	X	X, και
Προσδιορισμός αλληλουχίας			X

ΜΕΡΟΣ 6

ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΙΧΘΥΟΦΘΕΙΡΙΑΣΗΣ (WSD)

1. Διαγνωστικές διαδικασίες για την ανίχνευση του WSSV

Όταν η δειγματοληψία και οι εργαστηριακές εξετάσεις για τους σκοπούς των προγραμμάτων επιτήρησης και εξάλειψης που ορίζονται στο παράρτημα I μέρος 6 τμήμα I, και για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή τον αποκλεισμό υπόνοιας λοίμωξης από WSSV διενεργούνται σύμφωνα με το άρθρο 57 στοιχείο β) της οδηγίας 2006/88/EK, με τη χρήση των διαγνωστικών μεθόδων που προβλέπονται στο παράρτημα I μέρος 6 τμήμα II, εφαρμόζονται οι λεπτομερείς διαγνωστικές μέθοδοι και διαδικασίες που προβλέπονται στα σημεία 2 έως 7 του παρόντος μέρους.

Οι μέθοδοι και οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν μέρος του παραρτήματος II αποτελούν προσαρμογή της διαπιστευμένης κατά ISO 17025 δοκιμής που εφαρμόζεται στο εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις ασθένειες των καρκινοειδών. Μπορούν να εφαρμοστούν εναλλακτικές προσεγγίσεις με τη χρήση ισοδύναμων συνθηκών ή κιτ από διαφορετικούς κατασκευαστές, τα οποία ωστόσο πρέπει να παρέχουν ισοδύναμη ευαισθησία και ειδικότητα με αυτά που περιγράφονται στο παρόν μέρος. Σε κάθε περίπτωση, προσδιορίζεται η αλληλουχία του προϊόντος ενίσχυσης της PCR για να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα του ιού της ιχθυοφθειρίασης (WSSV).

2. Επεξεργασία του δείγματος

Ιστός (πλεοπόδια και βράγχια) από καρκινοειδή που περιέχει τον WSSV μπορεί να φυλαχτεί σε αιθανόλη, RNAlater ή να υποστεί στιγμιαία κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα στάδια που απαιτούνται για την ταυτοποίηση του WSSV από δείγματα ιστών είναι τα εξής: Ομογενοποίηση του ιστού, εξαγωγή του DNA, ειδική ενίσχυση του DNA του WSSV με τη χρήση της PCR, απεικόνιση του ενισχυμένου προϊόντος σε πηκτική, καθαρισμός του DNA και προσδιορισμός της αλληλουχίας για την επιβεβαίωση της ταυτότητας του παθογόνου.

3. Ομογενοποίηση ιστού

Η διάσπαση των ιστών και η προετοιμασία του ομογενοποιημένου δείγματος σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα διεξάγεται με τη χρήση της συσκευής διάσπασης ιστών Fast Prep και σωλήνων Lysing matrix A (MP Biomedicals). Ο ιστός ζυγίζεται, τοποθετείται σε σωλήνες Lysing Matrix A, αραιώνεται σε αναλογία 1 προς 10 w/v ή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα [G2 και 10 μl πρωτεΐνωση K για χρήση με κιτ ιστών DNA (Qiagen)] και ομογενοποιείται με τη χρήση του ομογενοποιητή Fast Prep 24 επί 2 λεπτά. Τα ομογενοποιημένα δείγματα επωάζονται στους $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τουλάχιστον τέσσερις ώρες ή ολονυχτίς. Τα δείγματα υποβάλλονται σε περιδίνηση, φυγοκεντρώνονται στις 9 000 σ.α.λ. επί δύο λεπτά και 50 μl του υπερκείμενου υγρού ή όγκος ισοδύναμος με 5 mg ιστού (βέλτιστο βάρος ιστού για κιτ εξαγωγής) προστίθενται σε ένα σωλήνα δείγματος για εξαγωγή DNA και επιτυγχάνεται όγκος 200 μl με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος G2.

4. Εξαγωγή DNA

Το ολικό DNA εξάγεται με τη χρήση κιτ εξαγωγής ιστών DNA και το EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Με κάθε παρτίδα δειγμάτων αναλύεται και ένας μάρτυρας εξαγωγής (DNA από το θύμο αδένος μύσχος) και ένας αρνητικός μάρτυρας (ρυθμιστικό διάλυμα G2). Το DNA εκλύεται σε όγκο 50 μl. Για να διασφαλιστεί η επιτυχής ολοκλήρωση της εξαγωγής, η συγκέντρωση DNA για όλα τα δείγματα και τους μάρτυρες προσδιορίζεται με τη χρήση μηχανήματος Nano Drop. Το εξαγόμενο DNA καταψύχεται στους -20°C εάν δεν απαιτείται άμεσα.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τον WSSV

Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του WSSV είναι το πρωτόκολλο για την ανίχνευση του WSSV μέσω ένδετης PCR όπως ορίζεται στις ακόλουθες παραγράφους, κατά την οποία γίνεται ενίσχυση ενός αμπλικονίου μεγέθους 1 447 bp και 848 bp του 18s rRNA γονιδίου στον πρώτο και δεύτερο γύρο της PCR αντίστοιχα.

Ο 1ος γύρος της αντίδρασης PCR πραγματοποιείται σε όγκο 50 μl που περιέχει σε τελικές συγκεντρώσεις $1 \times$ ρυθμιστικό διάλυμα GoTaq (Promega), 5 mM MgCl_2 , 1 pmol/μl εκκινητή WSSV 146 F1, 1 pmol/μl εκκινητή WSSV 146 R1 (Πίνακας 1), 0,25 mM dNTP, 1,25 U Taq πολυμεράσης και 2,5 μl του DNA. Κάθε δείγμα αναλύεται εις διπλούν μαζί με έναν αρνητικό μάρτυρα εξαγωγής, έναν αρνητικό μάρτυρα της PCR (προσθήκη 2,5 μl H_2O αντί για DNA) και έναν θετικό μάρτυρα. Ο θετικός μάρτυρας αραιώνεται σε πλασμίδιο WSSV που κατασκευάστηκε και επικυρώθηκε για χρήση εντός εργαστηρίου (διαθέσιμο από τα EURL).

Ο 2ος γύρος της αντίδρασης PCR για τον WSSV πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο όπως ο πρώτος γύρος αλλά χρησιμοποιείται το σετ εκκινητών WSSV 146 F2/R2, καθώς και ένας δεύτερος θετικός μάρτυρας προκειμένου να ελεγχθεί ότι αυτός ο γύρος της PCR ήταν επιτυχής.

Εκκινητής	Αλληλουχία
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAAGTGGCCCTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Τόσο ο 1ος όσο και ο 2ος γύρος της PCR εκτελείται με τη χρήση των παρακάτω συνθηκών κύκλων σε θερμικό κυκλοποιητή DNA Engine Tetrad 2 Peltier (ή ισοδύναμο). Αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 94°C επί 2 λεπτά και, στη συνέχεια, στους 94°C επί 30 δευτερόλεπτα, στους 62°C επί 30 δευτερόλεπτα, στους 72°C επί 30 δευτερόλεπτα και επανάληψη για 30 κύκλους, βήμα επιμήκυνσης στους 72°C επί 2 λεπτά και παραμονή στους 4°C .

6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

Τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR από τον 1ο και 2ο γύρο της PCR απεικονίζονται σε 2 % πηκτές αγαρόζης που παρασκευάζονται από ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Αναλύονται 15 μl κάθε δείγματος με ηλεκτροφόρηση σε τάση 120 V επί περίπου 20 λεπτά και παρατηρούνται υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Τα θετικά δείγματα παράγουν ζώνη μεγέθους 1 447 bp στον 1ο γύρο της PCR και 848 bp στον 2ο γύρο της PCR. Τα δείγματα αυτού του μεγέθους κόβονται και τοποθετούνται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης των 1,5ml. Το DNA που υπάρχει εντός των τομών πηκτικής καθαρίζεται με τη χρήση του Wizard® SV Gel και του PCR clean-Up System της Promega σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με τη χρήση ενός μηχανήματος Nano Drop. Το καθαρισμένο DNA καταψύχεται στους -20°C εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί άμεσα.

7. Προσδιορισμός αλληλουχίας των προϊόντων της PCR

Η αλληλουχία του DNA προσδιορίζεται με το Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι 20 μl, όπου οι τελικές συγκεντρώσεις είναι $1 \times$ τερματιστή Big Dye, $1 \times$ ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού αλληλουχίας (sequencing buffer), 10 pmol/μl πρόσθιων και αντίστροφων εκκινητών και 10 μl καθαρισμένου DNA (αραιωμένο σε περίπου 10 ng/μl) και πραγματοποιείται με τη χρήση των ακόλουθων συνθηκών κύκλων σε θερμικό κυκλοποιητή DNA Engine Tetrad 2 Peltier (ή ισοδύναμο): στους 94°C επί 30 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, στους 96°C επί 10 δευτερόλεπτα, στους 50°C επί 10 δευτερόλεπτα και στους 60°C επί τέσσερα λεπτά, όπου εκτελούνται 30 κύκλοι των τελευταίων τριών βημάτων.

Τα προϊόντα PCR κατακρήνιζονται με τη χρήση της μεθόδου οξικού νατρίου, όπου 20 μl DNA προστίθενται σε 10 μl NaAc, 70 μl H₂O και 250 μl αιθανόλης και ακολουθεί περιδίνηση και φυγοκέντρηση στις 13 000 σ.α.λ. επί 20 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το κατακρήνισμα εκπλένεται με 200 μl απόλυτης αιθανόλης και φυγοκεντρείται στις 13 000 σ.α.λ. επί 5 λεπτά. Το κατακρήνισμα ξηραίνεται επί 5 λεπτά στους 37 °C. Προστίθενται 25 μl φορμαμίδιου Hi-Di στο κατακρήνισμα, ακολουθεί θέρμανση στους 95 °C επί 2 λεπτά και πλήρης περιδίνηση. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας των δειγμάτων εκτελείται με τη χρήση του γενετικού αναλυτή ABI3130xl Avant σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Τα αποτελέσματα των αλληλουχιών αναλύονται με τη χρήση του λογισμικού Sequencher και γίνεται αντιστοίχιση των αλληλουχιών με γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων του NCBI με τη χρήση της λειτουργίας BLAST.

ISSN 1977-0669 (ηλεκτρονική έκδοση)
ISSN 1725-2547 (έντυπη έκδοση)



Υπηρεσία Εκδόσεων της Ευρωπαϊκής Ένωσης
2985 Λουξεμβούργο
ΛΟΥΞΕΜΒΟΥΡΓΟ

EL