Euroopan unionin
virallinen lehti

L 247

58. vuosikerta

Suomenkielinen laitos **Lainsäädäntö**

23. syyskuuta 2015

Sisältö

II *Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset*

PÄÄTÖKSET

★ **Komission täytäntöönpanopäätös (EU) 2015/1554, annettu 11 päivänä syyskuuta 2015, direktiivin 2006/88/EY soveltamissäännöistä seurantaa ja diagnostisia menetelmiä koskevien vaatimusten osalta** *(tiedoksiannettu numerolla C(2015) 6188)* [1] 1

[1] ETA:n kannalta merkityksellinen teksti

FI

Säädökset, joiden otsikot on painettu laihalla kirjasintyypillä, ovat maatalouspolitiikan alaan kuuluvia juoksevien asioiden hoitoon liittyviä säädöksiä, joiden voimassaoloaika on yleensä rajoitettu.

Kaikkien muiden säädösten otsikot on painettu lihavalla kirjasintyypillä ja merkitty tähdellä.

II

(Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset)

PÄÄTÖKSET

KOMISSION TÄYTÄNTÖÖNPANOPÄÄTÖS (EU) 2015/1554,

annettu 11 päivänä syyskuuta 2015,

direktiivin 2006/88/EY soveltamissäännöistä seurantaa ja diagnostisia menetelmiä koskevien vaatimusten osalta

(tiedoksiannettu numerolla C(2015) 6188)

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon vesiviljelyeläimiin ja niistä saataviin tuotteisiin sovellettavista eläinten terveyttä koskevista vaatimuksista sekä vesieläinten tiettyjen tautien ehkäisemisestä ja torjunnasta 24 päivänä lokakuuta 2006 annetun neuvoston direktiivin 2006/88/EY ([1]) ja erityisesti sen 49 artiklan 3 kohdan, 50 artiklan 4 kohdan, 57 artiklan b alakohdan ja 61 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Direktiivissä 2006/88/EY säädetään ennaltaehkäisevistä vähimmäistoimenpiteistä, joiden tarkoituksena on direktiivin liitteessä IV lueteltujen tautien, jäljempänä 'luetellut taudit', seuranta ja varhainen havaitseminen vesieläimissä, sekä torjuntatoimenpiteistä, joita on sovellettava, kun kyseessä on lueteltujen tautien taudinpurkaus tai epäily siitä. Lisäksi direktiivissä säädetään vaatimuksista, jotka koskevat taudista vapaan aseman saavuttamista jäsenvaltioiden tai niiden vyöhykkeiden tai lokeroiden osalta.

(2) Lueteltujen tautien hävittämisen ja taudista vapaan aseman saavuttamisen jäsenvaltion, vyöhykkeen tai lokeron osalta on perustuttava samoihin periaatteisiin ja noudatettava samaa tieteellistä lähestymistapaa kaikkialla unionissa. Tästä syystä on tarpeen vahvistaa unionin tasolla erityiset vaatimukset, jotka koskevat hävittämis- ja seurantajärjestelmiä sekä näytteenottoa ja diagnostisia menetelmiä, joita jäsenvaltiot käyttävät taudista vapaan aseman saavuttamiseksi koko jäsenvaltion tai sen jonkin vyöhykkeen tai lokeron osalta.

(3) Luetellun taudin epäillyn tai vahvistetun esiintymisen tapauksessa tehtävien laboratoriotutkimusten olisi oltava samat unionin tasolla, ja niissä olisi noudatettava samoja tieteellisiä standardeja ja protokollia. Direktiivin 2006/88/EY mukaisesti on tarpeen vahvistaa erityiset diagnostiset menetelmät ja menettelyt, joita jäsenvaltioiden toimivaltaisten viranomaisten tätä tarkoitusta varten nimeämien hyväksyttyjen laboratorioiden on käytettävä.

(4) Maailman eläintautijärjestön, jäljempänä 'OIE', antamassa vesieläinten terveyttä koskevassa säännöstössä, jäljempänä 'vesieläinsäännöstö', vahvistetaan standardit vesieläinten terveyden ja viljelykalojen hyvinvoinnin parantamiseksi maailmanlaajuisesti, mukaan lukien vesieläinten ja niistä saatujen tuotteiden turvallista kansainvälistä kauppaa koskevat standardit. Useissa vesieläinsäännöstön luvuissa vahvistetaan suosituksia, jotka koskevat tiettyjen diagnostisten testien käyttämistä. Tällaiset OIE:n määräämät testit esitetään OIE:n vesieläinten diagnostisia testejä käsittelevässä käsikirjassa, jäljempänä 'vesieläinkäsikirja'. Sen varmistamiseksi, että vesieläinten tautien diagnosointia koskevat unionin vaatimukset ovat kansainvälisten standardien mukaiset, tässä päätöksessä vahvistetuissa säännöissä olisi otettava huomioon vesieläinsäännöstön standardit ja suositukset.

([1]) EUVL L 328, 24.11.2006, s. 14.

(5) Tältä osin vesieläinsäännöstössä mainitaan monien lueteltujen tautien osalta useita laboratoriotutkimuksissa käytettäviä testejä ja menettelyjä. Lueteltuja tauteja koskevan diagnostisen työn tieteellisen perustan yhtenäistämiseksi unionin tasolla on suoritettava valinta OIE:n suosittelemien diagnostisten tutkimusten ja menettelyjen joukosta ja täsmennettävä, mitkä testit olisi määrättävä pakollisiksi laboratoriotutkimuksessa seurantaohjelmia toteutettaessa ja luetellun taudin epäilyn poissulkemiseksi tai sen esiintymisen vahvistamiseksi. Koska tietyissä tapauksissa saatavilla on tarpeen olla myös vaihtoehtoisia menetelmiä ja menettelyjä, olisi esitettävä kuvauksia ja tieteellisistä perusteita sille, milloin ja miten vaihtoehtoisia menetelmiä voidaan käyttää. Tämä on erityisesti tarpeen yksityiskohtaisempien diagnostisten menetelmien osalta.

(6) Jotta voidaan tuottaa tarkkoja ja toistettavissa olevia diagnostisia tuloksia, on tärkeää, että käytettävät yksityiskohtaiset menettelyt ja protokollat on validoitu direktiivin 2006/88/EY liitteessä VI olevassa I osassa tarkoitettujen asiaa koskevien laatuvaatimusten mukaisesti. Useiden tässä päätöksessä säädettyjen diagnostisten menetelmien osalta kaupallisten testikittien käyttäminen on välttämätön osa diagnostisia protokollia, ja Euroopan vertailulaboratoriot (EURL) ovat validoineet kyseiset testikitit akkreditoiduilla testeillä asianomaisten tautien torjumiseksi. Oikeusvarmuuden vuoksi tässä päätöksessä olisi viitattava kyseisten validoitujen testikittien kaupallisiin nimiin.

(7) Joidenkin jäsenvaltioiden voi olla vaikea saavuttaa yhdestä tai useammasta luetellusta taudista vapaa asema koko jäsenvaltion tai sen jonkin vyöhykkeen tai lokeron osalta. Tällaisessa tilanteessa asianomainen jäsenvaltio ei ehkä halua saada tai palauttaa taudista vapaata asemaa kyseisten luetteloitujen tautien osalta. Vähimmäistorjuntatoimenpiteiden, joita on sovellettava, kun asianomainen jäsenvaltio ei halua saada tai palauttaa taudista vapaata asemaa, olisi oltava samat unionin tasolla ja niissä olisi noudatettava samoja perusteita. Direktiivin 2006/88/EY mukaisesti on siksi tarpeen vahvistaa kyseisten lueteltujen tautien rajoittamista koskevat yksityiskohtaiset säännöt ja vähimmäisvaatimukset rajoittavien toimenpiteiden poistamiseksi.

(8) Komission päätöksessä 2001/183/EY ([1]) vahvistetaan vaatimukset, jotka koskevat näytteenottosuunnitelmia ja taudinmääritysmenetelmiä lueteltujen tautien vertamuodostavan kudoksen tarttuva kuolio (IHN) ja verenvuotoseptikemia (VHS) havaitsemiseksi ja vahvistamiseksi. Komission päätöksessä 2003/466/EY ([2]) vahvistetaan vaatimukset, jotka koskevat näytteenottosuunnitelmia ja taudinmääritysmenetelmiä lohen tarttuvan anemian havaitsemiseksi sekä vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteita epäiltäessä kyseistä tautia tai sen esiintymisen varmistuttua. Komission päätöksessä 2002/878/EY ([3]) vahvistetaan vaatimukset, jotka koskevat näytteenottosuunnitelmia ja taudinmääritysmenetelmiä nilviäistautien bonamioosi ja marteilioosi havaitsemiseksi ja niiden esiintymisen varmistamiseksi. Vaatimusten saattamiseksi ajan tasalle kyseiset kolme päätöstä olisi korvattava tällä päätöksellä. Päätökset 2001/183/EY, 2002/878/EY ja 2003/466/EY olisi näin ollen kumottava.

(9) Koska tietyt jäsenvaltiot tarvitsevat aikaa saattaakseen kansalliset vertailulaboratorionsa ajan tasalle, jotta ne olisivat tässä päätöksessä vahvistettujen vaatimusten mukaiset, päätöstä olisi sovellettava 1 päivästä huhtikuuta 2016.

(10) Tässä päätöksessä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän kasvi-, eläin-, elintarvike- ja rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

Kohde

Tässä päätöksessä vahvistetaan säännöt, jotka koskevat seuraavia:

a) seuranta, puskurivyöhykkeet, näytteenotto ja diagnostiset menetelmät, joita jäsenvaltioiden on käytettävä sen mukaan, mikä on tautitilanne jäsenvaltioissa tai niiden vyöhykkeillä tai lokeroissa direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltujen muiden kuin eksoottisten vesieläinten tautien osalta, jäljempänä 'luetellut taudit';

([1]) Komission päätös 2001/183/EY, tehty 22 päivänä helmikuuta 2001, näytteenottosuunnitelmista ja taudinmääritysmenetelmistä tiettyjen kalatautien esiintymisen havaitsemiseksi ja varmistamiseksi ja päätöksen 92/532/ETY kumoamisesta (EYVL L 67, 9.3.2001, s. 65).

([2]) Komission päätös 2003/466/EY, tehty 13 päivänä kesäkuuta 2003, vyöhykejaon ja virallisen valvonnan perusteista epäiltäessä lohen tarttuvan anemiaa (ISA-tautia) tai sen esiintymisen varmistuttua (EUVL L 156, 25.6.2003, s. 61).

([3]) Komission päätös 2002/878/EY, tehty 6 päivänä marraskuuta 2002, näytteenottosuunnitelmista ja taudinmääritysmenetelmistä nilviäistautien bonamioosi (*Bonamia ostreae*) ja marteilioosi (*Marteilia refringens*) havaitsemiseksi ja niiden esiintymisen varmistamiseksi (EYVL L 305, 7.11.2002, s. 57).

b) laboratoriotutkimuksissa käytettävät diagnostiset menetelmät epäiltäessä lueteltujen tautien esiintymistä tai niiden esiintymisen varmistuttua; ja

c) vähimmäistorjuntatoimenpiteet, joita on sovellettava epäiltäessä luetellun taudin esiintymistä tai sen esiintymisen varmistuttua jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, jota ei ole julistettu kyseisestä luetellusta taudista vapaaksi.

2 artikla

Määritelmät

Tässä päätöksessä tarkoitetaan

a) 'virusperäisellä verenvuotoseptikemialla (VHS-tauti)' tautia, jonka aiheuttaa *Rhabdoviridae*-heimoon kuuluvaan *Novirhabdovirus*-sukuun kuuluva virusperäistä verenvuotoseptikemiaa aiheuttava virus (VHSV), joka tunnetaan myös nimellä Egtved-virus;

b) 'tarttuvalla verta muodostavan kudoksen kuoliolla (IHN)' tautia, jonka aiheuttaa *Rhabdoviridae*-heimoon kuuluvaan *Novirhabdovirus*-sukuun kuuluva infektioosi hematopoieettinen nekroosivirus (IHNV);

c) 'koikarpin herpesvirus -taudilla (KHV-tauti)' tautia, jonka aiheuttaa *Alloherpesviridae*-heimoon kuuluva koikarpin herpesvirus. Sen tieteellinen nimi on koikarpin herpesvirus 3 (CyHV-3);

d) 'tarttuvalla lohen anemialla (ISA-tauti)' tautia, jonka aiheuttaa *Orthomyxoviridae*-heimoon kuuluvaan *Isavirus*-sukuun kuuluva ISA-viruksen HPRΔ-kanta (HPR-geenin kohdalla deleetio) (ISAV);

e) 'nilviäisten marteilioosilla' alkueläimen *Marteilia refringens* aiheuttamaa tartuntaa;

f) 'nilviäisten bonamioosilla' alkueläimen *Bonamia ostreae* aiheuttamaa tartuntaa;

g) 'äyriäisten valkopilkkutaudilla' tautia, jonka aiheuttaa äyriäisten valkopilkkutautivirus (WSSV), joka on *Nimaviridae*-heimoon kuuluvaan *Whispovirus*-sukuun kuuluva kaksijuosteinen DNA-virus.

3 artikla

Hävittämis- ja seurantaohjelmia koskevat vähimmäisvaatimukset

Jäsenvaltioiden on varmistettava, että liitteessä I vahvistettuja seuranta- ja hävittämisohjelmia, puskurivyöhykkeitä, näytteenottoa ja diagnostisia menetelmiä koskevia sääntöjä ja liitteessä II vahvistettuja erityisiä menetelmiä ja yksityiskohtaisia menettelyjä noudatetaan, kun taudista vapaa asema myönnetään, peruutetaan tai palautetaan jäsenvaltiolle tai sen vyöhykkeelle tai lokerolle yhden tai useamman luetellun taudin osalta.

4 artikla

Diagnostisia menetelmiä ja erityisiä menettelyjä koskevat vähimmäisvaatimukset

Jäsenvaltioiden on varmistettava, että liitteessä I vahvistettuja torjuntamenetelmiä ja liitteessä II vahvistettuja erityisiä diagnostisia menetelmiä ja yksityiskohtaisia menettelyjä noudatetaan, kun suoritetaan laboratoriotutkimuksia luetellun taudin esiintymisen varmistamiseksi tai poissulkemiseksi.

5 artikla

Vähimmäistorjuntatoimenpiteet lueteltujen tautien rajoittamiseksi ja vähimmäisvaatimukset rajoittavien toimenpiteiden poistamiseksi jäsenvaltioissa, vyöhykkeillä tai lokeroissa, joita ei ole julistettu vapaiksi luetelluista taudeista

Jäsenvaltioiden on varmistettava, että liitteessä I vahvistettuja vähimmäistorjuntatoimenpiteitä ja rajoittavien toimenpiteiden poistamista koskevia vähimmäisvaatimuksia noudatetaan, kun suoritetaan torjuntatoimenpiteitä ja poistetaan rajoittavia toimenpiteitä yhden tai useamman luetellun taudin osalta jäsenvaltiossa tai sen vyöhykkeellä tai lokerossa, jota ei ole julistettu kyseisistä luetelluista taudeista vapaaksi.

6 artikla

Kumoaminen

Kumotaan päätökset 2001/183/EY, 2002/878/EY ja 2003/466/EY.

7 artikla

Soveltamispäivä

Tätä päätöstä sovelletaan 1 päivästä huhtikuuta 2016.

8 artikla

Osoitus

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 11 päivänä syyskuuta 2015.

Komission puolesta
Vytenis ANDRIUKAITIS
Komission jäsen

LIITE I

SEURANTA- JA TORJUNTAMENETELMÄT

I **Johdanto**

Tässä liitteessä vahvistetaan

a) direktiivin 2006/88/EY 44 artiklassa säädettyjä hävittämis- ja seurantaohjelmia koskevat vaatimukset ja näytteenotto- ja diagnostiset menetelmät, joita käytetään jäsenvaltioiden tai niiden vyöhykkeiden tai lokerojen taudista vapaan aseman vahvistamiseksi kyseisen direktiivin VII luvun mukaisesti;

b) näytteenotto- ja diagnostiset menetelmät, joita käytetään laboratoriotutkimuksissa epäiltäessä direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevan II osan luetteloon sisältyvien muiden kuin eksoottisten tautien, jäljempänä 'luetellut taudit', esiintymistä tai niiden esiintymisen vahvistamiseksi, kyseisen direktiivin 28 artiklan a alakohdan ja 57 artiklan b alakohdan mukaisesti;

c) direktiivin 2006/88/EY 39 artiklassa säädetyt rajoittavat toimenpiteet, jotka on toteutettava, kun luetellun taudin esiintyminen on vahvistettu, ja toimenpiteet, jotka on toteutettava, kun jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne, haluaa saavuttaa luokan III terveystilanteen.

Tässä liitteessä vahvistetut vaatimukset kattavat seuraavat luetellut taudit:

1.	Virusperäinen verenvuotoseptikemia (VHS-tauti)	1 osa
2.	Tarttuva vertamuodostavan kudoksen kuolio (IHN)	1 osa
3.	Koikarpin herpesvirus (KHV-tauti)	2 osa
4.	Tarttuva lohen anemia (ISA-tauti)	3 osa
5.	Nilviäisten marteilioosi (*Marteilia refringens* -loisen aiheuttama tartunta)	4 osa
6.	Nilviäisten bonamioosi (*Bonamia ostreae* -loisen aiheuttama tartunta)	5 osa
7.	Äyriäisten valkopilkkutauti	6 osa

II **Määritelmät**

Liitteessä I ja II sovelletaan seuraavia määritelmiä:

a) 'mantereella sijaitsevalla lokerolla' tarkoitetaan yhden tai useamman jäsenvaltion mannerosassa sijaitsevaa yhtä tai useampaa yhteiseen bioturvallisuusjärjestelmään kuuluvaa viljelylaitosta, jossa pidettävällä vesieläinpopulaatiolla on tietyn taudin osalta muista erottuva terveystilanne;

b) 'mantereella sijaitsevalla viljelylaitoksella' tarkoitetaan viljelylaitosta, jossa pidetään vesiviljelyeläimiä ja joka sijaitsee yhden jäsenvaltion alueen mannerosassa;

c) 'mantereella sijaitsevalla vyöhykkeellä' tarkoitetaan yhden tai useamman jäsenvaltion mannerosassa sijaitsevaa maantieteellisesti täsmällisesti rajattua aluetta, joka muodostuu homogeenisesta hydrologisesta järjestelmästä ja joka sisältää osia vesistöalueesta yhdeltä tai useammalta alkulähteeltä sellaiselle luonnolliselle tai keinotekoiselle esteelle, joka estää vesieläinten vaeltamisen ylävirtaan vesistöalueen alajuoksulta, kokonaisen vesistöalueen yhdeltä tai useammalta alkulähteeltä suistoon asti tai useamman kuin yhden vesistöalueen suistoineen, jonka välityksellä näillä vesistöalueilla on epidemiologinen yhteys toisiinsa;

d) 'tartunnan saastuttamaksi virallisesti julistetulla viljelylaitoksella' tarkoitetaan vesieläimiä pitävää viljelylaitosta, jossa toimivaltainen viranomainen on vahvistanut yhden tai useamman luetellun taudin esiintymisen direktiivin 2006/88/EY 28 artiklan a alakohdan, 29 artiklan ja 57 artiklan b alakohdan mukaisesti.

e) 'kontaktilaitoksella' tarkoitetaan vesiviljelyeläimiä pitävää viljelylaitosta, jonka on jollain tavalla osoitettu tai jonka vahvasti epäillään joutuneen tartunnan saastuttamaksi virallisesti julistetusta viljelylaitoksesta peräisin olevan tarttuvan aineksen saastuttamaksi.

1 OSA

VIRUSPERÄISTÄ VERENVUOTOSEPTIKEMIAA (VHS) JA TARTTUVAA VERTA MUODOSTAVAN KUDOKSEN KUOLIOTA (IHN) KOSKEVAT SEURANTA- JA TORJUNTAMENETELMÄT

I **Vaatimukset, jotka koskevat seuranta- ja hävittämisohjelmia taudista vapaa -terveystilanteen saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi VHS- ja IHN-taudin osalta ja kyseisten lueteltujen tautien rajoittamistoimenpiteitä**

I.1 Yleiset vaatimukset IHN- ja VHS-tauteja koskeville terveystarkastuksille ja näytteenotolle:

a) terveystarkastukset ja tarvittaessa näytteenotto on suoritettava sellaiseen aikaan vuodesta, jolloin veden lämpötila on alle 14 °C tai todennäköisesti alhaisimmillaan;

b) kun luonnonvaraisten populaatioiden kohdennettua seurantaa edellytetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan I osan 2 kohdan toisen kohdan mukaisesti, näytteenottokohtien lukumäärä ja maantieteellinen jakauma on määritettävä siten, että kattavuus on kohtuullinen kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa. Näytteenottopaikkojen on edustettava erilaisia ekosysteemejä, joissa taudille alttiit luonnonvaraiset populaatiot sijaitsevat;

c) silloin kun viljelylaitokselle ja luonnonvaraisille populaatioille tehdään terveystarkastus tai näytteenotto useammin kuin kerran vuodessa, terveystarkastusten välisen ajan ja näytteenottojen välisen ajan on oltava vähintään neljä kuukautta ja mahdollisimman pitkä, ottaen huomioon a alakohdassa vahvistetut lämpötilavaatimukset;

d) kaikille tuotantoyksiköille, kuten lammikoille, altaille ja verkkoaltaille, on tehtävä terveystarkastus kuolleiden, heikkojen tai poikkeavasti käyttäytyvien kalojen havaitsemiseksi. Erityistä huomiota on kiinnitettävä poistovesipisteeseen, jonne heikoilla kaloilla on taipumus kerääntyä veden virtauksen vuoksi;

e) taudille alttiit näytteenottoon kerättävät kalat on valittava seuraavasti:

i) jos laitoksessa on kirjolohia, vain tämän lajin kaloja kerätään näytteenottoon, paitsi jos laitoksessa on muita taudille alttiita lajeja, joissa näkyy tyypillisiä VHS- tai IHN-taudin oireita; jos laitoksessa ei ole kirjolohia, näytteen on edustettava kaikkia muita taudille alttiita lajeja, joita laitoksessa on;

ii) jos joukossa on heikkokuntoisia, poikkeavasti käyttäytyviä tai äskettäin kuolleita mutta ei vielä hajoamistilassa olevia kaloja, on ensisijaisesti valittava tällaisia kaloja; jos kalantuotannossa käytetään useampaa kuin yhtä vedensaantilähdettä, näytteessä on oltava kaikkia vedensaantilähteitä edustavia kaloja;

iii) valittuihin kaloihin on sisällyttävä kaloja, jotka kerätään siten, että kaikki viljelylaitoksen osat ja kaikki vuosiluokat ovat suhteellisesti edustettuina näytteessä.

I.2 Taudista vapaa -terveystilanteen (luokka I) saavuttamista VHS- ja IHN-tautien osalta koskevat erityisvaatimukset

I.2.1 Seurantaohjelmat:

a) jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on direktiivin 2006/88/EY liitteessä III olevassa B osassa tarkoitettu luokan III terveystilanne VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisten lueteltujen tautien osalta edellyttäen, että kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudeille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, noudattavat kyseisen direktiivin liitteessä V vahvistettuja vaatimuksia ja kaikissa kyseisissä viljelylaitoksissa ja, kun sen liitteessä V olevassa I osassa olevan 2 kohdan toisessa kohdassa niin vaaditaan, kyseisen osan mukaisesti valituissa luonnonvaraisten populaatioiden näytteenottopaikoissa on toteutettu jokin seuraavista seurantaohjelmista:

i) malli A – kaksivuotinen seurantaohjelma:

Viljelylaitoksissa tai näytteenottopaikoilla on oltava tehty terveystarkastuksia ja näytteenottoja vähintään kahden peräkkäisen vuoden ajan II jaksossa olevan taulukon 1.A mukaisesti.

Kyseisen kahden vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulosten on oltava ollut negatiivisia joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien suhteen ja kaikki VHS- tai IHN-taudin tai molempien epäilyt on oltava suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

ii) malli B – nelivuotinen seurantaohjelma pienemmällä näytekoolla:

Viljelylaitoksissa tai näytteenottopaikoilla on oltava tehty terveystarkastuksia ja näytteenottoja vähintään neljän peräkkäisen vuoden ajan II jaksossa olevan taulukon 1.B mukaisesti.

Kyseisen neljän vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulosten on oltava ollut negatiivisia joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien suhteen ja kaikki VHS- tai IHN-taudin tai molempien epäilyt on oltava suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

b) jos a alakohdassa tarkoitetun seurantaohjelman täytäntöönpanon aikana kyseiseen seurantaohjelmaan kuuluvassa viljelylaitoksessa vahvistetaan joko VHS- tai IHN-tartunta tai molemmat ja sen vuoksi viljelylaitoksen luokan II terveystilanne on peruutettu, kyseinen viljelylaitos voi saada välittömästi takaisin luokan II terveystilanteen ja jatkaa seurantaohjelman täytäntöönpanoa taudista vapaan aseman saavuttamiseksi panematta täytäntöön I.2.2 kohdassa vahvistettua hävittämisohjelmaa, edellyttäen, että viljelylaitos täyttää seuraavat edellytykset:

i) se on mantereella sijaitseva viljelylaitos, jonka terveystilanne joko VHS-taudin tai IHN-taudin tai molempien osalta ei riipu ympäröivien luonnonvesien vesieläinpopulaatioiden kyseisiä lueteltuja tauteja koskevasta terveystilanteesta direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 3 kohdan mukaisesti;

ii) se on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään; tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa;

iii) sinne on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta.

I.2.2 Hävittämisohjelmat

I.2.2.1 Yleiset vaatimukset

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisten lueteltujen tautien osalta edellyttäen, että kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu a–e alakohdan mukainen hävittämisohjelma:

a) direktiivin 2006/88/EY V luvun 4 jaksossa säädettyjä vähimmäistorjuntatoimenpiteitä on oltava sovellettu käytännössä ja joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien kyseisten lueteltujen tautien saastuttamiksi virallisesti julistettujen viljelylaitosten läheisyyteen on oltava perustettu kyseisen direktiivin 32 artiklan b alakohdassa tarkoitettu rajoitusalue, johon kuuluu suoja-alue ja seuranta-alue.

Rajoitusalue on oltava määritelty tapauskohtaisesti ottaen huomioon kyseisen luetellun taudin leviämiseen viljeltyihin ja luonnonvaraisiin kaloihin vaikuttavat tekijät, kuten: kalakuolemien määrä, osuus ja jakauma joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien saastuttamassa viljelylaitoksessa; etäisyys lähimpiin viljelylaitoksiin ja niiden sijaintitiheys; teurastamojen läheisyys; kontaktilaitokset; laitoksissa viljeltävät lajit; saastuneissa viljelylaitoksissa ja niiden lähellä sijaitsevissa laitoksissa sovelletut viljelykäytännöt, hydrodynaamiset olosuhteet ja muut identifioidut epidemiologisesti merkittävät tekijät.

Suoja- ja seuranta-alueiden perustamisessa on noudatettava seuraavia näiden alueiden maantieteellisiä rajoja koskevia vähimmäisvaatimuksia:

i) joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien kyseisten lueteltujen tautien saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen välittömään läheisyyteen on perustettava suoja-alue, jonka on vastattava:

1) rannikkoalueilla: säteeltään yhden vuorovesikantaman tai vähintään viiden kilometrin mittaisen ympyrän sisään jäävää aluetta, jonka keskipisteenä on joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien saastuttamaksi virallisesti julistettu viljelylaitos, taikka tätä vastaavaa aluetta, joka on määritetty asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta;

2) sisävesialueilla: VHS- tai IHN-taudin tai molempien saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen koko vesistöaluetta; toimivaltainen viranomainen voi rajoittaa alueen koskemaan vain osia vesistöalueesta tai viljelylaitoksen aluetta edellyttäen, että joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien leviämisen ehkäisy ei vaarannu;

ii) toimivaltaisen viranomaisen on perustettava suoja-alueen ulkopuolelle seuranta-alue, jonka on vastattava:

1) rannikkoalueilla: suoja-aluetta ympäröivää aluetta, jonka vuorovesikantamat ovat päällekkäisiä; tai suoja-aluetta ympäröivää, sellaiseen ympyrään sisältyvää aluetta, jonka keskus on suoja-alueen keskus ja säde 10 km; taikka vastaavanlaista, asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta;

2) sisävesialueilla: perustetun suoja-alueen ulkopuolista laajennettua aluetta;

b) kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja suoja-alueella ja joita ei ole virallisesti julistettu joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien saastuttamaksi, on tehtävä virallinen tutkimus, joka käsittää vähintään seuraavat seikat:

i) näytteiden kerääminen testausta varten 10 kalasta, kun havaitaan joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien taudinkuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, tai vähintään 30 kalasta, kun kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä ei havaita;

ii) yksi terveystarkastus: viljelylaitoksissa, joissa on saatu negatiiviset tulokset i alakohdassa tarkoitetuissa testeissä, terveystarkastusten tekemistä on jatkettava kerran kuukaudessa sinä aikana, jolloin veden lämpötila on alle 14 °C, paitsi silloin, kun kalalammikot tai verkkoaltaat ovat jään peitossa, kunnes suoja-alue peruutetaan I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti;

c) kaikki joko VHS- tai IHN-tartunnan tai molempien saastuttamaksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennettävä, puhdistettava, desinfioitava ja pidettävä tyhjillään. Tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa. Kun kaikki samalla suoja-alueella sijaitsevat tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, niitä on pidettävä samanaikaisesti tyhjillään vähintään kolme viikkoa. Tätä kohtaa sovelletaan myös uusiin viljelylaitoksiin, jotka julistetaan virallisesti tartunnan saastuttamiksi hävittämisohjelman täytäntöönpanon aikana.

Kun tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuja viljelylaitoksia pidetään tyhjillään, suoja-alueet on muutettava seuranta-alueiksi.

Toimivaltainen viranomainen voi päättää vaatia, että perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitsevat muut viljelylaitokset tyhjennetään, puhdistetaan, desinfioidaan ja pidetään tyhjillään. Toimivaltainen viranomainen määrittää kyseisten viljelylaitosten tyhjillään pitämisen keston suorittamansa riskinarvioinnin perusteella;

d) kaikkiin joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien kyseisten lueteltujen tautien virallisesti saastuttamiksi julistettuihin viljelylaitoksiin ja c alakohdassa tarkoitettuihin kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla tyhjinä pidettyihin viljelylaitoksiin on istutettava kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joiden terveystilanne on taudista vapaa (luokka I) joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta.

Istuttaminen on tehtävä vasta, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu ja desinfioitu ja pidetty tyhjillään I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti;

e) kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja hävittämisohjelman kattamassa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa ja, kun luonnonvaraisten populaatioiden seurantaa edellytetään, I.1 kohdan mukaisesti valituissa näytteenottopaikoissa on sen jälkeen toteutettava I.2.1 kohdassa vahvistettu seurantaohjelma.

I.2.2.2 Vaatimukset taudista vapaan aseman palauttamiseksi mantereella sijaitseville lokeroille, jotka käsittävät yhden ainoan joko IHN- tai VHS-taudista tai molemmista aiemmin vapaaksi julistetun viljelylaitoksen

Mantereella sijaitseva lokero, joka käsittää yhden ainoan joko VHS- tai IHN-taudista tai molemmista kyseisistä luetelluista taudeista aiemmin vapaaksi julistetun viljelylaitoksen, jonka terveystilanne kyseisten lueteltujen tautien osalta ei riipu ympäröivistä luonnonvesistä direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 3 kohdan mukaisesti ja jonka luokan I terveystilanne on peruutettu kyseisen direktiivin 53 artiklan 3 kohdan mukaisesti, voi saada luokan I terveystilanteen takaisin välittömästi sen jälkeen, kun toimivaltainen viranomainen on vahvistanut, että seuraavat edellytykset täyttyvät:

a) joko VHS- tai IHN-tartunnan tai molempien saastuttamaksi virallisesti vahvistettu viljelylaitos on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään; tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa;

b) joko VHS- tai IHN-tartunnan tai molempien saastuttamaksi virallisesti vahvistettuun viljelylaitokseen on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta.

I.3 Erityisvaatimukset taudista vapaa -terveystilanteen (luokka I) säilyttämiseksi joko VHS- tai IHN-taudin osalta

Kun luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi edellytetään kohdennettua seurantaa direktiivin 2006/88/EY 52 artiklan mukaisesti, kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja asianomaisessa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on tehtävä terveystarkastus ja kaloista on otettava näytteet tämän osan II jaksossa olevan taulukon 1.C mukaisesti ottaen huomioon joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien kyseisten lueteltujen tautien tartuntariskin taso viljelylaitoksessa.

Kun määritetään terveystarkastusten tiheys lokeroille, joissa on luokan I terveystilanne joko VHS- tai IHN-taudin osalta ja jotka sijaitsevat mantereella sijaitsevilla alueilla ja joiden terveystilanne VHS- tai IHN-taudin osalta on riippuvainen ympäröivien luonnonvesien vesieläinpopulaatioiden terveystilanteesta, direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 2 kohdan mukaisesti, joko VHS- tai IHN-tartunnan tai molempien riskiä on pidettävä korkeana.

Taudista vapaa asema säilyy ainoastaan niin kauan kuin kaikkien II.2 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä käyttämällä testattujen näytteiden tulokset ovat negatiivisia joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien kyseisten lueteltujen tautien suhteen ja kaikki joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti.

I.4 Vaatimukset direktiivin 2006/88/EY 39 artiklassa säädettyjen rajoittavien toimenpiteiden poistamiseksi ja terveystilanteen muuttamiseksi luokasta V luokkaan III

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne joko VHS- ja IHN-taudin tai molempien osalta, voi saavuttaa luokan III terveystilanteen kyseisten lueteltujen tautien osalta edellyttäen, että

a) I.2.2.1 kohdan a, b ja c alakohdassa vahvistetut vaatimukset täyttyvät. Jos tyhjillään pitäminen ei ole teknisesti mahdollista, asianomaisiin viljelylaitoksiin on sovellettava vaihtoehtoista toimenpidettä, joka antaa lähes vastaavan takeen joko VHS- tai IHN-viruksen tai molempien hävittämisestä viljelylaitoksen alueelta;

b) kaikkiin tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja kaikkiin muihin tyhjinä pidettyihin tai perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla a alakohdan mukaisesti vaihtoehtoisten toimenpiteiden kohteina olleisiin viljelylaitoksiin on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I, II tai III terveystilanne joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta;

c) istuttaminen on tehty vasta sen jälkeen, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään tai niihin on sovellettu vaihtoehtoisia toimenpiteitä a alakohdan mukaisesti.

II **Diagnostiset menetelmät ja näytteenottomenetelmät**

II.1 Elimet, joista on otettava näytteet:

Tutkittavat kudokset ovat perna, etummainen munuainen ja joko sydän tai aivot. Otettaessa näytteitä emokannasta voidaan tutkia myös ovariaali- tai siemenneste.

Jos näyte koostuu pikkukaloista, kokonaiset kalat, joiden pituus on alle 4 cm, voidaan leikata steriileillä saksilla tai skalpellilla pieniksi palasiksi sen jälkeen, kun suolen aukon takana oleva osa ruumiista on poistettu. Jos näyte koostuu kokonaisista 4–6 cm:n pituisista kaloista, on otettava talteen sisälmykset, munuaiset mukaan lukien.

Enintään 10 kalan elinten kappaleet voidaan yhdistää.

II.2 Diagnostiset menetelmät taudista vapaan aseman saamiseksi ja säilyttämiseksi joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta

Liitteessä II olevan 1 osan I kohdassa vahvistettujen hyväksyttyjen diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti diagnostisen menetelmän taudista vapaan aseman saavuttamiseksi tai säilyttämiseksi VHS- tai IHN-taudin tai molempien osalta on oltava joko:

a) viruksen eristäminen soluviljelmissä, jota seuraa tunnistaminen käyttämällä entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä (ELISA), epäsuoraa fluoresenssivasta-ainetestiä (IFAT), virusten neutralisaatiotestiä tai reaaliaikaista käänteistranskriptaasi-polymeraasiketjureaktiota (RT-qPCR); tai

b) RT-qPCR.

II.3 Näytteenotto ja diagnostiset menetelmät VHS- tai IHN-taudin esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi

Kun joko VHS- tai IHN-tautiepäily tai molemmat on vahvistettava tai suljettava pois direktiivin 2006/88/EY 28 artiklan mukaisesti, on noudatettava seuraavia tarkastus-, näytteenotto- ja testausmenettelyjä:

a) epäilyksenalaisessa viljelylaitoksessa on tehtävä vähintään yksi terveystarkastus ja yksi 10 kalan näytteenotto, kun havaitaan joko VHS- tai IHN-taudin tai molempien taudinkuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, tai vähintään 30 kalan, kun ei havaita kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä. Näytteet on testattava käyttämällä yhtä tai useampaa i ja ii alakohdassa vahvistettua diagnostista menetelmää liitteessä II olevan 1 osan II jaksossa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti:

   i) tavanomainen viruseristys soluviljelmissä, ja sitä seuraava immunohistokemiallinen tai molekulaarinen viruksen tunnistaminen;

   ii) viruksen osoittaminen RT-qPCR-menetelmällä;

   iii) muut yhtä tehokkaiksi osoitetut vastaavat diagnostiset tekniikat, kuten epäsuora fluoresenssivasta-ainetesti (IFAT), entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA), RT-PCR ja immunohistokemia (IHC).

b) VHS-taudin esiintyminen katsotaan vahvistetuksi, jos yksi tai useampi kyseisistä diagnostisista menetelmistä antaa positiivisen tuloksen VHS-viruksen suhteen. IHN-taudin esiintyminen katsotaan vahvistetuksi, jos yksi tai useampi kyseisistä diagnostisista menetelmistä antaa positiivisen tuloksen IHN-viruksen suhteen. Ensimmäisen VHS- tai IHN-tapauksen vahvistamisen jäsenvaltioissa, vyöhykkeillä tai lokeroissa, jotka eivät aiemmin ole olleet tartunnan saastuttamia, on perustuttava viruksen tavanomaiseen eristämiseen soluviljelmissä tai RT-qPCR-menetelmällä;

c) Joko VHS- tai IHN-viruksen tai molempien epäily voidaan sulkea pois, jos soluviljely tai RT-qPCR-testit eivät tuo esiin lisänäyttöä joko VHS- tai IHN-viruksen tai molempien esiintymisestä.

Taulukko 1.A

Vyöhykkeitä ja lokeroja koskeva seurantaohjelma I.2.1 kohdan a alakohdan i alakohdassa tarkoitetuksi kahden vuoden pituiseksi valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää taudista vapaan aseman saavuttamista VHS- ja IHN-taudin osalta

Viljelylaitoksen tyyppi	Terveystarkastusten lukumäärä vuodessa (kahdessa vuodessa)	Näytteenottojen lukumäärä vuodessa (kahdessa vuodessa)	Kalojen lukumäärä näytteessä (1)	
			Kasvuvaiheessa olevien kalojen lukumäärä	Emokantaan kuuluvien kalojen lukumäärä (2)
a) Viljelylaitokset, joissa on emokantaa	2	2	50 (ensimmäinen tarkastus) 75 (toinen tarkastus)	30 (ensimmäinen tai toinen tarkastus) 0 (ensimmäinen tai toinen tarkastus)
b) Viljelylaitokset, joissa on ainoastaan emokantaa	2	1	0	75 (ensimmäinen tai toinen tarkastus)
c) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokantaa	2	2	75 (3) (ensimmäinen ja toinen tarkastus)	0
Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytteessä: 10				

(1) Näytteet on kerättävä aikaisintaan kolme viikkoa sen jälkeen, kun kalat on siirretty makeasta vedestä suolaiseen.
(2) Emokannan ovariaali- tai siemenneste on kerättävä sen kypsyttyä lypsämisen yhteydessä.
(3) Näytteitä on otettava sellaisesta määrästä kaloja, jolla varmistetaan, että VHS- tai IHN-virus osoitetaan 95 %:n varmuudella, jos oletettu esiintyvyys on 5 %.

Taulukko 1.B

Seurantaohjelma pienemmällä näytekoolla I.2.1 kohdan a alakohdan ii alakohdassa tarkoitetuksi neljän vuoden pituiseksi valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää taudista vapaan aseman saavuttamista VHS- tai IHN-taudin osalta

Viljelylaitoksen tyyppi	Terveystarkastusten lukumäärä vuodessa	Näytteenottojen määrä vuodessa	Kalojen lukumäärä näytteessä (1)	
			Kasvuvaiheessa olevien kalojen lukumäärä	Emokantaan kuuluvien kalojen lukumäärä (2)
Seurantajakson kaksi ensimmäistä vuotta				
a) Viljelylaitokset, joissa on emokantaa	2	1	0 (ensimmäinen tarkastus) 30 (toinen tarkastus)	0 (ensimmäinen tarkastus) 0 (toinen tarkastus)
b) Viljelylaitokset, joissa on ainoastaan emokantaa	2	1	0	30 (ensimmäinen tai toinen tarkastus)
c) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokantaa	2	1	30 (3) (ensimmäinen tai toinen tarkastus)	0
Seurantajakson kaksi viimeistä vuotta				
a) Viljelylaitokset, joissa on emokantaa	2	2	30 (ensimmäinen tarkastus) 0 (toinen tarkastus)	0 (ensimmäinen tarkastus) 30 (toinen tarkastus)

Viljelylaitoksen tyyppi	Terveystarkastusten lukumäärä vuodessa	Näytteenottojen määrä vuodessa	Kalojen lukumäärä näytteessä (1)	
			Kasvuvaiheessa olevien kalojen lukumäärä	Emokantaan kuuluvien kalojen lukumäärä (2)
b) Viljelylaitokset, joissa on ainoastaan emokantaa	2	2		30 (ensimmäinen ja toinen tarkastus)
c) Viljelylaitokset, joissa ei ole emokantaa	2	2	30 (3) (ensimmäinen ja toinen tarkastus)	

Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytteessä: 10

(1) Näytteet on kerättävä aikaisintaan kolme viikkoa sen jälkeen, kun kalat on siirretty makeasta vedestä suolaiseen.
(2) Emokannan ovariaali- tai siemenneste on kerättävä sen kypsyttyä lypsämisen yhteydessä.
(3) Näytteitä on otettava sellaisesta määrästä kaloja, jolla varmistetaan, että VHS- tai IHN-virus osoitetaan 95 %:n varmuudella, jos oletettu esiintyvyys on 10 %.

Taulukko 1.C

Vyöhykkeitä tai lokeroja koskevat seurantaohjelmat I.3 kohdassa tarkoitetun taudista vapaan aseman säilyttämiseksi VHS- tai IHN-taudin osalta

Riskin taso	Terveystarkastusten lukumäärä	Kalojen lukumäärä näytteessä (3)
Korkea	2 joka vuosi	30 (1) (2)
Keskitasoinen	1 joka vuosi	30 (1)
Alhainen	1 joka toinen vuosi	30 (1)

Kalojen enimmäismäärä yhdistelmänäytteessä: 10

(1) Näytteet on kerättävä aikaisintaan kolme viikkoa sen jälkeen, kun kalat on siirretty makeasta vedestä suolaiseen.
(2) Näytteitä on otettava sellaisesta määrästä kaloja, jolla varmistetaan, että VHS- tai IHN-virus osoitetaan 95 %:n varmuudella, jos oletettu esiintyvyys on 10 %.
(3) Jokaista terveystarkastus kohti on oltava vähintään yksi näyte.

2 OSA

KOIKARPIN HERPESVIRUSTA (KHV) KOSKEVAT SEURANTA- JA VALVONTAMENETELMÄT

I **Seuranta- ja hävittämisohjelmia koskevat vaatimukset taudista vapaa -terveysaseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi KHV-taudin osalta ja koikarpin herpesvirustartuntojen (KHV) rajoittamiseksi**

I.1 Yleiset vaatimukset

Kun luonnonvaraisten populaatioiden kohdennettua seurantaa edellytetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan I osan 2 kohdan toisen kohdan mukaisesti, näytteenottokohtien lukumäärä ja maantieteellinen jakauma on määritettävä siten, että kattavuus on kohtuullinen jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa. Näytteenottopaikkojen on myös edustettava erilaisia ekosysteemejä, kuten jokia ja järviä, joissa on taudille alttiita luonnonvaraisia populaatioita.

Kohdennetun seurannan on perustuttava taudille alttiita lajeja käsittävien kohteiden säännölliseen seurantaan. Kohteita on seurattava, kun veden lämpötila saavuttaa tason, joka on otollinen taudin kehittymiselle (> 15 °C), ja aikaisintaan kaksi viikkoa siitä, kun kyseinen lämpötila on saavutettu. Kaikista kohteesta löydetyistä sairaista tai poikkeavasti käyttäytyvistä kaloista on otettava näytteet ja ne on testattava.

Aina kun mahdollista on otettava näytteet kaloista, joita on pidetty pitkään virukselle otollisessa lämpötilassa, eli kaksi–kolme viikkoa 15–26 °C:n lämpötilassa. Seuraava menettelytapa voidaan kuitenkin hyväksyä:

a) kun kaloja siirretään talvilammikosta kesälammikkoon, kerätään alapopulaatio ja pidetään kalat samassa vesimuodostumassa kuin kesälammikossa, kunnes vähimmäislämpötilavaatimukset on saavutettu, tai

b) otetaan näytteet keräysvaiheessa tai muun kalojen käsittelyvaiheen aikana osana tavanomaisia hoitokäytäntöjä. Jos mahdollista, näytteet on kerättävä 24–72 tuntia tällaisten hoitokäytäntöjen jälkeen KHV-taudin detektiomahdollisuuksien lisäämiseksi.

Kun viljelylaitoksissa tai luonnonvaraisille populaatioille on tehtävä terveystarkastuksia tai näytteenottoja useammin kuin kerran vuodessa, terveystarkastusten tai näytteiden keruiden välisen ajan on oltava mahdollisimman pitkä sen kauden aikana vuodesta, jolloin veden lämpötila on todennäköisesti korkeimmillaan ylittämättä kuitenkaan 28 °C.

Kaikille tuotantoyksiköille, kuten lammikoille ja altaille, on tehtävä terveystarkastus kuolleiden, heikkojen tai poikkeavasti käyttäytyvien kalojen havaitsemiseksi.

Cyprinus carpio -lajia ja sen hybridejä, kuten *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, on kerättävä kun niitä on viljelylaitoksessa.

Näytteenottoon kerättävät kalat on valittava seuraavasti:

i) jos joukossa on heikkokuntoisia, poikkeavasti käyttäytyviä tai äskettäin kuolleita mutta ei vielä hajoamistilassa olevia kaloja, on ensisijaisesti valittava tällaisia kaloja;

ii) jos kalantuotannossa käytetään useampaa kuin yhtä vedensaantilähdettä, näytteessä on oltava kaikkia vedensaantilähteitä edustavia kaloja;

iii) valittuihin kaloihin on sisällyttävä kaloja, jotka kerätään siten, että kaikki viljelylaitoksen osat ja kaikki vuosiluokat ovat suhteellisesti edustettuina näytteessä.

I.2 Erityisvaatimukset taudista vapaa -terveystilanteen (luokka I) saavuttamiseksi KHV-taudin osalta

I.2.1 Seurantaohjelmat

a) jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan III terveystilanne KHV-taudin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen, kun kaikki viljelylaitokset, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, noudattavat kyseisen direktiivin liitteessä V vahvistettuja vaatimuksia ja kaikissa kyseisissä viljelylaitoksissa ja, jos kyseisen liitteen I osassa olevan 2 kohdan toisessa alakohdassa niin vaaditaan, kyseisen osan mukaisesti valituissa luonnonvaraisten populaatioiden näytteenottopaikoissa on toteutettu jokin seuraavista seurantaohjelmista:

i) malli A – kaksivuotinen seurantaohjelma:

Viljelylaitoksissa tai näytteenottopaikoilla on oltava tehty terveystarkastuksia ja näytteenottoja vähintään kahden peräkkäisen vuoden ajan III jaksossa olevan taulukon 2.A mukaisesti.

Kyseisen kahden vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulosten on oltava ollut negatiivisia KHV-taudin suhteen ja kaikki KHV-tautiepäilyt on oltava suljettu pois III.2 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

ii) malli B – nelivuotinen seurantaohjelma pienemmällä näytekoolla:

Viljelylaitoksissa tai näytteenottopaikoilla on oltava tehty terveystarkastuksia ja näytteenottoja vähintään neljän peräkkäisen vuoden ajan III jaksossa olevan taulukon 2.B mukaisesti.

Kyseisen neljän vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulosten on oltava ollut negatiivisia KHV-taudin suhteen ja kaikki KHV-tautiepäilyt on oltava suljettu pois III.2 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

b) jos a alakohdassa tarkoitetun seurantaohjelman täytäntöönpanon aikana kyseiseen seurantaohjelmaan kuuluvassa viljelylaitoksessa vahvistetaan KHV-tartunta ja sen vuoksi sen luokan II terveystilanne on peruutettu, kyseinen viljelylaitos voi saada välittömästi takaisin luokan II terveystilanteen ja jatkaa seurantaohjelman täytäntöönpanoa taudista vapaan aseman saavuttamiseksi panematta täytäntöön I.2.2 kohdassa kuvattua hävittämisohjelmaa, edellyttäen, että viljelylaitos täyttää seuraavat edellytykset:

i) se on mantereella sijaitseva viljelylaitos, jonka terveystilanne KHV-taudin osalta ei riipu ympäröivän luonnonveden vesieläinpopulaatioiden kyseistä lueteltua tautia koskevasta terveystilanteesta direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 3 kohdan mukaisesti;

ii) se on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään; tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa;

iii) sinne on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne KHV-taudin osalta.

I.2.2 Hävittämisohjelmat

I.2.2.1 Yleiset vaatimukset

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne KHV-taudin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu vähintään seuraava hävittämisohjelma:

a) direktiivin 2006/88/EY V luvussa olevassa 4 jaksossa vahvistettuja vähimmäistorjuntatoimenpiteitä on sovellettu käytännössä ja KHV-tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettujen viljelylaitosten läheisyyteen on perustettu kyseisen direktiivin 32 artiklan b alakohdassa tarkoitettu rajoitusalue, johon kuuluu suoja-alue ja seuranta-alue.

Rajoitusalue on oltava määritelty tapauskohtaisesti ottaen huomioon KHV-taudin leviämiseen viljeltyihin ja luonnonvaraisiin kaloihin vaikuttavat tekijät, kuten: kalakuolemien määrä, osuus ja jakauma KHV-tartunnan saastuttamassa viljelylaitoksessa; etäisyys lähimpiin viljelylaitoksiin ja niiden sijaintitiheys; teurastamojen läheisyys; kontaktilaitokset; laitoksissa viljeltävät lajit; saastuneissa viljelylaitoksissa ja niiden lähellä sijaitsevissa laitoksissa sovelletut viljelykäytännöt; hydrodynaamiset olosuhteet ja muut identifioidut epidemiologisesti merkittävät tekijät.

Suoja- ja seuranta-alueiden perustamisessa on noudatettava seuraavia näiden alueiden maantieteellisiä rajoja koskevia vähimmäisvaatimuksia:

i) KHV-tartunnan saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen välittömään läheisyyteen on perustettava suoja-alue, jonka on vastattava KHV-tartunnan saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen koko vesistöaluetta; toimivaltainen viranomainen voi rajoittaa alueen koskemaan vain osia vesistöalueesta edellyttäen, että KHV-tartunnan leviämisen ehkäisy ei vaarannu;

ii) suoja-alueen ulkopuolelle on perustettava seuranta-alue, jonka on vastattava perustettua suoja-aluetta ympäröivää laajennettua aluetta;

b) kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja suoja-alueella ja joita ei ole virallisesti julistettu KHV-tartunnan saastuttamiksi, on tehtävä virallinen tutkimus, joka käsittää vähintään seuraavat seikat:

i) näytteiden kerääminen testausta varten 10 kalasta, kun havaitaan KHV-taudin kuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, tai vähintään 30 kalasta, kun kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä ei havaita;

ii) yksi terveystarkastus; viljelylaitoksissa, joissa on saatu negatiiviset tulokset III.2 kohdassa tarkoitetuissa testeissä, terveystarkastusten tekemistä on jatkettava kerran kuukaudessa sinä aikana, jolloin veden lämpötila on todennäköisesti > 15 °C, kunnes suoja-alue peruutetaan I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti;

c) kaikki KHV-tartunnan saastuttamaksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennettävä, puhdistettava, desinfioitava ja pidettävä tyhjillään. Tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa. Kun kaikki samalla suoja-alueella sijaitsevat tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, niitä on pidettävä samanaikaisesti tyhjillään vähintään kolme viikkoa. Tätä kohtaa sovelletaan myös uusiin viljelylaitoksiin, jotka julistetaan virallisesti tartunnan saastuttamiksi hävittämisohjelman täytäntöönpanon aikana.

Kun tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuja viljelylaitoksia pidetään tyhjillään, suoja-alueet on muutettava seuranta-alueiksi.

Toimivaltainen viranomainen voi päättää vaatia, että perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitsevat muut viljelylaitokset tyhjennetään, puhdistetaan, desinfioidaan ja pidetään tyhjillään. Toimivaltainen viranomainen määrittää tyhjillään pitämisen keston suorittamansa riskinarvioinnin perusteella;

d) Kaikkiin KHV-tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla tyhjinä pidettyihin viljelylaitoksiin on istutettava:

i) kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne KHV-taudin osalta; tai

ii) 31. joulukuuta 2020 saakka kestävän siirtymäkauden aikana, kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on hyväksytty KHV-taudin seurantaohjelma.

Istuttaminen on tehtävä vasta, kun kaikki KHV-tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu ja desinfioitu ja pidetty tyhjillään I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti;

e) Kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja hävittämisohjelman kattamassa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa ja, kun luonnonvaraisten populaatioiden seurantaa edellytetään, I.1 kohdan mukaisesti valituissa näytteenottopaikoissa on sen jälkeen toteutettu vähintään I.2.1 kohdassa esitetty seurantaohjelma.

I.2.2.2 Vaatimukset taudista vapaan aseman palauttamiseksi mantereella sijaitseville lokeroille, jotka käsittävät yhden ainoan KHV-taudista aiemmin vapaaksi julistetun viljelylaitoksen

Mantereella sijaitseva lokero, joka käsittää yhden ainoan viljelylaitoksen, jossa on luokan I terveystilanne KVH-taudin osalta ja jonka terveystilanne KHV-taudin osalta ei riipu ympäröivistä luonnonvesistä direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 3 kohdan mukaisesti ja jonka luokan I terveystilanne on peruutettu kyseisen direktiivin 53 artiklan 3 kohdan mukaisesti, voi saada takaisin luokan I terveystilanteen välittömästi sen jälkeen, kun toimivaltainen viranomainen on vahvistanut, että se täyttää seuraavat edellytykset:

a) se on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään; tyhjillään pitäminen on kestänyt vähintään kuusi viikkoa;

b) laitokseen on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne KHV-taudin osalta, tai lokeroista, joissa on hyväksytty KHV-taudin seurantaohjelma (luokan II terveystilanne).

I.3 Erityisvaatimukset luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi KHV-taudin osalta

Kun luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi edellytetään kohdennettua seurantaa direktiivin 2006/88/EY 52 artiklan mukaisesti, kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on tehtävä terveystarkastus ja otettava näytteet tämän osan III jaksossa olevan taulukon 2.B mukaisesti ottaen huomioon KHV-tartuntariskin taso viljelylaitoksessa.

Sellaisten luokan I lokerojen terveystarkastusten tarkastustiheyden, jotka sijaitsevat mantereella sijaitsevilla alueilla ja käsittävät yhden tai useampia viljelylaitoksia, joiden terveystilanne KHV-taudin osalta on riippuvainen kyseisen luetellun taudin terveystilanteesta ympäröivissä luonnonvesissä direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 2 kohdan mukaisesti, on oltava kyseisessä taulukossa 2.C korkealle riskitasolle asetetun lukumäärän mukainen.

Jäsenvaltioissa, vyöhykkeillä tai lokeroissa, joissa viljelylaitosten lukumäärä on rajoitettu eikä näiden viljelylaitosten kohdennettu seuranta tuota riittävästi epidemiologisia tietoja, taudista vapaan aseman säilyttämistä koskeviin seurantaohjelmiin on sisällyttävä I.1 kohdassa vahvistettujen vaatimusten mukaisesti valitut näytteenottopaikat.

Kyseisten näytteenottopaikat on tarkastettava kiertävällä otannalla siten, että näytteet otetaan vuosittain 50 prosentissa näytteenottopaikkoja. Näytteenotto on suoritettava III jaksossa olevan taulukon 2.C mukaisesti. Näytteet on valittava, valmistettava ja tutkittava II jaksossa kuvatulla tavalla, ja laboratoriotutkimusten tulosten on oltava negatiivisia KHV-taudinaiheuttajan esiintymisen suhteen.

Taudista vapaa asema säilyy ainoastaan niin kauan kuin kaikkien II.2 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä käyttämällä testattujen näytteiden tulokset ovat negatiivisia KHV-taudin suhteen ja kaikki KHV-tautiepäilyt on suljettu pois III.2 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti.

I.4 Erityisvaatimukset direktiivin 2006/88/EY 39 artiklassa säädettyjen rajoittavien toimenpiteiden poistamiseksi luokan III terveystilanteen saavuttamiseksi KHV-taudin osalta jäsenvaltioissa, lokeroissa tai vyöhykkeillä, joissa on luokan V terveystilanne

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne KHV-taudin osalta, voi saavuttaa luokan III terveystilanteen kyseiseen luetellun taudin osalta edellyttäen, että

a) I.2.2.1 kohdan a, b ja c alakohdassa vahvistetut vaatimukset täyttyvät. Jos tyhjillään pitäminen ei ole teknisesti mahdollista, asianomaisiin viljelylaitoksiin on sovellettava vaihtoehtoista toimenpidettä, joka antaa lähes vastaavan takeen KH-viruksen hävittämisestä viljelylaitoksen alueelta;

b) kaikkiin tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja kaikkiin muihin tyhjinä pidettyihin tai perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla a alakohdan mukaisesti vaihtoehtoisten toimenpiteiden kohteina olleisiin viljelylaitoksiin on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I, II tai III terveystilanne KHV-taudin osalta;

c) istuttaminen on tehty vasta, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään tai niihin on sovellettu vaihtoehtoisia toimenpiteitä a alakohdan mukaisesti.

II **Seurannan diagnostiset ja näytteenottomenetelmät KHV-taudista vapaan aseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi**

II.1 Näytteet

Tutkittavien kudosten on oltava kidusten ja munuaisten osia. Enintään kahden kalan elinten kappaleita saa yhdistää.

II.2 Seurannan diagnostiset menetelmät taudista vapaan aseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi KHV-taudin osalta

Diagnostisen menetelmän KHV-taudista vapaan aseman saavuttamiseksi tai säilyttämiseksi on oltava reaaliaikainen PCR (qPCR) liitteessä II olevan 2 osan II kohdassa esitettyjen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti.

III **Diagnostiset ja näytteenottomenetelmät virallisissa tutkimuksissa KHV-tautiepäilyn vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi**

III.1 Näytteet

Tutkittavien kudosten on oltava kidusten ja munuaisten osia. Enintään kahden kalan elinten kappaleita saa yhdistää.

III.2 Virallinen tutkimus ja diagnostiset menetelmät KHV-tartunnan vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi

Kun KHV-tautiepäily on vahvistettava tai suljettava pois direktiivin 2006/88/EY 28 artiklan mukaisesti, on noudatettava seuraavaa tarkastus-, näytteenotto- ja testausmenettelyä:

a) viralliseen tutkimukseen on kuuluttava vähintään yksi terveystarkastus ja yksi 10 kalan näytteenotto, kun havaitaan KHV-taudinkuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, tai vähintään 30 kalan, kun ei havaita kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä. Näytteet on testattava käyttämällä b alakohdassa vahvistettua diagnostista menetelmää liitteessä II olevan 2 osan II kohdassa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti;

b) KHV-tartunta katsotaan vahvistetuksi, jos KH-virus osoitetaan PCR-menetelmällä;

KHV-tautiepäily voidaan sulkea pois, jos kyseiset testit eivät tuo esiin lisänäyttöä KH-viruksen esiintymisestä.

Taulukko 2.A

Vyöhykkeitä ja lokeroja koskeva seurantaohjelma I.2.1 kohdassa tarkoitetuksi kahden vuoden valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää taudista vapaan aseman saavuttamista KHV-taudin osalta

		Kliinisten tarkastusten lukumäärä vuodessa (kahdessa vuodessa)	Laboratoriotutkimusten lukumäärä vuodessa (kahdessa vuodessa)	Kalojen lukumäärä näytteessä
Viljelylaitokset/näytteenottopaikat	Seurantajakson kaksi ensimmäistä vuotta	2	2	75 [1]
	Kalojen enimmäismäärä yhdistelmänäytteessä: 2			

[1] Näytteitä on otettava sellaisesta määrästä kaloja, jolla varmistetaan, että KH-virus osoitetaan 95 %: n varmuudella, jos oletettu esiintyvyys on 5 %.

Taulukko 2.B

Vyöhykkeitä ja lokeroja koskeva seurantaohjelma I.2.1 kohdassa tarkoitetuksi neljän vuoden valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää KHV-taudista vapaan aseman saavuttamista

		Kliinisten tarkastusten lukumäärä vuodessa	Laboratoriotutkimusten lukumäärä vuodessa	Kalojen lukumäärä näytteessä
Viljelylaitokset/näytteenottopaikat	Seurantajakson kaksi ensimmäistä vuotta	1	1	30
Viljelylaitokset/näytteenottopaikat	Seurantajakson kaksi viimeistä vuotta	2	2	30
	Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytteessä: 2			

Taulukko 2.C

Vyöhykkeitä tai lokeroja koskevat seurantaohjelmat I.3 kohdassa tarkoitetun taudista vapaan aseman säilyttämiseksi KHV-taudin osalta

Riskin taso	Terveystarkastusten lukumäärä	Kalojen lukumäärä näytteessä
Korkea	2 joka vuosi	30
Keskitasoinen	1 joka vuosi	30
Alhainen	1 joka toinen vuosi	30

Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytteessä: 2

Taulukko 2.D

Seurantaohjelma KHV-taudista vapaan aseman säilyttämiseksi jäsenvaltioissa, vyöhykkeillä tai lokeroissa, joissa viljelylaitosten lukumäärä on rajoitettu ja näiden viljelylaitosten kohdennetusta seurannasta ei saada riittävästi I.3 kohdassa tarkoitettua epidemiologista tietoa

	Kliinisten tarkastusten lukumäärä vuodessa	Laboratoriotutki–musten lukumäärä vuodessa	Kalojen lukumäärä näytteessä
Näytteenottopaikat	1 joka toinen vuosi	1 joka toinen vuosi	30

Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytteessä: 2

3 OSA

LOHEN TARTTUVAA ANEMIAA (ISA-TAUTIA) KOSKEVAT SEURANTA- JA VALVONTAMENETELMÄT

I **Seuranta- ja hävittämisohjelmia koskevat vaatimukset taudista vapaa -terveysaseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi ISA-taudin osalta ja HPRΔ-ISA-virustartuntojen rajoittamiseksi**

I.1 Yleiset vaatimukset

Kun viljelylaitosten terveystarkastukset ja näytteenotto edellytetään direktiivi 2006/88/EY liitteessä V olevan I osan 2 kohdan toisen kohdan mukaisesti tehtäviksi useammin kuin kerran vuodessa, terveystarkastusten tai näytteenottojen välisen ajan on oltava mahdollisimman pitkä.

Kun luonnonvaraisten populaatioiden kohdennettua seurantaa edellytetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan I osan 2 kohdan toisen kohdan mukaisesti, näytteenottokohtien lukumäärä ja maantieteellinen jakauma on määritettävä siten, että kattavuus on kohtuullinen jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa. Näytteenottopaikkojen on myös edustettava erilaisia ekosysteemejä, joissa on taudille alttiita luonnonvaraisia populaatioita.

Kaikille tuotantoyksiköille, kuten lammikoille, altaille ja verkkoaltaille, on tehtävä terveystarkastus kuolleiden, heikkojen tai poikkeavasti käyttäytyvien kalojen havaitsemiseksi. Erityistä huomiota on kiinnitettävä poistovesipisteeseen, jonne heikoilla kaloilla on taipumus kerääntyä veden virtauksen vuoksi.

Näytteenottoon kerättävät kalat on valittava seuraavasti:

a) on valittava ainoastaan kuolemaisillaan olevia tai äskettäin kuolleita mutta ei vielä hajoamistilassa olevia kaloja; ensisijaisesti on valittava kaloja, joissa on merkkejä anemiasta, verenvuotoa tai muita verenkierto-häiriöihin viittaavia kliinisiä merkkejä;

b) jos merilohi on yksi taudille alttiista lajeista laitoksessa, näytteet merilohesta ovat ensisijaisia. Jos kalanviljely-laitoksessa ei ole merilohia, on otettava näytteet muista taudille alttiista lajeista;

c) jos kalantuotannossa käytetään useampaa kuin yhtä vedensaantilähdettä, näytteessä on oltava kaikkia vedensaantilähteitä edustavia kaloja;

d) valittuihin kaloihin on sisällyttävä kaloja, jotka kerätään siten, että viljelylaitoksen kaikki tuotantoyksiköt, kuten verkkoaltaat, altaat ja lammikot, sekä kaikki vuosiluokat ovat suhteellisesti edustettuina näytteessä.

I.2 Erityisvaatimukset luokan I terveystilanteen saavuttamiseksi ISA-taudin osalta

I.2.1 Seurantaohjelmat

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on direktiivin 2006/88/EY liitteessä III olevassa B osassa tarkoitettu luokan III terveystilanne ISA-taudin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikki viljelylaitokset, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, noudattavat kyseisen direktiivin liitteessä V vahvistettuja asiaa koskevia vaatimuksia ja kaikissa kyseisissä viljelylaitoksissa ja, kun sen liitteessä V olevassa I osassa olevan 2 kohdan toisessa kohdassa niin vaaditaan, kyseisen osan mukaisesti valituissa luonnonvaraisten populaatioiden näytteenottopaikoissa on toteutettu seuraava seurantaohjelma:

a) viljelylaitoksissa tai näytteenottopaikoilla on tehty terveystarkastuksia ja otettu näytteitä vähintään kahden peräkkäisen vuoden ajan II jaksossa olevan taulukon 3.A mukaisesti;

b) kyseisen kahden vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulosten on oltava ollut negatiivisia HPRΔ-ISA-viruskannan suhteen ja kaikki ISA-tautiepäilyt on oltava suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

c) jos seurantaohjelman täytäntöönpanon aikana kyseiseen seurantaohjelmaan kuuluvassa viljelylaitoksessa vahvistetaan ISA-tartunta ja sen vuoksi viljelylaitoksen luokan II terveystilanne on peruutettu, I.2.2 kohdan mukainen hävittämisohjelma on oltava toteutettu.

I.2.2 Hävittämisohjelmat

I.2.2.1 Yleiset vaatimukset

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne ISA-taudin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu seuraavien a–e kohtien mukainen hävittämisohjelma:

a) direktiivin 2006/88/EY V luvussa olevassa 3 jaksossa vahvistettuja vähimmäistorjuntatoimenpiteitä on sovellettu käytännössä ja HPRΔ-ISA-virustartunnan tai vahvistetun ISA-taudin saastuttamiksi virallisesti julistettujen viljelylaitosten läheisyyteen on erityisesti perustettu kyseisen direktiivin 32 artiklan b alakohdassa tarkoitettu rajoitusalue, johon kuuluu suoja-alue ja seuranta-alue.

Rajoitusalue on oltava määritelty tapauskohtaisesti ottaen huomioon ISA-taudin leviämiseen viljeltyihin tai luonnonvaraisiin kaloihin vaikuttavat tekijät, kuten: kalakuolemien määrä, osuus ja jakauma HPRΔ-ISA-virustartunnan tai vahvistetun ISA-taudin saastuttamassa viljelylaitoksessa; etäisyys lähimpiin viljelylaitoksiin ja niiden sijaintitiheys; teurastamojen läheisyys; kontaktilaitokset; laitoksissa viljeltävät lajit; saastuneissa viljelylaitoksissa ja niiden lähellä sijaitsevissa laitoksissa sovelletut viljelykäytännöt; hydrodynaamiset olosuhteet ja muut identifioidut epidemiologisesti merkittävät tekijät.

Suoja- ja seuranta-alueiden perustamisessa on noudatettava seuraavia näiden alueiden maantieteellisiä rajoja koskevia vähimmäisvaatimuksia:

i) ISA-taudin saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen välittömään läheisyyteen on perustettava suoja-alue, jonka on vastattava:

1) rannikkoalueilla: säteeltään yhden vuorovesikantaman tai vähintään 5 kilometrin mittaisen ympyrän sisään jäävää aluetta – sen mukaan, kumpi on suurempi –, jonka keskipisteenä on ISA-tartunnan saastuttamaksi virallisesti julistettu viljelylaitos, taikka tätä vastaavaa aluetta, joka on määritetty asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta;

2) sisävesialueilla: ISA-tartunnan saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen koko vesistöaluetta; toimivaltainen viranomainen voi rajoittaa alueen koskemaan vain osia vesistöalueesta edellyttäen, että ISA-tartunnan leviämisen ehkäisy ei vaarannu;

ii) suoja-alueen ulkopuolelle on perustettava seuranta-alue, jonka on vastattava:

1) rannikkoalueilla: suoja-aluetta ympäröivää aluetta, jonka vuorovesikantamat ovat päällekkäisiä; tai suoja-aluetta ympäröivää, sellaiseen ympyrään sisältyvää aluetta, jonka keskus on suoja-alueen keskus ja säde 10 km; taikka vastaavanlaista, asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta; tai

2) sisävesialueilla: perustetun suoja-alueen ulkopuolista laajennettua aluetta;

b) kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja suoja-alueella ja joita ei ole virallisesti julistettu ISA-tartunnan saastuttamiksi, on tehtävä virallinen tutkimus, joka käsittää vähintään seuraavat seikat:

i) näytteiden kerääminen testausta varten vähintään 10:stä kuolemaisillaan olevasta kalasta, kun havaitaan ISA-taudin kuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, tai vähintään 30 kalasta, kun kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä ei havaita;

ii) yksi terveystarkastus; viljelylaitoksissa, joissa i alakohdassa tarkoitettujen testien tulos on ollut negatiivinen, terveystarkastusten tekemistä on jatkettava kerran kuukaudessa, kunnes suoja-alue peruutetaan I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti;

c) kaikki HPRΔ-ISA-virustartunnan tai vahvistetun ISA-taudin saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennettävä, puhdistettava, desinfioitava ja pidettävä tyhjillään vähintään kolme kuukautta. Suoja- ja seuranta-alueet voidaan lopettaa, kun kaikki suoja-alueella sijaitsevat viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu ja desinfioitu ja niitä on pidetty samanaikaisesti tyhjillään vähintään kuuden viikon ajan.

Kun tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuja viljelylaitoksia pidetään tyhjillään, suoja-alueet on muutettava seuranta-alueiksi.

Toimivaltainen viranomainen voi päättää vaatia, että perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitsevat muut viljelylaitokset tyhjennetään, puhdistetaan, desinfioidaan ja pidetään tyhjillään. Toimivaltainen viranomainen määrittää kyseisten viljelylaitosten tyhjillään pitämisen keston suorittamansa riskinarvioinnin perusteella;

d) kaikkiin HPRΔ-ISA-virustartunnan tai vahvistetun ISA-taudin saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitseviin viljelylaitoksiin, joita on pidetty tyhjillään, on istutettava kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne ISA-taudin osalta.

Istuttaminen on tehtävä vasta, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu ja desinfioitu ja pidetty tyhjillään I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti;

e) kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja hävittämisohjelman kattamassa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa ja, kun luonnonvaraisten populaatioiden seurantaa edellytetään, I.1 kohdan mukaisesti valituissa näytteenottopaikoissa on sen jälkeen toteutettava I.2.1 kohdassa vahvistettu seurantaohjelma.

I.2.2.2 Vaatimukset, jotka koskevat taudista vapaan aseman palauttamista mantereella sijaitseville lokeroille, jotka käsittävät yhden ainoan viljelylaitoksen, jossa on aikaisemmin vahvistettu luokan I terveystilanne

Mantereella sijaitseva lokero, joka käsittää yhden ainoan viljelylaitoksen, jossa on luokan I terveystilanne ISA-taudin osalta ja jonka terveystilanne ei riipu ympäröivistä luonnonvesistä direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 3 kohdan mukaisesti ja jonka luokan I terveystilanne on peruutettu kyseisen direktiivin 53 artiklan 3 kohdan mukaisesti, voi saada sen takaisin välittömästi sen jälkeen, kun toimivaltainen viranomainen on vahvistanut, että se täyttää seuraavat edellytykset:

a) se on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään; tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa;

b) sinne on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne ISA-taudin osalta.

I.3 Vähimmäistorjuntatoimenpiteet luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi ISA-taudin osalta

Kun luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi edellytetään kohdennettua seurantaa direktiivin 2006/88/EY 52 artiklan mukaisesti, kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja asianomaisessa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on tehtävä terveystarkastus ja otettava näytteet tämän osan II jaksossa olevan taulukon 3.B ([1]) mukaisesti ottaen huomioon ISA-tartuntariskin taso viljelylaitoksessa.

Kun määritetään terveystarkastusten tiheys lokeroille, joissa on luokan I terveystilanne ISA-taudin osalta, jotka sijaitsevat mantereella sijaitsevilla alueilla ja joiden terveystilanne ISA-taudin osalta on riippuvainen sellaisten ympäröivien luonnonvesien terveystilanteesta, joissa pidetään merilohta (*Salmo salar*), ISA-tartunnan riskiä on pidettävä korkeana.

ISA-taudista vapaa asema säilyy ainoastaan niin kauan kuin kaikkien II.2 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä käyttämällä testattujen näytteiden tulokset ovat negatiivisia ISA-viruksen HPRΔ-kannan suhteen ja kaikki ISA-tautiepäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti.

I.4 Erityisvaatimukset luokan III terveystilanteen saavuttamiseksi ISA-viruksen HPRΔ-kannan osalta jäsenvaltioissa, vyöhykkeillä tai lokeroissa, joissa on aiemmin ollut luokan V terveystilanne

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne ISA-taudin osalta, voi saavuttaa luokan III terveystilanteen edellyttäen, että

a) I.2.2.1 kohdan a, b ja c alakohdassa vahvistetut vaatimukset täyttyvät. Jos tyhjillään pitäminen ei ole teknisesti mahdollista, viljelylaitoksiin on sovellettava vaihtoehtoista toimenpidettä, joka antaa lähes vastaavan takeen ISA-viruksen hävittämisestä viljelylaitoksen alueelta;

b) kaikkiin tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja kaikkiin muihin tyhjinä pidettyihin tai perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla a alakohdan mukaisesti vaihtoehtoisten toimenpiteiden kohteina olleisiin viljelylaitoksiin on istutettu kaloja, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I, II tai III terveystilanne ISA-taudin osalta;

c) tällainen istuttaminen on tehty vasta sen jälkeen, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään tai niihin on sovellettu vaihtoehtoisia toimenpiteitä a alakohdan mukaisesti.

d) ISA-viruksen HPRΔ-kannan esiintymistä ei ole vahvistettu a, b ja c alakohdassa tarkoitettujen toimenpiteiden loppuun saattamisen jälkeisten kahden vuoden aikana ja tämän ajanjakson aikaiset epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen menettelyjen mukaisesti.

([1]) Ei sovelleta viljelylaitoksiin, joissa kasvatetaan ainoastaan kirjolohia (*Oncorhynchus mykiss*) tai taimenia (*Salmo trutta*) tai molempia ja joiden vedensaanti perustuu yksinomaan makean veden lähteisiin, joissa ei pidetä merilohia (*Salmo salar*).

II **Diagnostiset menetelmät ja viralliset tutkimukset**

II.1 Näytteet

Tutkittavien kudosten on oltava:

a) Histologia: munuaisen etuosa, maksa, sydän, haima, suolet, perna ja kidukset;

b) Immunohistokemia: munuaisen keskiosa ja sydän, mukaan luettuina läpät ja valtimokeko;

c) Rt-qPCR-analyysi: munuaisen keskiosa ja sydän;

d) virusviljely: munuaisen keskiosa, sydän, maksa ja perna.

Enintään viiden kalan elinten kappaleita saa yhdistää.

II.2 Diagnostiset menetelmät taudista vapaan aseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi ISA-taudin osalta

Diagnostisen menetelmän, jota käytetään taudista vapaan aseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi ISA-taudin osalta I.2 ja I.3 kohdan mukaisesti, on oltava RT-qPCR, jonka jälkeen suoritetaan positiivisten näytteiden sekvensointi RT-qPCR liitteessä II olevassa 3 osassa vahvistettujen yksityiskohtaisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti.

Jos RT-qPCR antaa positiivisen tuloksen, on testattava lisää näytteitä ennen direktiivin 2006/88/EY 28 artiklassa säädettyjen ensivaiheen torjuntatoimenpiteiden täytäntöönpanoa.

Kyseiset näytteet on testattava liitteessä II olevassa 3 osassa vahvistettujen yksityiskohtaisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti seuraavasti:

a) näytteiden seulonta RT-qPCR-menetelmällä, ja HE-geenin sekvensointi HPRΔ-deleetion tarkastamiseksi;

ja

b) kudospreparaattien tutkiminen ISA-viruksen spesifisten vasta-aineiden avulla (eli IHC kiinnitettyjen leikkeiden tai IFAT kudosleimausnäytteiden osalta); tai

c) ISA-viruksen eristäminen ja tunnistaminen soluviljelmässä vähintään yhdestä näytteestä, joka on peräisin viljelylaitoksesta näytteenottoon kerätystä mistä tahansa kalasta.

II.3 Virallinen tutkimus ja diagnostiset menetelmät ISA-taudin esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi

Kun ISA-tautiepäily on vahvistettava tai suljettava pois direktiivin 2006/88/EY 28 artiklan mukaisesti, on noudatettava seuraavaa tarkastus-, näytteenotto- ja testausmenettelyä:

a) virallinen tutkimus, johon sisältyy vähintään yksi terveystarkastusta ja yksi 10:n kuolemaisillaan olevan kalan näytteenotto, kun havaitaan ISA-taudinkuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä. Jos ei havaita ISA-taudinkuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, terveystarkastuksen jälkeen näytteet on kerättävä kohdennetusti vähintään 30:stä kuolemaisillaan olevasta kalasta tai tehtävä uudet *post mortem* -tarkastukset normaalikuntoisille kaloille I.1 kohdan mukaisesti. Näytteet on testattava b alakohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

b) jos RT-qPCR antaa ISA-viruksen HPRΔ-kannan suhteen positiivisen tuloksen, ennen direktiivin 2006/88/EY 28 artiklassa säädettyjen ensivaiheen torjuntatoimenpiteiden täytäntöönpanoa on testattava lisää näytteitä. Epäilty ISA-tautitartunta on vahvistettava seuraavien kriteerien mukaisesti käyttämällä liitteessä II olevassa 3 osassa vahvistettuja yksityiskohtaisia menetelmiä ja menettelyjä:

i) ISA-viruksen osoittaminen RT-qPCR-menetelmällä ja HE-geenin sekvensointi HPRΔ-deleetion tarkastamiseksi ja ISA-viruksen osoittaminen kudospreparaateissa ISA-viruksen spesifisten vasta-aineiden avulla (eli IHC kiinnitettyjen leikkeiden tai IFAT kudosleimausnäytteiden osalta);

tai

ii) näytteiden seulonta RT-qPCR-menetelmällä ja HE-geenin sekvensointi HPRΔ-deleetion tarkastamiseksi, ja;

ISA-viruksen eristäminen ja tunnistaminen soluviljelmässä vähintään yhdestä näytteestä, joka on otettu viljelylaitoksesta peräisin olevasta mistä tahansa kalasta;

c) jos havaitaan ISA-taudinkuvaan sopivia kliinisiä, suuria patologisia muutoksia tai histopatologisia löydöksiä, löydökset on vahvistettava osoittamalla virus kahdella diagnostisella menetelmällä, joilla on erilaiset osoittamisperiaatteet, kuten RT-qPCR ja IHC, liitteessä II olevan 3 osan mukaisesti.

ISA-epäily voidaan sulkea pois, jos testeissä ja tarkastuksissa ei 12 kuukauden aikana epäilyn esittämispäivästä tule esiin mitään lisänäyttöä ISA-taudin esiintymisestä.

Taulukko 3.A

Vyöhykkeitä ja lokeroja koskeva seurantaohjelma I.2.1 kohdassa tarkoitetuksi kahden vuoden valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää taudista vapaan aseman saavuttamista ISA-taudin osalta

Seurantavuosi	Terveystarkastusten lukumäärä vuodessa (kahdessa vuodessa)	Laboratoriotutkimusten lukumäärä vuodessa (kahdessa vuodessa)	Näytteenottoa varten kerättävien kalojen lukumäärä vuodessa
Vuosi 1	6	2 (1)	2 * 75 (2)
Vuosi 2	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Näytteet on kerättävä, varastoitava ja tutkittava kuukauden kestävän testijakson aikana kahdesti vuodessa (keväällä ja syksyllä) tai tarvittaessa käytännön näkökohtien perusteella.
(2) Kalojen enimmäismäärä yhteisnäytteessä: 5.

Taulukko 3.B

Vyöhykkeitä tai lokeroja koskevat seurantaohjelmat I.3 kohdassa (2) tarkoitetun taudista vapaan aseman säilyttämiseksi ISA-taudin osalta

Riskin taso	Terveystarkastusten lukumäärä vuodessa	Laboratoriotutkimusten lukumäärä vuodessa	Näytteenottoa varten kerättävien kalojen lukumäärä vuodessa
Korkea	2	2 (1)	2 * 30
Keskitasoinen	1	1 (1)	30
Alhainen	1 joka toinen vuosi	1 joka toinen vuosi	30 joka toinen vuosi

(1) Näytteet on kerättävä ja tutkittava kuukauden kestävän testijakson aikana kahdesti vuodessa (keväällä ja syksyllä) tai tarvittaessa käytännön näkökohtien perusteella.
(2) Ei sovelleta viljelylaitoksiin, joissa kasvatetaan ainoastaan kirjolohia (*Oncorhynchus mykiss*) tai taimenia (*Salmo trutta*) tai molempia ja joiden vedensaanti perustuu yksinomaan makean veden lähteisiin, joissa ei pidetä merilohia (*Salmo salar*).

4 OSA

NILVIÄISTEN MARTEILIOOSIA (*MARTEILIA REFRINGENS* -LOISEN AIHEUTTAMAA TARTUNTAA) KOSKEVAT SEURANTA- JA VALVONTAMENETELMÄT

I. **Seuranta- ja hävittämisohjelmia koskevat vaatimukset taudista vapaa -terveysaseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi nilviäisten marteilioosin (*Marteilia refringens* -loisen aiheuttaman tartunnan) osalta**

I.1 Yleiset vaatimukset

Terveystarkastukset ja tarvittaessa näytteenotto laboratoriotutkimuksia varten on suoritettava sellaisena aikana vuodesta, jolloin loisen esiintyvyyden kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa tiedetään olevan korkeimmillaan. Jos tällaista tietoa ei ole saatavilla, näytteenotto on suoritettava heti sen jälkeen, kun veden lämpötila on ylittänyt 17 °C.

Kun nilviäisistä aiotaan ottaa näytteitä 4 osassa vahvistettujen vaatimusten mukaisesti, on sovellettava seuraavia kriteerejä:

a) jos tuotantoyksiköissä tai tuotantoalueella on *Ostrea* spp.- ja *Mytilus* spp. -sukujen lajeja, näytteessä on oltava yhtä monta näytettä kummastakin suvusta. Jos laitoksessa on ainoastaan toisen suvun lajeja, kyseisestä suvusta on otettava näytteet. Jos laitoksessa ei ole *Ostrea* spp.- eikä *Mytilus* spp. -suvun lajeja, näytteen on edustettava kaikkia muita tuotantoyksiköissä tai tuotantoalueella olevia taudille alttiita lajeja;

b) jos tuotantoyksiköissä on heikkoja, kuori auki olevia tai äskettäin kuolleita mutta ei vielä hajoamistilassa olevia nilviäisiä, on valittava ensisijaisesti tällaisia nilviäisiä. Jos tällaisia nilviäisiä ei ole, valittujen nilviäisten joukossa on oltava vanhimpia terveitä nilviäisiä;

c) otettaessa näytteitä nilviäisten viljelylaitoksista, joissa nilviäistuotannossa käytetään useampaa kuin yhtä vesilähdettä, otettaviin näytteisiin on sisällytettävä jokaista vesilähdettä edustavia nilviäisiä niin, että kaikki laitoksen osat ovat suhteellisesti edustettuina näytteessä.

d) otettaessa näytteitä nilviäisten viljelyalueelta, näytteeseen on sisällytettävä nilviäisiä riittävästä määrästä näytteenottopisteitä niin, että kaikki nilviäisten viljelyalueen osat ovat suhteellisesti edustettuina näytteessä. Tärkeimmät näiden näytteenottopaikkojen valinnassa huomioon otettavat tekijät ovat aiemmat näytteenottopaikat, joissa nilviäisten marteilioosia havaittiin, eläintiheys, vesien virtaukset, taudille alttiit lajit, tartunnanlevittäjälajit, veden syvyys ja hoitokäytännöt. Luonnolliset esiintymät on otettava mukaan näytteenottoon.

I.2 Erityisvaatimukset luokan I terveystilanteen saavuttamiseksi nilviäisten marteilioosin osalta

I.2.1 Seurantaohjelmat

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan III terveystilanne nilviäisten marteilioosin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikissa viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu vähintään seuraava seurantaohjelma, joka käsittää terveystarkastuksia ja näytteiden keräämisen testausta varten.

Kaksivuotinen seurantaohjelma:

a) Viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla on tehty terveystarkastuksia ja otettu näytteitä vähintään kahden peräkkäisen vuoden ajan II jaksossa olevan taulukon 4.A mukaisesti;

b) kyseisen kahden vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulokset ovat olleet negatiivisia nilviäisten marteilioosin suhteen ja kaikki nilviäisten marteilioosin epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

c) kun näytteeseen sisällytetään *Ostrea edulis*-, *Mytilus edulis*- tai *Mytilus galloprovincialis* -nilviäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltiosta, vyöhykkeeltä tai lokerosta, jossa on luokan I terveystilanne, ne on oltava tuotu kyseiseen viljelylaitokseen tai nilviäisten viljelyalueelle viimeistään välittömästi seurantaohjelman toteuttamisajankohtaa edeltävänä keväänä.

I.2.2 Hävittämisohjelmat

Nilviäisten marteilioosin hävittämistä pidetään useimmissa tapauksissa mahdottomana, mutta jos jäsenvaltio katsoo sen olevan mahdollista, on sovellettava seuraavaa hävittämisohjelman mallia.

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne nilviäisten marteilioosin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikissa viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu vähintään seuraava hävittämisohjelma:

a) direktiivin 2006/88/EY V luvussa olevassa 3 jaksossa vahvistettuja toimenpiteitä on sovellettu käytännössä ja nilviäisten marteilioosin saastuttamiksi virallisesti julistettujen viljelylaitosten tai nilviäisten viljelyalueiden läheisyyteen on erityisesti perustettu kyseisen direktiivin 32 artiklan b alakohdassa tarkoitettu rajoitusalue, johon kuuluu suoja-alue ja seuranta-alue.

Rajoitusalue on määriteltävä tapauskohtaisesti ottaen huomioon nilviäisten marteilioosin leviämiseen vaikuttavat tekijät, kuten: nilviäiskuolemien määrä, ikä, osuus ja jakauma nilviäisten marteilioosin saastuttamassa viljelylaitoksessa tai nilviäisten viljelyalueella, mukaan luettuina luonnonvaraiset nilviäiset; etäisyys lähimpiin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille ja niiden sijaintitiheys, mukaan luettuna luonnonvaraiset nilviäiset; jalostuslaitosten, kontaktilaitosten tai nilviäisten viljelyalueiden läheisyys; viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla olevat lajit, erityisen taudille alttiit lajit ja tartunnanlevittäjälajit; saastuneissa viljelylaitoksissa ja niiden lähellä sijaitsevissa laitoksissa ja nilviäisten viljelyalueilla sovellettavat viljelykäytännöt, hydrodynaamiset olosuhteet ja muut identifioidut epidemiologisesti merkittävät tekijät.

Suoja- ja seuranta-alueiden perustamisessa on noudatettava seuraavia vähimmäisvaatimuksia:

i) nilviäisten marteilioosin saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen tai nilviäisten viljelyalueen välittömään läheisyyteen on perustettava suoja-alue, jonka on vastattava asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta;

ii) suoja-alueen ulkopuolelle on perustettava seuranta-alue, jonka on vastattava suoja-aluetta ympäröivää, asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta;

b) kaikissa viljelylaitoksissa ja nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja suoja-alueella ja joita ei ole virallisesti julistettu nilviäisten marteilioosin saastuttamiksi, on tehtävä virallinen tutkimus, joka käsittää vähintään näytteiden keruun 150 nilviäisen testaamiseksi nilviäisten marteilioosin tarttumisajan alkamisen jälkeen. Jos tarttumisaika ei ole tiedossa, näytteenotto on aloitettava sen jälkeen, kun veden lämpötila ylittää 17 °C;

c) kaikki nilviäisten marteilioosin saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset ja nilviäisten viljelyalueet on tyhjennettävä, pidettävä tyhjillään ja, jos mahdollista, puhdistettava ja desinfioitava.

Tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa.

i) kaksi kuukautta, kun kyseessä ovat viljelylaitokset ja nilviäisten viljelyalueet, joilla on rajoitetut yhteydet ympäröiviin vesiin, kuten hautomot ja poikaslaitokset;

ii) kaksi kuukautta, kun kyseessä ovat viljelylaitokset ja nilviäisten viljelyalueet, joilla on rajoittamattomat yhteydet ympäröiviin vesiin, jos taudille alttiiseen lajiin kuuluvat tartunnan saaneet nilviäiset ja taudille alttiiseen lajiin kuuluvat nilviäiset, joilla on epidemiologinen yhteys tartunnan saastuttamaan viljelylaitokseen tai nilviäisten viljelyalueeseen, on kerätty tai poistettu ennen sellaista ajanjaksoa vuodesta, jona nilviäisten marteilioosin esiintymisen tiedetään olevan korkeimmillaan, tai jos kyseinen ajanjakso ei ole tiedossa, ennen ajanjaksoa, jona veden lämpötila ylittää 17 °C;

iii) neljätoista kuukautta, kun kyseessä ovat viljelylaitokset ja nilviäisten viljelyalueet, joilla on rajoittamattomat yhteydet ympäröiviin vesiin, jos taudille alttiiseen lajiin kuuluvia tartunnan saaneita nilviäisiä ja taudille alttiiseen lajiin kuuluvia nilviäisiä, joilla on epidemiologinen yhteys tartunnan saastuttamaan viljelylaitokseen tai nilviäisten viljelyalueeseen, ei ole kerätty tai poistettu ennen sellaista ajanjaksoa vuodesta, jona nilviäisten marteilioosin esiintymisen tiedetään olevan korkeimmillaan tai jos tätä tietoa ei ole, kun taudille alttiiseen lajiin kuuluvia nilviäisiä ei ole kerätty tai poistettu ennen ajanjaksoa, jona veden lämpötila ylittää 17 °C;

Kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset ja nilviäisten viljelyalueet on tyhjennetty, niitä on pidettävä samanaikaisesti tyhjillään vähintään neljä viikkoa.

Toimivaltainen viranomainen voi päättää vaatia, että perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitsevat muut viljelylaitokset tai nilviäisten viljelyalueet tyhjennetään, puhdistetaan, desinfioidaan ja pidetään tyhjillään. Toimivaltainen viranomainen määrittää tyhjillään pitämisen keston suorittamansa riskinarvioinnin perusteella;

d) kaikkiin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille, jotka on virallisesti julistettu tartunnan saastuttamiksi, ja kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitseviin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille, joita on pidetty tyhjillään, on istutettava nilviäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne nilviäisten marteilioosin osalta.

Istuttaminen on tehtävä vasta, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään I.2.2 kohdan c alakohdan mukaisesti;

e) kaikissa viljelylaitoksissa ja nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja hävittämisohjelman piiriin kuuluvassa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on sen jälkeen toteutettava tämän osan kohdassa I.2.1 vahvistettu seurantaohjelma.

I.3 Erityisvaatimukset taudista vapaa -terveystilanteen (luokka I) säilyttämiseksi nilviäisten marteilioosin osalta

Kun luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi edellytetään kohdennettua seurantaa direktiivin 2006/88/EY 52 artiklan mukaisesti, kaikissa viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja asianomaisessa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on tehtävä terveystarkastukset ja otettava näytteet tämän osan II jaksossa olevan taulukon 4.B mukaisesti ottaen huomioon nilviäisten marteilioosin tartuntariskin taso viljelylaitoksessa tai nilviäisten viljelyalueilla.

Taudista vapaa asema säilyy ainoastaan niin kauan kuin kaikkien II.2 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä käyttämällä testattujen näytteiden tulokset ovat negatiivisia nilviäisten marteilioosin suhteen ja kaikki nilviäisten marteilioosin epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti.

I.4 Edellytykset direktiivin 2006/88/EY 39 artiklassa säädettyjen rajoittavien toimenpiteiden poistamiseksi (terveystilanteen muutos luokasta V luokkaan III) nilviäisten marteilioosin osalta

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne nilviäisten marteilioosin osalta, voi saavuttaa luokan III terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta edellyttäen, että

a) I.2.2 kohdan a, b ja c alakohdassa vahvistetut vaatimukset täyttyvät. Jos tyhjillään pitäminen ei ole teknisesti mahdollista, asianomaisiin viljelylaitoksiin on sovellettava vaihtoehtoista toimenpidettä, joka antaa lähes vastaavan takeen nilviäisten marteilioosin hävittämisestä viljelylaitoksen alueelta;

b) kaikkiin nilviäisten bonamioosin saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja nilviäisten viljelyalueille ja kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla tyhjinä pidettyihin tai a alakohdan mukaisesti vaihtoehtoisten toimenpiteiden kohteena olleisiin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille on istutettu nilviäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I, II tai III terveystilanne nilviäisten marteilioosin osalta.

c) istuttaminen on tehty vasta sen jälkeen, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset tai nilviäisten viljelyalueet on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään tai niihin on sovellettu vaihtoehtoisia toimenpiteitä a alakohdan mukaisesti.

d) nilviäisten marteilioosin esiintymistä ei ole vahvistettu a, b ja c alakohdassa tarkoitettujen toimenpiteiden loppuun saattamisen jälkeisten kahden vuoden aikana ja epäilyt on tämän ajanjakson aikana suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen menettelyjen mukaisesti.

II **Diagnostiset menetelmät ja viralliset tutkimukset**

II.1 Näytteet

Koko eläin on toimitettava laboratorioon II.2 ja II.3 kohdassa määrättyjen diagnostisten testien suorittamista varten

II.2 Diagnostiset menetelmät taudista vapaan aseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi nilviäisten marteilioosin osalta

Diagnostisten menetelmien, joita käytetään taudista vapaan aseman saavuttamiseksi tai säilyttämiseksi nilviäisten marteilioosin osalta liitteessä II olevassa 4 osassa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti, on oltava histopatologinen tutkimus, kudosleimausnäytteet tai PCR-menetelmä.

II.3 Virallinen tutkimus ja diagnostiset menetelmät nilviäisten marteilioosin esiintymisen vahvistamiseksi tai sen epäilyn poissulkemiseksi

Kun nilviäisten marteilioosin tartuntaepäily on vahvistettava tai suljettava pois direktiivin 2006/88/EY 28 artiklan mukaisesti, on noudatettava seuraavaa tarkastus-, näytteenotto- ja testausmenettelyä:

a) viralliseen tarkastukseen on sisällyttävä vähintään yksi näytteenotto, johon kerätään 30 taudille alttiiseen lajiin kuuluvaa nilviäisiä, jos epäilys perustuu kuolleisuusraporttiin, tai jos ei perustu, 150 taudille alttiiseen lajiin kuuluvaa nilviäistä, nilviäisten marteilioosin tarttumiskauden alkamisen jälkeen. Jos tarttumisaika ei ole tiedossa, näytteenotto aloitetaan sen jälkeen, kun veden lämpötila ylittää 17 °C;

b) Näytteet on testattava käyttämällä i alakohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä liitteessä II olevan 4 osan I jaksossa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti;

i) nilviäisten marteilioosin esiintyminen katsotaan vahvistetuksi, jos histopatologiaan, kudosleimausnäytteisiin tai *in situ* -hybridisaatioon perustuva positiivinen tulos yhdistetään PCR-menetelmällä saatuun positiiviseen tulokseen ja täydennetään sekvensoinnilla;

ii) nilviäisten marteilioosin tartuntaepäily voidaan sulkea pois, jos i alakohdassa tarkoitetut testit eivät tuo esiin lisänäyttöä nilviäisten marteilioosista.

Taulukko 4.A

Jäsenvaltioita, vyöhykkeitä tai lokeroja koskeva I.2.1 kohdassa tarkoitettu seurantaohjelma valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää taudista vapaan aseman saavuttamista nilviäisten marteilioosin osalta

	Terveystarkastusten lukumäärä vuodessa	Laboratoriotutkimusten lukumäärä vuodessa	Nilviäisten lukumäärä näytteessä
Viljelylaitokset/nilviäisten viljelyalueet	1	1	150

Taulukko 4.B

Jäsenvaltioita, vyöhykkeitä tai lokeroja koskevat seurantaohjelmat I.3 kohdassa tarkoitetun taudista vapaan aseman säilyttämiseksi nilviäisten marteilioosin osalta

Riskin taso	Terveystarkastusten lukumäärä	Laboratoriotutkimusten lukumäärä	Nilviäisten lukumäärä näytteessä
Korkea	1 joka vuosi	1 joka toinen vuosi	150
Keskitasoinen	Joka toinen vuosi	Joka toinen vuosi	150
Alhainen	1 joka toinen vuosi	1 joka neljäs vuosi	150

5 OSA

NILVIÄISTEN BONAMIOOSIA (*BONAMIA OSTREAE* -LOISEN AIHEUTTAMAA TARTUNTAA) KOSKEVAT SEURANTA- JA VALVONTAMENETELMÄT

I **Seuranta- ja hävittämisohjelmia koskevat vaatimukset taudista vapaa -terveysaseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi nilviäisten bonamioosin (*Bonamia ostreae* -loisen aiheuttaman tartunnan) osalta**

I.1 Yleiset vaatimukset

Terveystarkastukset ja tarvittaessa näytteenotto tuotantoyksiköistä on suoritettava sellaisena aikana vuodesta, jolloin nilviäisten bonamioosin esiintyvyyden kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa tiedetään olevan korkeimmillaan. Jos tätä tietoa ei ole saatavilla, näytteenotto on suoritettava talvella tai alkukeväästä.

Kun nilviäisistä aiotaan ottaa näytteitä 5 osassa vahvistettujen vaatimusten mukaisesti, on sovellettava seuraavia kriteerejä:

a) Jos tuotantoyksikössä on *Ostrea edulis* -lajia, vain tämän lajin ostereita kerätään näytteeseen. Jos *Ostrea edulis* -lajia ei ole, näytteen on edustettava kaikkia muita viljelyssä olevia taudille alttiita lajeja;

b) jos tuotantoyksikössä on heikkoja, kuori auki olevia tai äskettäin kuolleita mutta ei vielä hajoamistilassa olevia nilviäisiä, on valittava ensisijaisesti tällaisia nilviäisiä. Jos tällaisia nilviäisiä ei ole, valittujen nilviäisten joukossa on oltava vanhimpia terveitä nilviäisiä;

c) otettaessa näytteitä laitoksista, joissa nilviäistuotannossa käytetään useampaa kuin yhtä vesilähdettä, otettaviin näytteisiin on sisällytettävä jokaista vesilähdettä edustavia nilviäisiä niin, että kaikki laitoksen osat ovat suhteellisesti edustettuina näytteessä.

d) otettaessa näytteitä nilviäisten viljelyalueelta, näytteeseen on sisällytettävä nilviäisiä riittävästä määrästä näytteenottopisteitä. Tärkeimmät näiden näytteenottopaikkojen valinnassa huomioon otettavat tekijät ovat aiemmat näytteenottopaikat, joissa nilviäisten bonamioosia havaittiin, eläintiheys, vesien virtaukset, taudille alttiit lajit, tartunnanlevittäjälajit, veden syvyys ja hoitokäytännöt. Viljelyalueella tai sen vieressä sijaitsevat luonnolliset esiintymät on otettava mukaan näytteenottoon.

I.2 Erityisvaatimukset luokan I terveystilanteen saavuttamiseksi nilviäisten bonamioosin osalta

I.2.1 Seurantaohjelmat

jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan III terveystilanne nilviäisten bonamioosin osalta, voi saavuttaa taas luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu vähintään seuraava seurantaohjelma, joka käsittää terveystarkastuksia ja näytteenoton testausta varten.

Kaksivuotinen seurantaohjelma:

a) viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja, on tehty terveystarkastuksia ja otettu näytteitä vähintään kahden peräkkäisen vuoden ajan tässä osassa olevan taulukon 5.A mukaisesti;

b) kyseisen kahden vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulokset ovat olleet negatiivisia nilviäisten bonamioosin suhteen ja kaikki nilviäisten bonamioosin epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

c) kun näytteeseen otetaan *Ostrea edulis* -simpukoita, jotka ovat peräisin jäsenvaltiosta, vyöhykkeeltä tai lokerosta, jossa on luokan I terveystilanne, ne on oltava tuotu kyseiseen viljelylaitokseen tai nilviäisten viljelyalueelle viimeistään välittömästi seurantaohjelman toteuttamisajankohtaa edeltävänä syksynä.

I.2.2 Hävittämisohjelmat

Nilviäisten bonamioosin hävittämistä pidetään useimmissa tapauksissa mahdottomana, mutta jos jäsenvaltio katsoo sen olevan mahdollista, on sovellettava seuraavaa hävittämisohjelman mallia.

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne nilviäisten bonamioosin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikissa viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu vähintään seuraava hävittämisohjelma:

a) direktiivin 2006/88/EY V luvussa olevassa 3 jaksossa vahvistettuja toimenpiteitä on sovellettu käytännössä ja nilviäisten bonamioosin saastuttamiksi virallisesti julistettujen viljelylaitosten tai nilviäisten viljelyalueiden läheisyyteen on erityisesti perustettu kyseisen direktiivin 32 artiklan b alakohdassa tarkoitettu rajoitusalue, johon kuuluu suoja-alue ja seuranta-alue.

Rajoitusalue on määriteltävä tapauskohtaisesti ottaen huomioon nilviäisten bonamioosin leviämiseen vaikuttavat tekijät, kuten: nilviäiskuolemien määrä, osuus, ikä ja jakauma nilviäisten bonamioosin saastuttamassa viljelylaitoksessa tai nilviäisten viljelyalueella, mukaan luettuina luonnonvaraiset nilviäiset; etäisyys lähimpiin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille ja niiden sijaintitiheys, mukaan luettuna luonnonvaraiset nilviäiset; jalostuslaitosten, kontaktilaitosten tai nilviäisten viljelyalueiden läheisyys; viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla olevat lajit, erityisesti taudille alttiit laji ja tartunnanlevittäjälajit; saastuneissa viljelylaitoksissa ja niiden lähellä sijaitsevissa laitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla sovelletut viljelykäytännöt, hydrodynaamiset olosuhteet ja muut identifioidut epidemiologisesti merkittävät tekijät.

Suoja- ja seuranta-alueiden perustamisessa on noudatettava seuraavia vähimmäisvaatimuksia:

i) nilviäisten bonamioosin saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen tai nilviäisten viljelyalueen välittömään läheisyyteen on perustettava suoja-alue, jonka on vastattava asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta;

ii) suoja-alueen ulkopuolelle on perustettava seuranta-alue, jonka on vastattava suoja-aluetta ympäröivää, asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta;

b) kaikissa viljelylaitoksissa ja nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja suoja-alueella ja joita ei ole virallisesti julistettu nilviäisten bonamioosin saastuttamiksi, on tehtävä virallinen tutkimus, joka käsittää vähintään näytteiden keruun 150:n taudille alttiiseen lajiin kuuluvan nilviäisen testaamiseksi nilviäisten bonamioosin tarttumisajan alkamisen jälkeen. Jos tarttumisaika ei ole tiedossa, näytteenotto on aloitettava talvella tai alkukeväästä;

c) kaikki nilviäisten bonamioosin saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset ja nilviäisten viljelyalueet on tyhjennettävä, pidettävä tyhjillään ja, jos mahdollista, puhdistettava ja desinfioitava. Tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi kuukautta.

Kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset tai nilviäisten viljelyalueet on tyhjennetty, niitä on pidettävä samanaikaisesti tyhjillään vähintään neljä viikkoa.

Toimivaltainen viranomainen voi päättää vaatia, että perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitsevat muut viljelylaitokset tai nilviäisten viljelyalueet tyhjennetään, puhdistetaan, desinfioidaan ja pidetään tyhjillään. Toimivaltainen viranomainen määrittää tyhjillään pitämisen keston suorittamansa riskinarvioinnin perusteella;

d) kaikkiin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille, jotka on virallisesti julistettu tartunnan saastuttamiksi, ja kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitseviin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille, joita on pidetty tyhjillään, on istutettava nilviäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne nilviäisten bonamioosin osalta. Istuttaminen on tehtävä vasta, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään I.2.2 kohdan c alakohdan mukaisesti;

e) kaikissa viljelylaitoksissa ja nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja hävittämisohjelman piiriin kuuluvassa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on sen jälkeen toteutettava tämän osan kohdassa I.2 vahvistettu seurantaohjelma.

I.3 Erityisvaatimukset taudista vapaa -terveystilanteen (luokka I) säilyttämiseksi nilviäisten bonamioosin osalta

Kun luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi edellytetään kohdennettua seurantaa direktiivin 2006/88/EY 52 artiklan mukaisesti, kaikissa viljelylaitoksissa tai nilviäisten viljelyalueilla, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja asianomaisessa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on tehtävä terveystarkastukset ja otettava näytteet tämän osan II jaksossa olevan taulukon 5.B mukaisesti ottaen huomioon nilviäisten bonamioosin tartuntariskin taso viljelylaitoksessa tai nilviäisten viljelyalueilla.

Nilviäisten bonamioosista vapaa asema voidaan säilyttää ainoastaan niin kauan kuin II.2 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä käyttämällä kaikkien näytteiden tulokset ovat negatiivisia nilviäisten bonamioosin suhteen ja kaikki nilviäisten bonamioosin epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti.

I.4 Edellytykset direktiivin 2006/88/EY 39 artiklassa säädettyjen rajoittavien toimenpiteiden poistamiseksi (terveystilanteen muutos luokasta V luokkaan III) nilviäisten bonamioosin osalta.

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne nilviäisten bonamioosin osalta, voi saavuttaa luokan III terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta edellyttäen, että

a) I.2.2 kohdan a, b ja c alakohdassa vahvistetut vaatimukset täyttyvät. Jos tyhjillään pitäminen ei ole teknisesti mahdollista, asianomaisiin viljelylaitoksiin on sovellettava vaihtoehtoista toimenpidettä, joka antaa lähes vastaavan takeen nilviäisten bonamioosin hävittämisestä viljelylaitoksen alueelta;

b) kaikkiin nilviäisten bonamioosin saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja nilviäisten viljelyalueille ja kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla tyhjinä pidettyihin tai a alakohdan mukaisesti vaihtoehtoisten toimenpiteiden kohteena olleisiin viljelylaitoksiin tai nilviäisten viljelyalueille on istutettu nilviäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I, II tai III terveystilanne nilviäisten bonamioosin osalta.

c) istuttaminen on tehty vasta sen jälkeen, kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset tai nilviäisten viljelyalueet on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään tai niihin on sovellettu vaihtoehtoisia toimenpiteitä a alakohdan mukaisesti.

d) nilviäisten bonamioosin esiintymistä ei ole vahvistettu a, b ja c alakohdassa tarkoitettujen toimenpiteiden loppuun saattamisen jälkeisten kahden vuoden aikana ja tämän ajanjakson aikana epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen menettelyjen mukaisesti.

II **Diagnostiset menetelmät ja diagnoosikriteerit**

II.1 Näytteet

Koko eläin on toimitettava laboratorioon II.2 ja II.3 kohdassa määrättyjen diagnostisten testien suorittamista varten

II.2 Diagnostiset menetelmät taudista vapaan aseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi nilviäisten bonamioosin osalta

Diagnostisten menetelmien, joita käytetään taudista vapaan aseman saavuttamiseksi tai säilyttämiseksi nilviäisten bonamioosin osalta liitteessä II olevassa 5 osassa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti, on oltava histopatologinen tutkimus, kudosnäytteet tai PCR-menetelmä. Sovellettaessa näitä diagnostisia menetelmiä on noudatettava liitteessä II olevassa 5 osassa vahvistettuja vastaavia yksityiskohtaisia menetelmiä ja menettelyjä.

II.3 Diagnoosikriteerit nilviäisten bonamioosin esiintymisen vahvistamiseksi tai sen epäilyn poissulkemiseksi

Kun nilviäisten bonamioosin epäily on vahvistettava tai suljettava pois direktiivin 2006/88/EY 28 artiklan mukaisesti, on noudatettava seuraavaa tarkastus-, näytteenotto- ja testausmenettelyä:

Viralliseen tarkastukseen on sisällyttävä vähintään yksi näytteenotto, johon kerätään 30 taudille alttiiseen lajiin kuuluvaa nilviäisiä, jos epäilys perustuu kuolleisuusraporttiin, tai jos ei perustu, 150 taudille alttiiseen lajiin kuuluvaa nilviäistä, nilviäisten bonamioosin tarttumiskauden alkamisen jälkeen. Jos tarttumisaika ei ole tiedossa, näytteenotto on aloitettava talvella tai alkukeväästä; Näytteet on testattava käyttämällä i alakohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä liitteessä II olevan 5 osan I jaksossa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti.

i) nilviäisten bonamioosin esiintyminen katsotaan vahvistetuksi, jos histopatologiseen tutkimukseen, kudosleimausnäytteisiin tai *in situ* -hybridisaatioon perustuva positiivinen tulos yhdistetään PCR-menetelmällä saatuun positiiviseen tulokseen ja täydennetään sekvensoinnilla liitteessä II olevassa 5 osassa vahvistetuin hyväksytyin menetelmin ja menettelyin;

ii) nilviäisten bonamioosin epäily on suljettava pois, jos kyseiset testit eivät tuo esiin lisänäyttöä nilviäisten bonamioosin esiintymisestä.

Taulukko 5.A

Jäsenvaltioita, vyöhykkeitä tai lokeroja koskeva I.2.1 kohdassa tarkoitettu seurantaohjelma valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää taudista vapaan aseman saavuttamista nilviäisten bonamioosin osalta

	Terveystarkastusten lukumäärä vuodessa	Laboratoriotutkimusten lukumäärä vuodessa	Nilviäisten lukumäärä näytteessä
Viljelylaitokset/Nilviäisten viljelyalueet	1	1	150

Taulukko 5.B

Jäsenvaltioita, vyöhykkeitä tai lokeroja koskevat seurantaohjelmat I.3 kohdassa tarkoitetun taudista vapaan aseman säilyttämiseksi nilviäisten bonamioosin osalta

Riskin taso	Terveystarkastusten lukumäärä	Laboratoriotutkimusten lukumäärä	Nilviäisten lukumäärä näytteessä
Korkea	1 joka vuosi	1 joka toinen vuosi	150
Keskitasoinen	Joka toinen vuosi	Joka toinen vuosi	150
Alhainen	1 joka toinen vuosi	1 joka neljäs vuosi	150

6 OSA

ÄYRIÄISTEN VALKOPILKKUTAUTIA KOSKEVAT SEURANTA- JA VALVONTAMENETELMÄT

I **Seuranta- ja hävittämisohjelmia koskevat vaatimukset taudista vapaa -terveysaseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi äyriäisten valkopilkkutaudin osalta ja äyriäisten valkopilkkutautivirustartuntojen rajoittamiseksi**

I.1 Yleiset vaatimukset tarkastuksille ja näytteenotolle

Näytteenotto äyriäisistä laboratoriotutkimusta varten on suoritettava, kun veden lämpötila on todennäköisesti vuoden korkeimmillaan. Tätä veden lämpötilaa koskevaa vaatimusta sovelletaan myös terveystarkastuksiin silloin, kun ne ovat toteutettavissa ja tarkoituksenmukaisia.

Kun viljeltyjä äyriäisiä kerätään näytteenottoon tässä osassa vahvistettujen vaatimusten mukaisesti, on sovellettava seuraavia kriteerejä:

a) jos tuotantoyksiköissä on heikkoja tai kuolemaisillaan olevia äyriäisiä, on valittava ensisijaisesti tällaisia äyriäisiä. Jos tällaisia äyriäisiä ei ole, näytteeseen on valittava valittuun taudille alttiiseen lajiin ja eri kokokohortteihin kuuluvia äyriäisiä, eli nuoria ja aikuisia, ja niiden on oltava suhteellisesti edustettuina näytteessä;

b) jos äyriäistuotannossa käytetään useampaa kuin yhtä vedensaantilähdettä, näytteessä on oltava kaikkia vedensaantilähteitä edustavia taudille alttiiseen lajiin kuuluvia äyriäisiä.

Kun luonnonvaraisten populaatioiden kohdennettua seurantaa edellytetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan I osan 2 kohdan toisen kohdan mukaisesti, näytteenottokohtien lukumäärä ja maantieteellinen jakauma on määritettävä siten, että kattavuus on kohtuullinen jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa. Näytteenottopaikkojen on myös edustettava erilaisia ekosysteemejä, kuten meriä, suistoja, jokia ja järviä, joissa on taudille alttiita luonnonvaraisia populaatioita.

Kun luonnonvaraisten populaatioiden kohdennettua seurantaa edellytetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan I osan 2 kohdan toisen kohdan mukaisesti, näytteeseen kerättävät äyriäiset on valittava seuraavasti:

i) meri- ja suistoalueilla on valittava yksi tai useampia seuraavista lajeista: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* tai *Penaeus*-suvun katkarapuja eli *Penaeus japonicus, Penaeus kerathurus, Penaeus semisulcatus*. Jos näitä lajeja ei ole, näytteen on edustettava muita *Decapoda*-lahkoon kuuluvia taudille alttiita lajeja. Koska taudille alttiiden isäntälajien määrä on suuri, isäntälajit voidaan valita *Decapoda*-lahkon suvuista tai heimoista, joissa alttius on osoitettu luonnollisesti tai kokeellisesti;

ii) joki- ja järvialueilla on valittava yksi tai useampia seuraavista lajeista: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* tai *Orconectes limosus*. Jos näitä lajeja ei ole, näytteen on edustettava muita *Decapoda*-lahkoon kuuluvia taudille alttiita lajeja. Koska taudille alttiiden isäntälajien määrä on suuri, isäntälajit voidaan valita *Decapoda*-lahkon suvuista tai heimoista, joissa alttius on osoitettu luonnollisesti tai kokeellisesti;

iii) jos joukossa on heikkoja tai kuolemaisillaan olevia äyriäisiä, on valittava ensisijaisesti tällaisia äyriäisiä. Jos tällaisia äyriäisiä ei ole, näytteeseen on valittava valitun taudille alttiin lajin eri ikäkohortteihin kuuluvia äyriäisiä, eli nuoria ja aikuisia, ja niiden on oltava suhteellisesti edustettuina näytteessä.

I.2 Erityisvaatimukset luokan I terveystilanteen saavuttamiseksi äyriäisten valkopilkkutaudin osalta

I.2.1 Seurantaohjelmat

a) Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on direktiivin 2006/88/EY liitteessä III olevassa B osassa tarkoitettu luokan III terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikki viljelylaitokset, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, noudattavat kyseisen direktiivin liitteessä V vahvistettuja asiaa koskevia vaatimuksia ja kaikissa kyseisissä viljelylaitoksissa ja, kun direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevassa I osassa olevan 2 kohdan toisessa kohdassa niin vaaditaan, kyseisen kohdan mukaisesti valituissa luonnonvaraisten populaatioiden näytteenottopaikoissa on toteutettu seuraava kaksivuotinen ohjelma, joka käsittää terveystarkastuksia ja näytteiden keruun testausta varten.

Viljelylaitoksissa tai näytteenottopaikoilla on tehty terveystarkastuksia ja otettu näytteitä vähintään kahden peräkkäisen vuoden ajan II jaksossa olevan taulukon 6.A mukaisesti;

Kyseisen kahden vuoden pituisen ajanjakson aikana II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä suoritettujen kaikille näytteille tehtyjen kokeiden tulokset ovat olleet negatiivisia äyriäisten valkopilkkutaudin suhteen ja kaikki äyriäisten valkopilkkutaudin epäilyt on suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti;

b) jos a alakohdassa tarkoitetun seurantaohjelman täytäntöönpanon aikana kyseiseen seurantaohjelmaan kuuluvassa viljelylaitoksessa vahvistetaan äyriäisten valkopilkkutautivirustartunta ja sen vuoksi viljelylaitoksen luokan II terveystilanne on peruutettu, kyseinen viljelylaitos voi saada välittömästi takaisin luokan II terveystilanteen ja jatkaa seurantaohjelman täytäntöönpanoa taudista vapaan aseman saavuttamiseksi panematta täytäntöön I.2.2 kohdassa vahvistettua hävittämisohjelmaa, edellyttäen, että

i) se on mantereella sijaitseva viljelylaitos, jonka terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta ei riipu ympäröivien luonnonvesien kyseistä lueteltua tautia koskevasta terveystilanteesta direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 3 kohdan mukaisesti;

ii) se on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään; tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa;

iii) sinne on istutettu äyriäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta.

I.2.2 Hävittämisohjelmat

I.2.2.1 Yleiset vaatimukset

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta, voi saavuttaa luokan I terveystilanteen kyseisen luetellun taudin osalta, kun kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on toteutettu vähintään seuraava hävittämisohjelma:

a) direktiivin 2006/88/EY V luvussa olevassa 4 jaksossa vahvistettuja vähimmäistorjuntatoimenpiteitä on sovellettu käytännössä ja äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamiksi virallisesti julistettujen viljelylaitosten läheisyyteen on perustettu kyseisen direktiivin 32 artiklan b alakohdassa tarkoitettu rajoitusalue, johon kuuluu suoja-alue ja seuranta-alue.

Rajoitusalue on oltava määritelty tapauskohtaisesti ottaen huomioon äyriäisten valkopilkkutaudin leviämiseen viljeltyihin ja luonnonvaraisiin äyriäisiin vaikuttavat tekijät, kuten: nilviäiskuolemien määrä, osuus ja jakauma äyriäisten valkopilkkutautitartunnan saastuttamassa viljelylaitoksessa; etäisyys lähimpiin viljelylaitoksiin ja niiden sijaintitiheys; kontaktilaitokset; laitoksissa viljeltävät lajit; saastuneissa viljelylaitoksissa ja niiden lähellä sijaitsevissa laitoksissa sovelletut viljelykäytännöt; hydrodynaamiset olosuhteet ja muut identifioidut epidemiologisesti merkittävät tekijät.

Suoja- ja seuranta-alueiden perustamisessa on noudatettava seuraavia vähimmäisvaatimuksia:

i) äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen välittömään läheisyyteen on perustettava suoja-alue, jonka on vastattava:

1) meri- ja rannikkoalueilla: säteeltään yhden vuorovesikantaman tai vähintään 5 kilometrin mittaisen ympyrän sisään jäävää aluetta – sen mukaan, kumpi on suurempi –, jonka keskipisteenä on äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamaksi virallisesti julistettu viljelylaitos, taikka tätä vastaavaa aluetta, joka on määritetty asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta; tai

2) makeissa vesissä: äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamaksi virallisesti julistetun viljelylaitoksen koko vesistöaluetta; toimivaltainen viranomainen voi rajoittaa suoja-alueen koskemaan vain osia vesistöalueesta edellyttäen, että äyriäisten valkopilkkutaudin leviämisen ehkäisy ei vaarannu;

ii) suoja-alueen ulkopuolelle on perustettava seuranta-alue, jonka on vastattava:

1) merialueilla: suoja-aluetta ympäröivää aluetta, jonka vuorovesikantamat ovat päällekkäisiä; tai suoja-aluetta ympäröivää, sellaiseen ympyrään sisältyvää aluetta, jonka keskus on suoja-alueen keskus ja säde 10 km; taikka vastaavanlaista, asianmukaisten hydrodynaamisten tai epidemiologisten tietojen pohjalta määritettyä aluetta; tai

2) makeissa vesissä: perustetun suoja-alueen ulkopuolista laajennettua aluetta;

b) kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja suoja-alueella ja joita ei ole virallisesti julistettu äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamiksi, on tehtävä virallinen tutkimus, joka käsittää vähintään seuraavaa:

i) näytteiden kerääminen testausta varten 10 äyriäisestä, kun havaitaan äyriäisten valkopilkkutaudin kuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, tai vähintään 150 äyriäisestä, kun kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä ei havaita; ja

ii) yksi terveystarkastus; niissä viljelylaitoksissa, joissa i alakohdassa tarkoitetut testit ovat tuottaneet negatiiviset tulokset, terveystarkastusten tekemistä on jatkettava kerran kuukaudessa sinä aikana, jona veden lämpötila on todennäköisesti vuoden korkeimmillaan, kunnes suoja-alue peruutetaan I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti.

c) kaikki äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamaksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennettävä, puhdistettava, desinfioitava ja pidettävä tyhjillään. Tyhjillään pitämisen keston on oltava vähintään kuusi viikkoa. Kun kaikki tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, niitä on pidettävä samanaikaisesti tyhjillään vähintään neljä viikkoa. Tätä kohtaa on sovellettava myös uusiin viljelylaitoksiin, jotka julistetaan virallisesti tartunnan saastuttamiksi hävittämisohjelman täytäntöönpanon aikana.

Kun tartunnan saastuttamiksi virallisesti julistettuja viljelylaitoksia pidetään tyhjillään, suoja-alueet on muutettava seuranta-alueiksi.

Toimivaltainen viranomainen voi päättää vaatia, että perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla sijaitsevat muut viljelylaitokset tyhjennetään, puhdistetaan, desinfioidaan ja pidetään tyhjillään. Toimivaltainen viranomainen määrittää kyseisen tyhjillään pitämisen keston suorittamansa riskinarvioinnin perusteella;

d) Kaikkiin äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja kaikkiin muihin perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla tyhjinä pidettyihin viljelylaitoksiin on istutettava:

i) äyriäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta; tai

ii) 31. joulukuuta 2020 saakka kestävän siirtymäkauden aikana, äyriäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on hyväksytty äyriäisten valkopilkkutaudin seurantaohjelma.

Istuttaminen on tehtävä vasta, kun kaikki äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu ja desinfioitu ja pidetty tyhjillään I.2.2.1 kohdan c alakohdan mukaisesti;

e) kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja hävittämisohjelman kattamassa jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa ja, kun luonnonvaraisten populaatioiden seurantaa edellytetään, kyseisen direktiivin liitteessä V olevan I osan 2 kohdan toisen kohdan mukaisesti valituissa näytteenottopaikoissa on sen jälkeen toteutettu vähintään I.2.1 kohdassa vahvistettu seurantaohjelma.

I.2.2.2 Vaatimukset taudista vapaan aseman palauttamiseksi äyriäisten valkopilkkutaudin osalta mantereella sijaitseville lokeroille, jotka käsittävät yhden ainoan äyriäisten valkopilkkutaudista aiemmin vapaaksi julistetun viljelylaitoksen

Mantereella sijaitseva lokero, joka käsittää yhden ainoan viljelylaitoksen, jossa on luokan I terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta ja jonka terveystilanne kyseisen luetellun taudin osalta ei riipu ympäröivistä luonnonvesistä direktiivin 2006/88/EY liitteessä V olevan II osan 3 kohdan mukaisesti ja jonka luokan I terveystilanne on peruutettu kyseisen direktiivin 53 artiklan 3 kohdan mukaisesti, voi saada luokan I terveystilanteen takaisin välittömästi sen jälkeen, kun toimivaltainen viranomainen on vahvistanut, että seuraavat edellytykset täyttyvät:

a) äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttama viljelylaitos on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään; tyhjillään pitäminen on kestänyt vähintään kuusi viikkoa;

b) äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamaan viljelylaitokseen on istutettu äyriäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta.

I.3 Erityisvaatimukset taudista vapaa -terveystilanteen (luokka I) säilyttämiseksi äyriäisten valkopilkkutaudin osalta

Kun luokan I terveystilanteen säilyttämiseksi edellytetään kohdennettua seurantaa direktiivin 2006/88/EY 52 artiklan mukaisesti, kaikissa viljelylaitoksissa, joissa pidetään kyseisen direktiivin liitteessä IV olevassa II osassa lueteltuja taudille alttiita lajeja kyseisessä jäsenvaltiossa, vyöhykkeellä tai lokerossa, on tehtävä terveystarkastus ja otettava näytteet II jaksossa olevan taulukon 6.B mukaisesti ottaen huomioon äyriäisten valkopilkkutaudin tartuntariskin taso viljelylaitoksessa.

Jäsenvaltioissa, vyöhykkeillä tai lokeroissa, joissa viljelylaitosten lukumäärä on rajoitettu eikä näiden viljelylaitosten kohdennettu seuranta tuota riittävästi epidemiologisia tietoja, taudista vapaan aseman säilyttämistä koskeviin seurantaohjelmiin on sisällyttävä I.1 kohdassa vahvistettujen vaatimusten mukaisesti valitut näytteenottopaikat.

Kyseisten näytteenottopaikat on tarkastettava kiertävällä otannalla siten, että näytteet otetaan vuosittain 50 prosentissa näytteenottopaikkoja. Näytteenotto on suoritettava jaksossa II olevan taulukon 6.B mukaisesti. Näytteet on valittava, valmistettava ja tutkittava II jaksossa vahvistettujen diagnostisten ja näytteenottomenetelmien mukaisesti, ja laboratoriotutkimusten tulosten on oltava negatiivisia äyriäisten valkopilkkutaudin taudinaiheuttajan esiintymisen suhteen.

Taudista vapaa asema säilyy ainoastaan niin kauan kuin kaikkien II.2 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä käyttämällä testattujen näytteiden tulokset ovat negatiivisia äyriäisten valkopilkkutaudin suhteen ja kaikki äyriäisten valkopilkkutautiepäilyt on suljettu pois virallisen tutkimuksen ja II.3 kohdassa vahvistettujen diagnostisten menetelmien mukaisesti.

I.4 Edellytykset direktiivin 2006/88/EY 39 artiklassa säädettyjen rajoittavien toimenpiteiden poistamiseksi (terveystilanteen muutos luokasta V luokkaan III) äyriäisten valkopilkkutaudin osalta

Jäsenvaltio, vyöhyke tai lokero, jossa on luokan V terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta, voi saavuttaa luokan III terveystilanteen kyseiseen luetellun taudin osalta edellyttäen, että

a) I.2.2.1 kohdan a, b ja c alakohdassa vahvistetut vaatimukset täyttyvät. Jos tyhjillään pitäminen ei ole teknisesti mahdollista, viljelylaitoksiin on sovellettava vaihtoehtoista toimenpidettä, joka antaa lähes vastaavan takeen äyriäisten valkopilkkutautiviruksen hävittämisestä viljelylaitoksen alueelta;

b) kaikkiin äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamiksi virallisesti julistettuihin viljelylaitoksiin ja kaikkiin muihin tyhjinä pidettyihin tai perustetuilla suoja- ja seuranta-alueilla a alakohdan mukaisesti vaihtoehtoisten toimenpiteiden kohteina olleisiin viljelylaitoksiin on istutettu äyriäisiä, jotka ovat peräisin jäsenvaltioista, vyöhykkeiltä tai lokeroista, joissa on luokan I, II tai III terveystilanne äyriäisten valkopilkkutaudin osalta;

c) istuttaminen on tehty vasta, kun kaikki äyriäisten valkopilkkutaudin saastuttamiksi virallisesti julistetut viljelylaitokset on tyhjennetty, puhdistettu, desinfioitu ja pidetty tyhjillään tai niihin on sovellettu vaihtoehtoisia toimenpiteitä a alakohdan mukaisesti;

d) äyriäisten valkopilkkutautia ei ole havaittu a ja b kohdassa vahvistettujen toimenpiteiden loppuun saattamisen jälkeisten kahden vuoden aikana ja epäilyt on tämän ajanjakson aikana suljettu pois II.3 kohdassa vahvistettujen menettelyjen mukaisesti.

II **Diagnostiset ja näytteenottomenetelmät**

II.1 Näytteet

Näytteet testieläimen integumentista orvaskedestä joko irtileikattuna tai kävelyraajoihin, pleopodeihin, suuosiin tai kiduksiin sisältyvänä on kiinnitettävä 95-prosenttisessa etanolissa ennen näytteiden valmistelua kaksivaiheista PCR-menetelmää varten.

Muitakin näytteitä, jotka on kiinnitetty histologista tutkimusta ja elektronimikroskopiaa varten, voidaan kerätä PCR-menetelmästä saatavien diagnoositietojen tukemiseksi.

II.2 Diagnostiset menetelmät taudista vapaan aseman saavuttamiseksi ja säilyttämiseksi äyriäisten valkopilkkutaudin osalta

Diagnostisen menetelmän, jota käytetään taudista vapaan aseman saavuttamiseksi tai säilyttämiseksi äyriäisten valkopilkkutaudin osalta liitteessä II olevassa 6 osassa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti, on oltava kaksivaiheinen PCR-menetelmä.

Jos kaksivaiheisella PCR-menetelmällä saadaan positiivinen tulos, tulos on vahvistettava amplikonin sekvensoinnilla ennen direktiivin 2006/88/EY 28 artiklassa säädettyjen ensivaiheen torjuntatoimenpiteiden täytäntöönpanoa, jos mahdollista käytännön olosuhteissa, osoittamalla äyriäisten valkopilkkutaudin patognomoniset merkit kyseisissä valituissa alttiisiin lajeihin kuuluvissa isännissä histologisella tutkimuksella ja elektronimikroskopialla.

II.3 Virallinen tutkimus ja diagnostiset menetelmät äyriäisten valkopilkkutautitartunnan vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi

Kun äyriäisten valkopilkkutautitartunta on vahvistettava tai tällaisen tartunnan epäily on vahvistettava tai suljettava pois direktiivin 2006/88/EY 28 artiklan mukaisesti, on noudatettava seuraavia tarkastus-, näytteenotto- ja testausmenettelyjä:

a) viralliseen tutkimukseen on kuuluttava vähintään yksi terveystarkastus ja yksi 10 äyriäisen näytteenotto, kun havaitaan valkopilkkutaudin kuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä, tai vähintään 150 äyriäisen, kun ei havaita kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä. Näytteet on testattava II.2 kohdassa vahvistetuilla diagnostisilla menetelmillä. (kaksivaiheinen PCR);

b) äyriäisten valkopilkkutaudin esiintyminen katsotaan vahvistetuksi, kun tässä liitteessä II olevassa 6 osassa vahvistettujen yksityiskohtaisten diagnostisten menetelmien ja menettelyjen mukaisesti suoritettu kaksivaiheisen PCR-menetelmä, jonka jälkeen suoritetaan sekvensointi, on positiivinen äyriäisten valkopilkkutautivirusten suhteen ja kun valituissa isännissä on äyriäisten valkopilkkutaudin patognomonisia merkkejä.

Äyriäisten valkopilkkutautiepäily voidaan sulkea pois, jos kyseiset testit eivät tuo esiin lisänäyttöä äyriäisten valkopilkkutaudin esiintymisestä.

Taulukko 6.A

Jäsenvaltioita, vyöhykkeitä ja lokeroja koskeva seurantaohjelma I.2.1 kohdassa tarkoitetuksi kahden vuoden valvonta-ajanjaksoksi, joka edeltää taudista vapaan aseman saavuttamista äyriäisten valkopilkkutaudin osalta

	Kliinisten tarkastusten lukumäärä vuodessa	Laboratorio–tutkimusten lukumäärä vuodessa	Äyriäisten lukumäärä näytteessä
Viljelylaitokset/näytteenottopaikat	1	1	150

Taulukko 6.B

Jäsenvaltioita, vyöhykkeitä tai lokeroja koskevat seurantaohjelmat I.3 kohdassa tarkoitetun taudista vapaan aseman säilyttämiseksi äyriäisten valkopilkkutaudin osalta

Riskin taso	Terveystarkastusten lukumäärä	Laboratoriotutkimusten lukumäärä	Äyriäisten lukumäärä näytteessä
Korkea	1 joka vuosi	1 joka toinen vuosi	150
Keskitasoinen	Joka toinen vuosi	Joka toinen vuosi	150
Alhainen	1 joka toinen vuosi	1 joka neljäs vuosi	150

LIITE II

YKSITYISKOHTAISET DIAGNOSTISET MENETELMÄT JA MENETTELYT

I **Johdanto**

Tässä liitteessä vahvistetaan yksityiskohtaiset menettelyt, jotka koskevat diagnostisia menetelmiä, joita käytetään tämän päätöksen liitteessä I vahvistettuihin hävittämis- ja seurantaohjelmiin kuuluvassa laboratoriotutkimuksessa ja direktiivin 2006/88/EY liitteessä IV olevan II osan luetteloon sisältyvien seuraavien muiden kuin eksoottisten tautien, jäljempänä 'luetellut taudit', epäillyn esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi kyseisen direktiivin 57 artiklan b alakohdan mukaisesti.

1.	Virusperäinen verenvuotoseptikemia (VHS-tauti)	1 osa
2.	Tarttuva vertamuodostavan kudoksen kuolio (IHN)	1 osa
3.	Koikarpin herpesvirus (KHV-tauti)	2 osa
4.	Tarttuva lohen anemia (ISA-tauti)	3 osa
5.	Nilviäisten marteilioosi (*Marteilia refringens* -loisen aiheuttama tartunta)	4 osa
6.	Nilviäisten bonamioosi (*Bonamia ostreae* -loisen aiheuttama tartunta)	5 osa
7.	Äyriäisten valkopilkkutauti	6 osa

II **Määritelmät**

Tässä liitteessä 'kuljetuselatusaineella' tarkoitetaan soluviljelyelatusainetta, jossa on 10 % vasikan seerumia ja 200 ky penisilliiniä, 200 µg streptomysiiniä ja 200 µg kanamysiiniä millilitrassa tai muita teholtaan tutkittuja antibiootteja.

1 OSA

YKSITYISKOHTAISET DIAGNOSTISET MENETELMÄT JA MENETTELYT IHN- JA VHS-TAUTIEN SEURANTAA JA NIIDEN ESIINTYMISEN VAHVISTAMISTA VARTEN

I **Diagnostiset menetelmät ja menettelyt IHN- ja VHS-tautien seurantaa varten**

Kun suoritetaan näytteenotto ja laboratoriotutkimuksia, joiden tarkoituksena on saavuttaa tai säilyttää taudista vapaa asema IHN- tai VHS-taudin osalta liitteessä I olevan 1 osan I jakson mukaisesti ja joissa käytetään kyseisen liitteen 1 osan II.1 ja II.2 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä, on sovellettava seuraavissa I.1–I.6 kohdassa vahvistettuja yksityiskohtaisia diagnostisia menetelmiä ja menettelyjä.

I.1 Kaloista otettujen näytteiden valmistelu ja lähettäminen

I.1.1 Kudokset virologista tutkimusta varten soluviljelmissä

Ennen lähettämistä tai laboratorioon siirtämistä tutkittavat elinten kappaleet on irrotettavaan kalasta steriilien dissektiovälineiden avulla ja asetettava kuljetuselatusainetta sisältäviin steriileihin muoviputkiin.

Soluviljelyssä ja RT-qPCR-menetelmällä tehtävään virologiseen tutkimukseen soveltuva kala-aineksen määrä riippuu kalan koosta. Näin ollen kokonainen ruskuaispussipoikanen (ruumiin pituus < 4 cm), sisälmykset munuaiset mukaan lukien (4 < ruumiin pituus < 6 cm) tai suuremmista kaloista munuaiset, perna, sydän ja/tai aivot ja emokalojen ovariaalineste kutuhetkellä ovat kudoksia, joista on otettava näyte.

Enintään 10 kalan ovariaali- tai siemennestettä tai elinten kappaleita voidaan kerätä yhteisnäytteeksi yhteen steriiliin muoviputkeen, joka sisältää vähintään 4 ml kuljetuselatusainetta. Kudoksen painon on oltava vähintään 0,5 grammaa (g) kussakin näytteessä.

Virologinen tutkimus soluviljelmissä on aloitettava mahdollisimman pian ja viimeistään 48 tuntia näytteiden keruusta. Poikkeustapauksissa virologinen tutkimus voidaan aloittaa viimeistään 72 tuntia aineksen keruusta, edellyttäen, että tutkittava aines on suojattu kuljetuselatusaineella ja että kuljetuksen aikana noudatetaan lämpötilavaatimuksia.

I.1.2 Näytteet käänteistranskriptaasi-polymeraasiketjureaktioanalyysia varten (RT-PCR tai RT-qPCR)

Näytteet on otettava kaloista I.1.1 kohdassa kuvatun menettelyn mukaisesti käyttämällä steriiliä välinettä ja siirrettävä kuljetuselatusainetta sisältävään steriiliin muoviputkeen. Yhteen putkeen voidaan kerätä yhteisnäytteeksi 10 kalan kudosta. Jos inokulaatin määrä on pieni, voidaan kuitenkin käyttää enintään viidestä kalasta saatua kudosta. Vaihtoehtoisesti näytteet voidaan yhdistää RNA-stabilointireagensseihin, kuten reagenssiin, jossa on 0,2 g kudosta/ml, valmistajan suosituksen mukaisesti, vaikka jokainen kala on käsiteltävä erikseen eikä niitä saa yhdistää näytteissä eristämiseen käytettävän aineksen vähäisen määrän vuoksi.

Myös kokonaisia kaloja voi lähettää laboratorioon.

I.2 Kaloista otettujen näytteiden lähettäminen

Putket, jotka sisältävät kuljetuselatusaineessa olevia kalakudoksia soluviljelyä tai RT-PCR/RT-qPCR-analyysiä varten, on asetettava eristettyihin säiliöihin, esim. paksuseinäisiin polystyreenilaatikoihin, joihin lisätään riittävä määrä jäätä tai vaihtoehtoista jäähdytysainetta, jolla on samanlainen jäähdyttävä vaikutus, näytteiden jäähdytyksen varmistamiseksi laboratorioon kuljettamisen aikana. Näytteiden jäätymistä on kuitenkin vältettävä. Näytteen lämpötila kuljetuksen aikana ei saa koskaan ylittää 10 °C:ta, ja kuljetuslaatikossa on oltava jäätä vielä vastaanottopaikassa tai yhden tai useamman kylmävaraajan on vielä oltava osittain tai kokonaan jäätynyt.

Kokonaisia kaloja voidaan lähettää laboratorioon, jos ensimmäisessä kohdassa tarkoitetut lämpötilavaatimukset voidaan täyttää kuljetuksen aikana. Kokonaiset kalat on käärittävä imukykyiseen paperiin, ja ne on lopuksi lähetettävä muovipussissa. Myös eläviä kaloja voi lähettää.

I.3 Diagnostisen lisäaineiston kerääminen

Diagnostisen laboratorion luvalla myös muita kalojen kudoksia voidaan kerätä ja valmistella lisätutkimuksia varten.

I.4 Näytteiden valmistelu soluviljelytutkimusta ja RT-qPCR-menetelmää varten

I.4.1 Jäädyttäminen poikkeustapauksissa

Jos näytteitä on käytännön ongelmien vuoksi mahdotonta käsitellä 48 tunnin kuluessa kalojen kudosaineksen keräämisestä, kudosnäytteet voidaan jäädyttää kuljetuselatusaineessa – 20 °C:seen ja suorittaa virologinen tutkimus 14 päivän kuluessa. Kalakudoksen saa kuitenkin jäädyttää ja sulattaa vain kerran ennen tutkimusta. Jokaisen kalakudosnäytteen jäädyttämisen syistä on pidettävä kirjaa.

I.4.2 Elinten homogenointi

Putkissa olevat kalakudokset on homogenoitava täydellisesti laboratoriossa joko stomacher-homogenisaattorin, sekoittimen tai huhmaren ja steriiliä hiekkaa sisältävän morttelin avulla ja sen jälkeen suspendoitava alkuperäiseen kuljetuselatusaineeseen.

Jos näyte koostuu alle 4 cm pitkästä kokonaisesta kalasta, se on leikattava steriileillä saksilla tai skalpellilla pieniksi palasiksi sen jälkeen, kun suolen aukon takana oleva osa ruumiista on poistettu. Jos näyte koostuu 4–6 cm pitkästä kokonaisesta kalasta, on kerättävä sisälmykset, munuaiset mukaan lukien. Jos näyte koostuu yli 6 cm pitkästä kokonaisesta kalasta, kudosnäytteet on kerättävä I.1 kohdan mukaisesti. Kudosnäytteet on leikattava steriileillä saksilla tai skalpellilla pieniksi palasiksi tämän kohdan ensimmäisessä kohdassa kuvatun mukaisesti ja suspendoitava kuljetuselatusaineeseen.

Kudosaineen ja kuljetuselatusaineen lopullinen suhde on säädettävä laboratoriossa suhteeseen 1:10.

I.4.3 Homogenaatin sentrifugointi

Homogenaatti on sentrifugoitava jäähdyttävässä sentrifugissa 2–5 °C:ssa kierrosnopeudella 2 000–4 000 × *g* 15 minuutin ajan, ja supernatantti on kerättävä talteen, ja sitä voidaan käsitellä joko neljä tuntia 15 °C:ssa tai yön yli 4–8 °C:ssa antibiooteilla. Jos näyte on lähetetty elatusaineessa, supernatantin käsittely antibiooteilla voidaan jättää pois.

Jos esiintyy käytännön ongelmia (esimerkiksi inkubaattori menee rikki tai soluviljelyn kanssa on ongelmia), joiden takia on mahdotonta inokuloida soluja 48 tunnin kuluessa kalojen kudosaineksen keräämisestä, supernatantti voidaan jäädyttää – 80 °C:seen ja virologinen tutkimus voidaan suorittaa 14 päivän kuluessa.

Jos talteen kerätty supernatantti varastoidaan – 80 °C:seen 48 tunnin kuluessa näytteenotosta, se voidaan käyttää uudelleen vain kerran virologista tutkimusta varten.

Ennen inokulaatiota soluihin supernatantti on sekoitettava tilavuudeltaan yhtä suureen määrään tarpeen mukaan laimennettua antiseerumiseosta, joka koostuu kotoperäisinä esiintyvien kalojen tarttuvan haimakuoliotaudin (IPN) virusserotyyppien vasta-aineista, ja inkuboitava tällaisena vähintään tunti 15 °C:ssa tai enintään 18 tuntia 4 °C:ssa. Antiseerumin titterin on oltava vähintään 1/2 000 50-prosenttisessa plakkineutralisaatiokokeessa.

Käsittelemällä kaikki inokulaatit IPN-viruksen antiseerumilla pyritään estämään IPN-viruksen aiheuttaman sytopaattisen vaikutuksen (CPE) kehittyminen inokuloiduissa soluviljelmissä. Tämä lyhentää virologisten tutkimusten kestoa sekä vähentää sellaisten tapausten lukumäärää, joissa sytopaattisen vaikutuksen ilmeneminen olisi katsottava VHS- tai IHN-viruksen mahdolliseksi indikaatioksi.

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

I.4.4 Näytteiden valmistaminen RT-PCR- ja RT-qPCR -menetelmiin perustuvia seurantaohjelmia varten

Jos näytteet on kerätty kuljetuselatusaineeseen, on suoritettava I.4.2 ja I.4.3 kohdassa vahvistettu menettely. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti on kerättävä ja RNA uutettava. Jos heti sentrifugoinnin jälkeen ei ole tarkoitus suorittaa jatkotutkimuksia, näytteet on välittömästi jäädytettävä enintään – 20 °C:n lämpötilassa.

RNA-stabilointireagenssissa säilytettyjen kalakudosten analyysia varten jatkotoimet eri lämpötiloissa varastoiduille näytteille on suoritettava seuraavissa määräajoissa:

37 °C:ssa säilytetyt näytteet: yksi päivä;

25 °C:ssa säilytetyt näytteet: yksi viikko;

4 °C:ssa säilytetyt näytteet: yksi kuukausi;

– 20 °C:ssa säilytetyt näytteet: rajoittamaton

RNA-stabilointireagenssiin yhdistetyt yhteisnäytteet on käsiteltävä kuten RNA-stabilointireagenssissa olevat yksittäiset näytteet. RNA-stabilointireagenssiin yhdistettyjen näytteiden osalta näytteen määrä ei saa ylittää määrää, jota valmistaja suosittelee eristämiseen RNA-kitin avulla, kuten RNeasy Mini kits (Qiagen) tai vastaava. Jos suurempia näytteitä yhdistetään yhteisnäytteeksi, eristämiskiteissä tai -menetelmissä on otettava yhdistäminen huomioon.

RNA-stabilointireagensseihin kerättyjä näytteitä ei saa käyttää soluviljelyyn.

I.4.5 Näytteiden yhdistäminen RT-qPCR-menetelmää varten

Koska annetut RT-qPCR-protokollat ovat yhtä herkkiä tai herkempiä kuin soluviljelymenetelmät, PCR-menetelmää varten voi olla hyväksyttävää käyttää enintään 10 kalan yhdistettyjen elinten homogenoidusta kalakudosaineesta saatua supernatanttia soluviljelyelatusaineessa. Koska PCR-menetelmää varten käytetyn inokulaatin määrä on paljon pienempi verrattuna soluviljelyyn, kaikki kalakudokset on homogenoitava huolellisesti ennen aineksen kokoamista eristämistä varten.

Samaa periaatetta on sovellettava myös, jos näytteet kerätään RNA-stabilointireagensseihin. Tällöin on kuitenkin usein vaikea kerätä edustavaa ainesta jopa 10 kalasta yhteen putkeen, joten kalojen määrä yhteisnäytettä kohti on näin ollen vähennettävä 2–5:een.

I.5 Virologinen tutkimus soluviljelmillä

I.5.1 Soluviljelmät ja elatusaineet

Bluegill fry -solulinjaa 2 (BF-2, isoaurinkoahvenen poikaset) tai Rainbow trout gonad -solulinjaa 2 (RTG-2, kirjolohen sukurauhaset) ja joko *Epithelioma papulosum cyprini* -soluja (EPC) tai Fathead minnow -soluja (FHM, paksupäämutu) on kasvatettava 20–30 °C:ssa sopivassa elatusaineessa, esimerkiksi Eaglen MEM-elatusaineessa tai sen muunnelmissa, johon on lisätty 10 prosenttia naudan sikiön seerumia ja antibiootteja standardipitoisuuksina.

Kun soluja viljellään suljetuissa pulloissa, elatusaine on puskuroitava bikarbonaatilla. Avoimissa yksiköissä kasvatettavissa soluviljelmissä käytettävä elatusaine voidaan puskuroida tris(hydroksimetyyli)aminometaani-suolahapolla (Tris-HCl) (23 mM) ja natriumbikarbonaatilla (6 mM). pH:n on oltava 7,6 ± 0,2.

Inokulaatiossa kalakudoksen kanssa käytettävien soluviljelmien on mahdollisuuksien mukaan oltava tuoreita, tavallisesti yhden vuorokauden ikäisiä yksikerroksisia soluviljelmiä; 4–48 tunnin ikäiset viljelmät voidaan hyväksyä. Solujen on kasvettava aktiivisesti inokulaatiossa.

I.5.2 Soluviljelmien inokulaatio

Soluviljelmiin on inokuloitava antibioottikäsiteltyä elinsuspensiota kahtena laimennuksena eli primaarilaimennuksena ja lisäksi sen 1:10 laimennoksena, joka on tulosta kudosaineksen lopullisesta laimennuksesta soluviljelyelatusaineeseen suhteessa 1:100 ja 1:1 000 homologisen interferenssin estämiseksi. Vähintään kaksi solulinjaa on inokuloitava I.5.1 kohdan mukaisesti. Inokulaatin koon ja soluviljelyelatusaineen tilavuuden suhteen on oltava noin 1:10.

Kutakin laimennosta ja solulinjaa kohti käytettävän solualueen on oltava vähintään noin 2 cm^2, joka vastaa yhtä kuoppaa 24-kuoppaisessa soluviljelyastiassa. Soluviljelyalustoja on käytettävä aina kun se on mahdollista.

I.5.3 Soluviljelmien inkubaatio

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

Jäädytetyt VHS- ja IHN-virusten kantaliuos on soluviljelmien infektioherkkyyden tarkistamiseksi titrattava vähintään kuuden kuukauden välein tai jos epäillään solujen herkkyyden vähentyneen. Edellä III jaksossa vahvistettua menettelyä on käytettävä, jos mahdollista.

I.5.4 Mikroskopointi

Inokuloidut soluviljelmät on tarkastettava säännöllisesti (vähintään 3 kertaa viikossa) sytopaattisen vaikutuksen ilmenemisen havaitsemiseksi 40–150-kertaisella suurennuksella. Jos havaitaan selvää sytopaattista vaikutusta, viruksen tunnistamismenetelmät on aloitettava välittömästi I.6 kohdan mukaisesti.

I.5.5 Jatkoviljely

Jos sytopaattista vaikutusta ei ole kehittynyt 7–10 päivän primaarisen inkubaation jälkeen, tuoreille soluviljelmille on suoritettava jatkoviljely, jossa käytetään vastaavaa solualuetta kuin primaariviljelmässä.

Kaikista primaariviljelmän muodostavista viljelmistä tai kuopista lähtöisin olevat elatusaineen (supernatantti) osanäytteet on ryhmiteltävä solulinjan mukaan 7–10 päivää inokulaation jälkeen. Ryhmitelmät on inokuloitava tämän jälkeen homologisiin soluviljelmiin laimentamattomina ja laimennettuina suhteessa 1:10 (tuloksena supernatantin lopulliset laimennokset suhteessa 1:10 ja 1:100), kuten I.5.2 kohdassa esitetään. Vaihtoehtoisesti 10 prosentin osanäytteet primaariviljelmän muodostavasta elatusaineesta on inokuloitava suoraan tuoretta soluviljelmää sisältävään kuoppaan (kuopasta kuoppaan -jatkoviljely). Inokulointia voi edeltää kaikkien laimennosten esi-inkubointi IPN-viruksen antiseerumin kanssa sopivana laimennuksena, kuten I.4.3 kohdassa esitetään.

Tämän jälkeen inokuloituja viljelmiä inkuboidaan 7–10 päivän ajan 15 °C:ssa tarkkailun alaisena siten kuin I.5.4 osassa esitetään.

Jos myrkyllistä sytopaattista vaikutusta ilmenee kolmen ensimmäisen päivän sisällä inkubaatiosta, jatkoviljely voidaan suorittaa tässä vaiheessa, mutta soluja on tällöin inkuboitava seitsemän päivän ajan ja jatkoviljeltävä uudelleen seitsemän uuden inkubaatiopäivän ajan. Siinä tapauksessa, että myrkyllinen sytopaattinen vaikutus kehittyy kolmen päivän jälkeen, solut on vaihdettava kerran ja inkubaatiota jatkettava, kunnes 14 vuorokautta on kulunut ensimmäisestä inokulaatiosta. Seitsemänä viimeisenä inkubaatiopäivänä ei saa ilmetä myrkyllisyyttä.

Jos bakteerikontaminaatiota tapahtuu antibioottikäsittelystä huolimatta, jatkoviljelyä ennen on suoritettava sentrifugaatio (2 000–4 000 × g, 15–30 minuuttia 2–5 °C:ssa) ja/tai supernatantin suodattaminen 0,45 µm:n kalvolla (jolla on heikko proteiineja sitova ominaisuus) tai molemmat. Tämän lisäksi jatkoviljelyssä on noudatettava samoja menettelyjä kuin myrkyllisen sytopaattisen vaikutuksen osalta kuvataan tämän kohdan neljännessä alakohdassa.

Jos sytopaattista vaikutusta ei ilmene, testiä voidaan pitää negatiivisena.

I.6 Viruksen tunnistaminen

Jos soluviljelmässä on havaittu sytopaattisen vaikutuksen kehittymistä, elatusaine (supernatantti) on kerättävä talteen ja tutkittava yhdellä tai useammalla seuraavista menetelmistä: entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA), immunofluoresenssi (IF), neutralointi, RT-PCR tai RT-qPCR. Jos virusta ei pystytä varmuudella tunnistamaan näissä testeissä viikon kuluessa, supernatantti on toimitettava direktiivin 2006/88/EY liitteessä VI tarkoitettuun kansalliseen vertailulaboratorioon tai EU:n kalatauteja tutkivaan vertailulaboratorioon välitöntä tunnistusta varten.

I.6.1 ELISA

Virusisolaatin tunnistamiseksi on suoritettava DAS-ELISA. Microwell-levyt on peitettävä 50 µl/kuoppa (0,9 pg) tutkittua laatua olevasta kanin antiseerumista IHN- tai VSH-viruksia vastaan saaduilla proteiini A:lla puhdistetuilla immunoglobuliineilla (Ig) laimennettuna karbonaattipuskurilla (pH 9,6), jossa on 15 mM natriumatsidia, ja inkuboitava 18 tuntia – 2 viikkoa 4 °C:ssa.

Laimennuslevyllä kukin näyte, jossa on 1 % Triton X-100:aa, ja positiivikontrollit on laimennettava puskuriliuoksella (eli fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) 4-kertaiseksi laimennossarjaksi: laimentamaton, 1:4, 1:16, 1:64. ELISA-levyt on pestävä PBS:ssä, joka sisältää 0,05 % Tween-20:ta (PBS-T), ja 50 µl kutakin laimennosta on siirrettävä laimennuslevyltä pestylle ja päällystetylle ELISA-levylle.

Sitten ELISA-levyt on inkuboitava 30 minuutin ajan 37 °C:ssa. Sen jälkeen levyt on pestävä ja inkuboitava 30 minuutin ajan 37 °C:ssa spesifisillä monoklonaalisilla vasta-aineilla (eli VHS-viruksen tunnistamista varten MAb IP5B11 ja IHN-viruksen tunnistamista varten Hyb 136–3). ELISA-levylle on siirrettävä 50µl piparjuuriperoksidaasi (HRP) -konjugoituja kanin anti-hiiri-vasta-aineita, jotka on laimennettu suhteessa 1:1 000 PBS-T-BSA:ssa.

Uuden pesun jälkeen on kehitettävä reaktioita lisäämällä o-fenyleenidiamiinia (OPD) 50 µl/kuoppa. ELISA-levyt on inkuboitava 20 minuutin ajan huoneenlämpötilassa pimeässä ja reaktio pysäytettävä lisäämällä 0,5 M H_2SO_4 100 µl/kuoppa.

Absorbanssia on seurattava aallonpituudella 492 ja 620 nm ELISA-lukijassa. Näytteet on merkittävä positiivisiksi tai negatiivisiksi sen jälkeen, kun testin tuloksia on verrattu positiivi- ja negatiivikontrollien absorbanssiarvoihin. Negatiivisina pidetään yleensä näytteitä, joiden yhteenlaskettu absorbanssi (A) on < 0,5 laimentamattomassa aineksessa, epäilyttävinä pidetään näytteitä, joiden A-arvot ovat 0,5–1,0, ja positiivisina pidetään näytteitä, joiden A-arvot ovat > 1,0.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja ELISA-versioita.

I.6.2 Immunofluoresenssi (IF)

Lueteltujen patogeenien, VHS- ja IHN-virusten, tunnistaminen on suoritettava infektoimalla soluja "Black" 96-kuoppalevyillä, tavanomaisilla 24-kuoppalevyillä tai 24-kuoppalevyjen peitelaseilla. Kun VHS- tai IHN-virus tai molemmat on tunnistettu infektoimalla soluja peitelaseilla, on sovellettava seuraavaa menettelyä:

a) peitelaseille on istutettava soluja tiheydellä, joka johtaa 60–90-prosenttiseen peittoon 24 tunnin viljelyn jälkeen. EPC-soluja on mahdollisuuksien mukaan käytettävä tähän tarkoitukseen, koska ne kiinnittyvät voimakkaasti lasipintoihin, mutta myös muita solulinjoja voidaan käyttää (esim. BF-2, RTG-2 tai FHM). 150 µl soluviljelmien supernatanttia on inokuloitava kahtena eri laimennoksena (1:10 ja 1:1 000) duplikaattina yhden vuorokauden ikäisiin yksikerroksisiin soluviljelmiin ja inkuboitava 15 °C:ssa 24 tunnin ajan;

b) sen jälkeen soluviljelyelatusaine on poistettava ja tartutettujen solujen yksikerroksiset viljelmät on kiinnitettävä 0,5 ml:llä jääkylmää vesipitoista asetoniliuosta (80 % vol:vol). Kiinnityksen on tapahduttava vetokaapissa 15 minuutin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen asetoniliuos on poistettava ja peitelasit on ilmakuivattava vähintään 30 minuutin ajan. Tässä vaiheessa levyt on käsiteltävä välittömästi tai säilytettävä – 20 °C:ssa jatkokäyttöä varten;

c) spesifit monoklonaaliset vasta-aineet (VHS-viruksen tunnistamista varten Mab IP5B11 ja IHN-viruksen tunnistamista varten Hyb 136–3) on laimennettava 0,01 M:iin PBST:tä, pH 7,2, monoklonaalisten vasta-aineiden toimittajan suosittamalla laimennuksella; Kiinnitettyyn yksikerrosviljelmään on lisättävä 50–100 µl/kuoppa, ja levyt on inkuboitava yhden tunnin ajan 37 °C:ssa kosteassa tilassa;

d) peitelasit on pestävä varovasti kolmeen kertaan puskuroidulla suolaliuoksella (PBS), jossa on 0,05 prosenttia Tween-20:tä (PBS-T), ja puskuriliuos on oltava täysin poistettu viimeisen huuhtelun jälkeen. Tämän jälkeen soluja on inkuboitava tunnin ajan 37 °C:ssa käyttämällä primaarisena vasta-aineena fluoreseiini-isotiosyanaatti- (FITC) tai tetrametyylirodamiini-5-(ja -6-) isotiosyanaatti (TRITC) -konjugoituja hiiren immunoglobuliinin vasta-aineita, jotka on laimennettu toimittajan ohjeiden mukaan, pestävä uudelleen PBS-T:ssä ja kuivattava. Värjäytyneet viljelmät on kiinnitettävä lasilevyille käyttämällä glyserolisuolaliuosta, ja niitä on tarkasteltava tulevan ultraviolettisäteilyn (UV) alla. On käytettävä 10 × tai 12 × -okulaaria ja × 25 tai × 40 -objektiivilinssejä, joiden vastaavat numeeriset aukot ovat > 0,7 ja > 1,3.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja IF-menetelmiä soluviljelyn, kiinnityksen ja vertailulaatua olevien vasta-aineiden osalta.

I.6.3 Neutralisaatio

Talteen kerätystä supernatantista on poistettava solut sentrifugoinnilla (kierrosnopeus 2 000–4 000 × *g*) tai 0,45 µm:n kalvosuodattimella, jolla on heikko proteiineja sitova ominaisuus, ja supernatantti on laimennettava suhteessa 1:100 ja 1:10 000 soluviljelyelatusaineessa.

Supernatantin vähintään kahden laimennoksen osanäytteet on sekoitettava, ja niitä on inkuboitava erikseen 60 minuutin ajan 15 °C:ssa yhdessä seuraavien reagenssien samansuuruisten osien kanssa:

a) seerumi, joka sisältää VHS-viruksen ryhmäspesifistä vasta-ainetta 1:50-laimennoksena (vol:vol);

b) seerumi, joka sisältää IHN-viruksen ryhmäspesifistä vasta-ainetta 1:50-laimennoksena (vol:vol);

c) IPN-viruksen kotoperäisten serotyyppien antiseerumiseosta 1:50-laimennoksena (vol:vol);

d) pelkkää elatusainetta (positiivikontrolli).

Kustakin viruksen supernatantti-seerumi-seoksesta on inokuloitava vähintään kaksi soluviljelmää 50 µl:lla kukin ja sitten inkuboitava 15 °C:ssa. Sytopaattisen vaikutuksen kehittyminen on tarkastettava I.5.4 kohdassa kuvatulla tavalla.

VHS-viruskannat ja -isolaatit, jotka eivät reagoi neutralisaatiokokeissa, on tunnistettava IF:n tai ELISA:n avulla.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja neutralisaatiotestejä.

I.6.4 RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1 Virus-RNA:n valmistelu

Kaikki RNA:han liittyvä työ on suoritettava jäähauteessa käsineet kädessä.

RNA on eristettävä käyttämällä fenolikloroformimenetelmää tai affiniteettipuhdistamalla RNA spin-kolonneilla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kaupallisia RNA-eristämiskittejä, jotka tuottavat korkealaatuisia RNA:ta, joka soveltuu käytettäväksi jäljempänä esitettyjen PCR-protokollien kanssa, saa käyttää.

RNA on suspendoitava uudelleen tislattuun RNase-vapaaseen veteen (eli 0,1-prosenttisella dietyyli-pyrokarbonaatilla käsiteltyyn veteen) tai soveltuvaan eluointipuskuriin.

I.6.4.2 RT-PCR

IHN-viruksen osoittamiseksi on käytettävä seuraavia alukkeita:

Etualuke 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

Taka-aluke 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

On käytettävä seuraavia syklejä (yksivaiheinen RT-PCR): 1 sykli: 50 °C 30 minuuttia; 1 sykli: 95 °C 2 minuuttia; 30 sykliä: 95 °C 30 sekuntia, 50 °C 30 sekuntia, 72 °C 60 sekuntia; 1 sykli: 72 °C 7 minuuttia ja liotus 4 °C:ssa.

VHS-viruksen osoittamiseksi on käytettävä seuraavia alukkeita:

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

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

On käytettävä seuraavia syklejä (yksivaiheinen RT-PCR): 50 °C 30 minuuttia, 95 °C 15 minuuttia, 35 sykliä 94 °C 30 sekuntia, 55 °C 30 sekuntia ja 68 °C 60 sekuntia. Tämän jälkeen reaktiota on pidettävä vähintään 68 ƒC:n lämpötilassa 7 minuutin ajan.

RT-PCR-reaktioiden määrä ja spesifisyys on arvioitava geelielektroforeesilla 1,5-prosenttisessa agaroosigeelissä, jossa on etidiumbromidia, ja todettava käyttämällä UV-läpivalaisua. IHN-viruksen osalta voidaan havaita 693 emäsparin PCR-amplikoni. VHS-viruksen osalta sen on oltava kooltaan 505 emäsparia.

PCR:n tulokset saattavat vaihdella suoritusolosuhteiden mukaan, joten lämpötilaprotokollat saatetaan joutua optimoimaan käytössä olevan lämpöblokin mukaan. Lisäksi voi ilmetä vääriä positiivisia tuloksia alukkeen väärän kiinnittymisen tai laboratorion saastumisen vuoksi. Siksi on varmuuden vuoksi otettava mukaan asianmukaiset positiivi- ja negatiivikontrollit sekä sekvenssiamplikonit. VHS-virusalukkeiden osalta on oltava erityisen varovainen käytettäessä BF-2-soluja, sillä alukkeet voivat reagoida solulinjan DNA/RNA:n kanssa ja antaa samansuuruisia vääriä positiivisia tuloksia. Kun testataan supernatanttia BF-2-soluista, mahdolliset monistetut PCR-fragmentit on sekvensoitava.

I.6.4.3 RT-qPCR VHS-virusmääritystä varten

VHS-virusmääritystä varten on suoritettava monistus käyttämällä seuraavia alukkeita ja koettimia:

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

Taka-aluke: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′;

ja koetin: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Yksivaiheinen RT-qPCR:

Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Ajo-olosuhteet: 50 °C 30 minuuttia, 95 °C 15 minuuttia, 40 sykliä 94 °C 15 sekuntia, 60 °C 40 sekuntia ja 72 °C 20 sekuntia; mukautettava tarvittaessa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja RT-PCR- tai RT-qPCR-versioita.

I.6.4.4 RT-qPCR IHN-virusmääritystä varten

IHN-viruksen osalta on suoritettava monistus käyttämällä seuraavia alukkeita ja koetinta:

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

Taka-aluke: 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3′;

ja koetin: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Kaksivaiheinen RT-qPCR:

Koska seuraava määritys riippuu kaksivaiheisesta monistuksesta, on noudatettava erityistä varovaisuutta käsiteltäessä putkia yhdestä reaktiosta toiseen saastumisen ehkäisemiseksi.

Ajo-olosuhteet (RT-vaiheen jälkeen): 50 °C 2 minuuttia, 95 °C 10 minuuttia, minkä jälkeen 40 sykliä 95 °C 15 sekuntia ja 60 °C 1 minuutti; mukautettava tarvittaessa.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja RT-PCR- tai RT-qPCR-versioita.

II **Yksityiskohtaiset diagnostiset menetelmät ja menettelyt VHS- tai IHN- tai molempien epäilyn vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi epäillyissä taudinpurkauksissa**

Kun IHN- tai VHS-taudin tai molempien esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi direktiivin 2006/88/EY 57 artiklan b alakohdan mukaisesti edellytetään laboratoriotutkimusta, jossa käytetään liitteessä I olevan 1 osan II.3 kohdassa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä, on sovellettava seuraavia yksityiskohtaisia diagnostisia menetelmiä ja menettelyjä:

a) tavanomainen viruseristys ja sen jälkeen virusneutralisaatio, viruksen immunokemiallinen tai molekulaarinen tunnistaminen,

b) viruksen osoittaminen RT-PCR- tai RT-qPCR-menetelmällä;

c) muut diagnostiset menetelmät, kuten IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

II.1 Tavanomainen viruseristys ja sitä seuraava viruksen serologinen tunnistaminen

II.1.1 Näytteiden valinta

Tutkimusta varten on valittava vähintään 10 kalaa, joissa ilmenee tyypillisiä IHN- tai VHS-taudin merkkejä.

II.1.2 Kaloista otettujen näytteiden valmistelu ja lähettäminen

Valmistelussa ja lähettämisessä tavanomaista viruseristystä varten on noudatettava I.2 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.1.3 Diagnostisen lisäaineiston kerääminen

Diagnostisen lisämateriaalin keräämisessä tavanomaista viruseristystä varten on noudatettava I.3 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.1.4 Näytteiden valmistelu soluviljelytutkimusta varten

Näytteiden valmistelussa soluviljelytutkimusta varten tavanomaista viruseristystä varten on noudatettava I.4 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.1.5 Soluviljelmien virologinen tutkimus

Virologisessa tutkimuksessa tavanomaista viruseristystä varten on noudatettava I.5 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.1.6 Viruksen tunnistaminen

Viruksen tunnistamisessa tavanomaista viruseristystä varten on noudatettava I.6 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.2 Viruksen osoittaminen RT-qPCR-menetelmällä

II.2.1 Näytteiden valinta

Näytteiden valinnassa tavanomaista viruseristystä varten on noudatettava I.1.2 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.2.2 Kaloista otettujen näytteiden valmistelu ja lähettäminen

Näytteiden valmistelussa ja lähettämisessä viruksen osoittamiseksi RT-qPCR-menetelmällä on noudatettava I.2 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.2.3 Diagnostisen lisäaineiston kerääminen

Diagnostisen lisäaineiston keräämisessä viruksen osoittamiseksi RT-qPCR-menetelmällä on noudatettava I.3 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.2.4 Näytteiden valmistelu RT-qPCR-menetelmää varten

Näytteiden valmistelussa viruksen osoittamiseksi RT-qPCR-menetelmällä on noudatettava I.6.4.1 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.2.5 RT-qPCR

Viruksen osoittamisessa RT-qPCR-menetelmällä on noudatettava I.6.4.1, I.6.4.3 ja I.6.4.4 kohdassa vahvistettuja menetelmiä ja menettelyjä.

II.3 Muut diagnostiset menetelmät

I.4.3 kohdassa kuvatulla tavalla valmistetulle supernatantille voidaan tehdä I.6.1 kohdan mukaisesti ELISA, I.6.2 kohdan mukaisesti epäsuora fluoresenssivasta-ainetesti (IFAT) tai I.6.4 kohdan mukaisesti RT-PCR-menetelmä. Kudosaines voidaan tutkia muilla diagnostisilla menetelmillä, kuten jäähdytettyjen kantojen IFAT-testi tai formaliinilla kiinnitetyn kudosaineksen immunohistokemia. Kyseisiä nopeita menetelmiä on täydennettävä virologisella tutkimuksella II kohdan joko a tai b alakohdan mukaisesti 48 tunnin kuluessa näytteenotosta, jos

a) on saatu negatiivinen tulos; tai

b) ensimmäistä IHN- tai VHS-tapausta edustavasta aineksesta on saatu positiivinen tulos.

III **Titraatiomenettely soluviljelmien infektioherkkyyden tarkistamiseksi**

Kun suoritetaan I.5.3 kohdassa tarkoitettu titraatio soluviljelmien infektioherkkyyden tarkistamiseksi, on noudatettava tämän kohdan seuraavissa kohdissa vahvistettuja menettelyjä.

On käytettävä ainakin kahta VHS-virusisolaattia ja yhtä IHN-virusisolaattia. Isolaattien on edustettava tärkeimpiä Euroopan unionissa esiintyviä virusryhmiä, esimerkiksi VHS-viruksen osalta on mukana oltava yksi kirjolohen patogeeninen isolaatti makeasta vedestä ja yksi piikkikampelan patogeeninen isolaatti merivedestä ja IHN-viruksen osalta yksi kirjolohen patogeeninen kanta Euroopan unionista. On käytettävä jäsenvaltioista peräisin olevia hyvin määriteltyjä isolaatteja. Viruksia, jotka ovat peräisin vain muutaman kerran siirrostetuista viljelmistä, on viljeltävä solusviljelypulloissa, joissa on BF-2- tai RTG-2-soluja VHS-virusmääritystä varten tai EPC- tai FHM-soluja IHN-virusmääritystä varten. Soluviljelyelatusaineessa on oltava vähintään 10 % seerumia. Inokulaatiossa on käytettävä alhaista infektiokerrointa (< 1).

Kun sytopaattinen vaikutus on täysin kehittynyt, virus otetaan talteen sentrifugoimalla soluviljelmien supernatanttia kierrosnopeudella 2 000 × *g* 15 minuutin ajan, minkä jälkeen neste steriloidaan 0,45 µm:n kalvosuodattimella ja jaetaan etiketillä varustettuihin kryoputkiin. Virus on säilytettävä – 80 °C:ssa.

Viikon kuluttua jäädyttämisestä kolme rinnakkaisnäytepulloa on sulatettava kylmässä vedessä, ja virusnäytteet on titrattava vastaavilla solulinjoillaan. Vähintään 6 kuukauden välein tai aina, kun epäillään solulinjan herkkyyden vähentyneen, kukin virusisolaatti on sulatettava ja titrattava.

Titraatiomenettelyt on kuvattava yksityiskohtaisesti, ja joka kerran on noudatettava samaa menettelyä.

Jos titrauksessa määritetään loppupistelaimennos, määritykseen on otettava vähintään 6 rinnakkaisnäytettä kustakin laimennusvaiheesta. Tittereitä on verrattava aiemmin saatuihin tittereihin. Jos jollekin kyseisiin kolmeen virusisolaattiin kuuluvista isolaateista saadaan titteri, joka laskee 2 log-kertaluvun verran tai enemmän kuin alkuperäinen titteri, kyseistä solulinjaa ei saa enää käyttää seurantatarkoituksiin.

Jos laboratoriossa pidetään erilaisia solulinjoja, kukin linja on tutkittava erikseen.

Kirjanpito on säilytettävä vähintään 10 vuotta.

2 OSA

YKSITYISKOHTAISET DIAGNOSTISET MENETELMÄT JA MENETTELYT KHV-TAUDIN SEURANTAA JA SEN ESIINTYMISEN VAHVISTAMISTA VARTEN

I **Yksityiskohtaiset diagnostiset menetelmät ja menettelyt KHV-taudin esiintymisen vahvistamiseksi tai sen epäilyn poissulkemiseksi**

Kun KHV-taudin esiintymisen vahvistamiseksi tai sen epäilyn poissulkemiseksi direktiivin 2006/88/EY 57 artiklan b alakohdan mukaisesti edellytetään laboratoriotutkimusta, jossa käytetään liitteessä I olevan 2 osan III jaksossa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä, on sovellettava tämän osan I.1–I.2 kohdassa vahvistettuja yksityiskohtaisia diagnostisia menetelmiä ja menettelyjä:

I.1 Kaloista otettujen näytteiden valmistelu

Diagnostisia tarkoituksia varten testauksessa tavanomaisilla PCR- tai qPCR-reaktioon perustuvilla menetelmillä voidaan käyttää kaloja (lähetettyinä elävinä tai tapettuina ja erikseen pakattuina aseptisiin sinetöityihin säiliöihin) tai vaihtoehtoisesti jäädytettyjä elimiä tai elinten kappaleita, jotka on säilötty absoluuttiseen etanoliin tai virusperäiseen kuljetuselatusaineeseen (käsiteltävä 48 tunnin kuluessa keräämisestä).

KH-viruksen osoittamiseksi on kerättävä kidukset ja munuaiset; erilliseen lisänäytteeseen voidaan sisällyttää lisäksi perna, aivot ja suolet. Akuuteissa tapauksissa voidaan yhdistää enintään viiden kalan kudosainesta.

Lisäksi ei-tappavia näytteitä, kuten verta, kiduspyyhkäisynäytteitä, kidusbiopsiaa tai limakalvon kaavintanäytteitä, voidaan käyttää tietyissä tapauksissa (eli hyvin arvokkaita kaloja voidaan käyttää, jos epäillään KH-viruksen esiintymistä).

I.1.1 DNA:n eristäminen

DNA on eristettävä standardimenettelyjen mukaisesti.

Kaupallisesti saatavilla olevia DNA:n eristämiskittejä, jotka tuottavat korkealaatuisia DNA:ta, joka soveltuu käytettäväksi I.2 kohdassa tarkoitettujen PCR-protokollien kanssa, saa käyttää.

I.2 Taudinaiheuttajien osoittaminen ja tunnistamisen polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvilla menetelmillä

I.2.1 qPCR-menetelmä KH-viruksen osoittamista varten

KV-viruksen osoittamiseksi qPCR-menetelmällä on käytettävä seuraavaa qPCR-määritystä:

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

Taka-aluke (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

ja koetin (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Ajo-olosuhteet: yksi sykli 95 °C 15 minuuttia, minkä jälkeen 40 sykliä 94 °C 15 sekuntia ja 60 °C 60 minuuttia. Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja qPCR-versioita.

I.2.2 Tavanomainen PCR KH-viruksen osoittamiseksi

On käytettävä tässä kohdassa kuvattua KH-viruksen tymidiinikinaasi (TK) -geeniin kohdistuvaa määritystä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita PCR-määrityksiä, jolla on osoitettu olevan vastaava herkkyys ja spesifisyys.

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

Taka-aluke (KHV-TKr): 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Ajo-olosuhteet: yksi sykli 95 °C 5 minuuttia ja sen jälkeen 35 sykliä 95 °C 30 sekuntia, 52 °C 30 sekuntia, 72 °C yksi minuutti ja yksi sykli 72 °C 10 minuuttia. Tuotteen koon olisi oltava 409 bp.

PCR:n tulokset saattavat vaihdella suoritusolosuhteiden mukaan, joten lämpötilaprotokollat saatetaan joutua optimoimaan käytössä olevan lämpöblokin mukaan. Lisäksi voi ilmetä vääriä positiivisia tuloksia alukkeen väärän kiinnittymisen tai laboratorion saastumisen vuoksi. Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja PCR-versioita.

Ensimmäinen havainto alueella on vahvistettava joko sekvensoinnilla tai lähetettävä direktiivin 2006/88/EY liitteessä VI tarkoitettuun kansalliseen vertailulaboratorioon tai EU:n kalatauteja tutkivaan vertailulaboratorioon välitöntä tunnistusta varten.

II **Yksityiskohtaiset diagnostiset menetelmät ja menettelyt KHV-taudin seurantaa varten**

Kun taudista vapaan aseman saavuttamiseksi tai säilyttämiseksi KHV-taudin osalta liitteessä I olevan 2 osan I jakson mukaisesti suoritetaan näytteenotto ja laboratoriotutkimukset, joissa käytetään kyseisen liitteen 2 osan II tai III jaksossa määrättyjä diagnostisia menetelmiä, on sovellettava tämän osan II.1 ja II.2 kohdassa vahvistettuja yksityiskohtaisia diagnostisia menetelmiä ja menettelyjä.

II.1 Kaloista otettujen näytteiden valmistelu

Jos mahdollista, näytteet on otettava kaloista, joita on pidetty pitkään virukselle otollisessa lämpötilassa, eli kaksi–kolme viikkoa 15–26 °C:n lämpötilassa. Jos mahdollista, KH-viruksen detektiomahdollisuuksien parantamiseksi näytteet on kerättävä 24 tuntia ja viimeistään 72 tuntia sellaisten hoitokäytäntöjen jälkeen, jotka saattavat reaktivoida viruksen tautia kantavissa kaloissa, kuten verkkojen käyttö tai kuljetus.

KH-viruksen seurantatarkoituksia varten testauksessa PCR-reaktioon perustuvilla menetelmillä voidaan käyttää kaloja, jotka lähetetään elävinä tai tapettuina ja erikseen pakattuina sinetöityihin aseptisiin säiliöihin, tai vaihtoehtoisesti jäädytettyjä elimiä tai elinten kappaleita, jotka on säilötty 80–100-prosenttiseen alkoholiin tai virusperäiseen kuljetuselatusaineeseen (käsiteltävä 48 tunnin kuluessa keräämisestä). KHV-taudin seurantaa varten on kerättävä kidus- ja munuaiskudoksia.

KHV-taudin seurantatarkoituksia varten on mahdollisuuksien mukaan vältettävä näytteiden yhdistämistä. Jos yhdistäminen on välttämätöntä, enintään kahden kalan kudosainesta voidaan yhdistää. Suuremmat näytteet on homogenisoitava huhmaren ja morttelin tai stomacher-homogenisaattorin avulla, ja osanäytteet on otettava talteen DNA:n eristämistä varten ennen kirkastamista. Vaihtoehtoisesti osanäytteet voidaan kerätä kustakin näytteessä olevasta kudoksesta ja sijoittaa ”lyysaysputkiin”.

II.1.1 DNA:n eristäminen

DNA on eristettävä standardimenettelyjen mukaisesti. Kaupallisia DNA:n eristämiskittejä, jotka tuottavat korkealaatuisia DNA:ta, joka soveltuu käytettäväksi II.2 kohdassa vahvistettujen PCR-protokollien kanssa, saa käyttää.

Hyväksyttävä kudos-elatusaine-suhde on 1:9 w/v. Testeihin on otettava 20–25 mg kudosainesta.

II.2 KH-viruksen seuranta PCR-reaktioon perustuvilla menetelmillä

KH-viruksen seurannassa on käytettävä qPCR-menetelmää. Jos alueella, jota ei ole aiemmin vahvistettu positiiviseksi, ilmenee positiivisia näytteitä, testitulokset on vahvistettava joko

a) sekvensoimalla PCR:n tai nested PCR:n tuote näytteistä,

Saadun puhtaan konsensussekvenssin on vastattava (vähintään 98-prosenttisesti) näitä vertailusekvenssejä.

b) tai vaihtoehtoisesti se on lähetettävä kansalliseen vertailulaboratorioon vahvistusta varten.

II.2.1 qPCR-menetelmä KH-viruksen osoittamiseksi

On käytettävä seuraavassa kuvattua qPCR-menetelmää:

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

Taka-aluke (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

ja koetin (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Ajo-olosuhteet: yksi sykli 95 °C 15 minuuttia, minkä jälkeen 50 sykliä 94 °C 15 sekuntia ja 60 °C 60 minuuttia.

qPCR:n tulokset saattavat vaihdella suoritusolosuhteiden mukaan, joten lämpötilaprotokollat saatetaan joutua optimoimaan käytössä olevan lämpöblokin mukaan. Lisäksi voi ilmetä vääriä positiivisia tuloksia alukkeen väärän kiinnittymisen tai laboratorion saastumisen vuoksi. Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja qPCR-versioita.

II.2.2 Tavanomainen PCR KH-viruksen osoittamisen vahvistamiseksi

KH-virustartunnan vahvistamiseksi on käytettävä seuraavassa taulukossa 2.1 kuvattua geneeristä nested PCR:ää, minkä jälkeen monistettu tuote sekvensoidaan.

Taulukko 2.1

Alukkeet ja ajo-olosuhteet kaikkiin koikarpin herpesviruksiin (CyHV-1, CyHV-2 ja CyHV-3) kohdistuvaa nested PCR-määritystä varten.

Alukkeen nimi	Sekvenssi	Ajo-olosuhteet:	Tuotteen koko
CyHVpol-forward	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	PCR-reaktion ensimmäinen kierros *1 sykli:* 95 °C 2 minuuttia *40 sykliä:* 95 °C 30 sekuntia 55 °C 30 sekuntia 72 °C 45 sekuntia *1 sykli:* 72 °C 10 minuuttia	362 bp
CyHVpol-reverse	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Alukkeen nimi	Sekvenssi	Ajo-olosuhteet:	Tuotteen koko
CyHVpol-internal forward	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	PCR-reaktion toinen kierros: *1 sykli:* 95 °C 2 minuuttia *40 sykliä:* 95 °C 30 sekuntia 55 °C 30 sekuntia 72 °C 45 sekuntia *1 sykli:* 72 °C 10 minuuttia	339 bp
CyHVpol-internal reverse	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

PCR-reaktion tulokset saattavat vaihdella suoritusolosuhteiden mukaan, joten lämpötilaprotokollat saatetaan joutua optimoimaan käytössä olevan lämpöblokin mukaan. Lisäksi voi ilmetä vääriä positiivisia tuloksia alukkeen väärän kiinnittymisen tai laboratorion saastumisen vuoksi. Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja PCR-versioita.

Sekvensoinnin voi suorittaa laboratorio tai ulkopuolinen erikoistunut sekvensointiyritys. Sekvensoinnin tulokset on analysoitava mukauttamalla sekvenssit KH-viruksen tunnettuihin vertailusekvensseihin (Gen Bank, tunnusnumerot AP008984, DQ657948 ja DQ177346). Saadun puhtaan konsensussekvenssin on vastattava (vähintään 98-prosenttisesti) näitä vertailusekvenssejä.

3 OSA

YKSITYISKOHTAISET DIAGNOSTISET MENETELMÄT JA MENETTELYT LOHEN TARTTUVAN ANEMIAN (ISA-TAUDIN) SEURANTAA JA SEN ESIINTYMISEN VAHVISTAMISTA VARTEN

I **Näytteenottomenetelmät ISA-taudin seurantaa ja valvontaa varten**

Kun suoritetaan näytteenotto tai laboratoriotutkimus tämän asetuksen liitteessä I olevassa 3 osassa vahvistettuja valvonta- tai hävittämisohjelmia varten tai ISA-taudin esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi direktiivin 2006/88/EY 57 artiklan b alakohdan mukaisesti, on sovellettava tämän jakson I.1, I.2 ja I.3 kohdassa vahvistettuja yksityiskohtaisia menetelmiä ja menettelyjä.

I.1 Kaloista otettujen näytteiden valmistelu

Jos mahdollista, kalanäytteitä ei pidä yhdistää ISA-taudin esiintymisen osoittamiseksi tehtävää laboratoriotutkimusta varten. ISA-taudin seurantaa varten 2–5 kalan yhdistäminen kuitenkin hyväksytään.

Kaikista näytteenottoon kerätystä kaloista on otettava näytteet käänteistranskriptaasi- polymeraasiketjureaktioanalyysiä (RT-PCR) varten. Munuaisen keskiosasta on poistettava pala käyttämällä steriiliä välinettä, ja se on siirrettävä mikrofugiputkeen, joka sisältää yhden millilitran tehokkaaksi osoitettua RNA-säilytysliuosta. Yhteen kuljetuselatusainetta sisältävään putkeen saa kerätä yhteisnäytteeksi enintään viiden kalan kudosta. Yhdessä näytteessä olevien kudosten painon on oltava 0,5 g. Jos kalat ovat liian pieniä vaaditun painoisen näytteen saamiseksi, voidaan ottaa paloja munuaisesta, sydämestä, pernasta, maksasta tai umpisuolesta, tässä järjestyksessä, jotta saadaan kokoon 0,5 grammaa.

Histologiseen tutkimukseen tarkoitetut kudokset saa ottaa ainoastaan juuri tapetusta normaalikuntoisesta kalasta, jossa havaitaan ISA-taudinkuvaan sopivia kliinisiä oireita tai *post mortem* -löydöksiä. Kaikista ulkoisista tai sisäisistä leesioista ja joka tapauksessa yksittäisten kalojen munuaisen keskiosasta, sydämestä, maksasta, haimasta, suolesta, kiduksista ja pernasta on otettava skalpellin avulla näyte, joka siirretään puskuroituun suolaliuokseen, jossa on 8–10 % formolia (vol:vol). Kiinnitysaineen ja kudosmateriaalin välisen suhteen on oltava vähintään 20:1, jotta kudokset säilyisivät riittävän hyvin. Immunohistokemiaa (IHC) varten näytteet on otettava munuaisen keskiosasta ja sydämestä.

Soluviljelyn virologiseen tutkimukseen tarkoitetut kudosnäytteet otetaan kaikista niistä kaloista, jotka on kerätty näytteenottoa varten. Maksasta, munuaisen etu- tai keskiosasta, sydämestä ja pernasta otettavat kudosnäytteet on irrotettava kalasta steriilillä instrumentilla ja siirrettävä muoviputkiin, jotka sisältävät 9 ml kuljetuselatusainetta. Yhteen kuljetuselatusainetta sisältävään putkeen saa kerätä yhteisnäytteeksi enintään viiden kalan kudoksia. Yhdessä näytteessä olevien kudosten painon on oltava 1,0 ± 0,5 g.

I.2 Kaloista otettujen näytteiden lähettäminen

Laboratorioon voidaan lähettää kokonaisia kaloja, jos tämän kohdan 3 kohdassa määritellyt kuljetuslämpötilalle asetetut vaatimukset täyttyvät. Kokonaiset kalat on käärittävä imupaperiin ja lähetettävä muovipussissa kyseisessä kohdassa kuvatulla tavalla jäähdytettyinä.

Myös eläviä kaloja voi lähettää, mutta ainoastaan kansallisen kalatauteja tutkivan vertailulaboratorion valvonnassa ja ottaen huomioon desinfiointiin ja bioturvaamiseen liittyvistä näkökohdat eläviä kaloja kuljetettaessa.

Virologiseen tutkimukseen tai RT-PCR-analyysiin tarkoitetut verinäytteet ja kalan kudoksia sisältävät näyteputket on asetettava eristettyihin säiliöihin, kuten paksuseinäisiin polystyreenilaatikoihin, joissa on riittävästi jäätä tai kylmävaraajia sen varmistamiseksi, että näytteet pysyvät jäähdytettyinä laboratorioon kuljettamisen aikana. Näytteitä on varjeltava jäätymiseltä, ja kuljetuslaatikossa on oltava jäätä vielä lähetyksen vastaanottopaikassa tai yhden tai useamman kylmävaraajan on vielä oltava osittain tai kokonaan jäätynyt. Poikkeustapauksissa RT-PCR-näytteet ja virologisesti tutkittavat näytteet voidaan pikajäädyttää ja kuljettaa laboratorioon – 20 °C:ssa tai sitä alemmassa lämpötilassa.

Ribonukleiinihapossa (RNA) säilytetyille näytteille myöhemmin tehtävää RT-PCR-analyysiä varten RNA:n eristäminen on suoritettava seuraavissa määräajoissa näytteiden säilytyslämpötilan mukaan:

37 °C:ssa säilytetyt näytteet: yksi päivä;

25 °C:ssa säilytetyt näytteet: yksi viikko;

4 °C:ssa säilytetyt näytteet: yksi kuukausi;

– 20 °C:ssa säilytetyt näytteet: rajoittamaton.

Jos kalan kudoksia kuljetetaan histologiseen tutkimukseen kiinnitysaineessa, ne on lähetettävä vuotamattomissa putkissa iskunkestävissä säiliöissä. Näytteiden jäätymistä on vältettävä.

Virologinen tutkimus soluviljelmissä on aloitettava mahdollisimman pian ja viimeistään 48 tuntia näytteiden keruusta. Poikkeustapauksissa virologinen tutkimus voidaan aloittaa viimeistään 72 tuntia aineksen keruusta, edellyttäen, että tutkittava aines on suojattu kuljetuselatusaineella ja että kuljetuslämpötilalle asetetut vaatimukset täyttyvät.

I.3 Diagnostisen lisäaineiston kerääminen

Diagnostisen laboratorion luvalla myös muita kuin I.1 kohdassa tarkoitettuja kalojen kudoksia voidaan kerätä ja valmistella lisätutkimuksia varten.

II **Yksityiskohtaiset diagnostiset menetelmät ja menettelyt ISA-taudin seurantaa varten ja sen esiintymisen vahvistamiseksi tai sen epäilyn poissulkemiseksi**

Kun suoritetaan laboratoriotutkimuksia, joiden tarkoituksena on saavuttaa tai säilyttää tietty terveystilanne ISA-taudin osalta liitteessä I olevan 3 osan I jakson mukaisesti tai vahvistaa ISA-taudin esiintyminen tai sulkea pois sen epäily direktiivin 2006/88/EY 57 artiklan b alakohdan mukaisesti ja joissa käytetään liitteessä I olevan 3 osan II jaksossa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä, on sovellettava seuraavissa kohdissa II.1–II.5 vahvistettuja yksityiskohtaisia menetelmiä ja menettelyjä.

II.1 Näytteiden tutkiminen RT-PRC-menetelmällä

ISA-viruksen seulonnassa käytettävän diagnostisen menetelmän on oltava RT-qPCR. Koska RT-qPCR-menetelmän tulokset voivat vaihdella suoritusolosuhteiden mukaan, on varmuuden vuoksi otettava mukaan riittävät positiivi- ja negatiivikontrollit ja amplikonit.

II.1.1 Kokonais-RNA:n eristäminen

Kaikki RNA:han liittyvä työ on suoritettava jäähauteessa käsineet kädessä.

Kokonais-RNA on eristettävä fenolikloroformimenetelmällä tai affiniteettipuhdistamalla RNA spin-kolonneilla valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Puhdistettu RNA on suspendoitava uudelleen tislattuun RNaasi-vapaaseen veteen (eli 0,1-prosenttisella dietyylipyrokarbonaatilla käsiteltyyn veteen).

Eristetyn RNA:n pitoisuus ja puhtaus on arvioitava mittaamalla optinen tiheys aallonpituuksilla 260 ja 280 nm. Vaihtoehtoisesti voidaan lisätä sisäisiä viruksen genomiin kohdistuvia kontrolleja II.1.3 kohdassa tarkoitetulla tavalla.

II.1.2 RT-PCR-menetelmä ISA-viruksen osoittamiseksi

ISA-viruksen genomin monistamisessa voidaan käyttää useita RT-PCR-menetelmiä. Voidaan suorittaa kaksivaiheinen RT-PCR, jossa RT- ja PCR-reaktioiden vaiheet ajetaan kahdessa erillisessä koeputkessa. Voidaan kuitenkin myös suorittaa yksivaiheinen reaktio, jossa kyseiset kaksi reaktiota ajetaan yhdessä koeputkessa. Yksivaiheista menetelmää on käytettävä mahdollisuuksien mukaan, sillä määritys yhdessä koeputkessa minimoi ristikontaminaation, koska sisältöä ei tarvitse siirtää, ja sitä pidetään yhtä herkkänä kuin kaksivaiheista menetelmää.

On käytettävä tässä kohdassa kuvattuja alukkeita ja määritystä eli ILA1- tai ILA2 -alukeparia, jotka kohdistuvat segmenttiin 8 ja joiden on todettu soveltuvan ISA-viruksen osoittamiseen taudinpurkauksissa ja tautia kantavissa kaloissa. ILA2-taka-aluke ei sovellu Pohjois-Amerikasta peräisin oleville isolaateille, joten näissä tapauksissa on käytettävä vaihtoehtoista alukeyhdistelmää.

Etualuke (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′;

Taka-aluke (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Ajo-olosuhteet: yksi sykli 50 °C 30 minuuttia, yksi sykli 94 °C 15 minuuttia, 40 sykliä 94 °C 30 sekuntia, 55 °C 30 sekuntia, 72 °C 60 sekuntia; yksi sykli 72 °C 5 minuuttia. Tuotteen koko 155 bp.

PCR-reaktion tulokset saattavat vaihdella suoritusolosuhteiden mukaan, joten lämpötilaprotokollat saatetaan joutua optimoimaan käytössä olevan lämpöblokin mukaan. Lisäksi voi ilmetä vääriä positiivisia tuloksia alukkeen väärän kiinnittymisen tai laboratorion saastumisen vuoksi. Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja RT-PCR-versioita.

II.1.3 RT-qPCR-menetelmä ISA-viruksen osoittamiseksi

RT-qPCR-menetelmän käyttö voi lisätä spesifisyyttä ja todennäköisesti myös herkkyyttä. Menetelmä voidaan suorittaa nopeammin, sillä geelielektroforeesivaihe ei ole tarpeen, ja se vähentää ristikontaminaation riskiä, koska on mahdollista arvioida viruksen genomi-RNA:n määrä näyteputkessa. RT-qPCR-määrityksen haittapuolena on, että useinkaan ei ole mahdollista sekvensoida monistettuja tuotteita. Jos monistetun tuotteen spesifisyydestä on kuitenkin epäilyksiä, tuloksen tarkistamiseksi on ajettava toinen ISA-virukselle spesifinen määritys.

On käytettävä tässä kohdassa kuvattua määritystä, joka on segmenttiin 8 kohdistuva määritys. Tämä määritelmä kattaa Euroopan unionista, Euroopan vapaakauppaliiton maista ja Pohjois-Amerikasta peräisin olevat isolaatit. Yksivaiheista menetelmää on käytettävä mahdollisuuksien mukaan, sillä määritys yhdessä koeputkessa minimoi ristikontaminaation.

Etualuke: 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;

Taka-aluke: 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;

ja koetin: 5′-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – *MGBNFQ*-3′.

Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Ajo-olosuhteet: yksi sykli 50 °C 30 minuuttia, yksi sykli 95 °C 15 minuuttia, 40 sykliä 94 °C 15 sekuntia, 60 °C 60 sekuntia; mukautettava tarvittaessa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja RT-PCR- tai RT-qPCR-versioita.

II.1.4 Monistettujen PCR-tuotteiden sekvensointi

Etualuke (ILAs6-3F): 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;

Taka-aluke (ILAs6-2R): 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.

Negatiiviset templaattikontrollit ja positiivikontrollit on sisällytettävä kuhunkin levyajoon. Ajo-olosuhteet (yksivaiheinen RT-PCR-menetelmä): yksi sykli 50 °C 30 minuuttia, yksi sykli 94 °C 15 minuuttia, 40 sykliä 94 °C 30 sekuntia, 55 °C 30 sekuntia, 72 °C 60 sekuntia, yksi sykli 72 °C 5 minuuttia; mukautettava tarvittaessa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita yhtä tehokkaiksi osoitettuja RT-PCR- tai RT-qPCR-versioita.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää seuraavaa menetelmää HPR:n sekvensointiin segmentissä 6:

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

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

Tuotteen koko: 304 nt jos HPR0.

Voidaan käyttää myös muita RT-PCR-määrityksiä, joilla on tässä kohdassa kuvattuja määritelmiä vastaava herkkyys ja spesifisyys.

Monistettujen RT-PCR-tuotteiden puhtaus on tarkastettava geelielektroforeesilla ennen sekvensointia. Jos ilmaantuu ainoastaan yksi puhdas fragmentti, se on puhdistettava suoraan PCR-reaktiosta. Jos monistettuja fragmentteja on useita, kiinnostuksen kohteena oleva fragmentti on puhdistettava geelielektroforeesilla. PCR-fragmenttien puhdistaminen liuoksista tai agaroosigeeleistä on tehtävä affiniteettipuhdistamalla PCR-fragmentit spin-kolonneilla valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Sekvensointi on suoritettava monistusalukkeita käyttämällä ulkopuolisessa erikoistuneessa sekvensointiyrityksessä. Tulokset on analysoitava BLAST-ohjelman avulla, ja sekvenssejä on verrattava muihin tunnettuihin sekvensseihin US National Centre for Biotechnical Information -keskuksen (NCBI) nukleotiditietokannassa.

Sekvensoinnin on poistettava kaikki epävarmuus monistetun RT-PCR-tuotteen spesifisyydestä.

II.2 ISA-viruksen eristäminen soluviljelmissä

II.2.1 Näytteiden valmistelu

Kudosta voidaan säilyttää – 80 °C:ssa. Kudoksen saa jäädyttää ja sulattaa vain kerran ennen tutkimusta. Seuranta- ja valvontatarkoituksia varten tutkimus on suoritettava mahdollisimman nopeasti.

Jokainen näyte (yhteisnäyte kuljetuselatusaineessa) on täydellisesti homogenoitava validoidulla homogenaattorilla ja sentrifugoitava kierrosnopeudella 2 000–4 000 × *g* 15 minuutin ajan 0–6 °C:n lämpötilassa, ja supernatantti on suodatettava 0,45 µm:n suodattimella ja inkuboitava vastaavassa tilavuudessa sopivana laimennuksena olevan, IPN-viruksen kotoperäisten serotyyppien antiseerumiseoksen kanssa. Antiseerumin titterin on oltava vähintään 1:2 000 50 prosentin plakkineutralisaatiokokeessa. Seosta on inkuboitava yhden tunnin ajan 15 °C:n lämpötilassa. Näin saadaan inokulaatti.

Kaikki inokulaatit on käsiteltävä tarttuvan haimakuoliotauviruksen (IPN-viruksen) antiseerumilla (tietyillä alueilla Euroopassa tätä virusta esiintyy 50 prosentissa kalanäytteistä), jotta voidaan ehkäistä IPN-viruksen aiheuttaman sytopaattisen vaikutuksen muodostuminen inokuloiduissa soluviljelmissä. Tällainen käsittely voidaan suorittaa virologisten tutkimusten keston lyhentämiseksi ja sellaisten tapausten lukumäärän vähentämiseksi, joissa sytopaattisen vaikutuksen ilmeneminen olisi katsottava VHS- tai IHN-viruksen mahdolliseksi indikaatioksi. Jos näytteet ovat lähtöisin IPN-vapaiksi katsotuista tuotantoyksiköistä, inokulaatteja ei tarvitse käsitellä IPN-viruksen antiseerumilla.

II.2.2 Soluviljelmien inokulaatio

ASK-soluja (Atlantic salmon kidney cells, merilohen munuaissolut) on käytettävä ISA-viruksen primaariseen eristämiseen. Myös muita solulinjoja voidaan käyttää, jos niiden on osoitettu olevan tehokkaita ja herkkiä ISA-viruksen eristyksessä. Tällöin on myös otettava huomioon kantojen vaihtelu ja eri kantojen kyky replikoitua eri solulinjoissa. ASK-solut näyttävät tukevan tähän asti tunnettujen virusisolaattien isolaatiota ja kasvua, kunhan käytetään matalaa siirrostustasoa. ASK-soluissa voi ilmetä selkeämpi sytopaattinen vaikutus kuin muissa taudille alttiissa solulinjoissa kuten SHK-1:ssa (lohen munuaisen etuosan solut, Salmon head kidney-1).

ASK-soluja (pasaasi 65. tai pienempi) on viljeltävä monikuoppaisilla soluviljelylevyillä L-15-elatusaineessa, joka sisältää 10 % naudan sikiön seerumia (FBS), 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamiinia ja 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanolia. Tuoreisiin aktiivisessa kasvuvaiheessa oleviin soluviljelmiin on inokuloitava antiseerumikäsiteltyä elinsuspensiota siten, että elatusaineen lopullinen laimennussuhde on 1:1 000. Kustakin elinsuspensiosta on inokuloitava 40 µl yhteen kuoppaan, joka sisältää 2 ml elatusainetta. Ristikontaminaatioriskin minimoimiseksi eri viljelylaitoksista tulleille näytteille on käytettävä omia erillisiä 12- tai 24-kuoppalevyjä.

Yksi levy on jätettävä inokuloimatta, ja sitä käytetään negatiivikontrollina. Toinen levy on inokuloitava ISA-viruksen vertailuisolaatilla ja sitä käytetään positiivikontrollina seuraavasti: Ensimmäiseen kuoppaan on inokuloitava 100 µl ISA-viruksen kantaliuosta (vähimmäistitteri 10^7, 50 % soluviljelmästä infektoiva annos (TCID50 ml^{-1})) ja sekoitettava hyvin. Tätä liuosta on siirrettävä yksi tilavuusyksikkö ensimmäisestä kuopasta toiseen kuoppaan, jotta saadaan laimennussuhde 1:10 ja sekoitettava. Tätä menettelyä on toistettava levyn päähän asti, jolloin saadaan kuusi 10-kertaista laimennosta. ISA-viruksen kantaliuosta voidaan säilyttää – 80 °C:n lämpötilassa ainakin 2 vuoden ajan, mutta sulatuksen jälkeen se on käytettävä 3 päivän kuluessa. Tutkittavat levyt on pidettävä erillään positiivikontrollista ristikontaminaation estämiseksi. Kyseisen riskin välttämiseksi positiivikontrollit on valmistettava ja niitä on käsiteltävä erillään tutkittavista levyistä. Joka kuudes kuukausi tehtävä ASK-solujen herkkyystesti ISA-virusisolaatteja kohtaan voi korvata positiivikontrollin sisällyttämisen jokaiseen inokulaatioon.

Näytteitä on inkuboitava 15 ± 2 °C:n lämpötilassa enintään 15 päivän ajan. Soluviljelmät on tarkastettava kaksi kertaa mikroskoopilla sytopaattisen vaikutuksen osoittamiseksi, 5.–7 päivänä ja 12.–14 päivänä inokulaatiosta. Jos jossakin yhteisnäytteessä näkyy merkkejä sytopaattisesta vaikutuksesta, viruksen tunnistamismenettelyt on aloitettava välittömästi II.2.4 kohdan mukaisesti. Jos sytopaattista vaikutuksta ei havaita 14. päivään mennessä, on suoritettava epäsuora fluoresenssivasta-ainetesti (IFAT), hemadsorptiokoe tai RT-PCR.

II.2.3 Jatkoviljely

Jatkoviljely on suoritettava 13.–15. päivänä. Tuoreita aktiivisessa kasvuvaiheessa olevia soluja sisältäviin kuoppiin on lisättävä viljelmästä saatua supernatanttia soveltuvana laimennuksena (1:10) monikuoppaisilla soluviljelylevyillä ja inkuboitava 14 ± 2 °C:n lämpötilassa enintään 18 päivän ajan. Soluviljelmistä on tutkittava sytopaattiset vaikutukset mikroskoopilla kaksi kertaa, ensin 5–7 päivän ja sitten 14–18 päivän kuluttua inokulaatiosta. Jos jossakin yhteisnäytteessä näkyy merkkejä sytopaattisesta vaikutuksesta, viruksen tunnistamismenettelyt on aloitettava välittömästi II.2.4 kohdan mukaisesti. Jos sytopaattista vaikutusta ei havaita 14–18 päivän kuluttua, on tehtävä hemadsorptiokoe tai RT-PCR-testi.

Jos sytotoksisuutta esiintyy ensimmäisten seitsemän päivän sisällä inkubaatiosta, jatkoviljely on tehtävä tässä vaiheessa ja soluja on inkuboitava 14–18 päivää, jatkoviljeltävä uudelleen ja inkuboitava taas 14–18 päivää. Jos sytotoksisuutta esiintyy 7. päivän jälkeen, jatkoviljely on suoritettava kerran ja soluja on inkuboitava, kunnes ensimmäisestä inokulaatiosta on kulunut kaikkiaan 28–36 päivää.

Jos primaariviljelmässä tapahtuu bakteerikontaminaatiota, testi on valmistettava uudelleen käyttämällä – 80 °C:n lämpötilassa säilytettyä kudoshomogenaattia. Ennen inokulaatiota kudoshomogenaattia on sentrifugoitava kierrosnopeudella 4 000 × *g* 30 minuutin ajan 0–6 °C:n lämpötilassa ja supernatantti on suodatettava 0,22 µm:n suodattimella. Jos jatkoviljelyvaiheen aikana tapahtuu bakteerikontaminaatiota, supernatantti on suodatettava 0,22 µm:n suodattimella, inokuloitava tuoreisiin soluihin ja inkuboitava vielä 14–18 päivän ajan.

II.2.4 Viruksen tunnistustestit

Jos jossain soluviljelyn vaiheessa havaitaan sytopaattista vaikutusta tai jos hemadsorptiokoe on positiivinen, on suoritettava viruksen tunnistaminen. ISA-viruksen ensisijaisia tunnistusmenetelmiä ovat RT-PCR II.1 kohdan mukaisesti ja immunofluoresenssi (IF) II.2.6 kohdan mukaisesti. Jos näytteessä epäillään olevan muitakin viruksia, on tehtävä lisätestejä virusten tunnistamiseksi. Jos testeissä ei ole tunnistettu virusta varmuudella viikon kuluessa, supernatantti on toimitettava välitöntä tunnistusta varten

a) Maailman eläintautijärjestön (OIE) ISA-tautia tutkivaan vertailulaboratorioon tai;

b) direktiivin 2006/88/EY liitteessä VI tarkoitettuun kansalliseen vertailulaboratorioon tai EU:n kalatauteja tutkivaan vertailulaboratorioon.

II.2.5 Hemadsorptio

Koska ISA-viruksen replikaatio soluviljelmässä ei aina johda sytopaattiseen vaikutukseen, jokaiselle kuopalle on tehtävä RT-PCR-testi tai hemadsorptiokoe tämän kohdan mukaisesti taikka IF-testi II.2.6 kohdan mukaisesti.

Jokainen kuoppa, positiivi- ja negatiivikontrollia sisältävät kuopat mukaan lukien, on tyhjennettävä soluviljelyssä käytetystä elatusaineesta, joka on siirrettävä etiketillä varustettuihin steriileihin putkiin. Jokaiseen kuoppaan on lisättävä 500 µl 0,2-prosenttista (vol:vol) kaniinin tai hevosen pestyjä punasoluja sisältävää suspensiota tai 0,05-prosenttista (vol:vol) kirjolohen tai merilohen pestyjä punasoluja sisältävää suspensiota ja inkuboitava huoneenlämmössä 45 minuutin ajan. Punasolut on poistettava, ja jokainen kuoppa on pestävä kaksi kertaa L-15-elatusaineella. Jokaista kuoppaa on tutkittava mikroskoopilla.

ASK-solujen pintaan kiinnittyneitä punasolukertymiä on pidettävä alustavasti ortomyksovirusinfektiona. Jos hemadsorptiokoe on positiivinen, viruksen tunnistamistesti on tehtävä välittömästi II.2.4 kohdan mukaisesti.

II.2.6 Immunofluoresenssi (IF)

ASK-soluja (pasaasi 65. tai pienempi) on viljeltävä monikuoppalevyllä L-15-elatusaineessa, joka sisältää 10 % naudan sikiön seerumia (FBS), 2 % (vol:volv/v) 200 mM L-glutamiinia ja 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanolia, ja ne on käytettävä, kun solut peittävät vähintään 50 prosenttia viljelypinta-alasta. Myös muita teholtaan tutkittuja solulinjoja tai elatusaineita voidaan käyttää. Kahteen rinnakkaiseen kuoppaan on lisättävä 225 µl mahdollisesti virusta sisältävää supernatanttia, sekoitettava ja siirrettävä 225 µl kahteen uuteen kuoppaan (1:5-laimennus). Kaksi muuta kuoppaa on jätettävä inokuloimatta, ja niitä käytetään kontrolleina. Eri kalanviljelylaitosten näytteitä ja viruskontrollinäytteitä on käsiteltävä erillisillä levyillä. Viruskontrollina on käytettävä ISAV-vertailuisolaattia.

Levyjä on inkuboitava 14 ± 2 °C:ssa, ja niitä on tarkasteltava mikroskoopilla enintään 7 päivän ajan. Kun havaitaan varhaista sytopaattista vaikutusta tai jos sytopaattista vaikutusta ei havaita 7 päivän aikana, näytteet on kiinnitettävä. Kuopat on pestävä fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS) ja kiinnitettävä inkuboimalla niitä 80-prosenttisessa asetonissa 20 minuutin ajan huoneenlämmössä. Levyt on kuivattava ilmassa, minkä jälkeen ne on värjättävä välittömästi tai niitä on säilytettävä 0–6 °C:ssa enintään 24 tunnin ajan ennen värjäystä.

Rinnakkaiskuopat on värjättävä ISA-viruksen monoklonaalisten vasta-aineiden 3H6F8 ja 1OC9F5 sekoituksella tai muulla monoklonaalisella vasta-aineella, jonka teho ja spesifisyys on osoitettu, laimennettava PBS:ään ja inkuboitava 37 ± 4 °C:ssa 30 minuutin ajan. Monoklonaalinen vasta-aine on poistettava ja levyt pestävä kolme kertaa PBS:lla, johon on lisätty 0,05 % Tween 20:tä. Jokaiseen kuoppaan on lisättävä PBS:ään laimennettua antihiiri-IgG-fluoreseiini-isotiosyanaatti- (FITC) -konjugaattia ja inkuboitava 37 ± 4 °C:ssa 30 minuutin ajan. Monoklonaalisten vasta-aineiden ja FITC-konjugaatin eri erien laimennokset on optimoitava jokaisessa laboratoriossa erikseen. Vasta-aine on poistettava ja levyt pestävä kolme kertaa PBS:lla, johon on lisätty 0,05 % Tween 20:tä.

Kuoppia on välittömästi tarkasteltava käänteisfluoresenssimikroskoopilla, joka on varustettu FITC:n virittymiseen sopivalla suotimella. Jos fluoresoivia soluja havaitaan, testin tulosta on pidettävä positiivisena. Testi on luotettava, jos positiivikontrollit ovat positiivisia ja negatiivikontrollit negatiivisia.

II.3 Muiden kudosten tutkiminen

II.2.6 kohdassa tarkoitettua tekniikkaa voidaan soveltaa kalan muihin kudoksiin kuten maksa-, perna- ja sydänkudoksiin, jos objektilasille saadaan riittävä määrä endoteelisoluja, leukosyyttejä tai lymfosyyttejä. Värjäysmenetelmän on pysyttävä samana kaikille kudoksille, vaikka joidenkin kudosten kohdalla on suositeltavaa jättää pois propidiumjodidivärjäys ja käyttää leimausnäytteen solutyyppien tunnistukseen vain faasikontrastivalaistusta.

II.4 Histologinen tutkimus

Parafiiniin valetut leikkeet on leikattava 5 µm:n viipaleiksi ja värjättävä hematoksyliinillä ja eosiinilla.

Histologiset muutokset kliinisesti sairaissa merilohissa ovat vaihtelevia, mutta niihin kuuluu seuraavaa:

a) lukuisia punasoluja laskimonlaajennuksessa ja kidusten lamellien hiussuonissa, joissa voi myös muodostua punasolutrombiineja;

b) multifokaalisia tai konfluentteja petekioita tai maksasolunekroosi tai molempia jonkin matkan päässä maksan suurista verisuonista; multifokaalisia punasolukertymiä laajenneissa hepaattisissa sinusoideissa;

c) punasolukertymiä suoliston limakalvon tukikerroksen verisuonissa ja mahdollista verenvuotoa suoliston limakalvon tukikerrokseen;

d) punasolujen kertymisen laajentama pernan strooma;

e) lievän multifokaalisesta laajaan diffuusia interstitiaalista verenvuotoa, tubulaarinen kuolio verenvuotoalueilla, punasolukertymää munuaisen hiussuonikeräsissä;

f) erytrofagosytoosi pernassa ja sekundaarista verenvuotoa maksassa ja munuaisessa.

II.5 Immunohistokemia (IHC)

ISA-viruksen nukleoproteiinin polyklonaalisia vasta-aineita on käytettävä formaliiniin kiinnitetyn kudoksen parafiinileikkeisiin. Tutkittavien elinten on oltava munuaisen keskiosa ja sydän (eteinen sekä kaikki kolme kammiota ja läpät). Patologisten merkkien vuoksi epäilyttävät tapaukset on tarkistettava positiivisella IHC:llä. Histologiset leikkeet on valmisteltava standardimenetelmien mukaisesti.

1) Kudosleikkeiden valmistelu

Kudokset on kiinnitettävä neutraalissa fosfaattipuskuroidussa 10 % formaliinissa vähintään yhden päivän ajan, dehydratoitava etanoli-laimennossarjassa, kirkastettava ksyleenissä ja valettava parafiiniin standardiprotokollien mukaisesti. Noin 5 µm paksuja leikkeitä (sijoitettu poly-L-lysiini-päällysteisille laseille IHC:tä varten) on kuumennettava 56–58 °C:ssa (enintään 60 °C:ssa) 20 minuutin ajan, ne on deparanifoitava ksyleenissä, rehydratoitava etanoli-laimennossarjassa ja värjättävä hematoksylinillä ja eosiinilla patomorfologiaa ja IHC:tä varten 2 kohdan mukaisesti.

2) Värjäysmenettely IHC:tä varten

Kaikki inkuboinnit on suoritettava huoneenlämpötilassa keinuvalla alustalla, jollei tässä päätöksessä toisin säädetä:

a) antigeeni on osoitettava keittämällä leikkeitä 0,1 M:ssä sitraattipuskuria, pH 6,0, 2 × 6 minuutin ajan, ja sen jälkeen blokkaamalla 5-prosenttisella maidon rasvattomalla kuiva-aineella ja 2-prosenttisella vuohiseerumilla 50 mM:ssä TBS:ää (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) 20 minuutin ajan;

b) sitten leikkeitä on inkuboitava yön yli primaarisen vasta-aineen kanssa (ISA-viruksen nukleoproteiinin monospesifinen kanin vasta-aine), joka on laimennettu TBS:llä, jossa on 1-prosenttista maidon rasvatonta kuiva-ainetta, ja sen jälkeen pestävä kolme kertaa TBS:llä, johon on lisätty 0,1 % Tween 20:tä;

c) sidottujen vasta-aineiden osoittamiseksi leikkeet on inkuboitava alkaliini-forfataasi-konjugoiduilla kanin igG-vasta-aineilla 60 minuutin ajan. Viimeisen pesun jälkeen on lisättävä Fast Red (1 mg ml^{-1}) ja naftoli-AS-MX-fosfaatti (0,2 mg ml^{-1}) 1 mM levamisoliliuoksessa (0,1 M TBS, pH 8,2) ja annettava kehittyä 20 minuutin ajan. Sitten leikkeet on pestävä hanavedessä ennen kuin ne vastavärjätään Harrisin hematoksyliinillä ja peitataan vesipitoisella peittausaineella. ISA-viruspositiiviset ja ISA-virusnegatiiviset kudosleikkeet on sisällytettävä kontrolleina jokaiseen koejärjestelyyn.

3) IHC:n tulosten tulkinta

IHC-testin tuloksia on tulkittava a ja b kohdassa vahvistetulla tavalla:

a) kontrollileikkeitä on pidettävä positiivisina, kun kontrollileikkeissä havaitaan selkeästi näkyvää punaista (punertavaa) sytomeriloplasmista ja intranukleaarista värjäytymää sydämen sisäkalvon verisuonten endoteelisoluissa. Testinäyteleikettä on pidettävä positiivisena vain, jos tällaista endoteelisolujen selkeää, intranukleaarista punaista värjäytymistä havaitaan;

b) kontrollileikkeitä on pidettävä negatiivisina, jos niissä ei ole mitään merkittäviä värireaktioita.

Koska intranukleaarinen lokalisaatio on ominaista ortomyksoviruksen nukleoproteiinille viruksen replikaatiovaiheessa, mutta samanaikainen sytoplasminen värjäytyminen on usein vallitseva, sytoplasmisia ja muita värjäytymiskuvioita, joihin ei liity intranukleaarista lokalisaatiota, on pidettävä epäspesifisinä tai tuloksiltaan epävarmoina.

Vahvin positiivinen värjäytymisreaktio saadaan yleensä sydämen ja munuaisen endoteelisoluissa. Endoteeliset värjäytymisreaktiot hyvin laajoissa verenvuotovaurioissa voivat olla lieviä tai niitä ei ole, mahdollisesti siksi, että tartunnan saaneet endoteelisolut hajoavat.

4 OSA

YKSITYISKOHTAISET DIAGNOSTISET MENETELMÄT JA MENETTELYT NILVIÄISTEN MARTEILIOOSIN (*MARTEILIA REFRINGENS* -LOISEN AIHEUTTAMAN TARTUNNAN) SEURANTAA JA SEN ESIINTYMISEN VAHVISTAMISTA VARTEN

I **Yksityiskohtaiset diagnostiset menetelmät ja menettelyt nilviäisten marteilioosin (*Marteilia refringens* -loisen aiheuttaman tartunnan) diagnosointia varten**

Kun suoritetaan näytteenotto ja laboratoriotutkimuksia, joiden tarkoituksena on saavuttaa tai säilyttää tietty terveystilanne nilviäisten marteilioosin osalta liitteessä I olevan 4 osan I jakson mukaisesti tai vahvistaa kyseisen luetellun taudin esiintyminen tai sulkea pois sen epäily direktiivin 2006/88/EY 57 artiklan b alakohdan mukaisesti ja joissa käytetään liitteessä I olevan 4 osan II jaksossa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä, on sovellettava tämän osan II.1, II.2 ja II.3 kohdassa vahvistettuja yksityiskohtaisia menetelmiä ja menettelyjä.

I.1 Näytteenottomenettely

Näytteenottoon on valittava ensisijaisesti kuori auki olevia tai äskettäin kuolleita nilviäisiä tartunnan saaneiden eläinten löytymismahdollisuuksien lisäämiseksi.

Kun näytteenotto on suoritettu, osterit tai simpukat on pidettävä 4 °C:ssa tai jäähauteessa enintään 24 tuntia, jos näytteessä on kuori auki olevia nilviäisiä, ja enintään 72 tuntia, jos ei ole, muovipussissa, joka on varustettu etiketillä, josta ilmenevät osterien tai simpukoiden luonnetta ja alkuperää koskevat tiedot. Kuori auki olevat tai äskettäin kuolleet nilviäiset on pidettävä erillään muista nilviäisistä.

Nilviäisten marteilioosin määrittämiseen histologian avulla on käytettävä 3–5 mm:n paksuisia kudosleikkeitä, jotka sisältävät kidus- ja sydänkudosta. Ruoansulatusrauhasen palasta on käytettävä eräissä testeissä, kuten leimausnäytteissä ja polymeraasiketjureaktiossa (PCR).

I.2 Mikroskooppitekniikat

I.2.1 Sytologia (leimausnäytesytologia)

Sen jälkeen, kun ruoansulatusrauhasen kudokset on kuivattu imupaperilla, lasilevylle on tehtävä useita leimausnäytteitä. Levyt on kuivattava ilmassa, kiinnitettävä metanolissa tai absoluuttisessa etanolissa ja värjättävä käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa hematologian värjäyskittiä, kuten Diff-Quik®/Hemacolor®, valmistajan ohjeiden mukaisesti. Hanavedellä huuhtelun ja kuivaamisen jälkeen levyihin on kiinnitettävä peitelasi soveltuvan synteettisen hartsin avulla. Levyjä on tarkkailtava ensin 200-kertaisena suurennoksena ja sitten öljyimmersiossa 1 000-kertaisena suurennoksena.

Positiiviseksi tulokseksi katsotaan 30–40 µm:n kokoisten solujen havaitseminen. Solulima värjäytyy basofiiliseksi ja tuma eosinofiiliseksi. Suurten voimakkaasti värjäytyneiden (valoa taittavien) jyvästen ympärillä havaitaan heikko kehä ja suuremmissa soluissa soluja, joissa on solurakenteita.

Tämä tekniikka ei ole spesifinen millekään loislajille.

I.2.2 Histologinen tutkimus

Kudosleikkeet, joihin sisältyvät kidukset, ruoansulatusrauhanen, vaippa ja sukurauhaset, on kiinnitettävä vähintään 24 tuntia Davidsonin kiinnitysaineessa ennen tavanomaista käsittelyä parafiinihistologiaa ja värjäystä varten esimerkiksi hematoksyliinillä ja eosiinilla. Havainnot on tehtävä kasvavilla suurennoksilla 1 000-kertaiseen asti.

Positiiviseksi tulokseksi katsotaan 4–40 µm:n kokoisten solujen havaitseminen. Varhaiset vaiheet ovat monitumaiset pallomaiset tai pitkänomaiset solut. Niitä havaitaan pääasiassa ruokatorven ja vatsan ja joskus huulirihman epiteelisoluissa. Sporulaatio käsittää solunsisäisten solujen jakautumisia ja tapahtuu ruoansulatusrauhasen tubuluksissa ja tiehyeissä. Valoa taittavat jyväset ilmestyvät sporulaation aikana, eikä niitä havaita varhaisvaiheissa. Tartunnan myöhemmissä vaiheissa itiöitä havaitaan vapaina ruoansulatuskanavan soluontelossa. Solulima värjäytyy basofiiliseksi ja tuma eosinofiiliseksi. Jyvästen väri voi vaihdella syvän oranssista syvän punaiseen.

Tämä tekniikka ei ole spesifinen millekään loislajille.

I.3 Molekyylitekniikat

I.3.1 DNA:n eristäminen

DNA on eristettävä standardimenettelyjen mukaisesti.

Kaupallisesti saatavilla olevia DNA:n eristämiskittejä, jotka tuottavat korkealaatuisia DNA:ta, joka soveltuu käytettäväksi I.2 kohdassa tarkoitettujen PCR-protokollien kanssa, saa käyttää.

I.3.2 *Polymeraasiketjureaktio(PCR)*

PCR-protokollia on kehitetty ja julkaistu useita.

On käytettävä ITS (ITS1) -alueelle kohdistuvia PCR-alukkeita, sillä ne kykenevät monistamaan ainoastaan *M. refringens* -loisen.

PCR on suoritettava 50 µl:n tilavudessa. PCR-seosten on sisällettävä puskuria (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 25 °C:ssa] ja 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP mix, 1 µM etu- ja taka-alukkeita, 0,02 yksikköä μl^{-1} Taq DNA polymeraasia, ja 10–100 ng eristettyä DNA:ta. Kun DNA:ta on denaturoitu 94 °C:ssa 5 minuuttia, on ajettava 30 sykliä seuraavasti: denaturaatio 94 °C:ssa yhden minuutin ajan, kiinnitys 55 °C:ssa yhden minuutin ja elongaatio 72 °C:ssa yhden minuutin ajan kiloemäsparia kohti. On suoritettava loppuelongaatiovaihe 72 °C:ssa 10 minuutin ajan. *M. refringens* -loisen osoittamiseksi PCR on suoritettava sellaisilla alukkeilla, jotka kohdistuvat ITS1-alueeseen (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ ja 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Positiivikontrollien on koostuttava vakavan tartunnan saaneen isännän genomi-DNA:sta tai plasmidi-DNA:sta mukaan luettuna kohdealue.

Negatiivikontrollien on koostuttava tartunnasta vapaiden isäntien genomi-DNA:sta tai PCR-reaktiiveista ilman kohde-DNA:ta.

Positiivisen tuloksen on oltava odotetun kokoinen (412 bp) onnistunut PCR-monistus siten, että kaikki negatiivikontrollit ovat negatiivisia ja positiivikontrollit positiivisia.

I.3.3 In-situ hybridisaatio (ISH)

ISH-protokollia on kehitetty ja julkaistu useita.

On käytettävä koetinta, joka kohdistuu rRNA-geenikompleksin pieneen alayksikköön (SSU), sillä se on validoitu histologian avulla.

Ne kudosleikkeet, joihin sisältyvät kidukset ja ruoansulatusrauhanen, on kiinnitettävä vähintään 24 tuntia Davidsonin kiinnitysaineessa ennen tavanomaista käsittelyä parafiinihistologiaa varten. On leikattava 5 µm leikkeet, jotka on sijoitettava aminoalkyylisilaani-päällysteisille laseille, joita on sitten paistettava yli yön 40 °C:ssa. Leikkeet on deparafinoitava upottamalla ne ksyleeniin 10 minuutiksi. Tämä vaihe on toistettava kerran, ja sitten liuote on poistettava upottamalla leikkeet kahteen peräkkäiseen 10 minuutin mittaiseen etanolihauteeseen. Sitten leikkeet on dehydratoitava upottamalla ne etanoli-laimennossarjaan. Leikkeet on käsiteltävä porteinaasi-K:lla (100 µg ml–1) TE-puskurissa (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Lasit on dehydratoitava upottamalla ne etanoli-laimennossarjaan ja sitten ilmakuivattava. Leikkeet on inkuboitava 100 µl:ssa hybridisaatiopuskuria (4 × SSC [standardoitu suolasitraatti], 50 % formamidia, 1 × Denhardtin liuosta, 250 µg ml–1 hiivan siirtäjä-RNA, 10 % dekstraanisulfaattia), joka sisältää 10 ng (1 µl PCR-reaktantteja valmisteltuina I.3.2 kohdassa kuvatulla tavalla käyttäen alukkeita CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG ja TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) digoksigeniini-leimattua koetinta. Leikkeet on peitettävä *in-situ* muovisilla peitelaseilla ja sijoitettava lämpöblokkiin 95 °C:een 5 minuutiksi. Sitten levyt on jäähdytettävä jäähauteessa yhden minuutin ajan ennen yli yön tapahtuvaa hybridisaatiota 42 °C:ssa kosteassa tilassa. Tämän jälkeen leikkeet on pestävä kahdesti 5 minuutin ajan 2 × SSC:ssä huoneenlämpötilassa ja kerran 10 minuutin ajan 0,4 × SSC:ssä 42 °C:ssa. Detektiovaiheet on suoritettava valmistajan ohjeiden mukaisesti. Sitten lasit on huuhdeltava steriilissä tislatussa vedessä (dH_2O). Leikkeet on vastavärjättävä Bismarck Brown Yellow -värillä, huuhdottava dH_2O:ssa ja levyt on kiinnitettävä käyttäen vesipitoista peittausainetta.

Positiivikontrollien on oltava tunnetuista saastuneista isännistä otetut leikkeet ja negatiivikontrollien tartunnasta vapaista isännistä otetut leikkeet.

Positiivinen tulos on osoitettava tunnetuissa kohdekudoksissa violetinmusta-leimatuilla *M. refringens* -loisen soluilla siten, että kaikki negatiivikontrollit ovat negatiivisia ja kaikki positiivikontrollit positiivisia.

I.3.4 Sekvensointi

Sekvensointi on suoritettava yhtenä viimeisistä vaiheista varmistavassa määrityksessä. Kohdealueet ovat SSU rDNA ja ITS1.

II **Yksityiskohtaiset diagnostiset menetelmät ja menettelyt nilviäisten marteilioosin (*Marteilia refringens* -loisen aiheuttaman tartunnan) seurantaa ja sen esiintymisen vahvistamista varten**

Seurantaohjelmien tarkoituksiin ja nilviäisten marteilioosin esiintymisen vahvistamiseksi tai kyseisen luetellun taudin epäilyn poissulkemiseksi liitteessä I olevan 4 osan II jaksossa vahvistettujen vaatimusten mukaisesti käytettävien diagnostisten menetelmien ja niitä vastaavien menettelyjen on oltava seuraavassa taulukossa 4.1 vahvistettujen suuntaviivojenmukaiset:

Taulukko 4.1

Diagnostisten menetelmien käytön suuntaviivat seurantaohjelmia varten ja nilviäisten marteilioosin esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi

Menetelmä	Kohdennettu seuranta	Alustava diagnoosi	Varmistava diagnoosi
Ruoansulatusrauhasen leimausnäytteet	X	X	X, tai
Hispatologia	X		X, tai
In situ -hybridisaatio			X, ja
PCR	X	X	X, ja
Sekvensointi			X

5 OSA

YKSITYISKOHTAISET DIAGNOSTISET MENETELMÄT JA MENETTELYT NILVIÄISTEN BONAMIOOSIN (*BONAMIA OSTREAE* -LOISEN AIHEUTTAMAN TARTUNNAN) SEURANTAA JA SEN ESIINTYMISEN VAHVISTAMISTA VARTEN

I **Menettelyt nilviäisten bonamioosin diagnosointia varten**

Kun suoritetaan näytteenotto ja laboratoriotutkimuksia, joiden tarkoituksena on saavuttaa tai säilyttää tietty terveystilanne nilviäisten bonamioosin osalta liitteessä I olevan 5 osan I jakson mukaisesti tai vahvistaa kyseisen luetellun taudin esiintyminen tai sulkea pois sen epäily direktiivin 2006/88/EY 57 artiklan b alakohdan mukaisesti ja joissa käytetään liitteessä I olevan 5 osan II jaksossa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä, on sovellettava seuraavissa II.1, II.2 ja II.3 kohdassa vahvistettuja yksityiskohtaisia menetelmiä ja menettelyjä.

I.1 Näytteenottoprosessi

Näytteenottoon on valittava ensisijaisesti kuori auki olevia tai äskettäin kuolleita nilviäisiä tartunnan saaneiden eläinten löytymismahdollisuuksien kasvattamiseksi.

Kun näytteenotto on suoritettu, osterit on pidettävä 4 °C:ssa tai jäähauteessa enintään 24 tuntia, jos näytteeseen sisältyy kuori auki olevia nilviäisiä, ja 72 tuntia, jos ei sisälly, muovipussissa, joka on varustettu etiketillä, josta ilmenevät osterien luonnetta ja alkuperää koskevat tiedot. Kuori auki olevat tai äskettäin kuolleet nilviäiset on pidettävä erillään muista nilviäisistä.

Nilviäisten bonamioosin määrittämiseen histologisen tutkimuksen avulla on käytettävä 3–5 mm:n paksuisia kudosleikkeitä, jotka sisältävät kidus- ja sydänkudosta. Eräissä testeissä, kuten leimausnäytteissä ja polymeraasiketjureaktiossa (PCR), on käytettävä ruoansulatusrauhasen palasta.

I.2 Mikroskooppitekniikat

I.2.1 Sytologia (leimausnäytesytologia)

Sen jälkeen, kun kidus- tai sydänkudokset on kuivattu imupaperilla, lasilevylle on tehtävä useita leimausnäytteitä. Levyt on kuivattava ilmassa, kiinnitettävä metanolissa tai absoluuttisessa etanolissa ja värjättävä käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa hematologian värjäyskittiä (kuten Diff- Quik®/Hemacolor®) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Hanavedellä huuhtelun ja kuivaamisen jälkeen levyihin on kiinnitettävä peitelasi soveltuvan synteettisen hartsin avulla. Levyjä on tarkkailtava ensin 200-kertaisena suurennoksena ja sitten öljyimmersiossa 1 000-kertaisena suurennoksena.

Positiivisena tuloksena on pidettävä pienten pallomaisten tai munanmuotoisten (2–5 µm leveiden) organismien esiintymistä hemosyyteissä. Loista saattaa kuitenkin esiintyä myös solujen ulkopuolella. Näillä organismeilla on basofiilinen solulima ja eosinofiilinen tuma (värit saattavat vaihdella käytetyn väriaineen mukaan), ja koska ne leviävät lasilla, ne voivat vaikuttaa laajemmilta leimanäytteissä kuin histologisessa tutkimuksessa. Monitumaisia soluja voidaan havaita. Tämä tekniikka ei ole spesifinen millekään loislajille.

I.2.2 Histologinen tutkimus

Kudosleikkeet, joihin sisältyvät kidukset ja ruoansulatusrauhanen, on kiinnitettävä vähintään 24 tuntia Davidsonin kiinnitysaineessa ennen tavanomaista käsittelyä parafiinihistologiaa ja värjäystä varten esimerkiksi hematoksyliinillä ja eosiinilla. Havainnot on tehtävä kasvavilla suurennoksilla 1 000-kertaiseen asti.

Positiivisena tuloksena on pidettävä loisen esiintymistä hyvin pieninä, 2–5 µm leveinä soluina hemosyyteissä tai vapaina kiduksen, suolen ja vaipan epiteelin tukikudoksessa tai sinuksissa, mihin usein liittyy raju tulehdusreaktio. Loista on tarkkailtava hemosyytin sisässä positiivisen diagnoosin varmistamiseksi. Tämä tekniikka ei ole spesifinen millekään loislajille.

I.3 Molekyylitekniikat

I.3.1 DNA:n eristäminen

DNA on eristettävä standardimenettelyjen mukaisesti.

Kaupallisesti saatavilla olevia DNA:n eristämiskittejä, jotka tuottavat korkealaatuisia DNA:ta, joka soveltuu käytettäväksi jäljempänä kuvattujen PCR-protokollien kanssa, saa käyttää.

I.3.2 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

PCR-protokollia on kehitetty ja julkaistu useita.

Kahta yhdistelmä-DNA:n pieneen alayksikköön (SSU) kohdistuvaa PCR-protokollaa saa käyttää:

a) ensimmäinen niistä on tavanomainen PCR, joka monistaa useita *Haplosporidia* -heimon jäseniä mukaan luettuna *Bonamia spp*. Aluke Bo on 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ ja aluke Boas on 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′, ja ne monistavat 300 emäsparin tuotteen. PCR-seos sisältää puskuriliuosta (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 25 °C:ssa] ja 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP mix, 1 µM etu- ja taka-alukkeita, 0,02 yksikköä µl–1 Taq DNA polymeraasia ja 0,2 ng µl–1 DNA-templaattia 50 µl:n kokonaisvolyymissä. Näytteet on denaturoitava lämpöblokissa viiden minuutin ajan 94 °C:ssa ennen kuin ajetaan 30 sykliä (94 °C yksi minuutti, 55 °C yksi minuutti, 72 °C yksi minuutti) ja sen jälkeen loppuekstensio 72 °C 10 minuuttia.

   Positiivikontrollien on koostuttava vakavan tartunnan saaneen isännän genomi-DNA:sta tai plasmidi-DNA:sta mukaan luettuna kohdealue.

   Negatiivikontrollien on koostuttava tartunnasta vapaiden isäntien genomi-DNA:sta tai PCR-reaktiiveista ilman kohde-DNA:ta.

   Positiivisen tuloksen on oltava odotetun kokoinen (300 bp) onnistunut PCR-monistus siten, että kaikki negatiivikontrollit ovat negatiivisia ja positiivikontrollit positiivisia.

b) toinen PCR-protokolla on SYBR® Green RT-PCR-määritys. Se mahdollistaa *B. ostreae* -loisen spesifin detektion (kuvataan jäljempänä), ja se voidaan yhdistää SYBR® Green RT-PCR-määritykseen, joka mahdollistaan *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013) spesifin detektion.

Alukkeet BOSTRE-F (5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) ja BOSTRE-R (5′- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) monistavat 208 emäsparin tuotteen. PCR-seokset sisältävät SYBR® Green Master Mix -reaktioseosta (1X), 0,3 µM etu- ja taka-alukkeita, ja 200 ng eristettyä DNA:ta. Näytteet on denaturoitava Real Time Detection System -laitteessa 10 minuutin ajan 95 °C:ssä, ja sen jälkeen ajetaan 35 sykliä (95 °C 30 sekuntia, 55 °C 45 sekuntia ja 72 °C yksi minuutti). Sulamiskäyränanalyysi on suoritettava nostamalla lämpötilaa 0,5 °C/s alkaen 55 °C:sta ja päättyen 95 °C:een, ja fluoresenssi on kirjattava aina lämpötilan vaihtuessa.

Positiivikontrollien on koostuttava vakavan tartunnan saaneen isännän genomi-DNA:sta tai plasmidi-DNA:sta mukaan luettuna kohdealue.

Negatiivikontrollien on koostuttava tartunnasta vapaiden isäntien genomi-DNA:sta tai PCR-reaktiiveista ilman kohde-DNA:ta.

Positiivisena tuloksena on pidettävä onnistunutta PCR-monistusta, jossa on yksi sulamispiikki (78,25 ± 0,25 °C julkaistuissa olosuhteissa, Ramilo et al. 2013) siten, että kaikki negatiivikontrollit ovat negatiivisia ja positiivikontrollit positiivisia.

I.3.3 *In-situ* hybridisaatio (ISH)

ISH-protokollia on kehitetty ja julkaistu useita.

On käytettävä koetinta, joka kohdistuu rRNA-geenikompleksin pieneen alayksikköön (SSU), vaikka sen oli osoitettu ristireagoivan joiden *Haplosporidia*-heimon jäsenten kanssa.

Ne kudosleikkeet, joihin sisältyvät kidukset ja ruoansulatusrauhanen, on kiinnitettävä vähintään 24 tuntia Davidsonin kiinnitysaineessa ennen tavanomaista käsittelyä parafiinihistologiaa varten. On leikattava 5 µm leikkeet, jotka on sijoitettava aminoalkyylisilaani-päällysteisille laseille, joita on sitten paistettava yli yön 40 °C:ssa. Leikkeet on deparafinoitava upottamalla ne ksyleeniin 10 minuutiksi. Tämä vaihe on toistettava kerran, ja sitten liuote on poistettava upottamalla leikkeet kahteen peräkkäiseen 10 minuutin mittaiseen etanolihauteeseen. Sitten leikkeet on dehydratoitava upottamalla ne etanoli-laimennossarjaan. Leikkeet on käsiteltävä porteinaasi-K:lla (100 µg ml–1) TE-puskurissa (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Lasit on dehydratoitava upottamalla ne etanoli-laimennossarjaan ja sitten ilmakuivattava. Leikkeet on inkuboitava 100 µl:ssa hybridisaatiopuskuria (4 × SSC [standardoitu suolasitraatti], 50 % formamidia, 1 × Denhardtin liuosta, 250 µg ml–1 hiivan siirtäjä-RNA, 10 % dekstraanisulfaattia), joka sisältää 20 ng (2 µl PCR-reaktiota valmisteltuina I.3.2 kohdassa kuvatulla tavalla käyttäen alukkeita Bo ja Boas) digoksigeniini-leimattua koetinta. Leikkeet on peitettävä *in-situ* muovisilla peitelaseilla ja sijoitettava lämpöblokkiin 95 °C:een 5 minuutiksi. Sitten levyt on jäähdytettävä jäähauteessa yhden minuutin ajan ennen yli yön tapahtuvaa hybridisaatiota 42 °C:ssa kosteassa tilassa. Tämän jälkeen leikkeet on pestävä kahdesti 5 minuutin ajan 2 × SSC-puskuriliuoksessa huoneenlämpötilassa ja kerran 10 minuutin ajan 0,4 × SSC-puskuriliuoksessa 42 °C:ssa. Detektiovaiheet on suoritettava valmistajan ohjeiden mukaisesti. Sitten lasit on huuhdeltava steriilissä tislatussa vedessä (dH_2O). Leikkeet on vastavärjättävä Bismarck Brown Yellow -värillä, huuhdottava dH_2O:ssa ja levyt on kiinnitettävä käyttäen vesipitoista peittausainetta.

Positiivikontrollien on oltava tunnetuista saastuneista isännistä otetut leikkeet ja negatiivikontrollien tartunnasta vapaista isännistä otetut leikkeet.

Positiivisen tuloksen on vastattava leimattuja loisia hemosyyttien sisässä siten, että kaikki negatiivikontrollit ovat negatiivisia ja positiivikontrollit positiivisia.

I.3.4 Sekvensointi

Sekvensointi on suoritettava yhtenä viimeisistä vaiheista varmistavassa määrityksessä. Kohdealueiden on oltava SSU rDNA ja ITS1.

II **Menettelyt nilviäisten bonamioosin seurantaa ja vahvistusta varten**

Diagnostisten menetelmien ja niitä vastaavien menettelyjen, joita käytetään seurantatarkoituksiin ja nilviäisten bonamioosin esiintymisen vahvistamiseksi tai sen epäilyn poissulkemiseksi liitteessä I olevan 5 osan II jaksossa vahvistettujen vaatimusten mukaisesti, on oltava seuraavassa taulukossa 5.1 vahvistettujen suuntaviivojen mukaiset:

Taulukko 5.1

Diagnostisten menetelmien käytön suuntaviivat seurantaohjelmia varten ja nilviäisten bonamioosin esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi

Menetelmä	Kohdennettu seuranta	Alustava diagnoosi	Varmistava diagnoosi
Sydän- tai kidusleimausnäytteet	X	X	X, tai
Hispatologia	X		X, tai
In situ -hybridisaatio			X, ja
PCR	X	X	X, ja
Sekvensointi			X

6 OSA

YKSITYISKOHTAISET DIAGNOSTISET MENETELMÄT JA MENETTELYT ÄYRIÄISTEN VALKOPILKKUTAUDIN SEURANTAA JA SEN ESIINTYMISEN VAHVISTAMISTA VARTEN

1. **Diagnostiset menettelyt äyriäisten valkopilkkutaudin osoittamiseksi**

Kun suoritetaan näytteenotto tai laboratoriotutkimus tämän asetuksen liitteessä I olevassa 3 osassa vahvistettuja valvonta- tai hävittämisohjelmia varten tai äyriäisten valkopilkkutaudin esiintymisen vahvistamiseksi tai poissulkemiseksi direktiivin 2006/88/EY 57 artiklan b alakohdan mukaisesti käyttäen liitteessä I olevan 6 osan II jaksossa vahvistettuja diagnostisia menetelmiä, on sovellettava tämän osan 2–7 kohdassa vahvistettuja yksityiskohtaisia diagnostisia menetelmiä ja menettelyjä:

Tässä liitteessä II olevassa 6 osassa kuvatut menetelmät ja menettelyt on mukautettu ISO 17025 -standardin hyväksytystä testistä, jota sovelletaan Euroopan unionin vertailulaboratoriossa äyriäisten tauteja varten. Voidaan käyttää myös vaihtoehtoisia lähestymistapoja, joissa käytetään vastaavia olosuhteita tai eri valmistajien tuottamia paketteja mutta jotka antavat vastaavan herkkyyden ja spesifisyyden kuin tässä osassa kuvatut. PCR-monistettu tuote on kaikissa tapauksissa sekvensoitava äyriäisten valkopilkkutautiviruksen identiteetin varmistamiseksi.

2. **Näytteenottoprosessi**

Äyriäisten valkopilkkutautiviruksen saastuttamat äyriäisten kudokset (pleopodit ja kidukset) voidaan säilöä etanoliin, RNAlater-reagenttiin tai pikapakastaa – 80 °C:ssa. Äyriäisten valkopilkkutautiviruksen tunnistamisessa kudosnäytteistä vaadittujen vaiheiden on oltava seuraavat: Kudoksen homogenointi, DNA:n eristäminen, äyriäisten valkopilkkutautiviruksen spesifinen monistus PCR:llä, monistetun tuotteen kuvantaminen geelillä, DNA:n puhdistus ja sekvensointi patogeenin identiteetin varmistamiseksi.

3. **Kudoksen homogenointi**

Kudosten hajottaminen ja homogenaatin valmistaminen soveltuvassa puskurissa on suoritettava käyttämällä TissueRuptor -laitetta (Fast Prep) ja Lysing matrix A -koeputkia (MP Biomedicals). Kudos on punnittava, sijoitettava in Lysing Matrix A -koeputkiin, laimennettava suhteeseen 1:10 w/v tai valmistajan ohjeiden mukaisesti soveltuvalla puskurilla (G2 ja 10 µl proteinaasi-K:ta käytettäväksi DNA Tissue -kitin kanssa (Qiagen)) ja homogenoitava käyttäen Fast Prep 24 -homogenisaattoria kahden minuutin ajan. Homogenoituja näytteitä on inkuboitava 56 °C:ssa vähintään neljä tuntia tai yön yli. Näytteet on vorteksoitava, sentrifugoitava kierrosnopeudella 9 000 rpm kahden minuutin ajan ja näyteputkeen on lisättävä 50 µl supernatanttia tai tilavuus, joka vastaa 5 mg kudosta (optimaalinen kudospaino eristyskittiä varten), DNA:n eristämistä varten ja seos on täytettävä tilavuuteen 200 µl käyttämällä G2-puskuria.

4. **DNA:n eristäminen**

Kokonais-DNA on eristettävä käyttämällä DNA-kudoseristyskittiä ja EZ1 Advanced XL Biorobot -laitetta (Qiagen) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Eristyskontrolli (vasikan kateenkorvan DNA) ja negatiivikontrolli (G2-puskuriliuos) on ajettava jokaisen näyte-erän kanssa. DNA:n eluointitilavuus on 50 µl. Eristämisen onnistuneen loppuunsaattamisen varmistamiseksi kaikkien näytteiden ja kontrollien DNA-pitoisuus on määritettävä Nano Drop -koneella. Eristetty DNA on jäädytettävä – 20 °C:ssa, jollei sitä tarvita välittömästi.

5. **Äyriäisten valkopilkkutautiviruksen osoittamiseksi polymeraasiketjureaktiolla (PCR)**

Äyriäisten valkopilkkutautiviruksen osoittamisessa käytettävän menetelmän on oltava seuraavissa kohdissa kuvattu protokolla äyriäisten valkopilkkutautiviruksen osoittamiseksi nested PCR:llä, joka monistaa 18. rRNA-geenin 1 447 emäsparin amplikonin PCR-reaktion ensimmäisellä kierroksella ja 848 emäsparin amplikonin toisella kierroksella.

PCR-reaktion ensimmäinen kierros on valmistettava tilavuuteen 50 µl, joka sisältää lopulliset pitoisuudet 1 × GoTaq -puskuria (Promega), 5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/µl WSSV 146 F1 -aluketta, 1 pmol/µl WSSV 146 R1 -aluketta (Table 1), 0,25 mM dNTPs, 1,25 U Taq polymeraasia ja 2,5 µl DNA:ta. Jokainen näyte on ajettava duplikaattina rinnakkain negatiivisen eristyskontrollin, negatiivisen PCR-kontrollin (2,5 µl H_2O lisätty DNA:n sijasta) ja positiivikontrollin ohella. Positiivikontrollin on oltava laimennettu, sisäistä käyttöä varten valmistettu ja validoitu äyriäisten valkopilkkutautiviruksen plasmidi (saatavissa EU:n vertailulaboratoriosta).

Äyriäisten valkopilkkutautiviruksen toinen PCR-reaktio on valmistettava samalla tavoin kuin ensimmäinen kierros mutta käyttämällä WSSV 146 F2/R2 -alukesettiä ja käyttämällä toista positiivikontrollia sen tarkistamiseksi, että PCR-reaktion tämä vaihe on onnistunut.

Aluke	Sekvenssi
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

PCR-reaktion sekä ensimmäinen että toinen kierros on ajettava käyttäen seuraavia ajo-olosuhteita DNA Engine Tetrad 2 Peltier -lämpöblokissa (tai vastaavassa). Alkudenaturaatiovaihe 94 °C 2 minuuttia, jonka jälkeen 94 °C 30 sekuntia, 62 °C 30 sekuntia, 72 °C 30 sekuntia ja toistetaan 30 sykliä, ekstensiovaihe 72 °C 2 minuuttia ja pidetään 4 °C:ssa.

6. **Geelielektroforeesi**

Monistetut PCR-tuotteet PCR-reaktioiden sekä ensimmäiseltä että toiselta kierrokselta on kuvannettava 2-prosenttisissa agaroosigeeleissä, jotka on tehty käyttäen TAE-puskuria. 15 µl kumpaakin näytettä on ajettava 120 voltilla noin 20 minuutin ajan ja tarkasteltava UV-valossa. Positiiviset näytteet tuottavat 1 447 emäsparin raidan PCR-reaktion ensimmäisellä kierroksella ja 848 emäsparin raidan toisella kierroksella. Kyseisen kokoiset näytteet on leikattava irti ja sijoitettava 1,5 ml:n mikrofugiputkeen. Geelileikkeiden sisältämä DNA on puhdistettava käyttämällä Promega Wizard® SV Gel and PCR clean-Up -järjestelmää valmistajan ohjeiden mukaisesti. DNA:n pitoisuus on arvioitava käyttämällä Nano Drop -konetta. Puhdistettu DNA on jäädytettävä – 20 °C:ssa, jollei sitä käytetä välittömästi.

7. **PCR-tuotteiden sekvensointi**

DNA on sekvensoitava käyttämällä Big Dye Terminator Kit v3,1 -kittiä (Applied Biosystems). Kunkin reaktion kokonaisvolyymi on 20 µl ja lopulliset pitoisuudet 1 × Big Dye Terminator, 1 × sekvensointipuskuri, 10 pmol/µl etu- tai taka-aluketta ja 10 µl puhdistettua DNA:ta (laimennettu noin pitoisuuteen 10 ng/µl) ajetaan käyttämällä seuraavia ajo-olosuhteita DNA Engine Tetrad 2 Peltier -lämpöblokissa (tai vastaavassa): 94 °C:ssa 30 sekuntia, jonka jälkeen 96 °C:ssa 10 sekuntia, 50 °C:ssa 10 sekuntia ja 60 °C:ssa 4 minuuttia, kolme viimeistä vaihetta toistetaan 30 kertaa.

PCR-tuotteet on saostettava natriumasetaattimenetelmällä, jossa 20 µl DNA:ta lisätään 10 µl:iin NaAc:a, 70 µl H_20:ta ja 250 µl etanolia, vorteksoitava ja sentrifugoitava kierrosnopeudella 13 000 rpm 20 minuutin ajan, supernatantti on poistettava ja pelletti on pestävä 200 µl:llä 100-prosenttista etanolia sentrifugoimalla kierrosnopeudella 13 000 rpm viiden minuutin ajan. Pelletti on kuivattava 37 °C:ssa viiden minuutin ajan. 25 µl Hi-Di-formamidia on lisättävä pelletteihin, kuumennettava 95 °C:een 2 minuutiksi ja vorteksoitava läpikotaisin. Näytteet on sekvensoitava käyttämällä ABI3130xl Avant Genetic analyser -laitetta valmistajan ohjeiden mukaisesti. Sekvensoinnin tulokset on analysoitava käyttämällä Sequencher-ohjelmistoa, ja sekvenssejä on verrattava NCBI-tietokannassa oleviin sekvensseihin käyttämällä BLAST-ohjelmaa.

ISSN 1977-0812 (sähköinen julkaisu)
ISSN 1725-261X (painettu julkaisu)

Euroopan unionin julkaisutoimisto
2985 Luxemburg
LUXEMBURG

FI