

II.

(Nezakonodavni akti)

ODLUKE

PROVEDBENA ODLUKA KOMISIJE (EU) 2015/1554

od 11. rujna 2015.

o utvrđivanju pravila za primjenu Direktive 2006/88/EZ u pogledu zahtjeva u vezi s nadziranjem i dijagnostičkih metoda

(priopćeno pod brojem dokumenta C(2015) 6188)

(Tekst značajan za EGP)

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 2006/88/EZ od 24. listopada 2006. o zahtjevima zdravlja životinja koji se primjenjuju na životinje akvakulture i njihove proizvode te o sprečavanju i kontroli određenih bolesti akvatičnih životinja ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 49. stavak 3., članak 50. stavak 4., članak 57. točku (b) i članak 61. stavak 3.,

budući da:

- (1) Direktivom 2006/88/EZ utvrđene su minimalne preventivne mjere za nadziranje i rano otkrivanje, kod akvatičnih životinja, bolesti uvrštenih u popis u Prilogu IV. toj Direktivi („bolesti s popisa”) i mjere kontrole koje je potrebno primijeniti u slučaju sumnje ili izbijanja bolesti s popisa. Njome su utvrđeni i zahtjevi za postizanje statusa područja slobodnog od bolesti za države članice ili njihove zone ili kompartimente.
- (2) Iskorjenjivanje bolesti s popisa i postizanje statusa područja slobodnog od bolesti za državu članicu, zonu ili kompartiment trebali bi se temeljiti na istim načelima i u cijeloj bi se Uniji trebao slijediti isti znanstveni pristup. Stoga je potrebno na razini Unije utvrditi posebne zahtjeve za programe iskorjenjivanja i nadziranja te metode uzorkovanja i dijagnostičke metode kojima će se države članice služiti za dobivanje statusa područja slobodnog od bolesti za cijelu državu članicu ili njezinu zonu ili kompartiment.
- (3) Laboratorijska pretraživanja koja je potrebno obaviti u slučaju sumnje ili u svrhu potvrđivanja prisutnosti bolesti s popisa trebala bi biti ista na razini Unije i na njih bi se trebali primjenjivati isti znanstveni standardi i protokoli. U skladu s Direktivom 2006/88/EZ potrebno je utvrditi posebne dijagnostičke metode i postupke koje će upotrebljavati laboratoriji koje je nadležno tijelo države članice imenovalo u tu svrhu.
- (4) Kodeksom o zdravlju akvatičnih životinja (Akvatični kodeks) koji je donijela Svjetska organizacija za zdravlje životinja (OIE) utvrđeni su standardi za poboljšanje zdravlja akvatičnih životinja i dobrobiti riba iz uzgoja u cijelom svijetu, uključujući standarde za sigurnu međunarodnu trgovinu akvatičnim životinjama i njihovim proizvodima. U nekoliko poglavlja Akvatičnog kodeksa navedene su preporuke u pogledu uporabe određenih dijagnostičkih testova. Ti testovi, koje je pripremio OIE, navedeni su u njegovu Priručniku o dijagnostičkim testovima za akvatične životinje (Akvatični priručnik). Kako bi se osigurala usklađenost zahtjeva Unije u pogledu dijagnosticiranja bolesti akvatičnih životinja s međunarodnim standardima, pravilima utvrđenima ovom Odlukom trebali bi se uzeti u obzir standardi i preporuke iz Akvatičnog kodeksa.

⁽¹⁾ SL L 328, 24.11.2006., str. 14.

- (5) U tom pogledu, za mnoge bolesti s popisa u Akvatičnom priručniku navedeno je nekoliko testova i postupaka kojima se potrebno služiti u svrhu laboratorijskih pretraživanja. Kako bi se na razini Unije ujednačila znanstvena osnova za dijagnosticiranje bolesti s popisa, potrebno je odabrati među dijagnostičkim testovima i postupcima koje je preporučio OIE i odrediti koji bi testovi trebali biti obvezni za laboratorijsko pretraživanje pri provedbi programa nadziranja te u svrhu isključivanja sumnje ili potvrđivanja prisutnosti bolesti s popisa. U određenim slučajevima bit će potrebno imati na raspolaganju alternativne metode i postupke te bi trebalo osigurati opis i određena znanstvena objašnjenja uvjeta i načina primjene tih metoda. To se posebno odnosi na detaljnije dijagnostičke postupke.
- (6) Kako bi se dobili precizni dijagnostički rezultati koji se mogu ponoviti, važno je da su detaljni postupci i protokoli koji se upotrebljavaju validirani u skladu s relevantnim standardima kvalitete iz dijela I. Priloga VI. Direktivi 2006/88/EZ. Za mnoge dijagnostičke metode predviđene ovom Odlukom upotreba komercijalne opreme za testiranje nužan je dio dijagnostičkih protokola, a tu su opremu za testiranje europski referentni laboratoriji (EURL) validirali akreditiranim testovima za odgovarajuće bolesti. Radi pravne sigurnosti, komercijalne nazive te validirane komercijalne opreme za testiranje trebalo bi navesti u ovoj Odluci.
- (7) Određene države članice mogle bi imati poteškoća u postizanju statusa područja slobodnog od bolesti za cijelu državu članicu ili njezinu zonu ili kompartment s obzirom na jednu ili više bolesti s popisa. U takvim situacijama država članica možda neće htjeti dobiti ili ponovno steći status područja slobodnog od bolesti za te bolesti s popisa. Minimalne mjere kontrole koje će se primjenjivati u slučajevima u kojima predmetna država članica ne želi dobiti ili ponovno steći status područja slobodnog od bolesti trebale bi biti iste na razini Unije i za njih bi trebali vrijediti isti kriteriji. Stoga je u skladu s Direktivom 2006/88/EZ potrebno utvrditi detaljna pravila za suzbijanje tih bolesti s popisa i minimalne zahtjeve za ukidanje tih mjera za suzbijanje bolesti.
- (8) Odlukom Komisije 2001/183/EZ ⁽¹⁾ utvrđeni su zahtjevi koji se odnose na planove uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrđivanje bolesti s popisa zarazne hematopoetske nekroze i virusne hemoragijske septikemije. Odlukom Komisije 2003/466/EZ ⁽²⁾ utvrđeni su zahtjevi koji se odnose na planove uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje zarazne anemije lososa te kriteriji za zoniranje i službeno nadziranje u slučaju pojave sumnje i potvrđene prisutnosti te bolesti. Odlukom Komisije 2002/878/EZ ⁽³⁾ utvrđeni su zahtjevi koji se odnose na planove uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrđivanje bolesti mekušaca bonamioze i marteilioze. Radi ažuriranja zahtjeva, te bi se tri Odluke trebale zamijeniti ovom Odlukom. U skladu s time, Odluka 2001/183/EZ, Odluka 2002/878/EZ i Odluka 2003/466/EZ trebale bi se staviti izvan snage.
- (9) Budući da određenim državama članicama treba vremena da prilagode svoje nacionalne referentne laboratorije radi usklađivanja sa zahtjevima utvrđenima u ovoj Odluci, ona bi se trebala primjenjivati od 1. travnja 2016.
- (10) Mjere utvrđene ovom Odlukom u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za bilje, životinje, hranu i hranu za životinje,

DONIJELA JE OVU ODLUKU:

Članak 1.

Predmet

Ovom se Odlukom utvrđuju pravila za sljedeće:

- (a) nadziranje, zone ograničenja, uzorkovanje i dijagnostičke metode kojima se države članice moraju služiti u vezi sa svojim zdravstvenim statusom ili zdravstvenim statusom svojih zona ili kompartmenta u pogledu neegzotičnih bolesti akvatičnih životinja navedenih u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ („bolesti s popisa”);

⁽¹⁾ Odluka Komisije 2001/183/EZ od 22. veljače 2001. o utvrđivanju planova uzorkovanja i dijagnostičkih metoda za otkrivanje i potvrđivanje određenih bolesti riba i stavljanju izvan snage Odluke 92/532/EEZ (SL L 67, 9.3.2001., str. 65.).

⁽²⁾ Odluka Komisije 2003/466/EZ od 13. lipnja 2003. o utvrđivanju kriterija za zoniranje i službeno nadziranje u slučaju pojave sumnje ili potvrđene prisutnosti zarazne anemije lososa (ZAL) (SL L 156, 25.6.2003., str. 61.).

⁽³⁾ Odluka Komisije 2002/878/EZ od 6. studenoga 2002. o uspostavi planova uzorkovanja i dijagnostičkih metoda za otkrivanje i potvrđivanje prisutnosti bolesti mekušaca bonamioze (*Bonamia ostreae*) i marteilioze (*Marteilia refringens*) (SL L 305, 7.11.2002., str. 57.).

- (b) dijagnostičke metode za upotrebu pri laboratorijskim pretraživanjima u slučaju sumnje ili u svrhu potvrđivanja prisutnosti bolesti s popisa; i
- (c) minimalne mjere kontrole koje se moraju primijeniti u slučaju sumnje ili potvrde prisutnosti bolesti s popisa u državi članici, zoni ili kompartmentu koji nisu proglašeni slobodnima od te bolesti.

Članak 2.

Definicije

Za potrebe ove Odluke primjenjuju se sljedeće definicije:

- (a) „virusna hemoragijska septikemija” (VHS) znači bolest koju uzrokuje virus virusne hemoragijske septikemije, poznat i pod nazivom Egtved virus, a riječ je o virusu koji pripada rodu *Novirhabdovirus* iz porodice *Rhabdoviridae*;
- (b) „zarazna hematopoetska nekroza” (IHN) znači bolest koju uzrokuje virus zarazne hematopoetske nekroze, a riječ je o virusu koji pripada rodu *Novirhabdovirus* iz porodice *Rhabdoviridae*;
- (c) „koi herpes viroza” (KHV) znači bolest koju uzrokuje koi herpes virus koji pripada porodici *Alloherpesviridae*. Znanstveni naziv je ciprinidni herpes virus 3 (CyHV-3);
- (d) „zarazna anemija lososa” (ISA) znači bolest koju uzrokuje zaraza virusom anemije lososa s uklonjenim genotipom HPR (visoko polimorfno područje), a riječ je o virusu koji pripada rodu *Isavirus* iz porodice *Orthomyxoviridae*;
- (e) „zaraza *Marteilijom refringens*” znači bolest koju uzrokuje zaraza *Marteilijom refringens*, protozoon iz koljena *Paramyxea*;
- (f) „zaraza *Bonamijom ostreaeom*” znači bolest koju uzrokuje zaraza *Bonamijom ostreaeom*, protozoon iz koljena *Haplosporidia*;
- (g) „bolest bijelih pjega rakova” (WSD) znači bolest koju uzrokuje virus sindroma bijelih pjega, a riječ je o dvolančanom DNK virusu roda *Whispovirus* iz porodice *Nimaviridae*.

Članak 3.

Minimalni zahtjevi za programe iskorjenjivanja i nadziranja

Države članice dužne su osigurati da se u slučaju odobravanja, povlačenja ili ponovnog uspostavljanja statusa područja slobodnog od bolesti za državu članicu ili njezinu zonu ili kompartment za jednu ili više bolesti s popisa poštuju pravila o programima nadziranja i iskorjenjivanja, zonama ograničenja, uzorkovanju i dijagnostičkim metodama iz Priloga I. te posebne metode i detaljni postupci iz Priloga II.

Članak 4.

Minimalni zahtjevi za dijagnostičke metode i posebne postupke

Države članice dužne su osigurati da se pri obavljanju laboratorijskih pretraživanja radi otklanjanja sumnje na bolest s popisa ili potvrđivanja prisutnosti bolesti s popisa poštuju metode kontrole iz Priloga I. i posebne dijagnostičke metode i detaljni postupci iz Priloga II.

Članak 5.

Minimalne mjere kontrole za suzbijanje bolesti s popisa i minimalni zahtjevi za ukidanje mjera za suzbijanje bolesti u državama članicama, zonama ili kompartmentima koji nisu proglašeni slobodnima od bolesti s popisa

Države članice dužne su osigurati da se pri provođenju mjera kontrole i ukidanju mjera za suzbijanje jedne ili više bolesti s popisa u državi članici ili njezinoj zoni ili kompartmentu koji nisu proglašeni slobodnima od tih bolesti s popisa poštuju minimalne mjere kontrole i minimalni zahtjevi za ukidanje mjera za suzbijanje bolesti iz Priloga I.

Članak 6.

Stavljanje izvan snage

Odluke 2001/183/EZ, 2002/878/EZ i 2003/466/EZ stavljaju se izvan snage.

Članak 7.

Datum primjene

Ova Odluka primjenjuje se od 1. travnja 2016.

Članak 8.

Adresati

Ova je Odluka upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 11. rujna 2015.

Za Komisiju
Vytenis ANDRIUKAITIS
Član Komisije

PRILOG I.

METODE NADZIRANJA I KONTROLE

I. Uvod

Ovim se Prilogom definira sljedeće:

- (a) zahtjevi za programe iskorjenjivanja i nadziranja, kako su predviđeni u članku 44. Direktive 2006/88/EZ, te metode uzorkovanja i dijagnostičke metode koje se će upotrebljavati radi proglašavanja država članica ili njihovih zona ili kompartmenta slobodnima od bolesti kako je predviđeno u poglavlju VII. te Direktive;
- (b) metode uzorkovanja i dijagnostičke metode koje će se upotrebljavati u laboratorijskim pretraživanjima u slučaju sumnje na prisutnost neegzotičnih bolesti navedenih u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ („bolesti s popisa”) i radi potvrđivanja te prisutnosti, kako je predviđeno u članku 28. točki (a) i članku 57. točki (b) te Direktive;
- (c) mjere za suzbijanje bolesti koje je potrebno poduzeti u slučaju potvrde prisutnosti neke od bolesti s popisa, kako su predviđene u članku 39. Direktive 2006/88/EZ, i mjere koje je potrebno poduzeti radi postizanja zdravstvenog statusa kategorije III. u državi članici, zoni ili kompartmentu koji ima zdravstveni status kategorije V.

Zahtjevima utvrđenima u ovom Prilogu obuhvaćene su sljedeće bolesti s popisa:

1.	Virusna hemoragijska septikemija (VHS)	Dio 1.
2.	Zarazna hematopoetska nekroza (IHN)	Dio 1.
3.	Koi herpes viroza (KHV)	Dio 2.
4.	Zarazna anemija lososa (ISA)	Dio 3.
5.	Zaraza <i>Marteilijom refringens</i>	Dio 4.
6.	Zaraza <i>Bonamijom ostreaeom</i>	Dio 5.
7.	Bolest bijelih pjega rakova (WSD)	Dio 6.

II. Definicije

Za potrebe Priloga I. i II. primjenjuju se sljedeće definicije:

- (a) „kopneni kompartment” znači jedno uzgajalište (ili više njih) koje se nalazi u kopnenom predjelu jedne države članice (ili više njih) i djeluje u okviru zajedničkog sustava biološke sigurnosti i u kojem se nalazi populacija akvatičnih životinja s posebnim zdravstvenim statusom s obzirom na određenu bolest;
- (b) „kopneno uzgajalište” znači uzgajalište koje drži životinje akvakulture, a nalazi se u kopnenom predjelu jedne države članice;
- (c) „kopnena zona” znači jasno određeno zemljopisno područje koje se nalazi u kopnenom predjelu jedne ili više država članica, s homogenim hidrološkim sustavom koje obuhvaća dijelove područja vodenog sliva od izvora do prirodne ili umjetne prepreke koja sprečava uzvodnu migraciju akvatičnih životinja iz donjih dijelova područja vodenog sliva, ili cijelo područje vodenog sliva od izvora do ušća, ili više područja vodenih slivova, uključujući njihova ušća, koja su međusobno epidemiološki povezana preko ušća;

- (d) „uzgajalište službeno proglašeno zaraženim” znači uzgajalište koje drži akvatične životinje u kojem je nadležno tijelo potvrdilo jednu od bolesti s popisa ili više njih u skladu s člankom 28. točkom (a), člankom 29. i člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ;
- (e) „kontaktno uzgajalište” znači uzgajalište koje drži akvatične životinje za koje je na bilo koji način dokazano ili postoji snažna sumnja da su kontaminirane infektivnim materijalom iz uzgajališta koje je službeno proglašeno zaraženim.

DIO 1.

METODE NADZIRANJA I KONTROLE ZA VIRUSNU HEMORAGIJSKU SEPTIKEMIJU (VHS) I ZARAZNU HEMATO-POETSKU NEKROZU (IHN)

- I. **Zahtjevi za programe nadziranja i iskorjenjivanja radi postizanja i održavanja statusâ područja slobodnih od bolesti u odnosu na VHS i IHN te mjere za suzbijanje tih bolesti s popisa**
- I.1. Opći zahtjevi za zdravstvene preglede i uzorkovanje za VHS i IHN:
- (a) zdravstveni pregledi i, prema potrebi, uzorkovanje provode se tijekom razdoblja godine kada je temperatura vode niža od 14 °C ili u razdoblju kad je vjerojatno da će temperatura vode dosegnuti svoje najniže godišnje vrijednosti;
- (b) kada je potrebno ciljano nadziranje divljih populacija u skladu s drugim stavkom točke 2. dijela I. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ, utvrđuju se broj i zemljopisna rasprostranjenost točaka uzorkovanja radi postizanja razumne pokrivenosti države članice, zone ili kompartmenta. Točke uzorkovanja reprezentativne su za različite ekosustave u kojima se nalaze divlje populacije prijemljivih vrsta;
- (c) kada su uzgajališta ili divlje populacije podvrgnuti zdravstvenim pregledima ili ih se uzorkuje više od jednom godišnje, između zdravstvenih pregleda i prikupljanja uzoraka mora proći najmanje četiri mjeseca te traju što je dulje moguće, a u obzir se uzimaju zahtjevi u pogledu temperature predviđeni u točki (a);
- (d) sve se proizvodne jedinice poput ribnjaka, bazena i kaveza podvrgava zdravstvenim pregledima kako bi se utvrdila prisutnost uginulih ili oslabljenih riba ili riba s neuobičajenim ponašanjem. Posebnu pozornost treba posvetiti području ispusta vode gdje se zbog vodene struje obično sakupljaju oslabljene ribe;
- (e) ribe prijemljivih vrsta koje je potrebno prikupiti za uzorkovanje biraju se na sljedeći način:
- ako je prisutna kalifornijska pastrva, za uzorkovanje se sakupljaju samo jedinke te vrste, osim ako su prisutne i druge prijemljive vrste koje pokazuju uobičajene znakove VHS-a ili IHN-a. Ako nije prisutna kalifornijska pastrva, uzorak mora biti reprezentativan za sve druge prisutne prijemljive vrste;
 - ako su prisutne oslabljene ribe, ribe s neuobičajenim ponašanjem ili uginule ribe koje još nisu u stanju raspadanja, sakuplja se te ribe. Ako se za proizvodnju riba upotrebljava više izvora vode, uzorak se mora sastojati od riba iz svih izvora vode;
 - u odabrane ribe uključene su ribe koje treba prikupiti tako da u uzorku budu razmjerno zastupljeni svi dijelovi uzgajališta kao i sve dobne kategorije.
- I.2. Posebni zahtjevi za postizanje zdravstvenog statusa područja slobodnog od bolesti (kategorija I.) u odnosu na VHS i IHN
- I.2.1. Programi nadziranja:
- (a) država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije III. kako je navedeno u dijelu B Priloga III. Direktivi 2006/88/EZ u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti, može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu tih bolesti s popisa pod uvjetom da su sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. toj Direktivi i koja se nalaze u toj državi članici, zoni ili kompartmentu u skladu sa zahtjevima utvrđenima u Prilogu V. toj Direktivi i da su sva ta uzgajališta i, kada se to zahtijeva drugim stavkom točke 2. dijela I. Priloga V. toj Direktivi, točke uzorkovanja divljih populacija odabranih u skladu s tim dijelom podvrgnuta jednom od sljedećih programa nadziranja:

i. model A – dvogodišnji program nadziranja:

Uzgajališta ili točke uzorkovanja moraju biti podvrgnuti zdravstvenim pregledima i uzorkovani najmanje dvije godine zaredom kako je utvrđeno u Tablici 1.A u odjeljku II.

Tijekom tog dvogodišnjeg razdoblja ispitivanjem svih uzoraka upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u točki II.2. moralo se postići negativne rezultate za VHS ili IHN ili obje te bolesti i otkloniti svaku sumnju na VHS ili IHN ili obje te bolesti u skladu s metodama uzorkovanja i dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.;

ii. model B – četverogodišnji program nadziranja sa smanjenom veličinom uzorka:

Uzgajališta ili točke uzorkovanja moraju biti podvrgnuti zdravstvenim pregledima i uzorkovani najmanje četiri godine zaredom kako je utvrđeno u Tablici 1.B u odjeljku II.

Tijekom tog četverogodišnjeg razdoblja ispitivanjem svih uzoraka upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u točki II.2. moralo se postići negativne rezultate za VHS ili IHN ili obje te bolesti i otkloniti svaku sumnju na VHS ili IHN ili obje bolesti u skladu s metodama uzorkovanja i dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.;

(b) ako se tijekom provedbe programa nadziranja navedenog u točki (a) zaraza VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima potvrdi na uzgajalištu uključenom u taj program nadziranja te se stoga povuče zdravstveni status kategorije II. uzgajališta, to uzgajalište može odmah povratiti svoj zdravstveni status kategorije II. i nastaviti s provedbom programa nadziranja radi postizanja statusa područja slobodnog od bolesti bez provedbe programa iskorjenjivanja bolesti utvrđenog u točki I.2.2. pod uvjetom da to uzgajalište zadovoljava sljedeće uvjete:

- i. radi se o kopnenom uzgajalištu čiji zdravstveni status u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti ne ovisi o zdravstvenom statusu populacija akvatičnih životinja u okolnim prirodnim vodama u odnosu na te bolesti s popisa u skladu s točkom 3. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ;
- ii. prazni ga se, čisti, dezinficira i u njemu se provodi mirovanje koje traje najmanje šest tjedana;
- iii. poribljeno je ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona i kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti.

I.2.2. Programi iskorjenjivanja

I.2.2.1. Opći zahtjevi

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu tih bolesti s popisa pod uvjetom da su sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta programu iskorjenjivanja koji je u skladu s točkama od (a) do (e):

(a) minimalne mjere kontrole utvrđene u odjeljku 4. poglavlja V. Direktive 2006/88/EZ moraju biti učinkovito primijenjene, a u blizini uzgajališta (ili više njih) službeno proglašenog zaraženim VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima s popisa mora biti uspostavljeno područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti, navedeno u članku 32. točki (b) te Direktive, koje će uključivati zaraženo i ugroženo područje.

Područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti potrebno je definirati na temelju svakog pojedinačnog slučaja, uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na rizike širenja bolesti s popisa na ribe iz uzgoja i divlje ribe poput sljedećih: broj, stopa i rasprostranjenost uginuća riba u uzgajalištu zaraženome VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima; udaljenost između susjednih uzgajališta i njihova gustoća; blizina klaonice; kontaktna uzgajališta; vrste prisutne u uzgajalištima; načini uzgoja koji se primjenjuju u zahvaćenim uzgajalištima i uzgajalištima u blizini zahvaćenih uzgajališta; hidrodinamički uvjeti i drugi utvrđeni čimbenici od epidemiološke važnosti.

Za uspostavu zaraženih i ugroženih područja primjenjuju se sljedeći minimalni zahtjevi u pogledu geografskih granica tih područja:

- i. zaraženo područje uspostavlja se u neposrednoj blizini uzgajališta službeno proglašenog zaraženim VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima s popisa i odgovara sljedećemu:
 1. u obalnim područjima: područje kruga s polumjerom od najmanje jednog plimnog doseg ili najmanje pet kilometara, ovisno o tome koje je veće, sa središtem u uzgajalištu koje je službeno proglašeno zaraženim VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima, ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima;
 2. u kopnenim područjima: čitavo područje vodnog sliva uzgajališta koje je službeno proglašeno zaraženim VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima; nadležno tijelo može ograničiti širenje zona na dijelove područja vodnog sliva ili na područje uzgajališta pod uvjetom da se ne ugrozi sprječavanje širenja VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti;
 - ii. ugroženo područje uspostavlja nadležno tijelo izvan zaraženog područja i ono odgovara sljedećemu:
 1. u obalnim područjima: područje koje okružuje zaraženo područje, sa zonama preklapanja izmjene plime i oseke; ili područje koje okružuje zaraženo područje, a uključeno je u krug polumjera 10 km od središta zaraženog područja; ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima;
 2. u kopnenim područjima: kao prošireno područje izvan uspostavljenog zaraženog područja;
- (b) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ unutar zaraženog područja koje nije službeno proglašeno zaraženim VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima podvrgava se službenom istraživanju koje sadržava barem sljedeće elemente:
- i. prikupljanje uzoraka za ispitivanje od 10 riba ako su prisutni klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi zaraze VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima, ili od najmanje 30 riba kada nisu prisutni klinički ili *post-mortem* znakovi;
 - ii. jedan zdravstveni pregled: u uzgajalištima u kojima su za ispitivanja iz točke i. dobiveni negativni rezultati zdravstveni pregledi nastavljaju se jednom mjesečno u razdoblju kad je temperatura vode niža od 14 °C, osim ako su ribnjaci ili kavezi prekriveni ledom, sve dok se ne povuče status zaraženog područja u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);
- (c) sva je uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima potrebno isprazniti, očistiti, dezinficirati i u njima je potrebno provesti mirovanje. Razdoblje mirovanja traje najmanje šest tjedana. Kad su ispražnjena sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima u istom zaraženom području, provode se najmanje tri tjedna sinkroniziranog mirovanja. Ovaj se stavak odnosi i na nova uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima tijekom provedbe programa iskorjenjivanja.
- Pri provođenju mirovanja u uzgajalištima koja su službeno proglašena zaraženima, zaražena područja postaju ugrožena područja.
- Nadležno tijelo može odlučiti zahtijevati pražnjenje, čišćenje, dezinfekciju i provedbu mirovanja drugih uzgajališta u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima. Duljinu razdoblja mirovanja za ta uzgajališta određuje nadležno tijelo nakon procjene rizika za svaki pojedinačni slučaj;
- (d) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima s popisa i sva druga uzgajališta u mirovanju u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima kako su navedena u točki (c) poribljavaju se ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta sa zdravstvenim statusom područja slobodnog od bolesti (kategorija I.) u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti.

Poribljavanje se provodi tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);

- (e) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u državi članici, zoni ili kompartmentu obuhvaćenom programom iskorjenjivanja i, kada je potrebno nadziranje divljih populacija, točke uzorkovanja odabrane u skladu s točkom I.1., naknadno su podvrgnuta programu nadziranja utvrđeno u točki I.2.1.

I.2.2.2. Zahtjevi za povrat statusa područja slobodnog od bolesti za kopnene kompartmente koji se sastoje od jednog uzgajališta koje je prethodno proglašeno slobodnim od IHN-a ili VHS-a ili oboje

Kopneni kompartment koji se sastoji od jednog uzgajališta koje je prethodno proglašeno slobodnim od VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti s popisa, čiji zdravstveni status u pogledu tih bolesti s popisa ne ovisi o okolnim prirodnim vodama u skladu s točkom 3. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ i čiji je zdravstveni status kategorije I. povučen u skladu s člankom 53. stavkom 3. te Direktive, može povratiti zdravstveni status kategorije I. neposredno nakon što nadležno tijelo potvrdi da su ispunjeni sljedeći uvjeti:

- (a) uzgajalište koje je službeno potvrđeno zaraženim VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima mora biti ispražnjeno, očišćeno, dezinficirano i u mirovanju; mirovanje mora trajati najmanje šest tjedana;
- (b) uzgajalište koje je službeno potvrđeno zaraženim VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima poribljeno je ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti.

I.3. Posebni zahtjevi za održavanje zdravstvenog statusa područja slobodnog od bolesti (kategorija I.) u odnosu na VHS ili IHN ili obje te bolesti

Kada je potrebno ciljano nadziranje radi održavanja zdravstvenog statusa kategorije I., kako je predviđeno u članku 52. Direktive 2006/88/EZ, sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. toj Direktivi u predmetnoj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgavaju se zdravstvenom pregledu te se riba uzorkuje u skladu s tablicom 1.C iz odjeljka II. ovog dijela, uzimajući u obzir razinu rizika uzgajališta za pojavu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti s popisa.

Pri utvrđivanju učestalosti zdravstvenih pregleda za kompartmente zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti, smještene u kontinentalnim područjima te u kojima zdravstveni status u pogledu VHS-a ili IHN-a ovisi o zdravstvenom statusu populacija akvatičnih životinja u okolnim prirodnim vodama u skladu s točkom 2. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ, rizik za pojavu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti smatra se visokim.

Status područja slobodnog od bolesti održava se sve dok se za sve uzorke ispitane dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.2. dobivaju negativni rezultati na VHS ili IHN ili obje te bolesti s popisa i svaka je sumnja na VHS ili IHN ili obje te bolesti otklonjena u skladu s metodama dijagnostike utvrđenima u točki II.3.

I.4. Zahtjevi za ukidanje mjera za suzbijanje bolesti predviđenih u članku 39. Direktive 2006/88/EZ, odnosno promjene zdravstvenog statusa iz kategorije V. na kategoriju III.

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti može postići zdravstveni status kategorije III. u pogledu tih bolesti s popisa pod sljedećim uvjetima:

- (a) ispunjeni su uvjeti utvrđeni u točki I.2.2.1. podtočkama (a), (b) i (c). Ako provođenje mirovanja nije tehnički moguće, predmetna se uzgajališta podvrgava alternativnoj mjeri kojom se pruža gotovo isto jamstvo za iskorjenjivanje virusa IHN-a ili virusa VHS-a ili oboje iz okruženja uzgajališta;
- (b) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta u mirovanju ili podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a) u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima poribljena su ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta sa zdravstvenim statusom kategorije I., II. ili III. u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti;

- (c) poribljavanje je provedeno tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje ili su podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a).

II. Dijagnostičke metode i metode uzorkovanja

II.1. Organi koje se uzorkuje:

Tkiva za pretragu su slezena, prednji bubreg te ili srce ili encefalon. Pri uzorkovanju matičnih riba mogu se pretražiti i ovarijalna ili seminalna tekućina.

U slučaju male mladi, cijele ribe kraće od 4 cm mogu se usitniti sterilnim škarama ili skalpelom nakon što se ukloni stražnji dio tijela iza crijevnog otvora. Ako uzorak čine cijele ribe dužine tijela od 4 do 6 cm, prikuplja se utroba uključujući bubrege.

Mogu se objediniti dijelovi organa od najviše deset riba.

II.2. Dijagnostičke metode za postizanje i održavanje statusa područja slobodnog od bolesti za VHS ili IHN ili obje te bolesti

Dijagnostička metoda, u skladu s odobrenim dijagnostičkim metodama i postupcima utvrđenima u točki I. dijela 1. Priloga II., za postizanje ili održavanje statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu VHS-a ili IHN-a ili obiju tih bolesti jedna je od sljedećih:

- (a) izolacija virusa u staničnim kulturama popraćena identifikacijom upotrebom enzimskog imunisorbentnog testa (ELISA), indirektnim testom fluorescentnim protutjelima (IFAT), testom neutralizacije virusa ili reverznom transkripcijom s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR) ili
- (b) RT-qPCR.

II.3. Metode uzorkovanja i dijagnostičke metode za otklanjanje sumnje na prisutnost VHS-a ili IHN-a ili za potvrdu njihove prisutnosti

Kada je potrebno potvrditi ili otkloniti sumnju na VHS ili IHN ili obje te bolesti u skladu s člankom 28. Direktive 2006/88/EZ, poštuju se sljedeći postupci pregleda, uzorkovanja i ispitivanja:

- (a) uzgajalište u kojem se sumnja na prisutnost tih bolesti podvrgava se najmanje jednom zdravstvenom pregledu i jednom uzorkovanju 10 riba kada su prisutni klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi zaraze VHS-om ili IHN-om ili objema tim bolestima, ili od najmanje 30 riba ako nisu prisutni klinički ili *post-mortem* znakovi. Uzorke se ispituje upotrebom jedne dijagnostičke metode utvrđene u točkama i. i ii., ili više njih, u skladu s detaljnim dijagnostičkim metodama i postupcima kako su utvrđeni u odjeljku II. dijela 1. Priloga II.:
 - i. uobičajena izolacija virusa u staničnoj kulturi nakon koje slijedi imunokemijska ili molekularna identifikacija virusa;
 - ii. otkrivanje virusa metodom RT-qPCR;
 - iii. druge dijagnostičke metode kod kojih je dokazana slična učinkovitost, poput indirektnog testa fluorescentnim protutjelima (IFAT), enzimskog imunisorbentnog testa (ELISA), metode RT-PCR i imunohistokemije (IHC).
- (b) prisutnost VHS-a smatra se potvrđenom ako su rezultati jedne od tih dijagnostičkih metoda, ili više njih, pozitivni na virus VHS-a. Prisutnost IHN-a smatra se potvrđenom ako su rezultati jedne od tih dijagnostičkih metoda, ili više njih, pozitivni na virus IHN-a. Potvrda prvog slučaja VHS-a ili IHN-a u državama članicama, zonama ili kompartmentima koji prije nisu bili zaraženi temelji se na uobičajenoj izolaciji virusa u staničnoj kulturi ili metodi RT-qPCR;
- (c) sumnja na virus VHS-a ili virus IHN-a ili oba ta virusa može se otkloniti ako se testovima kultivacije stanica ili RT-qPCR testovima ne dobiju dodatni dokazi prisutnosti virusa VHS-a ili virusa IHN-a ili obaju tih virusa.

Tablica 1.A

Program nadziranja zona i kompartmenta za dvogodišnje kontrolno razdoblje navedeno u točki I.2.1. podtočki (a) alineji i. koje prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu VHS-a ili IHN-a

Vrsta uzgajališta	Broj zdravstvenih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj uzorkovanja na godinu (dvije godine)	Broj riba u uzorku ⁽¹⁾	
			Broj riba iz uzgoja	Broj matičnih riba ⁽²⁾
(a) uzgajališta s matičnim ribama	2	2	50 (prvi pregled) 75 (drugi pregled)	30 (prvi ili drugi pregled) 0 (prvi ili drugi pregled)
(b) uzgajališta samo s matičnim ribama	2	1	0	75 (prvi ili drugi pregled)
(c) uzgajališta bez matičnih riba	2	2	75 ⁽³⁾ (prvi i drugi pregled)	0

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 10

⁽¹⁾ Uzorci se ne smiju prikupljati prije nego proteknu tri tjedna od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

⁽²⁾ Ovarijalna ili seminalna tekućina matičnih riba prikuplja se u trenutku sazrijevanja, pri istiskivanju.

⁽³⁾ Uzorke je potrebno uzeti od količine riba dovoljne za osiguranje otkrivanja virusa VHS-a ili virusa IHN-a s 95 % sigurnosti ako je pretpostavljena prevalencija 5 %.

Tablica 1.B

Program nadziranja sa smanjenom veličinom uzorka za četverogodišnje kontrolno razdoblje navedeno u točki I.2.1. podtočki (a) alineji ii. koji prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu VHS-a ili IHN-a

Vrsta uzgajališta	Broj zdravstvenih pregleda na godinu	Broj uzorkovanja godišnje	Broj riba u uzorku ⁽¹⁾	
			Broj riba iz uzgoja	Broj matičnih riba ⁽²⁾
Prve dvije godine u razdoblju nadziranja				
(a) uzgajališta s matičnim ribama	2	1	0 (prvi pregled) 30 (drugi pregled)	0 (prvi pregled) 0 (drugi pregled)
(b) uzgajališta samo s matičnim ribama	2	1	0	30 (prvi ili drugi pregled)
(c) uzgajališta bez matičnih riba	2	1	30 ⁽³⁾ (prvi ili drugi pregled)	0
Zadnje dvije godine u razdoblju nadziranja				
(a) uzgajališta s matičnim ribama	2	2	30 (prvi pregled) 0 (drugi pregled)	0 (prvi pregled) 30 (drugi pregled)

Vrsta uzgajališta	Broj zdravstvenih pregleda na godinu	Broj uzorkovanja godišnje	Broj riba u uzorku ⁽¹⁾	
			Broj riba iz uzgoja	Broj matičnih riba ⁽²⁾
(b) uzgajališta samo s matičnim ribama	2	2		30 (prvi i drugi pregled)
(c) uzgajališta bez matičnih riba	2	2	30 ⁽³⁾ (prvi i drugi pregled)	

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 10

⁽¹⁾ Uzorci se ne smiju prikupljati prije nego proteknu tri tjedna od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

⁽²⁾ Ovarijalna ili seminalna tekućina matičnih riba prikuplja se u trenutku sazrijevanja, pri istiskivanju.

⁽³⁾ Uzorke je potrebno uzeti od količine riba dovoljne za osiguranje otkrivanja virusa VHS-a ili virusa IHN-a s 95 % sigurnosti ako je pretpostavljena prevalencija 10 %.

Tablica 1.C

Programi za nadziranje zona ili kompartmenta radi održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu VHS-a ili IHN-a kako je navedeno u točki I.3.

Razina rizika	Broj zdravstvenih pregleda	Broj riba u uzorku ⁽³⁾
Visok	dva godišnje	30 ⁽¹⁾ ⁽²⁾
Srednji	1 na godinu	30 ⁽¹⁾
Nizak	1 svake 2 godine	30 ⁽¹⁾

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 10

⁽¹⁾ Uzorci se ne smiju prikupljati prije nego proteknu tri tjedna od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

⁽²⁾ Uzorke je potrebno uzeti od količine riba dovoljne za osiguranje otkrivanja virusa VHS-a ili virusa IHN-a s 95 % sigurnosti ako je pretpostavljena prevalencija 10 %.

⁽³⁾ Za svaki zdravstveni pregled postoji najmanje jedan uzorak.

DIO 2.

METODE NADZIRANJA I KONTROLE ZA KOI HERPES VIROZU (KHV)

I. **Zahtjevi za programe nadziranja i iskorjenjivanja radi postizanja i održavanja statusâ područja slobodnih od bolesti u odnosu na KHV te mjere za suzbijanje zaraze Koi herpes virusom (KHV)**

I.1. Opći zahtjevi

Kada je potrebno ciljano nadziranje divljih populacija u skladu s drugim stavkom točke 2. dijela I. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ, utvrđuje se broj i zemljopisna rasprostranjenost točaka uzorkovanja radi postizanja razumne pokrivenosti države članice, zone ili kompartmenta. Točke uzorkovanja isto su tako reprezentativne za različite ekosustave u kojima se nalaze divlje prijemljive populacije, odnosno za riječne sustave i jezera.

Ciljano se nadziranje oslanja na redovito praćenje mjesta na kojima se drže prijemljive vrste. Mjesta se prati kada temperatura vode dosegne razine koje su povoljne za razvoj bolesti (više od 15 °C) i najranije dva tjedna nakon dana na koji su dosegnute te temperature. Bolesne ribe ili ribe koje se ponašaju neuobičajeno, a pronađene su na tom mjestu, uzorkuju se i ispituju.

Kad god je to moguće uzorkuju se ribe koje se drži dulje vrijeme na rasponu temperatura koji je povoljan za virus, točnije dva do tri tjedna na temperaturi od 15 °C do 26 °C. Međutim, može se prihvatiti sljedeći pristup:

- (a) prikupljanje subpopulacije pri prijenosu iz zimskih u ljetna jezera te držanje ribe u istom vodnom tijelu u kojem se nalazi i ljetno jezero dok se ne postignu minimalni zahtjevi za temperature ili
- (b) prikupljanje uzoraka pri izlovljavanju ili pri postupanju s drugim ribama tijekom uobičajenih načina gospodarenja. Ako je moguće, uzorke se prikuplja između 24 i 72 sata nakon provedbe tih načina gospodarenja radi poboljšanja mogućnosti otkrivanja KHV-a.

Kada je uzgajališta ili divlje populacije potrebno podvrgnuti zdravstvenim pregledima ili uzorkovanju više od jednom godišnje, vremenski razmaci između zdravstvenih pregleda ili prikupljanja uzoraka moraju biti što je moguće dulji tijekom sezone kad je vjerojatno da će temperatura vode doseći najviše godišnje vrijednosti a da ne premašuje 28 °C.

Sve se proizvodne jedinice, poput ribnjaka i bazena, mora podvrgnuti zdravstvenim pregledima kako bi se utvrdila prisutnost uginulih ili oslabljenih riba ili riba s neuobičajenim ponašanjem.

Cyprinus carpio i njegovi križanci, poput *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, prikupljaju se kad su prisutni u uzgajalištu.

Ribe koje je potrebno prikupiti za uzorkovanje biraju se na sljedeći način:

- i. ako su prisutne oslabljene ribe, ribe s neuobičajenim ponašanjem ili svježe uginule ribe koje još nisu u stanju raspadanja, moraju se odabrati takve ribe;
- ii. ako se za proizvodnju riba upotrebljava više izvora vode, uzorak se mora sastojati od riba iz svih izvora vode;
- iii. odabrane ribe moraju uključivati ribe koje treba prikupiti tako da u uzorku budu razmjerno zastupljeni svi dijelovi uzgajališta kao i sve dobne kategorije.

I.2. Posebni zahtjevi za postizanje zdravstvenog statusa područja slobodnog od bolesti (kategorija I.) u odnosu na KHV

I.2.1. Programi nadziranja

- (a) država članica, zona ili kompartiment zdravstvenog statusa kategorije III. u pogledu KHV-a može postići zdravstveni status kategorije I. kad su sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ i koja se nalaze u toj državi članici, zoni ili kompartimentu u skladu sa zahtjevima u pogledu statusa područja slobodnog od bolesti utvrđenima u Prilogu V. toj Direktivi i kada su sva ta uzgajališta i, kada se to zahtijeva drugim podstavkom točke 2. dijela I. tog Priloga, točke uzorkovanja divljih populacija odabranih u skladu s tim dijelom, podvrgnuta jednom od sljedećih programa nadziranja:

- i. model A – dvogodišnji program nadziranja:

Uzgajališta ili točke uzorkovanja moraju biti podvrgnute zdravstvenim pregledima i uzorkovane najmanje dvije godine zaredom kako je utvrđeno u Tablici 2.A u odjeljku III.

Tijekom tog dvogodišnjeg razdoblja ispitivanjem svih uzoraka upotrebom metoda dijagnostike utvrđenih u točki II.2. moralo se postići negativne rezultate za KHV i otkloniti svaku sumnju na KHV u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki III.2.;

- ii. model B – četverogodišnji program nadziranja sa smanjenom veličinom uzorka:

Uzgajališta ili točke uzorkovanja moraju biti podvrgnuti zdravstvenim pregledima i uzorkovani najmanje četiri godine zaredom kako je utvrđeno u Tablici 2.B u odjeljku III.

Tijekom tog četverogodišnjeg razdoblja, ispitivanjem svih uzoraka upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u točki II.2. moralo se postići negativne rezultate za KHV i otkloniti svaku sumnju na bolest KHV-a u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki III.2.;

- (b) ako se tijekom provedbe četverogodišnjeg programa nadziranja utvrđenog u točki (a) zaraza KHV-om potvrdi u uzgajalištu uključenom u taj program nadziranja te se stoga uzgajalištu povuče zdravstveni status kategorije II., to uzgajalište može odmah povratiti zdravstveni status kategorije II. i nastaviti s provedbom programa nadziranja radi postizanja statusa područja slobodnog od bolesti bez provedbe programa iskorjenjivanja bolesti kako je opisano u točki I.2.2. pod uvjetom da to uzgajalište zadovoljava sljedeće uvjete:
- i. radi se o kopnenom uzgajalištu čiji zdravstveni status u pogledu KHV-a ne ovisi o zdravstvenom statusu populacija akvatičnih životinja u okolnim prirodnim vodama u odnosu na tu bolest s popisa u skladu s točkom 3. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ;
 - ii. ispražnjeno je, očišćeno, dezinficirano i u njemu je provedeno mirovanje koje traje najmanje šest tjedana;
 - iii. poribljeno je ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona i kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu KHV-a.

I.2.2. Programi iskorjenjivanja

I.2.2.1. Opći zahtjevi

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu KHV-a može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kada su sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta barem sljedećem programu iskorjenjivanja:

- (a) minimalne mjere kontrole utvrđene u odjeljku 4. poglavlja V. Direktive 2006/88/EZ učinkovito su primijenjene, a u blizini uzgajališta (ili više njih) službeno proglašenog zaraženim KHV-om uspostavljeno je područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti navedeno u članku 32. točki (b) te Direktive koje uključuje zaraženo i ugroženo područje.

Područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti potrebno je definirati na temelju svakog pojedinačnog slučaja, uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na rizike širenja KHV-a na ribe iz uzgoja i divlje ribe poput sljedećih: broj, stopa i rasprostranjenost uginuća riba u uzgajalištu zaraženom KHV-om; udaljenost između susjednih uzgajališta i njihova gustoća; blizina klaonice; kontaktna uzgajališta; vrste prisutne u uzgajalištu; načini uzgoja koji se primjenjuju u zahvaćenom uzgajalištu i susjednim uzgajalištima; hidrodinamički uvjeti i drugi utvrđeni čimbenici od epidemiološke važnosti.

Za uspostavu zaraženih i ugroženih područja primjenjuju se sljedeći minimalni zahtjevi u pogledu geografskih granica tih područja:

- i. zaraženo područje uspostavlja se u neposrednoj blizini uzgajališta koje je službeno proglašeno zaraženim KHV-om i odgovara čitavom području vodnog sliva uzgajališta koje je službeno proglašeno zaraženim KHV-om. Nadležno tijelo može ograničiti širenje područja na dijelove područja vodnog sliva pod uvjetom da se ne ugrozi sprječavanje širenja KHV-a;
- ii. ugroženo se područje uspostavlja izvan zaraženog područja i odgovara proširenom području koje okružuje uspostavljeno zaraženo područje;

- (b) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ unutar zaraženog područja koje nije službeno proglašeno zaraženim KHV-om podvrgava se službenom istraživanju koje sadržava barem sljedeće elemente:
- prikupljanje uzoraka za ispitivanje od 10 riba kada su prisutni klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi KHV-a, ili od 30 riba kada nisu prisutni klinički ili *post-mortem* znakovi;
 - jedan zdravstveni pregled; u uzgajalištima u kojima su za ispitivanja iz točke III.2. dobiveni negativni rezultati zdravstveni pregledi nastavljaju se jednom mjesečno u sezoni kad je vjerojatno da će temperatura vode dosegnuti više od 15 °C sve dok se ne povuče status zaraženog područja u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);
- (c) sva je uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima KHV-om potrebno isprazniti, očistiti, dezinficirati i u njima je potrebno provesti mirovanje. Razdoblje mirovanja traje najmanje šest tjedana. Kad su ispraznjena sva uzgajališta u istom zaraženom području koja su službeno proglašena zaraženima, provode se najmanje tri tjedna sinkroniziranog mirovanja. Ovaj se stavak odnosi i na nova uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima tijekom provedbe programa iskorjenjivanja.

Pri provođenju mirovanja u uzgajalištima koja su službeno proglašena zaraženima, zaražena područja postaju ugrožena područja.

Nadležno tijelo može odlučiti zahtijevati pražnjenje, čišćenje, dezinfekciju i provedbu mirovanja drugih uzgajališta u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima. Duljinu razdoblja mirovanja određuje nadležno tijelo nakon procjene rizika za svaki pojedinačni slučaj;

- (d) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima KHV-om i sva druga uzgajališta u mirovanju unutar uspostavljenih zaraženih i ugroženih područja poribljavaju se:
- ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu KHV-a ili
 - na prijelazno razdoblje do 31. prosinca 2020. ribom iz država članica, zona ili kompartmenta s odobrenim programom nadziranja KHV-a.

Poribljavanje se provodi tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima KHV-om ispraznjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);

- (e) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u državi članici, zoni ili kompartmentu obuhvaćenom programom iskorjenjivanja i, kada je potrebno nadziranje divljih populacija, točke uzorkovanja odabrane u skladu s točkom I.1., naknadno su podvrgnuti barem programu nadziranja utvrđenome u točki I.2.1.

I.2.2.2. Zahtjevi za povrat statusa područja slobodnog od bolesti za kopnene kompartmente koji se sastoje od jednog uzgajališta koje je prethodno proglašeno slobodnim od KHV-a

Kopneni kompartment koji se sastoji od jednog uzgajališta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu KHV-a, čiji zdravstveni status u pogledu KHV-a ne ovisi o okolnim prirodnim vodama u skladu s točkom 3. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ i čiji je status kategorije I. povučen u skladu s člankom 53. stavkom 3. te Direktive, može vratiti zdravstveni status kategorije I. u pogledu bolesti KHV-a neposredno nakon što nadležno tijelo potvrdi da su u uzgajalištu ispunjeni sljedeći uvjeti:

- ispraznjeno je, očišćeno, dezinficirano i u njemu je provedeno mirovanje u trajanju od najmanje šest tjedana;
- poribljeno je ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. ili kompartmenta s odobrenim programom nadziranja KHV-a (zdravstveni status kategorije II).

I.3. Posebni zahtjevi za održavanje zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu KHV-a

Kada je potrebno ciljano nadziranje radi održavanja zdravstvenog statusa kategorije I., kako je predviđeno u članku 52. Direktive 2006/88/EZ, sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. toj Direktivi u predmetnoj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgavaju se zdravstvenom pregledu te uzorkuju u skladu s tablicom 2.B iz odjeljka III. ovog dijela, uzimajući u obzir razinu rizika uzgajališta za pojavu KHV-a.

Učestalost zdravstvenih pregleda kompartmenta kategorije I. u pogledu KHV-a koji su smješteni u kontinentalnim područjima i sastoje se od jednog ili više uzgajališta čiji zdravstveni status u pogledu KHV-a ovisi o zdravstvenom statusu okolnih prirodnih voda u pogledu te bolesti s popisa u skladu s točkom 2. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ usklađena je s brojem koji je u toj tablici 2.C utvrđen kao visoka razina rizika.

U državama članicama, zonama ili kompartmentima u kojima je ograničen broj uzgajališta te se ciljanim nadziranjem u tim uzgajalištima ne dobivaju dostatni epidemiološki podaci, u programe nadziranja za održavanje statusa područja slobodnog od bolesti uključene su točke uzorkovanja odabrane u skladu sa zahtjevima utvrđenima u točki I.1.

Te se točke uzorkovanja pregledavaju i uzorkuju naizmjenično u iznosu od 50 % točki uzorkovanja godišnje. Uzorkovanje se provodi u skladu s tablicom 2.C utvrđenom u odjeljku III. Uzorci se odabiru, pripremaju i ispituju kako je opisano u odjeljku II., a laboratorijska pretraživanja moraju dati negativne rezultate s obzirom na prisutnost uzročnika KHV-a.

Status područja slobodnog od bolesti održava se sve dok se za sve uzorke ispitane dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.2. dobivaju negativni rezultati za KHV i mora se otkloniti svaka sumnja na KHV u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki III.2.

I.4. Posebni zahtjevi za ukidanje mjera za suzbijanje predviđenih u članku 39. Direktive 2006/88/EZ za postizanje zdravstvenog statusa Kategorije III. u pogledu KHV-a u državama članicama, kompartmentima ili zonama zdravstvenog statusa kategorije V.

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu KHV-a može postići zdravstveni status kategorije III. u pogledu te bolesti s popisa pod sljedećim uvjetima:

- (a) ispunjeni su uvjeti utvrđeni u točki I.2.2.1. podtočkama (a), (b) i (c). Ako provođenje mirovanja nije tehnički moguće, predmetna se uzgajališta podvrgava alternativnoj mjeri kojom će se pružiti gotovo slično jamstvo za iskorjenjivanje KHV-a iz okruženja uzgajališta;
- (b) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta u mirovanju ili podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a) u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima poribljena su ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta sa zdravstvenim statusom kategorije I., II. ili III. u pogledu KHV-a;
- (c) poribljavanje je provedeno tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje ili su podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a).

II. **Dijagnostičke metode i metode uzorkovanja za nadziranje radi postizanja i održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu KHV-a**

II.1. Uzorci

Tkiva za pretragu su dijelovi škrge i bubrega. Mogu se objediniti dijelovi organa od najviše dviju riba.

II.2. Dijagnostičke metode za nadziranje radi postizanja i održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu KHV-a

Dijagnostička je metoda za postizanje ili održavanje statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu KHV-a reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) u skladu s detaljnim dijagnostičkim metodama i postupcima kako su utvrđeni u točki II. dijela 2. Priloga II.

III. Dijagnostičke metode i metode uzorkovanja za službena istraživanja radi potvrđivanja ili uklanjanja sumnje na KHV

III.1. Uzorci

Tkiva za pretragu su dijelovi škrge i bubrega. Mogu se objediniti dijelovi organa od najviše dviju riba.

III.2. Službena istraživanja i dijagnostičke metode za otklanjanje sumnje na prisutnost zaraze KHV-om i za potvrđivanje prisutnosti te zaraze

Kada je potrebno potvrditi ili otkloniti sumnju na KHV u skladu s člankom 28. Direktive 2006/88/EZ, poštuje se sljedeći postupak pregleda, uzorkovanja i ispitivanja:

(a) u službeno istraživanje uključen je najmanje jedan zdravstveni pregled i jedno uzorkovanje 10 riba kada su prisutni klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi zaraze KHV-om, ili 30 riba kada nisu prisutni klinički ili *post-mortem* znakovi. Uzorke se ispituje upotrebom dijagnostičke metode utvrđene u točki (b) u skladu s detaljnim dijagnostičkim metodama i postupcima utvrđenima u točki II. dijela 2. Priloga II.;

(b) prisutnost zaraze KHV-om smatra se potvrđenom ako se KHV otkrije metodom PCR;

sumnja na KHV može se otkloniti ako se tim testovima ne dobiju dodatni dokazi prisutnosti KHV-a.

Tablica 2.A

Program nadziranja zona i kompartmenta za dvogodišnje kontrolno razdoblje koje prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu KHV-a kako je navedeno u točki I.2.1.

		Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu (dvije godine)	Broj riba u uzorku
Uzgajališta/mjesta uzorkovanja	Prve dvije godine u razdoblju nadziranja	2	2	75 ⁽¹⁾
	Najveći broj riba u skupnom uzorku: 2			

(¹) Uzorke je potrebno uzeti od količine riba dovoljne za osiguranje otkrivanja KHV-a s 95 % sigurnosti ako je pretpostavljena prevalencija 5 %.

Tablica 2.B

Program nadziranja zona i kompartmenta za četverogodišnje kontrolno razdoblje koje prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu KHV-a kako je navedeno u točki I.2.1.

		Broj kliničkih pregleda na godinu	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu	Broj riba u uzorku
Uzgajališta/mjesta uzorkovanja	Prve dvije godine u razdoblju nadziranja	1	1	30
Uzgajališta/mjesta uzorkovanja	Zadnje dvije godine u razdoblju nadziranja	2	2	30
	Najveći broj riba u skupnom uzorku: 2			

Tablica 2.C

Programi nadziranja zona ili kompartmenta radi održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu KHV-a kako je navedeno u točki I.3.

Razina rizika	Broj zdravstvenih pregleda	Broj riba u uzorku
Visok	dva godišnje	30
Srednji	1 na godinu	30
Nizak	1 svake 2 godine	30

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 2

Tablica 2.D

Program nadziranja za održavanje statusa područja slobodnog od bolesti u državama članicama, zonama ili kompartimentima s ograničenim brojem uzgajališta u kojima se ciljanim nadziranjem ne dobivaju dostatni epidemiološki podaci kako je navedeno u točki I.3.

	Broj kliničkih pregleda na godinu	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu	Broj riba u uzorku
Točke uzorkovanja	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine	30

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 2

DIO 3.

METODE NADZIRANJA I KONTROLE ZA ZARAZNU ANEMIJU LOSOSA (ISA)

I. Zahtjevi za programe nadziranja i iskorjenjivanja radi postizanja i održavanja statusâ područja slobodnih od bolesti u odnosu na ISA-u te mjere za suzbijanje zaraze ISA-om s uklonjenim genotipom HPR

I.1. Opći zahtjevi

Kada je zdravstvene preglede i uzorkovanje uzgajališta u skladu s drugim stavkom točke 2. dijela I. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ potrebno provoditi više od jednom godišnje, vremenski razmaci između zdravstvenih pregleda ili prikupljanja uzoraka moraju biti što je moguće dulji.

Kada je potrebno ciljano nadziranje divljih populacija u skladu s drugim stavkom točke 2. dijela I. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ, utvrđuju se broj i zemljopisna rasprostranjenost točaka uzorkovanja radi postizanja razumne pokrivenosti države članice, zone ili kompartmenta. Točke uzorkovanja reprezentativne su i za različite ekosustave u kojima se nalaze divlje populacije prijemljivih vrsta.

Zdravstveni pregledi za prisutnosti uginulih ili oslabljenih riba ili riba s neuobičajenim ponašanjem provode se u svim proizvodnim jedinicama poput jezera, bazena i kaveza. Posebnu pozornost treba obratiti na područje ispusta vode gdje se zbog vodene struje obično sakupljaju oslabljene ribe.

Ribe koje je potrebno prikupiti za uzorkovanje biraju se na sljedeći način:

- (a) odabiru se samo ugibajuće i svježe uginule ribe, ali ne one koje su u stanju raspadanja; kao prioritet se prikupljaju ribe kod kojih su vidljivi znakovi anemije, krvarenja ili drugi klinički znakovi koji ukazuju na poremećaje u cirkulaciji;
- (b) ako se među prijemljivim vrstama na tom mjestu nalazi atlantski losos, prvo se prikupljaju uzorci atlantskog lososa. Ako u uzgajalištu riba nema atlantskog lososa, moraju se uzorkovati druge prijemljive ribe;
- (c) ako se za proizvodnju riba upotrebljava više izvora vode, uzorak se sastoji od riba iz svih izvora vode;
- (d) u odabrane ribe uključene su ribe koje treba prikupiti tako da u uzorku budu razmjerno zastupljene sve proizvodne jedinice u uzgajalištu poput kaveza, bazena i jezera te sve dobne kategorije.

I.2. Posebni zahtjevi za postizanje zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu ISA-e

I.2.1. Programi nadziranja

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije III. u skladu s dijelom B Priloga III. Direktivi 2006/88/EZ u pogledu ISA-e može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kad sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ i koja se nalaze u toj državi članici, zoni ili kompartmentu ispune zahtjeve utvrđene u Prilogu V. toj Direktivi i kad su sva ta uzgajališta i, kada se to zahtijeva drugim podstavkom točke 2. dijela I. Priloga V. toj Direktivi, točke uzorkovanja divljih populacija odabranih u skladu s tom točkom, podvrgnuta sljedećem programu nadziranja:

- (a) uzgajališta ili točke uzorkovanja podvrgnute su zdravstvenim pregledima i uzorkovane najmanje dvije godine zaredom kako je utvrđeno u tablici 3.A iz odjeljka II.;
- (b) tijekom tog dvogodišnjeg razdoblja, ispitivanjem svih uzoraka upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u točki II.2. moralo se postići negativne rezultate za virus ISA-e s uklonjenim genotipom HPR i otkloniti svaku sumnju na ISA-u u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.;
- (c) ako se tijekom provedbe programa nadziranja ISA potvrdi u uzgajalištu uključenom u taj program nadziranja te mu se stoga povuče zdravstveni status kategorije II., mora se provesti program iskorjenjivanja u skladu s točkom I.2.2.

I.2.2. Programi iskorjenjivanja

I.2.2.1. Opći zahtjevi

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu ISA-e može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kad su sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta programu iskorjenjivanja koji je u skladu s točkama od (a) do (e) u nastavku.

- (a) minimalne mjere kontrole utvrđene u odjeljku 3. poglavlja V. Direktive 2006/88/EZ učinkovito su primijenjene, a u blizini uzgajališta (ili više njih) službeno proglašenog zaraženim ISA-om s uklonjenim genotipom HPR ili u kojem je potvrđena ISA uspostavljeno je područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti kako je navedeno u članku 32. točki (b) koje uključuje zaraženo i ugroženo područje.

Područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti potrebno je definirati na temelju svakog pojedinačnog slučaja, uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na rizike širenja ISA-e na ribe iz uzgoja i divlje ribe poput sljedećih: broj, stopa i rasprostranjenost uginuća riba u uzgajalištu zaraženom virusom ISA-e s uklonjenim genotipom HPR ili potvrđenom ISA-om; udaljenost između susjednih uzgajališta i njihova gustoća; blizina klaonica; kontaktna uzgajališta; vrste prisutne u uzgajalištu; načini uzgoja koji se primjenjuju u zahvaćenom uzgajalištu i susjednim uzgajalištima; hidrodinamički uvjeti i drugi utvrđeni čimbenici od epidemiološke važnosti.

Za uspostavu zaraženih i ugroženih područja primjenjuju se sljedeći minimalni zahtjevi u pogledu geografskih granica tih područja:

- i. zaraženo područje uspostavlja se u neposrednoj blizini uzgajališta koje je službeno proglašeno zaraženim ISA-om i odgovara sljedećemu:
 1. u obalnim područjima: područje kruga s polumjerom od najmanje jednog plimnog doseg ili najmanje pet kilometara, ovisno o tome koje je veće, sa središtem u uzgajalištu koje je službeno proglašeno zaraženim ISA-om, ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epizootiološkim podacima;
 2. u kopnenim područjima: čitavo područje vodnog sliva uzgajališta koje je službeno proglašeno zaraženim ISA-om. Nadležno tijelo može ograničiti širenje područja na dijelove područja vodnog sliva ili na područje uzgajališta pod uvjetom da se ne ugrozi sprječavanje širenja ISA-e;
 - ii. ugroženo se područje uspostavlja izvan zaraženog područja i odgovara sljedećemu:
 1. u obalnim područjima: područje koje okružuje zaraženo područje, sa zonama preklapanja izmjene plime i oseke; ili područje koje okružuje zaraženo područje, a uključeno je u krug polumjera 10 km od središta zaraženog područja; ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima ili
 2. u kopnenim područjima: prošireno područje izvan uspostavljenog zaraženog područja;
- (b) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ unutar zaraženog područja koje nije službeno proglašeno zaraženim ISA-om podvrgava se službenom istraživanju koje sadržava barem sljedeće elemente:
- i. prikupljanje uzoraka za ispitivanje od najmanje 10 ugibajućih riba kada su prisutni klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi zaraze ISA-om, ili od najmanje 30 riba kada nisu prisutni klinički ili *post-mortem* znakovi;
 - ii. jedan zdravstveni pregled; u uzgajalištima u kojima su za ispitivanja iz točke i. dobiveni negativni rezultati zdravstveni pregledi nastavljaju se jednom mjesečno sve dok se ne povuče status zaraženog područja u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);
- (c) sva uzgajališta službeno proglašena zaraženima virusom ISA-e s uklonjenim genotipom HPR ili u kojima je potvrđena ISA prazne se, čiste, dezinficiraju i u njima se provodi mirovanje koje traje najmanje tri mjeseca. Zaražena i ugrožena područja mogu se ukinuti nakon što su ispražnjena, očišćena i dezinficirana sva uzgajališta u zaraženom području nakon čega je slijedilo razdoblje sinkroniziranog mirovanja od najmanje šest tjedana.
- Pri provođenju mirovanja u uzgajalištima koja su službeno proglašena zaraženima, zaražena područja postaju ugrožena područja.
- Nadležno tijelo može odlučiti zahtijevati pražnjenje, čišćenje, dezinfekciju i provedbu mirovanja drugih uzgajališta u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima. Duljinu razdoblja mirovanja za ta uzgajališta određuje nadležno tijelo nakon procjene rizika za svaki pojedinačni slučaj;
- (d) sva uzgajališta službeno proglašena zaraženima virusom ISA-e s uklonjenim genotipom HPR ili u kojima je potvrđena ISA i sva druga uzgajališta u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima u kojima je provedeno mirovanje poribljavaju se ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta kategorije I. u pogledu ISA-e.
- Poribljavanje se provodi tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);
- (e) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u državi članici, zoni ili kompartmentu obuhvaćenom programom iskorjenjivanja i, kada je potrebno nadziranje divljih populacija, točke uzorkovanja odabrane u skladu s točkom I.1., naknadno se podvrgavaju programu nadziranja utvrđenome u točki I.2.1.

- I.2.2.2. Zahtjevi u pogledu vraćanja statusa područja slobodnog od bolesti za kopnene kompartmente koji se sastoje od jednog uzgajališta koje je prije imalo zdravstveni status kategorije I.

Kopneni kompartment koji se sastoji od jednog uzgajališta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu ISA-e, čiji zdravstveni status ne ovisi o okolnim prirodnim vodama u skladu s točkom 3. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ i čiji je status kategorije I. povučen u skladu s člankom 53. stavkom 3. te Direktive, može povratiti taj zdravstveni status neposredno nakon što nadležno tijelo potvrdi da su u uzgajalištu ispunjeni sljedeći uvjeti:

- (a) ispražnjeno je, očišćeno, dezinficirano i u njemu je provedeno mirovanje koje traje najmanje šest tjedana;
- (b) poribljeno je ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona i kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu ISA-e.

- I.3. Minimalne mjere za kontrolu za održavanje zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu ISA-e

Kada je potrebno ciljano nadziranje radi održavanja zdravstvenog statusa kategorije I., kako je predviđeno u članku 52. Direktive 2006/88/EZ, sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. toj Direktivi u predmetnoj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgavaju se zdravstvenim pregledima te uzorkuju u skladu s tablicom 3.B⁽¹⁾ iz odjeljka II. ovog dijela, uzimajući u obzir razinu rizika uzgajališta za pojavu ISA-e.

Pri utvrđivanju učestalosti zdravstvenih pregleda kompartmenta za zdravstveni status kategorije I. u pogledu ISA-e smještenih u kopnenim područjima te u kojima zdravstveni status u pogledu ISA-e ovisi o zdravstvenom statusu okolnih prirodnih voda u kojima obitava atlantski losos (*Salmo salar*), rizik za pojavu ISA-e smatra se visokim.

Status područja slobodnog od bolesti u pogledu ISA-e može se održavati samo dok se za sve uzorke ispitane dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.2. dobivaju negativni rezultati za ISA-u s uklonjenim genotipom HPR i otklonjena je svaka sumnja na ISA-u u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.

- I.4. Posebni zahtjevi za postizanje zdravstvenog statusa kategorije III. u pogledu ISA-e s uklonjenim genotipom HPR u državama članicama, zonama ili kompartmentima koji su prije imali zdravstveni status kategorije V

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu ISA-e može postići zdravstveni status kategorije III. pod sljedećim uvjetima:

- (a) ispunjeni su uvjeti utvrđeni u točki I.2.2.1. podtočkama (a), (b) i (c). Ako provođenje mirovanja nije tehnički moguće, uzgajališta se podvrgavaju alternativnoj mjeri kojom se pruža gotovo isto jamstvo za iskorjenjivanje ISA-e iz okruženja uzgajališta;
- (b) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta u mirovanju ili podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a) u zaraženim i ugroženim područjima poribljena su ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta sa zdravstvenim statusom kategorije I., II. ili III. u pogledu ISA-e;
- (c) to je poribljavanje provedeno tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje ili su podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a);
- (d) tijekom razdoblja od dvije godine nakon provođenja mjera navedenih u točkama (a), (b) i (c) nije bilo potvrde pojave ISA-e s uklonjenim genotipom HPR, a uklonjene su i sve sumnje tijekom tog razdoblja, u skladu s postupcima uspostavljenima u točki II.3.

⁽¹⁾ Ne primjenjuje se na uzgajališta koja uzgajaju samo kalifornijsku pastrvu (*Onchorynchus mykiss*) ili potočnu pastrvu (*Salmo trutta*) ili oboje i u kojima se opskrba vodom temelji isključivo na izvorima svježe vode u kojima nema atlantskog lososa (*Salmo salar*).

II. Dijagnostičke metode i službena istraživanja**II.1. Uzorci**

Tkiva za pretragu su sljedeća:

- (a) histologija: pronefros, jetra, srce, gušterača, crijeva, slezena i škrge;
- (b) imunohistokemija: mezonefros i srce, uključujući zaliske i arterijsku glavnicu;
- (c) analiza RT-qPCR: mezonefros i srce;
- (d) virusna kultura: mezonefros, srce, jetra i slezena;

Mogu se objediniti dijelovi organa od najviše pet riba.

II.2. Dijagnostičke metode za postizanje i održavanje statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu ISA-e

Dijagnostička je metoda koja se upotrebljava za postizanje ili održavanje statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu ISA-e u skladu s točkama I.2. i I.3. RT-qPCR, nakon koje slijedi sekvenciranje pozitivnih uzoraka u skladu s podrobnim metodama i postupcima utvrđenima u dijelu 3. Priloga II.

U slučaju pozitivnih rezultata dobivenih metodom RT-qPCR ispitat će se naknadni uzorci prije provedbe početnih kontrolnih mjera predviđenih u članku 28. Direktive 2006/88/EZ.

Te se uzorke ispituje u skladu s podrobnim metodama i postupcima utvrđenima u dijelu 3. Priloga II. na sljedeći način:

- (a) probiranje uzoraka metodom RT-qPCR, uključujući sekvenciranje gena HE radi potvrde uklanjanja genotipa HPR
 - i
- (b) pretraživanje tijekom pripreme tkiva upotrebom posebnih protutijela za virus ISA-e (točnije IHC-a na fiksiranim dijelovima ili IFAT-a na otiscima tkiva) ili
- (c) izolacija i identifikacija virusa ISA-e u staničnoj kulturi iz najmanje jednog uzorka dobivenog od bilo koje ribe uzorkovane u uzgajalištu.

II.3. Službena istraživanja i dijagnostičke metode za otklanjanje sumnje na prisutnost ISA-e ili za potvrđivanje njezine prisutnosti

Kada je potrebno potvrditi ili otkloniti sumnju na ISA-u u skladu s člankom 28. Direktive 2006/88/EZ, poštuje se sljedeći postupak pregleda, uzorkovanja i ispitivanja:

- (a) službeno istraživanje u koje je uključen najmanje jedan zdravstveni pregled i jedno uzorkovanje 10 ugibajućih riba kada postoje klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi koji upućuju na ISA-u. Ako ne postoje klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi koji upućuju na ISA-u, nakon zdravstvenog pregleda slijedi ciljano uzorkovanje najmanje 30 ugibajućih riba ili nedavno uginulih riba uobičajene građe u skladu s točkom I.1. Uzorke se ispituje u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki (b);
- (b) u slučaju pozitivnih rezultata dobivenih metodom RT-qPCR za ISA-u s uklonjenim genotipom HPR, ispitat će se dodatni uzorci prije provedbe početnih kontrolnih mjera predviđenih u članku 28. Direktive 2006/88/EZ. Slučaj zaraze ISA-om na koji se sumnja potvrđuje se upotrebom podrobnih metoda i postupaka utvrđenih u dijelu 3. Priloga II. u skladu sa sljedećim kriterijima:
 - i. otkrivanje virusa ISA-e metodom RT-qPCR, uključujući sekvenciranje gena HE radi potvrde uklanjanja genotipa HPR te otkrivanje virusa ISA-e tijekom pripreme tkiva upotrebom posebnih protutijela za virus ISA-e (točnije IHC-a na fiksiranim dijelovima ili IFAT-a na otiscima tkiva)

ili

ii. otkrivanje virusa ISA-e metodom RT-qPCR, uključujući sekvenciranje gena HE radi potvrde uklanjanja genotipa HPR i

izolacija i identifikacija virusa ISA-e u staničnoj kulturi iz najmanje jednog uzorka dobivenog od bilo koje ribe iz uzgajališta;

(c) kada su prisutne kliničke, makroskopske patološke promjene ili histopatološki nalazi koji upućuju na ISA-u, nalaze je potrebno potkrijepiti otkrivanjem virusa dvjema dijagnostičkim metodama s neovisnim načelima za otkrivanje, poput metoda RT-qPCR i IHC, u skladu s dijelom 3. Priloga II.

Sumnja na ISA-u može se otkloniti ako se ispitivanjima i pregledima tijekom razdoblja od 12 mjeseci od datuma kada se počelo sumnjati potvrdi da ne postoje daljnji dokazi prisutnosti ISA-e.

Tablica 3.A

Program nadziranja zona i kompartenta za dvogodišnje kontrolno razdoblje koje prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu ISA-e kako je navedeno u točki I.2.1.

Godina nadziranja	Broj zdravstvenih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu (dvije godine)	Broj riba koje je potrebno uzorkovati na godinu
Godina 1.	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾
Godina 2.	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Uzorke je potrebno prikupljati, pohranjivati i pretraživati tijekom dvaju jednomjesečnih razdoblja ispitivanja (točnije, u proljeće i jesen) ili kad je to potrebno u skladu s praktičnim zahtjevima.

⁽²⁾ Najveći broj riba u skupnom uzorku: 5.

Tablica 3.B

Programi nadziranja zona ili kompartenta radi održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu ISA-e kako je navedeno u točki I.3. ⁽²⁾

Razina rizika	Broj zdravstvenih pregleda na godinu	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu	Broj riba koje je potrebno uzorkovati na godinu
Visok	2	2 ⁽¹⁾	2 * 30
Srednji	1	1 ⁽¹⁾	30
Nizak	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine	30 svake dvije godine

⁽¹⁾ Uzorke je potrebno prikupljati i pretraživati tijekom dvaju jednomjesečnih razdoblja ispitivanja (točnije, u proljeće i jesen) ili kad je to potrebno u skladu s praktičnim zahtjevima.

⁽²⁾ Ne primjenjuje se na uzgajališta koja uzgajaju samo kalifornijsku pastrvu (*Oncorhynchus mykiss*) ili potočnu pastrvu (*Salmo trutta*) ili oboje i u kojima se opskrba vodom temelji isključivo na izvorima svježje vode u kojima nema atlantskog lososa (*Salmo salar*).

DIO 4.

METODE NADZIRANJA I KONTROLE ZA ZARAZU MARTEILIJOM REFRINGENS

I. **Zahtjevi za programe nadziranja i iskorjenjivanja radi postizanja i održavanja statusa područja slobodnih od bolesti u odnosu na zarazu *Marteilijom refringens***

I.1. Opći zahtjevi

Zdravstveni pregledi i, prema potrebi, uzorkovanje za laboratorijska pretraživanja provode se tijekom razdoblja godine za koje je poznato da je prevalencija parazita u državi članici, zoni ili kompartmentu najveća. Kada nisu dostupni ti podaci, uzorkovanje se provodi neposredno nakon što temperatura vode prijeđe 17 °C.

Kada je u skladu sa zahtjevima iz dijela 4. potrebno uzorkovati mekušce, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

- (a) ako su u proizvodnim jedinicama ili proizvodnom području prisutni *Ostrea* spp. i *Mytilus* spp., oba se roda uzorkuje u jednakoj količini uzorka. Ako je prisutan samo jedan od tih rodova, uzorkuje se taj rod. Ako nisu prisutni ni rod *Ostrea* ni rod *Mytilus*, uzorak mora biti reprezentativan za sve druge prisutne prijemljive vrste;
- (b) ako su u proizvodnim jedinicama prisutni oslabljeni, otvoreni ili svježe uginuli mekušci koji nisu u stanju raspadanja, primarno se sakuplja te mekušce. Ako nisu prisutni takvi mekušci, odabiru se najstariji zdravi mekušci;
- (c) pri uzorkovanju u uzgajalištima mekušaca u kojima se za proizvodnju mekušaca upotrebljava više od jednog izvora vode, u uzorkovanje se uključuju mekušci iz svih izvora vode tako da su svi dijelovi uzgajališta razmjerno predstavljeni u uzorku;
- (d) pri uzorkovanju u područjima uzgoja mekušaca u uzorak se uključuju mekušci iz dostatnog broja točki uzorkovanja tako da su svi dijelovi područja uzgoja mekušaca razmjerno predstavljeni u uzorku. Glavni su čimbenici koje je potrebno uzeti u obzir pri odabiru tih točki uzorkovanja prethodne točke uzorkovanja na kojima je otkrivena *Marteilia refringens*, gustoća držanja, protok vode, prisutnost prijemljivih vrsta, prisutnost vektorskih vrsta, batimetrija i načini gospodarenja. U uzorkovanje se uključuju prirodna staništa.

I.2. Posebni zahtjevi za postizanje zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu *Marteilije refringens*

I.2.1. Programi nadziranja

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije III. u pogledu zaraze *Marteilijom refringens* može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kad su sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta barem sljedećem programu nadziranja koji se sastoji od zdravstvenih pregleda i prikupljanja uzoraka za ispitivanje.

Dvogodišnji program nadziranja:

- (a) uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca podvrgnuta su zdravstvenim pregledima i uzorkovana najmanje dvije godine zaredom kako je utvrđeno u Tablici 4.A iz odjeljka II.;
- (b) tijekom tog dvogodišnjeg razdoblja, ispitivanjem svih uzoraka upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u točki II.2. postignuti su negativni rezultati za *Marteiliju refringens* i otklonjena svaka sumnja na *Marteiliju refringens* u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.;
- (c) kad je u uzorak potrebno uključiti *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* ili *Mytilus galloprovincialis* koji su podrijetlom iz države članice, zone ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I., oni su morali biti uvedeni u uzgajalište ili područje uzgoja mekušaca barem u proljeće neposredno prije razdoblja provedbe programa nadziranja.

I.2.2. Programi iskorjenjivanja

Iskorjenjivanje *Marteilije refringens* u većini se slučajeva smatra nemogućim, ali ako država članica procijeni da je to izvedivo, primjenjuje se model programa iskorjenjivanja naveden u nastavku.

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu zaraze *Marteilijom refringens* može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kad su sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta barem sljedećem programu iskorjenjivanja:

- (a) mjere utvrđene u odjeljku 3. poglavlja V. Direktive 2006/88/EZ učinkovito su primijenjene, a u blizini uzgajališta (ili više njih) ili područja uzgoja mekušaca (ili više njih) službeno proglašenog zaraženim *Marteilijom refringens* uspostavljeno je područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti navedeno u članku 32. točki (b) Direktive 2006/88/EZ koje uključuje zaraženo i ugroženo područje.

Područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti definira se na temelju svakog pojedinačnog slučaja, uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na rizike *Marteilije refringens* poput sljedećih: broj, dob, stopa i rasprostranjenost uginuća mekušaca u uzgajalištu ili području uzgoja mekušaca koji su zaraženi *Marteilijom refringens*, uključujući divlje mekušce; udaljenost između susjednih uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca, uključujući divlje mekušce, i njihova gustoća; blizina objekata za preradu, kontaktnih uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca; vrste, a posebno prijemljive vrste i vektorske vrste, prisutne u uzgajalištima ili područjima uzgoja mekušaca; načini uzgoja koji se primjenjuju u zahvaćenim uzgajalištima i područjima uzgoja mekušaca te susjednim uzgajalištima i područjima uzgoja mekušaca; hidrodinamički uvjeti i drugi utvrđeni čimbenici od epidemiološke važnosti.

Za uspostavu zaraženih i ugroženih područja primjenjuju se sljedeći minimalni zahtjevi:

- i. zaraženo područje uspostavlja se u neposrednoj blizini uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koje je službeno proglašeno zaraženim *Marteilijom refringens* te odgovara području utvrđenom u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima;
 - ii. ugroženo područje uspostavlja se izvan zaraženog područja i odgovara području koje okružuje zaraženu zonu, a utvrđeno je u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima;
- (b) sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u zaraženom području koje nije službeno proglašeno zaraženim *Marteilijom refringens* podvrgava se službenom istraživanju koje se sastoji barem od prikupljanja uzoraka za ispitivanje od 150 mekušaca nakon početka razdoblja prijenosa *Marteilije refringens*. Kada razdoblje prijenosa nije poznato, uzorkovanje započinje u razdoblju nakon što temperatura vode prijeđe 17 °C;
- (c) sva uzgajališta i područja uzgoja mekušaca koja su službeno proglašena zaraženima *Marteilijom refringens* prazne se i u njima se provodi mirovanje te ih se, ako je to moguće, čisti i dezinficira;

Razdoblje mirovanja traje najmanje:

- i. dva mjeseca u slučaju uzgajališta i područja uzgoja mekušaca čija je povezanost s okolnim vodama poput mrijestilišta i mladičnjaka ograničena;
- ii. dva mjeseca u slučaju uzgajališta i područja uzgoja mekušaca s neograničenom povezanošću s okolnim vodama pod uvjetom da su zaraženi mekušci prijemljivih vrsta i oni mekušci prijemljivih vrsta koji su epidemiološki povezani sa zaraženim uzgajalištem ili područjem uzgoja mekušaca sakupljeni ili uklonjeni prije razdoblja godine kad je poznato da je prevalencija *Marteilije refringens* najveća ili, kad to razdoblje nije poznato, prije razdoblja u kojem temperatura vode prijeđe 17 °C;
- iii. četrnaest mjeseci u slučaju uzgajališta i područja uzgoja mekušaca s neograničenom povezanošću s okolnim vodama pod uvjetom da zaraženi mekušci prijemljivih vrsta i oni mekušci prijemljivih vrsta koji su epidemiološki povezani sa zaraženim uzgajalištem ili područjem uzgoja mekušaca nisu sakupljeni ili uklonjeni prije razdoblja godine kad je poznato da je prevalencija *Marteilije refringens* najveća ili, kad taj podatak nije poznat, kad mekušci prijemljivih vrsta nisu sakupljeni ili uklonjeni prije razdoblja u kojem je temperatura vode prešla 17 °C.

Kad su ispražnjena sva uzgajališta i područja uzgoja mekušaca koja su službeno proglašena zaraženima, provode se najmanje četiri tjedna sinkroniziranog mirovanja.

Nadležno tijelo može odlučiti zahtijevati pražnjenje, čišćenje, dezinfekciju i provedbu mirovanja drugih uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca, prema potrebi, u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima. Duljinu razdoblja mirovanja određuje nadležno tijelo nakon procjene rizika za svaki pojedinačni slučaj;

- (d) sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima u kojima je provedeno mirovanje poribljavaju se mekušcima koji su podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu zaraze *Marteilijom refringens*.

Poribljavanje se provodi tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i njima je provedeno mirovanje u skladu s točkom I.2.2. podtočkom (c);

- (e) sva uzgajališta i područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u državi članici, zoni ili kompartmentu obuhvaćenom programom iskorjenjivanja naknadno se podvrgavaju programu nadziranja utvrđene u točki I.2.1. ovog dijela.

I.3. Posebni zahtjevi za održavanje zdravstvenog statusa područja slobodnog od bolesti (kategorija I.) u odnosu na zarazu *Marteilijom refringens*

Kad je potrebno ciljano nadziranje radi održavanja zdravstvenog statusa kategorije I., kako je predviđeno u članku 52. Direktive 2006/88/EZ, sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u predmetnoj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgavaju se zdravstvenim pregledima te uzorkuju u skladu s tablicom 4.B iz odjeljka II., uzimajući u obzir razinu rizika uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca za pojavu *Marteilije refringens*.

Status područja slobodnog od bolesti može se održavati dok se za sve uzorke dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.2. dobivaju negativni rezultati za *Marteiliju refringens* i otklanjaju sve sumnje na *Marteiliju refringens* u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.

I.4. Zahtjevi za ukidanje mjera za suzbijanje predviđeni u članku 39. Direktive 2006/88/EZ (promjena iz zdravstvenog statusa kategorije V. na kategoriju III.) u pogledu zaraze *Marteilijom refringens*

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu zaraze *Marteilijom refringens* može postići zdravstveni status kategorije III. u pogledu te bolesti s popisa pod sljedećim uvjetima:

- (a) ispunjeni su uvjeti utvrđeni u točki I.2.2. podtočkama (a), (b) i (c). Ako provođenje mirovanja nije tehnički moguće, uzgajališta se podvrgava alternativnoj mjeri kojom se pruža gotovo isto jamstvo za iskorjenjivanje *Marteilije refringens* iz okruženja uzgajališta;
- (b) sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja su u mirovanju ili su podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a) u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima poribljena su mekušcima koji su podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta sa zdravstvenim statusom kategorije I., II. ili III. u pogledu zaraze *Marteilijom refringens*;
- (c) poribljavanje je provedeno tek nakon što su sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje ili su podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a);
- (d) tijekom razdoblja od dvije godine nakon provedbe mjera navedenih u točkama (a), (b) i (c) nije bilo potvrde zaraze *Marteilijom refringens*, a uklonjene su i sve sumnje tijekom tog razdoblja, u skladu s postupcima uspostavljenima u točki II.3.

II. Dijagnostičke metode i službena istraživanja

II.1. Uzorci

Životinje se cijele dostavlja u laboratorij radi provođenja dijagnostičkih ispitivanja predviđenih u točkama II.2. i II.3.

II.2. Dijagnostičke metode za postizanje i održavanje statusa područja slobodnog od zaraze *Marteilijom refringens*

Dijagnostičke metode koje se upotrebljavaju za postizanje ili održavanje statusa područja slobodnog od zaraze *Marteilijom refringens* nakon provođenja detaljnih dijagnostičkih metoda i postupaka utvrđenih u dijelu 4. Priloga II. jesu histopatologija, otisci tkiva ili PCR.

II.3. Službena istraživanja i dijagnostičke metode za potvrđivanje prisutnosti zaraze *Marteilijom refringens* ili za otklanjanje sumnje na tu zarazu

Kad je sumnju na zarazu *Marteilijom refringens* potrebno potvrditi ili otkloniti u skladu s člankom 28. Direktive 2006/88/EZ, poštuju se sljedeći postupci pregleda, uzorkovanja i ispitivanja:

- (a) u službeno istraživanje uključeno je najmanje jedno uzorkovanje na 30 mekušaca prijemljivih vrsta ako se sumnja temelji na izvješću o uginućima, a na 150 mekušaca prijemljivih vrsta ako se ne temelji na njemu, nakon početka razdoblja prijenosa *Marteilije refringens*. Kada razdoblje prijenosa nije poznato, uzorkovanje započinje u razdoblju nakon što temperatura vode prijeđe 17 °C;
- (b) uzorke se ispituje upotrebom dijagnostičke metode utvrđene u točki i. u skladu s detaljnim dijagnostičkim metodama i postupcima utvrđenima u točki I. dijela 4. Priloga II.:
 - i. prisutnost *Marteilije refringens* smatra se potvrđenom kad se pozitivan rezultat histopatologije, otisaka tkiva ili hibridizacije *in situ* kombinira s pozitivnim rezultatom PCR-a nastalog sekvenciranjem;
 - ii. sumnja na zarazu *Marteilijom refringens* može se otkloniti ako se ispitivanjima navedenima u točki i. ne dobiju dodatni dokazi prisutnosti *Marteilije refringens*.

Tablica 4.A

Program nadziranja država članica, zona i kompartmenta za kontrolno razdoblje koje prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu *Marteilije refringens* kako je navedeno u točki I.2.1.

	Broj zdravstvenih pregleda na godinu	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu	Broj mekušaca u uzorku
Uzgaljišta ili područja uzgoja mekušaca	1	1	150

Tablica 4.B

Programi nadziranja država članica, zona ili kompartmenta radi održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu *Marteilije refringens* kako je navedeno u točki I.3.

Razina rizika	Broj zdravstvenih pregleda	Broj laboratorijskih pretraživanja	Broj mekušaca u uzorku
Visok	1 na godinu	1 svake 2 godine	150
Srednji	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine	150
Nizak	1 svake 2 godine	1 svake 4 godine	150

DIO 5.

METODE NADZIRANJA I KONTROLE ZA ZARAZU BONAMIJOM OSTREAEOM

I. **Zahtjevi za programe nadziranja ili iskorjenjivanja radi postizanja i održavanja statusâ područja slobodnih od bolesti u pogledu zaraze *Bonamijom ostreaeom***

I.1. Opći zahtjevi

Zdravstveni pregledi i, prema potrebi, uzorkovanje proizvodnih jedinica provode se tijekom razdoblja godine za koje je poznato da je prevalencija *Bonamije ostreae* u državi članici, zoni ili kompartmentu najveća. Kada takvi podaci nisu poznati, uzorkovanje se provodi zimi ili početkom proljeća.

Kad je u skladu sa zahtjevima iz dijela 5. potrebno uzorkovati mekušce, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

- (a) ako je prisutna *Ostrea edulis*, samo kamenice te vrste biraju se za uzorkovanje. Ako *Ostrea edulis* nije prisutna, uzorak je reprezentativan za sve druge prisutne prijemljive vrste;
- (b) ako su prisutni oslabljeni, otvoreni ili svježe uginuli mekušci koji nisu u stanju raspadanja, primarno se sakuplja te mekušce. Ako nisu prisutni takvi mekušci, odabiru se najstariji zdravi mekušci;
- (c) pri uzorkovanju u uzgajalištima u kojima se za proizvodnju mekušaca upotrebljava više od jednog izvora vode, u uzorkovanje se uključuju mekušci iz svih izvora vode tako da su svi dijelovi uzgajališta razmjerno predstavljeni u uzorku;
- (d) pri uzorkovanju u područjima uzgoja mekušaca, u uzorak se uključuju mekušci iz dostatnog broja točki uzorkovanja. Glavni su čimbenici koje je potrebno uzeti u obzir pri odabiru tih točki uzorkovanja prethodne točke na kojima je otkrivena *Bonamia ostreae*, gustoća držanja, protok vode, prisutnost prijemljivih vrsta, prisutnost vektorskih vrsta, batimetrija i načini gospodarenja. Prirodna staništa u područjima uzgoja ili blizu tih područja uključena su u uzorkovanje.

I.2. Posebni zahtjevi za postizanje zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu *Bonamije ostreae*

I.2.1. Programi nadziranja

Država članica, zona ili kompartiment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu *Bonamije ostreae* može ponovno postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kad su sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta barem programu nadziranja navedenom u nastavku koji se sastoji od zdravstvenih pregleda i prikupljanja uzoraka za ispitivanje.

Dvogodišnji program nadziranja:

- (a) uzgajališta i područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ podvrgnuta su zdravstvenim pregledima i uzorkovana najmanje dvije godine zaredom kako je utvrđeno u Tablici 5.A iz ovog dijela;
- (b) tijekom tog se dvogodišnjeg razdoblja ispitivanjem svih uzoraka upotrebom metoda dijagnostike utvrđenih u točki II.2. moralo postići negativne rezultate za *Bonamiju ostreae* i otkloniti svaku sumnju na *Bonamiju ostreae* u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.;
- (c) kad je u uzorak potrebno uključiti *Ostreu edulis* podrijetlom iz države članice, zone ili kompartimenta zdravstvenog statusa kategorije I., ona je morala biti uvedena u uzgajalište ili područje uzgoja mekušaca barem u jesen neposredno prije razdoblja provedbe programa nadziranja.

I.2.2. Programi iskorjenjivanja

Iskorjenjivanje *Bonamije ostreae* u većini se slučajeva smatra nemogućim, ali ako država članica procijeni da je to izvedivo, primjenjuje se model programa iskorjenjivanja naveden u nastavku.

Država članica, zona ili kompartiment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu *Bonamije ostreae* može ponovno postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa pod uvjetom da su sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta barem sljedećem programu iskorjenjivanja:

- (a) minimalne mjere kontrole utvrđene u odjeljku 3. poglavlja V. Direktive 2006/88/EZ učinkovito su primijenjene, a u blizini uzgajališta (ili više njih) ili područja uzgoja mekušaca (ili više njih) službeno proglašenog zaraženim *Bonamijom ostreae*om uspostavljeno je područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti kako je navedeno u članku 32. točki (b) koje uključuje zaraženo i ugroženo područje.

Područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti definira se na temelju svakog pojedinačnog slučaja, uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na rizik širenja te bolesti s popisa poput sljedećih: broj, stopa, dob i rasprostranjenost uginulih mekušaca u uzgajalištu ili području uzgoja mekušaca koji su zaraženi *Bonamijom ostreaeom*, uključujući divlje mekušce; udaljenost između susjednih uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca, uključujući divlje mekušce, i njihova gustoća, blizina objekata za obradu, kontaktnih uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca; vrste, a posebno prijemljive vrste i vektorske vrste, prisutne u uzgajalištima ili područjima uzgoja mekušaca; načini uzgoja koji se primjenjuju u zahvaćenim uzgajalištima ili područjima uzgoja mekušaca te susjednim uzgajalištima ili područjima uzgoja mekušaca; hidrodinamički uvjeti i drugi utvrđeni čimbenici od epidemiološke važnosti.

Za uspostavu zaraženih i ugroženih područja primjenjuju se sljedeći minimalni zahtjevi:

- i. zaraženo područje uspostavlja se u neposrednoj blizini uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koje je službeno proglašeno zaraženim *Bonamijom ostreaeom* te odgovara području utvrđenom u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima;
 - ii. ugroženo područje uspostavlja se izvan zaraženog područja i odgovara području koje okružuje zaraženu zonu, a utvrđeno je u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima;
- (b) sva uzgajališta i područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u zaraženom području koje nije službeno proglašeno zaraženim *Bonamijom ostreaeom* podvrgava se službenom istraživanju koje se sastoji barem od prikupljanja uzoraka za ispitivanje od 150 mekušaca prijemljivih vrsta nakon početka razdoblja prijenosa *Bonamije ostreae*. Kada razdoblje prijenosa nije poznato, uzorkovanje započinje zimi ili početkom proljeća;
- (c) sva uzgajališta i područja uzgoja mekušaca koja su službeno proglašena zaraženima *Bonamijom ostreaeom* prazne se i u njima se provodi mirovanje te ih se, ako je to moguće, čisti i dezinficira. Razdoblje mirovanja traje najmanje šest tjedana.

Kad su ispražnjena sva uzgajališta u istom zaraženom području koja su službeno proglašena zaraženima, provode se najmanje četiri tjedna sinkroniziranog mirovanja.

Nadležno tijelo može odlučiti zahtijevati pražnjenje, čišćenje, dezinfekciju i provedbu mirovanja drugih uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca, prema potrebi, u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima. Duljinu razdoblja mirovanja određuje nadležno tijelo nakon procjene rizika za svaki pojedinačni slučaj;

- (d) sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima u kojima je provedeno mirovanje poribljavaju se mekušcima koji su podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu zaraze *Bonamijom ostreaeom*. Poribljavanje se provodi tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje u skladu s točkom I.2.2. podtočkom (c);
- (e) sva uzgajališta i područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u državi članici, zoni ili kompartmentu obuhvaćenom programom iskorjenjivanja naknadno se podvrgavaju programu nadziranja utvrđene u točki I.2.
- I.3. Posebni zahtjevi za održavanje zdravstvenog statusa područja slobodnog od bolesti (kategorija I.) u odnosu na zarazu *Bonamijom ostreaeom*

Kada je potrebno ciljano nadziranje radi održavanja zdravstvenog statusa kategorije I., kako je predviđeno u članku 52. Direktive 2006/88/EZ, sva uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. toj Direktivi u predmetnoj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgavaju se zdravstvenim pregledima te uzorkuju u skladu s tablicom 5.B iz odjeljka II. ovog dijela, uzimajući u obzir razinu rizika uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca za pojavu zaraze *Bonamijom ostreaeom*.

Status područja slobodnog od zaraze *Bonamijom ostreaeom* može se održavati dok se za sve uzorke dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.2. dobivaju negativni rezultati za *Bonamiju ostreaeu* i otklonjena je svaka sumnja na *Bonamiju ostreaeu* u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.

- I.4. Zahtjevi za ukidanje mjera za suzbijanje bolesti predviđenih u članku 39. Direktive 2006/88/EZ (promjena zdravstvenog statusa iz kategorije V. na kategoriju III.) u pogledu zaraze *Bonamijom ostreaeom*.

Država članica, zona ili kompartiment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu zaraze *Bonamijom ostreaeom* može postići zdravstveni status kategorije III. u pogledu te bolesti pod sljedećim uvjetima:

- (a) ispunjeni su uvjeti utvrđeni u točki I.2.2. podtočkama (a), (b) i (c). Ako provođenje mirovanja nije tehnički moguće, uzgajališta se podvrgava alternativnoj mjeri kojom se pruža gotovo isto jamstvo za iskorjenjivanje *Bonamije ostreae* iz okruženja uzgajališta;
- (b) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta u mirovanju ili podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a) u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima poribljena su ribom koja je podrijetlom iz država članica, zona ili kompartimenta sa zdravstvenim statusom kategorije I., II. ili III. u pogledu zaraze *Bonamijom ostreaeom*;
- (c) poribljavanje je provedeno tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje ili su podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a);
- (d) tijekom razdoblja od dvije godine nakon provođenja mjera navedenih u točkama (a), (b) i (c) nije bilo potvrde pojave zaraze *Bonamijom ostreaeom*, a uklonjene su sve sumnje tijekom tog razdoblja, u skladu s postupcima uspostavljenima u točki II.3.

II. Dijagnostičke metode i dijagnostički kriteriji

II.1. Uzorci

Životinje se cijele dostavlja u laboratorij radi provođenja dijagnostičkih ispitivanja predviđenih u točkama II.2. i II.3.

II.2. Dijagnostičke metode za postizanje i održavanje statusa područja slobodnog od zaraze *Bonamijom ostreaeom*

Dijagnostičke su metode koje se upotrebljavaju radi postizanja ili održavanja statusa područja slobodnog od zaraze *Bonamijom ostreaeom* histopatologija, otisci tkiva ili PCR. U primjeni tih dijagnostičkih metoda prate se odgovarajuće detaljne metode i postupci utvrđeni u dijelu 5. Priloga II.

II.3. Dijagnostički kriteriji kojima se potvrđuje prisutnost ili uklanja sumnja na zarazu *Bonamijom ostreaeom*

Kada je potrebno potvrditi ili otkloniti sumnju na zarazu *Bonamijom ostreaeom* u skladu s člankom 28. Direktive 2006/88/EZ, poštuju se sljedeći postupci pregleda, uzorkovanja i ispitivanja:

U službeno istraživanje uključeno je najmanje jedno uzorkovanje na 30 mekušaca prijemljivih vrsta ako se sumnja temelji na izvješću o uginućima, a na 150 mekušaca prijemljivih vrsta ako se ne temelji na njemu, nakon početka razdoblja prijenosa *Bonamije ostreae*. Kada razdoblje prijenosa nije poznato, uzorkovanje započinje zimi ili početkom proljeća. Uzorke se ispituje dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki i. u skladu s detaljnim dijagnostičkim metodama i postupcima utvrđenima u odjeljku I. dijela 5. Priloga II.

- i. prisutnost *Bonamije ostreae* smatra se potvrđenom kad se pozitivan rezultat histopatologije, otisaka tkiva ili hibridizacije *in situ* kombinira s pozitivnim rezultatom PCR-a upotpunjenog sekvenciranjem u skladu s odobrenim metodama i postupcima utvrđenima u dijelu 5. Priloga II.;
- ii. sumnja na prisutnost zaraze *Bonamijom ostreaeom* otklanja se ako se tim testovima ne dobiju dodatni dokazi prisutnosti *Bonamije ostreae*.

Tablica 5.A

Program nadziranja država članica, zona ili kompartmenta za kontrolno razdoblje koje prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu *Bonamije ostreae* kako je navedeno u točki I.2.1.

	Broj zdravstvenih pregleda na godinu	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu	Broj mekušaca u uzorku
Uzgajališta ili područja uzgoja mekušaca	1	1	150

Tablica 5.B

Programi nadziranja država članica, zona ili kompartmenta radi održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu *Bonamije ostreae* kako je navedeno u točki I.3.

Razina rizika	Broj zdravstvenih pregleda	Broj laboratorijskih pretraživanja	Broj mekušaca u uzorku
Visok	1 na godinu	1 svake 2 godine	150
Srednji	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine	150
Nizak	1 svake 2 godine	1 svake 4 godine	150

DIO 6.

METODE NADZIRANJA I KONTROLE ZA BOLEST BIJELIH PJEGA RAKOVA (WSD)

I. Zahtjevi za programe nadziranja i iskorjenjivanja radi postizanja i održavanja statusâ područja slobodnih od bolesti u odnosu na WSD te mjere za suzbijanje zaraze virusom sindroma bijelih pjega rakova (WSSV)

I.1. Opći zahtjevi za preglede i uzorkovanje

Uzorkovanje rakova u laboratorijskim pretraživanjima provodi se kad god je vjerojatno da će temperatura vode doseći svoju najvišu godišnju vrijednost. Taj zahtjev u pogledu temperature vode primjenjuje se i na zdravstvene preglede ako su izvedivi i primjereni.

Kada je u skladu sa zahtjevima iz ovog dijela potrebno uzorkovati rakove iz uzgoja, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

- (a) ako su u proizvodnim jedinicama prisutni oslabljeni ili ugibajući rakovi, primarno se sakuplja te rakove. Ako nisu prisutni takvi rakovi, odabiru se rakovi različitih veličina, točnije mlade i odrasle jedinke, odabranih prijemljivih vrsta, razmjerno predstavljeni u uzorku;
- (b) ako se za proizvodnju rakova upotrebljava više izvora vode, uzorak se mora sastojati od rakova iz svih izvora vode.

Kada je potrebno ciljano nadziranje divljih populacija u skladu s drugim podstavkom točke 2. dijela I. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ, utvrđuje se broj i zemljopisna rasprostranjenost točaka uzorkovanja radi postizanja razumne pokrivenosti države članice, zone ili kompartmenta. Točke uzorkovanja isto su tako reprezentativne za različite ekosustave u kojima se nalaze divlje prijemljive populacije, točnije u morskim sustavima, sustavima ušća, riječnim sustavima i sustavima jezera.

Kada je potrebno ciljano nadziranje divljih populacija u skladu s drugim stavkom točke 2. dijela I. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ, rakove koje je potrebno uzorkovati odabire se kako slijedi:

- i. u područjima morskih i estuarijskih sustava odabire se jedna ili više sljedećih vrsta: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* ili *penaeid* vrste kozica, točnije *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Ako te vrste nisu prisutne, uzorak mora biti reprezentativan za sve druge prisutne prijemljive vrste desetonožaca. Uzme li se u obzir široki raspon prijemljivih domaćina, domaćine je moguće odabrati iz rodova ili obitelji desetonožaca u kojima je prijemljivost dokazana eksperimentalno ili prirodno;
- ii. u riječnim i jezerskim sustavima odabire se jedna ili više sljedećih vrsta: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* ili *Orconectes limosus*. Ako te vrste nisu prisutne, uzorak mora biti reprezentativan za sve druge prisutne prijemljive vrste desetonožaca. Uzme li se u obzir široki raspon prijemljivih domaćina, domaćine je moguće odabrati iz rodova ili obitelji desetonožaca u kojima je prijemljivost dokazana eksperimentalno ili prirodno;
- iii. ako su prisutni oslabljeni ili ugibajući rakovi, primarno se odabire te rakove. Ako nisu prisutni takvi rakovi, odabiru se rakovi različitih veličina, točnije mlade i odrasle jedinke, odabranih prijemljivih vrsta, razmjerno predstavljeni u uzorku.

I.2. Posebni zahtjevi za postizanje zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu WSD-a

I.2.1. Programi nadziranja

- (a) Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije III. u skladu s dijelom B Priloga III. Direktivi 2006/88/EZ u pogledu WSD-a može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kad sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. toj Direktivi i koja se nalaze u toj državi članici, zoni ili kompartmentu ispune zahtjeve utvrđene u Prilogu V. toj Direktivi i kad su sva ta uzgajališta i, kad se to zahtijeva drugim podstavkom točke 2. dijela I. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ, točke uzorkovanja divljih populacija odabranih u skladu s tom točkom, podvrgnuta sljedećem dvogodišnjem programu nadziranja koji se sastoji od zdravstvenih pregleda i prikupljanja uzoraka za ispitivanje.

Uzgajališta ili točke uzorkovanja podvrgnute su zdravstvenim pregledima i uzorkovane najmanje dvije godine zaredom kako je utvrđeno u Tablici 6.A iz odjeljka II.

Tijekom tog dvogodišnjeg razdoblja ispitivanjem svih uzoraka dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.2. moralo se postići negativne rezultate za WSD i otkloniti svaku sumnju na WSD u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.;

- (b) kad se tijekom provedbe programa nadziranja utvrđenog u točki (a) zaraza WSSV-om potvrdi u uzgajalištu uključenom u taj program nadziranja te se stoga povuče zdravstveni status kategorije II. uzgajališta, to uzgajalište može odmah povratiti zdravstveni status kategorije II. i nastaviti s provedbom programa nadziranja radi postizanja statusa područja slobodnog od bolesti bez provedbe programa iskorjenjivanja bolesti kako je opisano u točki I.2.2. pod sljedećim uvjetima:
 - i. radi se o kopnenom uzgajalištu čiji zdravstveni status u pogledu WSD-a ne ovisi o zdravstvenom statusu u pogledu te bolesti s popisa okolnih prirodnih voda u skladu s točkom 3. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ;
 - ii. ispražnjeno je, očišćeno, dezinficirano i u njemu je provedeno mirovanje koje mora trajati najmanje šest tjedana;
 - iii. poribljeno je rakovima podrijetlom iz država članica, zona i kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu WSD-a.

I.2.2. Programi iskorjenjivanja

I.2.2.1. Opći zahtjevi

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu WSD-a može postići zdravstveni status kategorije I. u pogledu te bolesti s popisa kad su sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u toj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgnuta barem sljedećem programu iskorjenjivanja:

- (a) minimalne mjere kontrole utvrđene u odjeljku 4. poglavlja V. Direktive 2006/88/EZ učinkovito su primijenjene, a u blizini uzgajališta (ili više njih) službeno proglašenog zaraženim WSD-om uspostavljeno je područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti u skladu s člankom 32. točkom (b) te Direktive, a koje uključuje zaraženo i ugroženo područje.

Područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti potrebno je definirati na temelju svakog pojedinačnog slučaja, uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na rizike širenja WSD-a na rakove iz uzgoja i divlje rakove, poput sljedećih: broj, stopa i rasprostranjenost uginuća rakova u uzgajalištu zaraženom WSD-om; udaljenost između susjednih uzgajališta i njihova gustoća; kontaktna uzgajališta; vrste prisutne u uzgajalištima; načini uzgoja koji se primjenjuju u zahvaćenom uzgajalištu i susjednim uzgajalištima; hidrodinamički uvjeti i drugi utvrđeni čimbenici od epidemiološke važnosti.

Za uspostavu zaraženih i ugroženih područja primjenjuju se sljedeći minimalni zahtjevi:

- i. zaraženo područje uspostavlja se u neposrednoj blizini uzgajališta službeno proglašenog zaraženim WSD-om i odgovara sljedećemu:

1. u morskim i estuarijskim područjima: područje kruga s polumjerom od najmanje jednog plimnog doseg ili najmanje pet kilometara, ovisno o tome koje je veće, sa središtem u uzgajalištu koje je službeno proglašeno zaraženim WSD-om, ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima ili
2. u slatkovodnim područjima: čitavo područje vodnog sliva uzgajališta koje je službeno proglašeno zaraženim WSD-om. Nadležno tijelo može ograničiti širenje područja na dijelove područja vodnog sliva ili na područje uzgajališta pod uvjetom da se ne ugrozi sprječavanje širenja WSD-a;

- ii. ugroženo se područje uspostavlja izvan zaraženog područja i odgovara sljedećemu:

1. u morskim područjima: područje koje okružuje zaraženo područje, sa zonama preklapanja izmjene plime i oseke; ili područje koje okružuje zaraženo područje, a uključeno je u krug polumjera 10 km od središta zaraženog područja; ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima ili
2. u slatkovodnim područjima: kao prošireno područje izvan uspostavljenog zaraženog područja;

- (b) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ unutar zaraženog područja koje nije službeno proglašeno zaraženim WSD-om podvrgava se službenom istraživanju koje sadržava barem sljedeće elemente:

- i. prikupljanje uzoraka za ispitivanje od 10 rakova kad su prisutni klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi zaraze WSD-om, ili od 150 rakova kad nisu prisutni klinički ili *post-mortem* znakovi i
- ii. jedan zdravstveni pregled; u uzgajalištima u kojima su za ispitivanja iz točke i. dobiveni negativni rezultati zdravstveni pregledi nastavljaju se jednom mjesečno u sezoni kad je vjerojatno da će temperatura vode dosegnuti svoje najviše godišnje vrijednosti, sve dok se ne povuče status zaraženog područja u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);

- (c) sva je uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima WSD-om potrebno isprazniti, očistiti, dezinficirati i u njima provesti mirovanje. Razdoblje mirovanja traje najmanje šest tjedana. Kad su ispražnjena sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima, provode se najmanje tri tjedna sinkroniziranog mirovanja. Ovaj se stavak odnosi i na nova uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima tijekom provedbe programa iskorjenjivanja.

Pri provođenju mirovanja u uzgajalištima koja su službeno proglašena zaraženima, zaražena područja postaju ugrožena područja.

Nadležno tijelo može odlučiti zahtijevati pražnjenje, čišćenje, dezinfekciju i provedbu mirovanja drugih uzgajališta u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima. Duljinu perioda mirovanja za ta uzgajališta određuje nadležno tijelo nakon procjene rizika za svaki pojedinačni slučaj;

- (d) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima i sva druga uzgajališta u mirovanju unutar uspostavljenih zaraženih i ugroženih područja poribljavaju se:
- i. rakovima koji su podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu WSD-a ili
 - ii. na prijelazno razdoblje do 31. prosinca 2020. rakovima iz država članica, zona ili kompartmenta s odobrenim programom nadziranja WSD-a.

Poribljavanje se provodi tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima WSD-om ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje u skladu s točkom I.2.2.1. podtočkom (c);

- (e) sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ u državi članici, zoni ili kompartmentu obuhvaćenom programom iskorjenjivanja i, kada je potrebno nadziranje divljih populacija, točke uzorkovanja odabrane u skladu s drugim stavkom točke 2. dijela I. Priloga V. toj Direktivi, naknadno se moraju podvrgnuti barem programu nadziranja utvrđenome u točki I.2.1.

I.2.2.2. Zahtjevi za povrat statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu WSD-a za kopnene kompartimente koji se sastoje od jednog uzgajališta koje je prethodno proglašeno slobodnim od WSD-a

Kopneni kompartiment koji se sastoji od jednog uzgajališta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu WSD-a, čiji zdravstveni status u pogledu te bolesti s popisa ne ovisi o okolnim prirodnim vodama u skladu s točkom 3. dijela II. Priloga V. Direktivi 2006/88/EZ i čiji je status kategorije I. povučen u skladu s člankom 53. stavkom 3. te Direktive, može vratiti zdravstveni status kategorije I. neposredno nakon što nadležno tijelo potvrdi da su ispunjeni sljedeći uvjeti:

- (a) uzgajalište s WSD-om ispražnjeno je, očišćeno, dezinficirano i u njemu je provedeno mirovanje koje je trajalo najmanje šest tjedana;
- (b) u uzgajalište s WSD-om uneseni su rakovi podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta zdravstvenog statusa kategorije I. u pogledu WSD-a.

I.3. Posebni zahtjevi za održavanje zdravstvenog statusa područja slobodnog od bolesti (kategorija I.) u odnosu na WSD

Kada je potrebno ciljano nadziranje radi održavanja zdravstvenog statusa kategorije I., kako je predviđeno u članku 52. Direktive 2006/88/EZ, sva uzgajališta koja drže prijemljive vrste navedene u dijelu II. Priloga IV. toj Direktivi u predmetnoj državi članici, zoni ili kompartmentu podvrgavaju se zdravstvenom pregledu te uzorkovanju u skladu s tablicom 6.B iz odjeljka II., uzimajući u obzir razinu rizika uzgajališta za pojavu WSD-a.

U državama članicama, zonama ili kompartmentima u kojima je ograničen broj uzgajališta te se ciljanim nadziranjem u tim uzgajalištima ne dobivaju dostatni epidemiološki podaci, u programe nadziranja za održavanje statusa slobodnog od bolesti uključuju se točke uzorkovanja odabrane u skladu sa zahtjevima utvrđenima u točki I.1.

Te se točke uzorkovanja pregledavaju i uzorkuju naizmjenično u iznosu od 50 % točki uzorkovanja godišnje. Uzorkovanje se provodi u skladu s Tablicom 6.B utvrđenom u odjeljku II. Uzorci se moraju odabirati, pripremati i ispitivati u skladu s dijagnostičkim metodama i metodama uzorkovanja utvrđenima u odjeljku II., a laboratorijska pretraživanja moraju dati negativne rezultate s obzirom na uzročnike WSD-a.

Status područja slobodnog od bolesti održava se sve dok se za sve uzorke ispitane dijagnostičkim metodama i metodama uzorkovanja utvrđenima u točki II.2. dobivaju negativni rezultati za WSD i mora se otkloniti svaka sumnja na WSD u skladu s dijagnostičkim metodama utvrđenima u točki II.3.

I.4. Zahtjevi za ukidanje mjera za suzbijanje bolesti predviđenih u članku 39. Direktive 2006/88/EZ (promjena zdravstvenog statusa iz kategorije V. na kategoriju III.) u pogledu WSD-a

Država članica, zona ili kompartment zdravstvenog statusa kategorije V. u pogledu WSD-a može postići zdravstveni status kategorije III. u pogledu te bolesti s popisa pod sljedećim uvjetima:

- (a) ispunjeni su uvjeti utvrđeni u točki I.2.2.1. podtočkama (a), (b) i (c). Ako provođenje mirovanja nije tehnički moguće, uzgajališta se podvrgava alternativnoj mjeri kojom se pruža gotovo isto jamstvo za iskorjenjivanje WSSV-a iz okruženja uzgajališta;
- (b) sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima WSD-om i sva druga uzgajališta u mirovanju ili podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a) u uspostavljenim zaraženim i ugroženim područjima poribljena su rakovima podrijetlom iz država članica, zona ili kompartmenta sa zdravstvenim statusom kategorije I., II. ili III. u pogledu WSD-a.
- (c) poribljavanje je provedeno tek nakon što su sva uzgajališta koja su službeno proglašena zaraženima WSD-om ispražnjena, očišćena, dezinficirana i u njima je provedeno mirovanje ili su podvrgnuta alternativnim mjerama u skladu s točkom (a).
- (d) tijekom razdoblja od dvije godine nakon provođenja mjera navedenih u točkama (a) i (b) nije bilo potvrde pojave WSD-a, a uklonjene su i sve sumnje tijekom tog razdoblja, u skladu s postupcima uspostavljenima u točki II.3.

II. **Dijagnostičke metode i metode uzorkovanja**

II.1. Uzorci

Uzorci integumentalne epiderme, secirani ili unutar nogu, pleopoda, dijelova ustiju ili škrge ispitivane životinje fiksiraju se u 95 %-tnom etanolu prije pripreme uzoraka za PCR u dva koraka.

Drugi uzorci, pripremljeni za histologiju i transmisijsku elektronsku mikroskopiju, mogu se prikupiti kao dodatak dijagnostičkim podacima proizišlim iz PCR-a.

II.2. Dijagnostičke metode za postizanje i održavanje statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu WSD-a

Dijagnostička je metoda koja se upotrebljava za postizanje ili održavanje statusa područja slobodnog od zaraze WSD-om nakon provođenja detaljnih dijagnostičkih metoda i postupaka utvrđenih u dijelu 6. Priloga II. PCR u dva koraka.

U slučaju pozitivnog rezultata dobivenog PCR-om u dva koraka, rezultat je potkrijepljen sekvenciranjem umnoženog produkta prije provedbe početnih mjera za kontrolu predviđenih u članku 28. Direktive 2006/88/EZ, ako je moguće u stvarnim uvjetima prikazom patognomoničnih znakova WSD-a u tim odabranim prijemljivim domaćinima histologijom i transmisijskom elektronskom mikroskopijom.

II.3. Službena istraživanja i dijagnostičke metode za otklanjanje sumnje na prisutnost zaraze WSD-om i za potvrđivanje prisutnosti te zaraze

Kada je potrebno potvrditi prisutnost zaraze WSD-om ili otkloniti sumnju na takvu zarazu u skladu s člankom 28. Direktive 2006/88/EZ, poštuju se sljedeći postupci pregleda, uzorkovanja i ispitivanja:

- (a) u službeno istraživanje uključen je najmanje jedan zdravstveni pregled i jedno uzorkovanje 10 rakova kad su prisutni klinički znakovi ili *post-mortem* znakovi zaraze WSD-om, ili 150 rakova kad nisu prisutni klinički ili *post-mortem* znakovi. Uzorke se ispituje upotrebom dijagnostičke metode utvrđene u točki II.2. (PCR u dva koraka);

- (b) prisutnost WSD-a smatra se potvrđenom ako je PCR u dva koraka nakon kojeg slijedi sekvenciranje nakon provođenja detaljnih metoda i postupaka utvrđenih u ovom dijelu 6. Priloga II. pozitivan na WSSV i ako su u odabranim domaćinima prisutni patognomonični znakovi WSD-a.

Sumnja na WSD može se otkloniti ako se tim testovima ne dobiju dodatni dokazi prisutnosti WSD-a.

Tablica 6.A

Program nadziranja država članica, zona i kompartmenta za dvogodišnje kontrolno razdoblje koje prethodi postizanju statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu WSD-a kako je navedeno u točki I.2.1.

	Broj kliničkih pregleda na godinu	Broj laboratorijskih pretraživanja na godinu	Broj rakova u uzorku
Uzgajališta/mjesta uzorkovanja	1	1	150

Tablica 6.B

Programi nadziranja država članica, zona ili kompartmenta radi održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu WSD-a kako je navedeno u točki I.3.

Razina rizika	Broj zdravstvenih pregleda	Broj laboratorijskih pretraživanja	Broj rakova u uzorku
Visok	1 na godinu	1 svake 2 godine	150
Srednji	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine	150
Nizak	1 svake 2 godine	1 svake 4 godine	150

PRILOG II.

DETALJNE DIJAGNOSTIČKE METODE I POSTUPCI

I. Uvod

Ovim se Prilogom definiraju detaljni postupci za dijagnostičke metode koje je potrebno upotrebljavati u laboratorijskim pretraživanjima u programima iskorjenjivanja i nadziranja utvrđenima u Prilogu I. ovoj Odluci, a radi potvrđivanja ili otklanjanja sumnje na prisutnost sljedećih neegzotičnih bolesti navedenih u dijelu II. Priloga IV. Direktivi 2006/88/EZ („bolesti s popisa“) u skladu s člankom 57. točkom (b) te Direktive:

1.	Virusna hemoragijska septikemija (VHS)	Dio 1.
2.	Zarazna hematopoetska nekroza (IHN)	Dio 1.
3.	Koi herpes viroza (KHV)	Dio 2.
4.	Zarazna anemija lososa (ISA)	Dio 3.
5.	Zaraza <i>Marteilijom refringens</i>	Dio 4.
6.	Zaraza <i>Bonamijom ostreaeom</i>	Dio 5.
7.	Bolest bijelih pjega rakova (WSD)	Dio 6.

II. Definicije

Za potrebe ovog Priloga, „transportni medij“ znači medij za staničnu kulturu s 10 % telećeg seruma i s 200 IJ penicilina, 200 µg streptomicina i 200 µg kanamicina po mililitru ili s drugim antibioticima dokazane djelotvornosti.

DIO 1.

DETALJNE DIJAGNOSTIČKE METODE I POSTUPCI ZA NADZIRANJE I POTVRĐIVANJE IHN-a I VHS-a

I. Dijagnostičke metode i postupci za nadziranje VHS-a i IHN-a

Pri uzorkovanju i laboratorijskom pretraživanju koji se provode u svrhu postizanja i održavanja statusa područja slobodnog od bolesti u pogledu IHN-a ili VHS-a kako je utvrđeno u odjeljku I. dijela I. Priloga I. upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u točkama II.1. i II.2. dijela 1. tog Priloga primjenjuju se detaljne dijagnostičke metode i postupci utvrđeni u točkama od I.1. do I.6.

I.1. Pripremanje i slanje uzoraka riba

I.1.1. Tkiva za virološko pretraživanje na staničnoj kulturi

Prije slanja ili prijevoza u laboratorij, dijelovi organa koji će se ispitivati moraju biti uklonjeni iz ribe s pomoću sterilnog pribora za seciranje te preneseni u sterilne plastične epruvete koje sadržavaju transportni medij.

Količina ribljeg materijala prikladnog za virološko pretraživanje na staničnoj kulturi i metodom RT-qPCR ovisi o veličini ribe. Stoga su uzorci koje je potrebno uzorkovati čitava mlađ (duljina tijela < 4 cm), utroba uključujući bubrege (4 cm < duljina tijela < 6 cm) ili, kod većih riba, bubrezi, slezena, srce i/ili encefalon te ovarijalna tekućina uzgojnih riba u trenutku mriještenja.

Ovarijalna tekućina ili dijelovi organa od najviše 10 riba mogu se prikupiti u jednu sterilnu epruvetu koja sadržava najmanje 4 ml transportnog medija i koja predstavlja jedan skupni uzorak. Tkivo u svakom uzorku teži najmanje 0,5 grama (g).

Virološko pretraživanje na staničnoj kulturi mora započeti što je prije moguće, a najkasnije 48 sati nakon prikupljanja uzoraka. U iznimnim slučajevima virološko pretraživanje može započeti najkasnije unutar 72 sata od prikupljanja materijala, pod uvjetom da je materijal za pretraživanje zaštićen transportnim medijem i da se mogu ispuniti zahtjevi u odnosu na temperaturu tijekom prijevoza.

I.1.2. Uzorci za analizu reverznom transkripcijom s lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR ili RT-qPCR)

Uzorke se sakuplja od riba u skladu s postupkom opisanim u točki I.1.1. upotrebom sterilnog instrumenta te ih se prebacuje u sterilnu plastičnu epruvetu koja sadržava transportni medij. Tkivo uzeto od najviše 10 riba može se prikupiti u jednu epruvetu, što čini jedan skupni uzorak. Međutim, ako je količina inokuluma mala, moguće je upotrijebiti tkiva od najviše pet riba. Druga je mogućnost objedinjavanje uzoraka u reagensima za stabilizaciju RNA, poput reagensa od 0,2 g tkiva/ml u skladu s preporukom proizvođača iako se svaku ribu obrađuje pojedinačno i ne smiju se objediniti uzorci zbog male količine materijala koji se upotrebljava za ekstrakciju.

Moguće je u laboratorij poslati i cijelu ribu.

I.2. Slanje uzoraka riba

Epruvete koje sadržavaju tkivo riba u transportnom mediju za kultivaciju stanica ili analizu RT-PCR/RT-qPCR stavljaju se u izolirane posude, poput kutija od polistirena s debelim stijenkama, zajedno s dovoljnom količinom leda ili drugog rashladnog medija jednakog rashladnog učinka kako bi se osiguralo rashlađivanje uzoraka tijekom prijevoza u laboratorij. Međutim, trebalo bi izbjegavati zamrzavanje uzoraka. Temperatura uzorka tijekom prijevoza ne smije biti viša od 10 °C, a pri njegovu prijemu led mora još uvijek biti prisutan u transportnoj kutiji odnosno jedan ili više rashladnih blokova moraju još uvijek biti djelomično ili u cijelosti zamrznuti.

U laboratorij se mogu poslati cijele ribe pod uvjetom da se mogu ispuniti zahtjevi u odnosu na temperaturu tijekom prijevoza navedeni u prvom stavku. Cijele ribe umataju se u upijajući papir i potom šalju u plastičnim vrećicama. Moguće je poslati i živu ribu.

I.3. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Kad to odobri dijagnostički laboratorij, za dodatna se pretraživanja mogu prikupiti i pripremiti i druga tkiva riba.

I.4. Pripremanje uzoraka za virološko pretraživanje i RT-qPCR

I.4.1. Zamrzavanje u iznimnim slučajevima

Kada je zbog praktičnih poteškoća nemoguće obraditi uzorke u roku od 48 sati nakon prikupljanja uzoraka tkiva riba, uzorci tkiva mogu se zamrznuti u transportnom mediju pri temperaturi od – 20 °C ili nižoj, a virološko pretraživanje obaviti u roku od 14 dana. Međutim, tkivo riba može se prije pretraživanja zamrznuti i otopiti samo jednom. Čuvaju se zapisi s detaljnim razlogom za svako zamrzavanje uzoraka tkiva riba.

I.4.2. Homogenizacija organa

U laboratoriju se tkivo riba iz epruveta potpuno homogenizira u homogenizatoru Stomacher, miješalici ili tarioniku i tučku sa sterilnim pijeskom i potom suspendira u izvornom transportnom mediju.

Ako se uzorak sastoji od cijelih riba kraćih od 4 cm, njih se usitnjava sterilnim škarama ili skalpelom nakon što se ukloni stražnji dio tijela iza crijevnog otvora. Ako uzorak čini cijela riba dužine tijela od 4 do 6 cm, prikuplja se utroba uključujući bubrege. Ako uzorak čini cijela riba dulja od 6 cm, prikupljaju se uzorci tkiva kako je opisano u točki I.1. Uzorke tkiva usitnjava se sterilnim škarama ili skalpelom i homogenizira kako je opisano u prvom stavku ove točke te suspendira u transportnom mediju.

Konačni se omjer tkiva i transportnog medija u laboratoriju postavlja u omjer 1:10.

I.4.3. Centrifugiranje homogenata

Homogenat se centrifugira na brzini od 2 000 do 4 000 × g u trajanju od 15 minuta u centrifugi ohlađenoj pri 2 do 5 °C te se supernatant prikuplja i može obrađivati antibioticima četiri sata na 15 °C ili preko noći na 4 do 8 °C s antibioticima. Ako je uzorak poslan u transportnom mediju, može se izostaviti obrada supernatanta antibioticima.

Ako je zbog praktičnih poteškoća poput kvara inkubatora ili problema sa staničnim kulturama nemoguće inokulirati stanice unutar 48 sati od prikupljanja uzoraka tkiva riba, supernatant se može zamrznuti na temperaturi od – 80 °C, a virološko pretraživanje obaviti unutar 14 dana.

Ako se sakupljeni supernatant pohrani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ unutar 48 sati nakon prikupljanja, može se još samo jednom ponovno upotrijebiti za virološko pretraživanje.

Prije inokulacije stanica supernatant se miješa s jednakim dijelovima odgovarajuće razrijeđenih skupina antiseruma za lokalne serotipove virusa zarazne nekroze gušterače (IPN) te se njima inkubira najmanje jedan sat na $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili najviše 18 sati na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Titar antiseruma iznosi najmanje 1/2 000 u 50 % plak neutralizacijskom testu.

Svrha je tretiranja svih inokulata antiserumom za virus IPN-a spriječiti da se u inokuliranim staničnim kulturama razvije citopatogeni učinak (CPU) zbog virusa IPN-a. To će skratiti trajanje viroloških pretraživanja i smanjiti broj slučajeva u kojima bi se pojava CPU-a morala smatrati potencijalnim znakom prisustva virusa VHS-a ili IHN-a.

Kada uzorci dolaze iz proizvodnih jedinica koje se smatraju slobodnima od IPN-a, može se izostaviti tretiranje inokulata antiserumom za virus IPN-a.

I.4.4. Priprema uzoraka za programe nadziranja temeljene na metodama RT-PCR i RT-qPCR

Ako su uzorci prikupljeni u transportnom mediju, provodi se postupak utvrđen u točkama I.4.2. i I.4.3. Nakon centrifuge prikuplja se supernatant i ekstrahira RNA. Ako nije potrebno provesti naknadno pretraživanje neposredno nakon centrifugiranja, uzorke se odmah zamrzava pri temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili nižoj.

Za analizu tkiva riba sačuvanog u reagensu za stabilizaciju RNA provode se radnje navedene u nastavku unutar vremenskih okvira navedenih u nastavku na uzorcima pohranjenima pri različitim temperaturama:

uzorci pohranjeni pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: jedan dan;

uzorci pohranjeni pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$: jedan tjedan;

uzorci pohranjeni pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: jedan mjesec;

uzorci pohranjeni pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: neograničeno

Sa skupnim uzorcima u reagensu za stabilizaciju RNA postupa se kao s pojedinačnim uzorcima u reagensu za stabilizaciju RNA. Za uzorke objedinjene u reagensu za stabilizaciju RNA količina uzorka ne smije biti veća od one koju preporučuje proizvođač za ekstrakciju RNA kompletima poput kompleta RNeasy Mini Kit (Qiagen) ili sličnog. Ako se objedinjuju veći uzorci, u kompletima za ekstrakciju ili metodama mora se odražavati to objedinjavanje.

Uzorci prikupljeni u reagensima za stabilizaciju RNA ne smiju se upotrebljavati za kultivaciju stanica.

I.4.5. Objedinjavanje uzoraka za RT-qPCR

Budući da su navedeni protokoli za RT-qPCR slične ili više osjetljivosti u usporedbi s metodama kultivacije stanica, moglo bi biti prihvatljivo upotrijebiti supernatant iz homogeniziranog materijala tkiva riba objedinjenog od najviše 10 riba u mediju stanične kulture za PCR. Međutim, zbog mnogo manjeg inokuluma upotrijebljenog za PCR u usporedbi s kultivacijom stanica, sva tkiva riba pažljivo se homogeniziraju prije sparivanja materijala za ekstrakciju.

Jednako se načelo primjenjuje ako se uzorci prikupljaju u reagensu za stabilizaciju RNA. Međutim, u tom je slučaju često teško prikupiti reprezentativan materijal od najviše 10 riba u jednoj epruveti te se broj riba po skupnom uzorku stoga smanjuje na dvije do pet.

I.5. Virološka pretraživanja na staničnoj kulturi

I.5.1. Stanične kulture i mediji

Mlađ ribe *Lepomis macrochirus* stanične linije – 2 (BF-2) ili gonade kalifornijske pastrve stanične linije – 2 (RTG-2) te stanice *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) ili *Pimephales promelas* (FHM) umnožavaju se na temperaturi od 20 do $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ u odgovarajućem mediju, točnije Eaglovom minimalnom esencijalnom mediju (MEM) ili njegovim modifikacijama, obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma i antibioticima u standardnim koncentracijama.

Kada se stanice umnožavaju u zatvorenim posudama, medij se puferira bikarbonatom. Medij koji se upotrebljava za kulturu stanica u otvorenim jedinicama može se puferirati tris(hidroksimetil)aminometan-HCl-om (Tris-HCl) (23 mM) i natrijevim bikarbonatom (6 mM). Ph mora biti $7,6 \pm 0,2$.

Stanične su kulture koje je potrebno upotrijebiti za inokulaciju materijalom tkiva riba mlade, jednoslojne, uobičajeno jedan dan stare stanične kulture, ako je moguće. Međutim, mogu biti prihvatljive i kulture starosti od 4 do 48 sati. Stanice moraju aktivno rasti pri inokulaciji.

I.5.2. Inokulacija staničnih kultura

Suspenzija organa obrađena antibiotikom inokulira se u stanične kulture u dva razrjeđenja, točnije u osnovnom razrjeđenju i, pored toga, njegovu razrjeđenju 1:10, što dovodi do konačnih razrjeđenja tkivnog materijala u staničnoj kulturi 1:100 odnosno 1:1 000 kako bi se spriječila homologna interferencija. Najmanje dvije stanične linije inokuliraju se kako je navedeno u točki I.5.1. Omjer je veličine inokuluma i količine stanične kulture oko 1:10.

Za svako razrjeđenje i svaku staničnu liniju upotrebljava se najmanje oko 2 cm² površine stanica, što odgovara jednoj jažici na 24-jažičnoj plitici za staničnu kulturu. Plitice za staničnu kulturu upotrebljavaju se kad je to moguće.

I.5.3. Inkubacija staničnih kultura

Inokulirane stanične kulture inkubiraju se sedam do deset dana pri 15 °C. Ako se boja medija za staničnu kulturu promijeni s crvene u žutu, što ukazuje na zakiseljenje medija, pH se prilagođava s pomoću sterilne otopine bikarbonata ili istovrijednim tvarima kako bi se osigurala osjetljivost stanica na virusnu infekciju.

Najmanje svakih šest mjeseci ili ako se sumnja na smanjenu osjetljivost stanica obavlja se titracija zamrznutih pohranjenih virusa VHS-a i IHN-a kako bi se verificirala osjetljivost staničnih kultura na infekciju. Ako je moguće, upotrebljava se postupak utvrđen u odjeljku III.

I.5.4. Mikroskopiranje

Inokulirane stanične kulture redovito se pregledavaju, najmanje tri puta tjedno, pri povećanju od 40 do 150 puta, kako bi se provjerilo je li došlo do pojave citopatogenog učinka (CPU). Ako se opazi očiti citopatogeni učinak (CPU), odmah se počinje s postupkom identifikacije virusa u skladu s točkom I.6.

I.5.5. Supkultiviranje

Ako se nakon primarne inkubacije od sedam do deset dana ne razvije citopatogeni učinak (CPU), provodi se supkultiviranje sa svježim staničnim kulturama korištenjem površine slične površini primarne kulture.

Alikvoti hranjive podloge (supernatant) svih kultura ili jažica koje čine primarnu kulturu objedinjavaju se prema staničnoj liniji sedam do deset dana nakon inokulacije. Tako dobiveni skupni uzorci inokuliraju se u homologne stanične kulture, nerazrijeđene i razrijeđene 1:10 (pri čemu se dobivaju konačna razrjeđenja supernatanta u omjeru 1:10 odnosno 1:100), kako je opisano u točki I.5.2. Druga je mogućnost da se alikvoti 10 % hranjive podloge koja čini primarnu kulturu inokuliraju izravno u jažicu sa svježom staničnom kulturom (točnije, supkultiviranje iz jažice u jažicu). Inokulaciji može prethoditi predinkubacija razrjeđenja s antiserumom za virus IPN-a u odgovarajućem razrjeđenju kako je opisano u točki I.4.3.

Inokulirane kulture potom se inkubiraju sedam do deset dana pri 15 °C i pregledavaju kako je opisano u točki I.5.4.

Ako se tijekom prva tri dana inkubacije javi toksični CPU, u toj se fazi može obaviti supkultiviranje, ali se stanice potom moraju inkubirati sedam dana i ponovno supkultivirati uz dodatnih sedam dana inkubacije. Kad se toksični CPU razvije nakon tri dana, stanice se jednom stavljaju u pasažu i inkubiraju dok ne prođe ukupno 14 dana od prve inokulacije. U zadnjih sedam dana inkubacije ne smiju se javiti znaci toksičnosti.

Ako unatoč obradi antibioticima dođe do bakterijske kontaminacije, prije supkultivacije provodi se centrifugiranje na 2 000 do 4 000 × g od 15 do 30 minuta pri temperaturi od 2 do 5 °C ili filtriranje supernatanta kroz filter od 0,45 μm ili oboje (membrana s niskom sposobnošću vezivanja proteina). Nadalje, u supkultivaciji slijede se isti postupci kao oni koji su opisani za toksični CPU u četvrtom stavku ove točke.

Ako se ne razvije CPU, ispitivanje se može proglasiti negativnim.

I.6. Identifikacija virusa

Ako se u staničnoj kulturi uoči postojanje CPU-a, medij (supernatant) se prikuplja i pretražuje korištenjem jedne ili više sljedećih metoda: enzimski imun sorbentni test (ELISA), imunofluorescencija (IF), neutralizacija, RT-PCR ili RT-qPCR. Ako se ovim testovima ne može sa sigurnošću identificirati virus u roku od jednog tjedna, supernatant se prosljeđuje u nacionalni referentni laboratorij ili u referentni laboratorij Europske unije za bolesti riba naveden u prilogu VI. Direktivi 2006/88/EZ kako bi se virus odmah identificirao.

I.6.1. ELISA

Dvojni sendvič ELISA provodi se radi identifikacije izolata virusa. Plitice s mikrojažicama premazuju se s 50 µl/jažica (0,9 pg) pročišćenog imunoglobulina (Ig) proteina-A dokazane kvalitete iz kunićjih protutijela protiv virusa IHN-a ili VHS-a razrijeđenog u puferu karbonata (pH 9,6) koji sadržava 15 mM natrijevog azida i inkubiranog između 18 sati i 2 tjedna pri temperaturi od 4 °C.

Na plitici za razrjeđivanje svi uzorci koji sadržavaju 1 % Tritona X-100 i pozitivne kontrole razrjeđuju se u otopinom pufera (točnije, fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) u četverostrukom razrjeđenju: nerazrijeđeno, 1:4, 1:16, 1:64. Plitice za ELISA-u peru se u PBS-u koji sadržava 0,05 % Tweena-20 (PBS-T) i 50 µl svakog razrjeđenja prebacuje se iz plitice za razrjeđivanje na opranu i premazanu pliticu za ELISA-u.

Plitice za ELISA-u zatim se inkubiraju 30 minuta pri temperaturi od 37 °C. Nakon toga, plitice se peru i inkubiraju 30 minuta pri temperaturi od 37 °C sa specifičnim monoklonskim protutijelima (točnije, za identifikaciju virusa VHS-a MAb IP5B11 odnosno Hyb 136-3 za virus IHN-a). 50 µl kunićjeg protumijeseg konjugata obilježenog peroksidazom iz hrena (HRP) razrijeđenog 1:1 000 u PBS-T-BSA prebacuje se na pliticu za ELISA-u.

Konačno, nakon ponovnog pranja, reakcije se razvijaju dodavanjem 50 µl/jažica ortofenilenediamina (OPD). Plitice za ELISA-u inkubiraju se 20 minuta na sobnoj temperaturi u tami te se reakciju zaustavlja dodavanjem 100 µl/jažica 0,5 M H₂SO₄.

Apsorbancija se prati na valnoj duljini od 492 i 620 nm u ELISA čitaču. Uzorke se proglašava pozitivnima ili negativnima nakon usporedbe rezultata ispitivanja s vrijednostima apsorbancije za pozitivne i negativne kontrole. Općenito, uzorci s kombiniranom apsorbancijom (A) < 0,5 za nerazrijeđeni materijal smatraju se negativnima, uzorci s vrijednostima A između 0,5 i 1,0 smatraju se sumnjivima, a uzorci s vrijednostima A > 1,0 smatraju se pozitivnima.

Druge verzije ELISA-e dokazane slične učinkovitosti mogu se upotrijebiti umjesto onih navedenih u ovoj točki.

I.6.2. Imunofluorescencija

Identifikacija navedenih patogena virusa VHS-a i IHN-a provodi se infekcijom stanica u pliticama s 96 jažica „Black”, konvencionalnim pliticama s 24 jažice ili pokrovnim stakalcima u pliticama s 24 jažice. Kad se virus VHS-a ili IHN-a ili obiju bolesti identificira infekcijom stanica na pokrovnim stakalcima, primjenjuje se sljedeći protokol:

- (a) pokrovna stakalca nasađuju se stanicama u gustoći tako da se postigne približno 60 % do 90 %-tna konfluencija nakon 24 sata kultivacije. U tu se svrhu upotrebljavaju stanice EPC gdje god je moguće jer one snažno prijanjaju za staklenu površinu, ali se mogu upotrebljavati i druge stanične linije kao što su BF-2, RTG-2 ili FHM. 150 µl supernatanta stanične kulture u dva različita razrjeđenja (1:10 i 1:1 000) inokuliraju se dvostruko na jednostruke slojeve stare jedan dan i inkubiraju 24 sata pri temperaturi od 15 °C;
- (b) naknadno se uklanja medij stanične kulture, a zaraženi jednostruki slojevi stanica fiksiraju se s 0,5 ml ledene vodene otopine acetona (80 % vol/vol). Fiksacija se provodi u odsisniku dima 15 minuta na sobnoj temperaturi, a tada se otopina acetona uklanja i pokrovna stakalca suše na zraku najmanje 30 minuta. U ovoj fazi plitice treba obraditi odmah ili ih pohraniti pri temperaturi od – 20 °C za daljnju upotrebu;
- (c) određena monoklonska protutijela (točnije za identifikaciju virusa VHS-a, MAb IP5B11 odnosno za virus IHN-a, Hyb 136-3) razrjeđuju se u 0,01 M PBST pri pH 7,2 u otopini koju je preporučio dobavljač MAb-a; 50 do 100 µl/jažica dodaje se u fiksiran jednostruki sloj te se plitice inkubiraju jedan sat pri temperaturi od 37 °C u vlažnoj komori;

- (d) pokrovna stakalca peru se oprezno tri puta PBS-om koji sadržava 0,05 % Tweena-20 (PBS-T), a pufer se u potpunosti uklanja nakon zadnjeg ispiranja. Stanice se naknadno inkubiraju jedan sat pri temperaturi od 37 °C protutijelima konjugiranima fluorescein-izotiocijanatom (FITC) ili tetrametilrodamin-5- (i -6-) izotiocijanatom protiv mišjeg imunoglobulina upotrijebljenog kao primarno protutijelo, razrjeđuju u skladu s uputama dobavljača, ponovno ispiru u PBS-T a zatim suše. Obojene kulture nanose se na staklene pločice upotrebom fiziološke otopine s dodatkom glicerola te ih se pregledava pod ulaznim ultraljubičastim (UV) svjetlom. Upotrebljavajte okulare s povećanjem od 10 ili 12 puta te objektivne s povećanjem od 25 ili 40 puta, s numeričkim otvorima > 0,7 odnosno > 1,3.

Umjesto njega mogu se upotrijebiti i drugi postupci imunofluorescencije s obzirom na stanične kulture, fiksiranje i protutijela referentne kvalitete dokazane slične učinkovitosti.

I.6.3. Neutralizacija

Iz prikupljenog supernatanta uklanjaju se stanice centrifugiranjem (2 000 do 4 000 × g) ili membranskim filtriranjem kroz filtar s membranom (0,45 µm) s niskom apsorpcijom proteina, a supernatant se razrjeđuje u omjerima 1:100 i 1:10 000 u mediju za staničnu kulturu.

Alikvoti najmanje dvaju razrjeđenja supernatanta pomiješaju se i odvojeno inkubiraju 60 minuta na 15 °C s jednakim dijelovima sljedećih reagensa:

- (a) serum koji sadržava skupinu specifičnih protutijela za virus VHS-a u razrjeđenju 1:50 (vol:vol);
- (b) serum koji sadržava skupinu specifičnih protutijela za virus IHN-a u razrjeđenju 1:50 (vol:vol);
- (c) skupni uzorak antiseruma za lokalne serotipove virusa IPN-a u razrjeđenju 1:50 (vol:vol);
- (d) sâm medij (pozitivna kontrola).

Za svaku mješavinu supernatanta i seruma inokuliraju se najmanje dvije stanične kulture svaka s 50 µl te se inkubiraju pri 15 °C. Razvoj CPU-a provjerava se kako je opisano u točki I.5.4.

Sojevi virusa VHS-a i izolati koji ne reagiraju u neutralizacijskim testovima identificiraju se IF-om ili ELISA-om.

Mogu se upotrijebiti i drugi neutralizacijski testovi dokazane slične učinkovitosti.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Priprema virusne RNA

Sve radnje s RNA izvršavaju se na ledu, uz upotrebu rukavica.

RNA se ekstrahira upotrebom fenol-kloroform metode ili afinitetnom kolonom za pročišćavanje RNA, u skladu s uputama proizvođača. Mogu se upotrebljavati komercijalno dostupni kompleti za ekstrakciju RNA kojima se dobiva RNA visoke kvalitete prikladan za upotrebu u protokolima za RT-PCR opisanim u nastavku.

RNA se resuspendira u destiliranoj vodi slobodnoj od RNAza (u prvom redu vodi tretiranoj 0,1 %-tnim dietil pirokarbonatom) ili odgovarajućim puferom za eluciju.

I.6.4.2. RT-PCR

Sljedeće početnice upotrebljavaju se za otkrivanje virusa IHN-a:

Prednja početnica 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3';

Stražnja početnica 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Upotrebljavaju se sljedeći ciklusi (RT-PCR u jednom koraku): 1 ciklus: 30 minuta na 50 °C; 1 ciklus: 2 minute na 95 °C; 30 ciklusa: 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi na 50 °C, 60 sekundi na 72 °C; 1 ciklus: 7 minuta na 72 °C i namakati na 4 °C.

Sljedeće početnice upotrebljavaju se za otkrivanje virusa VHS-a:

Prednji VN 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3';

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

Upotrebljavaju se sljedeći ciklusi (RT-PCR u jednom koraku): 30 minuta na 50 °C, 15 minuta na 95 °C, 35 ciklusa 30 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 55 °C i 60 sekundi na 68 °C. Naknadno se reakciju održava 7 minuta na 68 °C.

Količina i specifičnost reakcija RT-PCR-a ocjenjuje se gel elektroforezom u 1,5 %-tnom agar gelu s etidijevim bromidom i promatra upotrebom UV transiluminacije. Može se opaziti umnoženi produkt PCR-a od 693 bp za virus IHN-a. Za virus VHS-a veličina je 505 bp.

Rezultati PCR-a mogu varirati ovisno o uvjetima u kojima ga se provodi, točnije o termalnim protokolima za koje može biti potrebna optimizacija, ovisno o uređaju za PCR (*thermal cycler*) koji se upotrebljava. Nadalje, mogu se pojaviti lažni pozitivni rezultati zbog lažnog prijanjanja početnica ili kontaminacije u laboratoriju. Stoga se radi izbjegavanja bilo kakvih sumnji uključuje odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole i sljedove umnoženih produkata. Kod početnica virusa VHS-a posebnu je pažnju potrebno obratiti na upotrebu stanica BF-2 jer početnice mogu reagirati sa staničnom linijom DNA/RNA te tako proizvesti lažne pozitivne rezultate slične veličine. Pri ispitivanju supernatanta iz stanica BF-2 sekvenciraju se svi umnoženi PCR fragmenti.

I.6.4.3. RT-qPCR za virus VHS-a

Za virus VHS-a umnožavanje se provodi upotrebom sljedećih početnica i sonde:

Prednja početnica: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3';

Stražnja početnica: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3';

i sonda: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

RT-qPCR u jednom koraku:

Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. Uvjeti za cikluse: 30 minuta na 50 °C, 15 minuta na 95 °C, 40 ciklusa 15 sekundi na 94 °C, 40 sekundi na 60 °C, 20 sekundi na 72 °C; prilagoditi prema potrebi. Umjesto njega mogu se upotrijebiti i druge verzije metoda RT-PCR ili RT-qPCR dokazane slične učinkovitosti.

I.6.4.4. RT-qPCR za virus IHN-a

Za virus IHN-a umnožavanje se provodi upotrebom sljedećih početnica i sonde:

Prednja početnica: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3';

Stražnja početnica: 5'-TTCTTTGCGGCTTGTTGA-3';

i sonda: 5'-6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

RT-qPCR u dva koraka:

Budući da sljedeći test ovisi o umnožavanju u dva koraka, potrebno je obratiti posebnu pozornost pri rukovanju epruvetama u prelasku iz jedne reakcije na drugu kako bi se spriječila kontaminacija.

Uvjeti za cikluse (nakon koraka RT): 2 minute na 50 °C, 10 minuta na 95 °C, nakon čega slijedi 40 ciklusa 15 sekundi na 95 °C i 1 minutu na 60 °C; prilagođava se prema potrebi.

Umjesto njega mogu se upotrijebiti i druge verzije metoda RT-PCR ili RT-qPCR dokazane slične učinkovitosti.

II. **Detaljne dijagnostičke metode i postupci za potvrđivanje ili otklanjanje sumnje na VHS ili IHN ili obje te bolesti u slučaju sumnje na pojavu**

Kad su potrebna laboratorijska pretraživanja radi potvrđivanja prisutnosti IHN-a ili VHS-a ili obje tih bolesti ili otklanjanja sumnje na njihovu prisutnost u skladu s člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u točki II.3. dijela 1. Priloga I., primjenjuju se sljedeće detaljne dijagnostičke metode i postupci:

- (a) uobičajeno izdvajanje virusa nakon kojeg slijedi identifikacija serum neutralizacijskim testom, imunokemijskim testom ili molekularna identifikacija virusa;
- (b) otkrivanje virusa metodom RT-PCR ili RT-qPCR;
- (c) druge dijagnostičke tehnike poput IFAT-a, ELISA-e, RT-PCR-a, IHC-a.

- II.1. Uobičajeno izdvajanje virusa nakon kojeg slijedi identifikacija virusa
- II.1.1. Odabir uzoraka
- Za pretraživanje se uzima najmanje 10 riba koje pokazuju tipične znakove IHN-a ili VHS-a.
- II.1.2. Pripremanje i slanje uzoraka riba
- Za pripremanje i slanje za potrebe uobičajenog izdvajanja virusa slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.2.
- II.1.3. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala
- Za prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala za potrebe uobičajenog izdvajanja virusa slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.3.
- II.1.4. Pripremanje uzoraka za pretraživanje stanične kulture
- Za pripremanje i slanje uzoraka za pretraživanje stanične kulture za potrebe uobičajenog izdvajanja virusa slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.4.
- II.1.5. Virološka pretraživanja na staničnoj kulturi
- Za virološka pretraživanja na staničnoj kulturi za potrebe uobičajenog izdvajanja virusa slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.5.
- II.1.6. Identifikacija virusa
- Za identifikaciju virusa za potrebe uobičajenog izdvajanja virusa slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.6.
- II.2. Otkrivanje virusa metodom RT-qPCR
- II.2.1. Odabir uzoraka
- Za odabir uzoraka za potrebe otkrivanja virusa metodom RT-qPCR slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.1.2.
- II.2.2. Pripremanje i slanje uzoraka riba
- Za pripremanje i slanje uzoraka riba za potrebe otkrivanja virusa metodom RT-qPCR slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.2.
- II.2.3. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala
- Za prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala za potrebe otkrivanja virusa metodom RT-qPCR slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.3.
- II.2.4. Pripremanje uzorka za metodu RT-qPCR
- Za pripremanje uzoraka za potrebe otkrivanja virusa metodom RT-qPCR slijede se metode i postupci utvrđeni u točki I.6.4.1.
- II.2.5. RT-qPCR
- Za otkrivanje virusa metodom RT-qPCR slijede se metode i postupci utvrđeni u točkama I.6.4.1, I.6.4.3 i I.6.4.4.
- II.3. Druge dijagnostičke tehnike
- Supernatant pripremljen kako je opisano u točki I.4.3. može se podvrgnuti ELISA-i, indirektnom testu fluorescentnim protutijelima (IFAT) ili RT-PCR-u u skladu s točkom I.6.1., točkom I.6.2. odnosno točkom I.6.4. Materijal tkiva može se podvrgnuti drugim dijagnostičkim tehnikama, kao što su IFAT na zamrznutim rezovima, imunohistokemija na formalinom fiksiranom materijalu tkiva. Ove se brze tehnike trebaju dopuniti virološkim pretraživanjem u skladu s točkom II. podtočkom (a) ili (b) u roku od 48 sati od uzorkovanja ako se dobije:
- (a) negativan rezultat ili
- (b) pozitivan rezultat iz materijala koji predstavlja prvi slučaj IHN-a ili VHS-a.

III. Postupak titracije za provjeru osjetljivosti staničnih kultura na infekciju

Kad se provodi titracija radi provjere prijemljivosti staničnih kultura na zarazu kako je navedeno u točki I.5.3., slijede se postupci utvrđeni u stavcima ove točke u nastavku.

Treba upotrebljavati najmanje dva izolata virusa VHS-a i jedan izolat virusa IHN-a. Izolati predstavljaju glavnu skupinu virusa unutar Europske unije, točnije, za virus VHS-a treba odabrati jedan patogeni izolat koji potječe od kalifornijske pastrve iz slatke vode i jedan izolat koji je patogen za romba iz morske vode, a za virus IHN-a treba odabrati jedan soj koji je patogen za kalifornijsku pastrvu u Europskoj uniji. Upotrebljavaju se dobro definirani izolati podrijetlom iz država članica. Serije virusa u staničnim kulturama niske pasaže umnažaju se u bocama sa staničnom kulturom na stanicama BF-2 ili RTG-2 za virus VHS-a i na stanicama EPC ili FHM za virus IHN-a. Upotrebljava se medij za staničnu kulturu s najmanje 10 % seruma. Za inokulaciju se upotrebljava niski MOI (< 1).

Kod punog citopatogenog učinka (CPU) virus se sakuplja centrifugiranjem supernatanta stanične kulture na $2\ 000 \times g$ 15 minuta, sterilizira se filtriranjem kroz membranski filter od 0,45 μm te raspodijeli u označene krioeprovete. Virus se drži na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tjedan dana nakon zamrzavanja, pod mlazom hladne vode otope se po tri epruvete svakog virusa te se titriraju na odgovarajućim staničnim linijama. Svaki izolat virusa se odmrzava i titrira najmanje svakih šest mjeseci ili ako se sumnja da je osjetljivost stanične linije smanjena.

Postupci titracije moraju se detaljno opisati i svaki se put mora primijeniti isti postupak.

Titracija s razrjeđenjem do završne točke uključuje najmanje šest ponavljanja u svakoj fazi razrjeđenja. Titri se uspoređuju s prethodno dobivenim titrima. Ako titar bilo kojeg od tri izolata virusa padne za faktor od 2 log ili više u odnosu na početni titar, stanična se linija ne bi trebala više upotrebljavati u svrhe nadzora.

Ako se u laboratoriju drže različite stanične linije, svaku se liniju ispituje odvojeno.

Evidencija se čuva najmanje 10 godina.

DIO 2.

DETALJNE DIJAGNOSTIČKE METODE I POSTUPCI ZA NADZIRANJE I POTVRĐIVANJE KHV-a

I. Detaljne dijagnostičke metode i postupci za potvrđivanje prisutnosti KHV-a ili otklanjanje sumnje na njezinu prisutnost

Kad su potrebna laboratorijska pretraživanja radi potvrđivanja prisutnosti KHV-a ili otklanjanje sumnje na njezinu prisutnost u skladu s člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u odjeljku III. dijela 2. Priloga I., primjenjuju se detaljne dijagnostičke metode i postupci utvrđeni u točkama I.1. i I.2. ovog dijela:

I.1. Priprema uzoraka od riba

Za dijagnostičke se potrebe riba (poslana živa ili usmrćena i pakirana odvojeno u zapečaćenim aseptičnim posudama) ili, u alternativnom slučaju, zamrznuti organi ili dijelovi organa sačuvani u 80 %-tnom ili čistom etanolu ili transportnom mediju za viruse (radi obrade u roku od 48 sati od prikupljanja) mogu upotrijebiti za ispitivanje uobičajenim metodama temeljenima na PCR-u ili qPCR-u.

Za otkrivanje KHV-a prikupljaju se škrge i bubrezi. Nadalje, u dodatnom odvojenom uzorku mogu se uključiti i slezena, encefalon i crijeva. U akutnim slučajevima može se objedinjavati materijal tkiva od najviše pet riba.

Nadalje, uzorci radi kojih nije potrebno usmrčiti ribu, poput krvi, brisa škrge, biopsije škrge, brisa sluznice, mogu se upotrijebiti u određenim slučajevima (točnije, u slučaju sumnje na prisutnost KHV-a moguće je upotrijebiti vrlo vrijedne ribe).

I.1.1. Ekstrakcija DNA

DNA se ekstrahira u skladu sa standardnim postupcima.

Mogu se upotrebljavati komercijalno dostupni kompleti za ekstrakciju DNA kojima se dobiva DNA visoke kvalitete prikladan za upotrebu u protokolima za PCR navedenima u točki I.2.

I.2. Otkrivanje i identifikacija uzročnika metodama koje se temelje na lančanoj reakciji polimeraze (PCR)

I.2.1. qPCR za otkrivanje KHV-a

Za otkrivanje KHV-a metodom qPCR upotrebljava se sljedeći test qPCR:

Prednja početnica (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTTG -3';

Stražnja početnica (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTGTCTTGTT -3';

i sonda (KHV-109p): 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Uvjeti za cikluse: jedan ciklus od 15 minuta na 95 °C nakon kojeg slijedi 40 ciklusa od 15 sekundi na 94 °C i 60 sekundi na 60 °C. Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. No umjesto nje mogu se upotrijebiti i druge verzije metode qPCR dokazane slične učinkovitosti.

I.2.2. Uobičajena metoda PCR za otkrivanje KHV-a

Upotrebljava se test opisan u ovoj točki koji je usmjeren na gen timidin kinaze (TK) KHV-a. No umjesto njega mogu se upotrijebiti drugi PCR testovi s osjetljivostima i posebnostima koje su dokazano slične opisanome testu.

Prednja početnica (KHV-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3';

Stražnja početnica (KHV-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Uvjeti za cikluse: jedan ciklus od 5 minuta na 95 °C nakon kojeg slijedi 35 ciklusa od 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi na 52 °C, jednu minutu na 72 °C i jedan ciklus od 10 minuta na 72 °C. Veličina produkta trebala bi iznositi 409 bp.

Rezultati PCR-a mogu varirati ovisno o uvjetima u kojima ga se provodi, točnije o termalnim protokolima za koje može biti potrebna optimizacija, ovisno o uređaju za PCR (*thermal cycler*) koji se upotrebljava. Nadalje, mogu se pojaviti lažni pozitivni rezultati zbog lažnog prianjanja početnica ili kontaminacije. Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. No umjesto nje mogu se upotrijebiti i druge verzije metode PCR dokazane slične učinkovitosti.

Prvo otkrivanje u određenom području mora se potvrditi sekvenciranjem ili poslati u nacionalni referentni laboratorij ili u referentni laboratorij Europske unije za bolesti riba naveden u Prilogu VI. Direktivi 2006/88/EZ kako bi se virus odmah identificirao.

II. **Detaljne dijagnostičke metode i postupci za nadziranje KHV-a**

Pri uzorkovanju i laboratorijskom pretraživanju koji se provode u svrhu postizanja i održavanja određenih zdravstvenih statusa u pogledu KHV-a kako je utvrđeno u odjeljku I. dijela 2. Priloga I. upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u odjeljku II. ili III. dijela 2. tog Priloga primjenjuju se detaljne dijagnostičke metode i postupci utvrđeni u točkama I.1. i I.2. ovog dijela.

II.1. Priprema uzoraka od riba

Ako je moguće uzorkuju se ribe koje se drži dulje vrijeme na rasponu temperatura koji je povoljan za virus (točnije dva do tri tjedna na temperaturi od 15 °C do 26 °C). Ako je moguće, uzorke se prikuplja 24 sata, a najkasnije 72 sata, nakon gospodarenja zbog kojeg bi moglo doći do reaktivacije virusa u ribi koja ima status nositelja, poput stavljanja u kaveze ili prijevoza, radi poboljšanja mogućnosti otkrivanja KHV-a.

Za potrebe nadziranja KHV-a riba može biti poslana živa ili usmrćena i pakirana odvojeno u zapečaćenim aseptičnim posudama ili, u alternativnom slučaju, zamrznuti organi ili dijelovi organa sačuvani u 80 %-tnom ili 100 %-tnom alkoholu ili transportnom mediju za viruse (radi obrade u roku od 48 sati od prikupljanja) mogu se upotrijebiti za ispitivanje metodama temeljenima na PCR-u. Za nadziranje KHV-a prikupljaju se tkiva škrge i bubrega.

Za potrebe nadziranja KHV-a potrebno je izbjegavati objedinjavanje kad god je to moguće. Ako je objedinjavanje potrebno, može se objediniti materijal tkiva od najviše dviju riba. Veće uzorke potrebno je homogenizirati u tationiku i tučku ili homogenizatoru Stomacher te uzeti poduzorke radi ekstrakcije DNA prije bistrenja. Alternativno se poduzorci mogu prikupiti iz svih tkiva uključenih u uzorak i staviti u „tube za lizu“.

II.1.1. Ekstrakcija DNA

DNA se ekstrahira u skladu sa standardnim postupcima. Mogu se upotrebljavati komercijalno dostupni kompleti za ekstrakciju DNA kojima se dobiva DNA visoke kvalitete prikladan za upotrebu u protokolima za PCR utvrđenima u točki II.2.

Prihvatljiv omjer tkiva i medija je 1:9 w/v. U ispitivanja se uključuje 20 do 25 mg materijala tkiva.

II.2. Nadziranje KHV-a metodama koje se temelje na PCR-u

Za nadziranje KHV-a upotrebljava se metoda qPCR. Ako se pozitivni uzorci pojave u području koje prethodno nije bilo potvrđeno kao pozitivno, rezultati ispitivanja potvrđuju se:

(a) sekvenciranjem produkta PCR-a ili ugniježđenog PCR-a iz uzoraka.

Dobiveni čisti niz podudara se (u najmanje 98 %) s tim referentnim nizovima.

(b) ili alternativno, uzorke se može poslati u nacionalni referentni laboratorij radi potvrđivanja.

II.2.1. qPCR za otkrivanje KHV-a

Upotrebljava se metoda qPCR opisana u nastavku:

Prednja početnica (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTTG -3';

Stražnja početnica (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3';

i sonda (KHV-109p): 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Uvjeti za cikluse: jedan ciklus od 15 minuta na 95 °C nakon kojeg slijedi 50 ciklusa od 15 sekundi na 94 °C i 60 sekundi na 60 °C.

Rezultati qPCR-a mogu varirati ovisno o uvjetima u kojima ga se provodi, točnije o termalnim protokolima za koje može biti potrebna optimizacija, ovisno o uređaju za PCR (*thermal cycler*) koji se upotrebljava. Nadalje, mogu se pojaviti lažni pozitivni rezultati zbog lažnog prijanjanja početnica ili kontaminacije u laboratoriju. Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. No umjesto nje mogu se upotrijebiti i druge verzije metode qPCR dokazane slične učinkovitosti.

II.2.2. Uobičajena metoda PCR za potvrdu otkrivanja KHV-a

Za potvrđivanje prisutnosti zaraze KHV-om upotrebljava se generički ugniježđeni PCR opisan u tablici 2.1. u nastavku, a nakon njega se provodi sekvenciranje umnoženog produkta.

Tablica 2.1.

Početnice i uvjeti za test ugniježđenog PCR-a usmjerenog na sve ciprinidne herpes viruse (CyHV-1, CyHV-2 i CyHV-3).

Naziv početnice	Niz	Uvjeti za cikluse	Veličina produkta
CyHVpol-prednji	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	Prvi krug PCR-a 1 ciklus: 2 minute na 95 °C 40 ciklusa: 30 sekundi na 95 °C 30 sekundi na 55 °C 45 sekundi na 72 °C 1 ciklus: 10 minuta na 72 °C	362 bp
CyHVpol-stražnji	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'		

Naziv početnice	Niz	Uvjeti za cikluse	Veličina produkta
CyHVpol-unutarnji prednji	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	Drugi krug PCR-a 1 ciklus:	339 bp
CyHVpol-unutarnji stražnji	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTTCATC-3'	2 minute na 95 °C, 40 ciklusa: 30 sekundi na 95 °C 30 sekundi na 55 °C 45 sekundi na 72 °C 1 ciklus: 10 minuta na 72 °C	

Rezultati PCR-a mogu varirati ovisno o uvjetima u kojima ga se provodi, točnije o termalnim protokolima za koje može biti potrebna optimizacija, ovisno o uređaju za PCR (*thermal cycler*) koji se upotrebljava. Nadalje, mogu se pojaviti lažni pozitivni rezultati zbog lažnog prianjanja početnica ili kontaminacije u laboratoriju. Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. Umjesto nje mogu se upotrijebiti i druge verzije metode PCR dokazane slične učinkovitosti.

Sekvenciranje se može provesti u laboratoriju ili u vanjskim društvima koja su specijalizirana za sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja analiziraju se poravnavanjem nizova na poznate referentne nizove KHV-a (pristupni brojevi Gen Banka AP008984, DQ657948 i DQ177346). Dobiveni čisti niz podudara se u najmanje 98 % s tim referentnim nizovima.

DIO 3.

DETALJNE DIJAGNOSTIČKE METODE I POSTUPCI ZA NADZIRANJE I POTVRĐIVANJE ZARAZNE ANEMIJE LOSOSA (ISA)

I. Postupci uzorkovanja za nadziranje i kontrolu ISA-e

Pri uzorkovanju i laboratorijskom pretraživanju koji se provode u svrhu programâ nadziranja ili iskorjenjivanja utvrđenih u dijelu 3. Priloga I. ili za potvrđivanje prisutnosti ili otklanjanje sumnje na prisutnost ISA-e u skladu s člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ primjenjuju se detaljne dijagnostičke metode i postupci utvrđeni u točkama I.1., I.2. i I.3. ovog odjeljka.

I.1. Priprema uzoraka od riba

Za potrebe laboratorijskog pretraživanja prisutnosti ISA-e uzroci riba ne smiju se objedinjavati, ako je to moguće. Međutim, za potrebe nadziranja ISA-e prihvatljivo je objedinjavanje dviju do pet riba.

Uzorci za analizu reverznom transkripcijom s lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) uzimaju se od svih uzorkovanih riba. Upotrebom sterilnog instrumenta iz ribe se vadi komadić srednjeg bubrega te se prebacuje u epruvetu mikrocentrifuge koja sadržava 1 ml otopine za konzerviranje RNA s dokazanom djelotvornošću. Tkivo uzeto od najviše pet riba može se prikupiti u jednu transportnu otopinu, što čini jedan skupni uzorak. Težina tkiva u jednom uzorku iznosi 0,5 g. Kada je riba premala da bi se dobio uzorak potrebne težine, uzimaju se komadići bubrega, srca, slezene, jetre ili piloričnih nastavaka (cekuma), upravo navedenim redoslijedom, dok se ne postigne težina od 0,5 g.

Tkiva za histološko pretraživanje uzimaju se samo od svježe usmrćenih riba uobičajene građe koje pokazuju kliničke znakove ili *post-mortem* znakove koji odgovaraju prisutnosti ISA-e. Sve vanjske ili unutarnje lezije uzorkuju se i u svakom se slučaju uzorci srednjeg bubrega, srca, jetre, gušterače, utrobe, škrge i slezene vade iz ribe s pomoću skalpela i prebacuju u 8 %-tnu do 10 %-tnu (vol:vol) puferiranu fiziološku otopinu formalina. Omjer između fiksira i tkiva iznosi najmanje 20:1 kako bi se osiguralo zadovoljavajuće očuvanje tkiva. Za imunohistokemiju (IHC) uzimaju se uzorci srednjeg bubrega i srca.

Tkiva za virološko pretraživanje na staničnoj kulturi uzimaju se od svih uzorkovanih riba. Dijelovi jetre, prednjeg i srednjeg bubrega, srca i slezene vade se iz ribe s pomoću sterilnog instrumenta i prebacuju u plastične epruvete koje sadržavaju 9 ml transportnog medija. Tkiva uzeta od najviše pet riba mogu se prikupiti u jednu epruvetu koja sadržava transportnu otopinu, što čini jedan skupni uzorak. Težina tkiva u jednom uzorku iznosi $1,0 \pm 0,5$ g.

I.2. Slanje uzoraka riba

U laboratorij se mogu poslati cijele ribe pod uvjetom da se mogu ispuniti zahtjevi u odnosu na temperaturu tijekom prijevoza, kako su opisani u stavku 3. ove točke. Cijelu ribu umata se u upijajući papir i šalje u plastičnim vrećicama, rashlađene kako je opisano u tom stavku.

Moguće je slati i živu ribu, ali samo pod nadzorom nacionalnog referentnog laboratorija za bolesti riba i uzimajući u obzir dodatne probleme u pogledu dezinfekcije i biosigurnosti pri prijevozu živih riba.

Uzorci krvi i epruvete koje sadržavaju tkivo riba namijenjeno virološkom pretraživanju ili analizi RT-PCR stavljaju se u izolirane posude poput kutija od polistirena s debelim stijenkama, zajedno s dovoljnom količinom leda ili „rashladnih blokova” kako bi se osiguralo rashlađivanje uzoraka tijekom prijevoza u laboratorij. Izbjegava se zamrzavanje, a po primitku pošiljke u kutijama za prijevoz još uvijek mora biti leda ili jedan ili više „rashladnih blokova” još uvijek mora biti djelomično ili potpuno zamrznuto. U izuzetnim okolnostima uzorci za analizu RT-PCR i uzorci za virološko pretraživanje mogu se naglo zamrznuti i transportirati u laboratorij pri temperaturi od -20 °C ili nižoj.

Za analizu RT-PCR tkiva sačuvanih u ribonukleinskoj kiselini (RNA) kasnije se provodi ekstrakcija RNA unutar sljedećih vremenskih okvira ovisno o temperaturi pri kojoj se čuvaju uzorci:

uzorci pohranjeni pri 37 °C: jedan dan;

uzorci pohranjeni pri 25 °C: jedan tjedan;

uzorci pohranjeni pri 4 °C: jedan mjesec;

uzorci pohranjeni pri -20 °C: neograničeno.

Ako se tkivo riba prevozi u fiksiru radi histološkog pretraživanja, prevozi ih se u nepropusnim epruvetama u posudama otpornima na udarce. Trebalo bi izbjegavati zamrzavanje uzoraka.

Virološko pretraživanje na staničnoj kulturi mora započeti što je prije moguće, a najkasnije 48 sati nakon prikupljanja uzoraka. U iznimnim slučajevima virološko pretraživanje može započeti najkasnije unutar 72 sata od prikupljanja materijala, pod uvjetom da je materijal za pretraživanje zaštićen transportnim medijem i da se mogu ispuniti zahtjevi u odnosu na temperaturu tijekom prijevoza.

I.3. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Podložno odobrenju dijagnostičkog laboratorija, tkiva riba osim onih navedenih u točki I.1. mogu se prikupiti i pripremiti radi dodatnog pretraživanja.

II. **Detaljne dijagnostičke metode i postupci za nadziranje i potvrđivanje prisutnosti ISA-e ili otklanjanje sumnje na njezinu prisutnost**

Pri laboratorijskim pretraživanjima koja se provode u svrhu postizanja i održavanja određenog zdravstvenog statusa u pogledu ISA-e kako je utvrđeno u odjeljku I. dijela 3. Priloga I. ili u svrhu potvrđivanja prisutnosti ISA-e ili otklanjanja sumnje na njezinu prisutnost u skladu s člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u odjeljku II. dijela 3. Priloga I. primjenjuju se detaljne metode i postupci utvrđeni u točkama od II.1. do II.5. u nastavku.

II.1. Pretraživanje uzoraka metodom RT-PCR

Dijagnostička je metoda koja se upotrebljava za pregled u pogledu ISA-e RT-qPCR. Budući da rezultati metode RT-qPCR mogu varirati ovisno o uvjetima u kojima je provedena, uključuju se odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole i umnoženi produkti radi izbjegavanja svake sumnje.

II.1.1. Ekstrakcija ukupnog RNA

Sve radnje s RNA izvršavaju se na ledu, uz upotrebu rukavica.

Ukupan RNA ekstrahira se upotrebom fenol-kloroform metode ili afinitetnom kolonom za pročišćavanje RNA, u skladu s uputama proizvođača.

Pročišćeni RNA resuspendira se u destiliranoj vodi slobodnoj od RNAza (u prvom redu vodi tretiranoj 0,1 %-tnim dietil pirokarbonatom).

Koncentracija i čistoća ekstrahiranog RNA procjenjuje se mjerenjem optičke gustoće pri 260 nm i 280 nm. Alternativni pristup može biti uključivanje unutarnjih kontrola usmjerenih na genom virusa kako je navedeno u točki II.1.3.

II.1.2. Otkrivanje virusa ISA-e metodom RT-PCR

Nekoliko metoda RT-PCR može se upotrijebiti za umnažanje genoma virusa ISA-e. RT-PCR u dva koraka može se provesti ako se reakcije RT i PCR odvijaju u dvije odvojene epruvete. Međutim, može se provesti i reakcija u jednom koraku, pri čemu se obje reakcije odvijaju u jednoj epruveti. Metoda od jednog koraka upotrebljava se kad god je to moguće jer se testom u jednoj epruveti smanjuje rizik unakrsne kontaminacije jer nije potrebno prebacivati sadržaj, a smatra je se jednako osjetljivom kao metodu od dva koraka.

Upotrebljavaju se početnice i testovi opisani u ovoj točki, točnije par početnica ILA1 ili ILA2 koje su usmjerene na segment 8 i dokazano je da su primjerene za otkrivanje virusa ISA-e u slučaju pojave i kod riba nositelja. Stražnja početnica ILA2 ne odgovara izolatima iz Sjeverne Amerike te se u tim slučajevima upotrebljava drugi niz početnica.

Prednja početnica (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3';

Stražnja početnica (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Uvjeti za cikluse: jedan ciklus od 30 minuta na 50 °C, 1 ciklus od 15 minuta na 94 °C, 40 ciklusa od 30 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 55 °C, 60 sekundi na 72 °C; jedan ciklus od 5 minuta na 72 °C. Veličina produkta iznosi 155 bp.

Rezultati PCR-a mogu varirati ovisno o uvjetima u kojima ga se provodi, točnije o termalnim protokolima za koje može biti potrebna optimizacija, ovisno o uređaju za PCR (*thermal cycler*) koji se upotrebljava. Nadalje, mogu se pojaviti lažni pozitivni rezultati zbog lažnog prianjanja početnica ili kontaminacije u laboratoriju. Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. No umjesto nje mogu se upotrijebiti i druge verzije metode RT-PCR dokazane slične učinkovitosti.

II.1.3. Otkrivanje virusa ISA-e metodom RT-qPCR

Upotrebom metode RT-qPCR može se povećati specifičnost, a vjerojatno i osjetljivost. Metodu je moguće provesti brže jer nije potrebna gel elektroforeza, a smanjuje se i rizik unakrsne kontaminacije jer je moguće procijeniti količinu virusnoga genomskog RNA u epruveti s uzorkom. Nedostatak testa RT-qPCR je taj što često nije moguće sekvencirati umnožene produkte. Međutim, ako postoje sumnje u pogledu specifičnosti umnoženog produkta, mora se provesti još jedan test specifičan za virus ISA-e radi provjere rezultata.

Upotrebljava se test opisan u ovoj točki, koji je usmjeren na segment 8. Tim se testom obuhvaćaju izolati iz Europske unije, Europskog udruženja slobodne trgovine i Sjeverne Amerike. Metoda od jednog koraka upotrebljava se kad god je to moguće jer se testom u jednoj epruveti smanjuje rizik od unakrsne kontaminacije.

Prednja početnica: 5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3';

Stražnja početnica: 5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3';

i sonda: 5'-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC-MGBNFQ-3'.

Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. Uvjeti za cikluse: jedan ciklus od 30 minuta na 50 °C, jedan ciklus od 15 minuta na 95 °C, 40 ciklusa od 15 sekundi na 94 °C, 60 sekundi na 60 °C; prilagođava se prema potrebi. Umjesto njega mogu se upotrijebiti i druge verzije metoda RT-PCR ili RT-qPCR dokazane slične učinkovitosti.

II.1.4. Sekvenciranje umnoženih produkata PCR-a

Prednja početnica (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3';

Stražnja početnica (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3'.

Negativne kontrole s matricom i pozitivne kontrole uključuju se u svaki ciklus plitica. Uvjeti za cikluse (RT-PCR od jednog koraka): jedan ciklus od 30 minuta na 50 °C, jedan ciklus od 15 minuta na 94 °C, 40 ciklusa od 30 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 55 °C, 60 sekundi na 72 °C; jedan ciklus od 5 minuta na 72 °C; prilagođava se prema potrebi. Umjesto njega mogu se upotrijebiti i druge verzije metoda RT-PCR ili RT-qPCR dokazane slične učinkovitosti.

Alternativno se može upotrijebiti metoda sekvenciranja HPR-a u segmentu 6 navedena u nastavku:

Prednja početnica: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3';

Stražnja početnica: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3';

Veličina produkta: 304 nt ako je HPRO.

Mogu se upotrijebiti i testovi RT-PCR slične osjetljivosti i specifičnosti testovima opisanima u ovoj točki.

Čistoća umnoženog produkta RT-PCR-a provjerava se gel elektroforezom prije sekvenciranja. Ako se pojavi samo jedan čisti fragment, pročišćava ga se izravno iz reakcije PCR-a. Ako je prisutno više umnoženih fragmenata, fragment od interesa pročišćava se gel elektroforezom. Pročišćavanje fragmenata PCR-a iz otopina ili agar gelova provodi se s pomoću PCR afinitetnih kolona za pročišćavanje, u skladu s uputama proizvođača.

Sekvenciranje se provodi upotrebom početnica za umnožavanje u vanjskim društvima koja su specijalizirana za sekvenciranje. Rezultati se analiziraju alatom za pretraživanje BLAST, a nizovi se uspoređuju s drugim poznatim nizovima u bazi podataka o nukleotidima Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) u SAD-u.

Sekvenciranjem se moraju otkloniti sve sumnje u pogledu specifičnosti umnoženog produkta RT-PCR-a.

II.2. Izolacija virusa ISA-e na staničnim kulturama

II.2.1. Priprema uzoraka

Tkiva se može čuvati na temperaturi od – 80 °C. Tkivo se zamrzava i otapa samo jednom prije pretraživanja. Pretraživanje se provodi što je brže moguće u svrhu nadziranja i kontrole.

Svaki uzorak (skupni uzorak tkiva u transportnoj otopini) mora se potpuno homogenizirati upotrebom odobrenog homogenizatora centrifugiranjem pri 2 000 do 4 000 × g kroz 15 minuta na temperaturi od 0 do 6 °C, nakon čega se supernatant filtrira (0,45 µm) i inkubira s jednakim volumenom odgovarajućim razrijeđenjem skupnog antiseruma za autohtone serotipove virusa IPN-a. Titar antiseruma mora biti najmanje 1:2 000 s neutralizacijom plaka od 50 % u testu neutralizacije. Mješavina se inkubira jedan sat na 15 °C. To predstavlja inokulum.

Svrha je tretiranja svih inokuluma antiserumom za virus zarazne nekroze gušterače (virus koji se u nekim dijelovima Europe javlja u 50 % uzoraka ribe) spriječiti da se u inokuliranim staničnim kulturama razvije citopatogeni učinak (CPU) zbog virusa IPN-a. Taj se postupak može provesti radi smanjenja trajanja virološkog pretraživanja kao i broja slučajeva u kojima bi se pojava CPU-a morala smatrati mogućim pokazateljem virusa ISA-e. Kada uzorci dolaze iz proizvodnih jedinica koje se smatraju slobodnima od IPN-a, može se izostaviti tretiranje inokulata antiserumom za virus IPN-a.

II.2.2. Inokulacija staničnih kultura

Stanice bubrega atlantskog lososa (ASK) mogu se upotrijebiti za primarnu izolaciju virusa ISA-e. Mogu se upotrijebiti i druge stanične linije s dokazanom djelotvornošću i osjetljivošću za izolaciju virusa ISA-e, uvažavajući varijabilnost sojeva i sposobnost različitih sojeva da se umnožavaju u različitim staničnim linijama. Čini se da stanice ASK-a podržavaju izolaciju i rast dosad poznatih izolata virusa dok god se upotrebljava niska razina pasaže. U stanicama ASK-a može se pojaviti izraženiji citopatogeni učinak (CPU) nego u drugim osjetljivim staničnim linijama poput SHK-1 (pronefros lososa-1).

Stanice ASK-a (pasaža 65 ili niža) uzgajaju se u mediju L-15 koji sadržava 10 % fetalnoga goveđeg seruma, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamina i 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanolu u pliticama s više jažica. Suspenzija organa obrađena antiserumom inokulira se u mlade stanične kulture koje aktivno rastu radi konačnog razrjeđenja materijala tkiva u mediju stanične kulture od 1:1 000. Za svaki se organ suspenzija od 40 µl inokuluma dodaje u jednu jažicu koja sadržava 2 ml medija stanične kulture. Kako bi se smanjio rizik unakrsne kontaminacije, odvojene plitice s 12 ili 24 jažice upotrebljavaju se za uzorke iz različitih uzgajališta riba.

Jedna plitica se ostavlja neinokulirana da bi služila kao negativna kontrola. Odvojena plitica se inokulira referentnim izolatom virusa ISA-a kao pozitivna kontrola na sljedeći način. Stotinu µl radnog pripravka virusa ISA-e (minimalni titar 10^7 , infektivna doza kulture tkiva od 50 % na završnoj točki (TCID₅₀ ml⁻¹)) inokulira se u prvu jažicu i promiješa. Volumen tog materijala iz prve jažice prenosi se u drugu jažicu da bi se dobila otopina s omjerom 1:10 te se promiješa. Taj se postupak ponavlja kroz cijelu pliticu da bi se dobilo šest desetorostrukih razrjeđenja. Standardni virus ISA-e može se pohraniti na – 80 °C najmanje dvije godine, ali kada se jednom odmrzne mora se upotrijebiti u roku od tri dana. Treba paziti da se spriječi unakrsna kontaminacija testne plitice s materijalom pozitivne kontrole. Kako bi se izbjegao taj rizik, pozitivne se kontrole pripremaju i njima se rukuje odvojeno od testne plitice. Testom osjetljivosti stanica ASK-a u odnosu na izolate virusa ISA-e koji se provodi jednom u šest mjeseci može se zamijeniti uključivanje pozitivne kontrole pri svakoj inokulaciji.

Uzorci se inkubiraju pri 15 ± 2 °C kroz razdoblje do 15 dana. Stanične se kulture dva puta mikroskopski pregledavaju na pojavu CPU-a između 5. i 7. te između 12. i 14. dana nakon inokulacije. Ako se pri bilo kojem objedinjavanju pojavi CPU, odmah se započinje s postupcima identifikacije virusa u skladu s točkom II.2.4. Ako se do četrnaestog dana ne zapazi CPU, provodi se indirektni test fluorescentnim protutijelima (IFAT), test hemadsorpcije ili RT-PCR.

II.2.3. Supkultiviranje

Supkultiviranje se izvodi između trinaestog i petnaestog dana. Supernatant kulture dodaje se u jažice koje sadržavaju svježe stanice u aktivnom rastu u odgovarajućem razrjeđenju (1/10) u pliticama s više jažica i inkubira ga se na temperaturi od 14 ± 2 °C tijekom najviše 18 dana. Stanične se kulture dva puta mikroskopski pregledavaju na pojavu CPU-a između petog i sedmog te između četrnaestog i osamnaestog dana nakon inokulacije. Ako se pri bilo kojem objedinjavanju pojavi CPU, odmah se započinje s postupcima identifikacije virusa u skladu s točkom II.2.4. Ako se do četrnaestog odnosno osamnaestog dana ne zapazi CPU, provodi se test hemadsorpcije ili RT-PCR.

Ako se tijekom prvih sedam dana inkubacije pojavi citotoksičnost, u toj fazi provodi se supkultiviranje i stanice se inkubira 14 do 18 dana te ponovno supkultivira s daljnjih 14 do 18 dana inkubacije. Ako se citotoksičnost pojavi nakon sedam dana, supkultiviranje se provodi jedanput, a stanice se inkubiraju tako da se postigne ukupno 28 do 36 dana inkubacije od primarne inokulacije.

Ako se u primarnoj kulturi pojavi bakterijska kontaminacija, test se ponovno priprema upotrebom homogenata pohranjenog na – 80 °C. Prije inokulacije tkivo homogenata centrifugira se na $4\,000 \times g$ tijekom 15 do 30 minuta na temperaturi od 0 do 6 °C te se supernatant filtrira kroz 0,22 µm. Ako se bakterijska kontaminacija pojavi tijekom faze supkultiviranja, supernatant se filtrira kroz 0,22 µm, inokulira u svježe stanice i inkubira daljnjih 14 do 18 dana.

II.2.4. Testovi identifikacije virusa

Ako se u bilo kojoj fazi uoči dokaz CPU-a, ili ako je test hemadsorpcije pozitivan, provodi se identifikacija virusa. Metode koje se mogu upotrijebiti za identifikaciju virusa ISA-e jesu RT-PCR u skladu s točkom II.1. i imunofluorescencija (IF) u skladu s točkom II.2.6. Ako se sumnja na prisutnost drugih virusa, provode se dodatni testovi za identifikaciju virusa. Ako se tim testovima ne identificira virus sa sigurnošću unutar tjedan dana, supernatant se radi hitne identifikacije prosljeđuje:

- (a) referentnom laboratoriju za ISA-u Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE) ili
- (b) nacionalnom referentnom laboratoriju ili referentnom laboratoriju EU-a za bolesti riba kako je navedeno u Prilogu VI. Direktivi 2006/88/EZ.

II.2.5. Hemadsorpcija

Budući da replikacijom virusa ISA-e u staničnim kulturama ne dolazi uvijek do CPU-a, svaku se jažicu podvrgava testu RT-PCR ili testu hemadsorpcije u skladu s ovom točkom, ili testu IP u skladu s točkom II.2.6.

Medij stanične kulture uklanja se iz svake jažice, uključujući one koje se upotrebljavaju za pozitivnu i negativnu kontrolu, te je se stavlja u obilježene sterilne epruvete. 500 µl 0,2 %-tne (vol:vol) suspenzije ispranih crvenih krvnih zrnaca kunića ili konja, ili 0,05 %-tne (vol:vol) suspenzije ispranih crvenih krvnih zrnaca kalifornijske pastrve ili atlantskog lososa dodaje se u svaku jažicu i inkubira 45 minuta na sobnoj temperaturi. Crvena se krvna zrnca odstranjuju i svaka se jažica dvaput ispiru medijem L-15. Svaka se jažica mikroskopski pregledava.

Postojanje nakupina stanica crvenih krvnih zrnaca pričvršćenih uz površinu stanica ASK-a ukazuje na vjerojatnu zarazu ortomikrovirusom. Ako je test hemadsorpcije pozitivan, odmah se provodi test identifikacije virusa u skladu s točkom II.2.4.

II.2.6. Imunofluorescencija

Stanice ASK-a (pasaža 65 ili niža) uzgajaju se u mediju L-15 koji sadržava 10 % fetalnoga goveđeg seruma, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamina i 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanolu u pliticama s više jažica i upotrebljavaju se pri konfluenciji većoj od 50 %. Mogu se upotrijebiti i druge stanične linije i hranjive podloge s dokazanom djelotvornošću. 225 µl supernatanta kulture za koju se smatra da je zaražena virusom dodaje se u svaku od dviju jažica, pomiješa se i 225 µl prenosi u dvije sljedeće jažice, pri razrjeđenju od 1:5. Dvije dodatne jažice ostavljaju se neinokulirane i služe kao kontrola. Za uzorke iz različitih ribljih uzgajališta upotrebljavaju se posebne plitice kao i kontrole virusa. Kontrola virusa uspostavlja se upotrebom referentnog izolata virusa ISA-e.

Plitice se inkubiraju na 14 ± 2 °C i mikroskopski pregledavaju tijekom najviše sedam dana. Kada se zapazi rani CPU ili se u roku od sedam dana uopće ne zapazi CPU, sljedeći je korak fiksiranje. Jažice se ispiru fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom (PBS) i fiksiraju inkubacijom s 80 % acetona 20 minuta na sobnoj temperaturi. Plitice se suše na zraku i odmah boje ili se pohranjuju na temperaturi od 0 do 6 °C najviše 24 sata prije bojenja.

Umnožene se jažice boje monoklonskim protutijelima (MAb) 3H6F8 i 1OC9F5 za virus ISA-e ili nekim drugim monoklonskim protutijelom koje ima dokazanu učinkovitost i specifičnost, razrjeđuju u PBS-u i inkubiraju 30 minuta pri temperaturi od 37 ± 4 °C. Monoklonsko se protutijelo odstranjuje, a plitice se ispiru tri puta 0,05 %-tnom otopinom Tween 20 u PBS-u. Konjugat protumišjeg IgG fluorescein izotiocijanata (FITC) razrijeđen u PBS-u dodaje se u svaku jažicu i inkubira 30 minuta na 37 ± 4 °C. Razrjeđenja različitih serija MAb-a i konjugata FITC-a optimiziraju se u svakom laboratoriju. Protutijelo se odstranjuje a plitice se tri puta ispiru 0,05 %-tnom otopinom Tween 20 u PBS-u.

Jažice se odmah pregledava upotrebom invertiranog mikroskopa podešenog za fluorescentnu mikroskopiju s prikladnim filterom za ekscitaciju FITC-a. Test se smatra pozitivnim ako se uoče fluorescentne stanice. Da bi test bio valjan, rezultati pozitivne kontrole moraju biti pozitivni, a rezultati negativne kontrole negativni.

II.3. Pretraživanje drugih tkiva

Tehnika navedena u točki II.2.6. može se primijeniti na druga tkiva ribe, kao što su jetra, slezena i srce, pod uvjetom da se na stakalce može prenijeti dovoljna količina endotelnih stanica, leukocita ili limfocita. Postupak bojenja ostaje isti za sva tkiva, iako je kod nekih tkiva bolje izostaviti bojenje propidijevim jodidom i očekivati da će se tipovi stanica prisutni u otisku identificirati faznim osvjetljenjem.

II.4. Histologija

Dijelovi preparirani parafinom režu se na veličinu od 5 µm i boje upotrebom hematoksilina i eozina.

Histološke promjene kod klinički bolesnog atlantskog lososa različite su, ali mogu uključivati sljedeće:

- (a) mnogobrojne eritrocite u središnjem venoznom sinusu i lamelarnim kapilarama škrge, gdje mogu nastati i trombovi eritrocita;
- (b) multifokalne i konfluentne petehije ili nekroza hepatocita ili oboje na određenoj udaljenosti od većih žila u jetri; multifokalna akumulacija eritrocita u proširenim hepaticnim sinusoidima;

- (c) nakupljanje eritrocita u krvnim žilama lamine proprije crijeva i moguće krvarenje u laminu propriju;
- (d) stroma slezene raširena zbog nakupljanja eritrocita;
- (e) slabo multifokalno do obilno rašireno intersticijsko krvarenje s tubularnom nekrozom u područjima krvarenja, nakupljanje eritrocita u glomerulima u bubregu;
- (f) eritrofagocitoza u slezeni i sekundarna krvarenja u jetri i bubregu.

II.5. Imunohistokemija (IHC)

Poliklonalno protutijelo protiv nukleoproteina virusa ISA-e upotrebljava se na parafinskim dijelovima tkiva fiksiranog formalinom. Organi koje se pretražuje jesu srednji bubreg i srce (prijelazno područje, uključujući sve tri komore i zaliske). Slučajeve koji su sumnjivi zbog patoloških znakova provjerava se pozitivnim IHC-om. Histološke se dijelove priprema u skladu s uobičajenim postupcima.

1. Priprema dijelova tkiva

Tkiva se fiksira u neutralnom 10 %-tnom formalinu puferiranom fosfatnim puferom najmanje jedan dan, dehidrira uzastopnim uranjanjem u etanol rastuće koncentracije, pročisti u ksilenu i utisne u parafin, u skladu s uobičajenim protokolima. Dijelovi debljine oko 5 μm (za IHC stavljeni na stalce premazano poli-L-lizinom) zagrijavaju se 20 minuta na temperaturi od 56 °C do 58 °C (najviše 60 °C), deparafiniraju u ksilenu, rehidriraju uzastopnim uranjanjem u etanol rastuće koncentracije i boje hematoksilinom i eozinom radi patomorfologije i IHC-a u skladu s točkom 2.

2. Postupak bojenja za IHC

Sve se inkubacije provode na sobnoj temperaturi na pomičnoj mjernoj ploči, osim ako nije drukčije predviđeno u ovoj odluci:

- (a) antigeni se uzimaju vrenjem dijelova u 0,1 M citratnog pufera pH 6,0 tijekom 2 × 6 minuta nakon čega slijedi blokiranje 5 %-tnim bezmasnim mlijekom u prahu i 2 %-tnim kozjim serumom u 50 mM TBS-a (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) tijekom 20 minuta;
- (b) dijelove se zatim inkubira preko noći s primarnim protutijelom (monospecifično kuniće protutijelo protiv nukleoproteina virusa ISA-e) razrijeđenim u TBS-u s 1 %-tnim bezmasnim mlijekom u prahu, nakon čega slijede tri ispiranja u TBS-u s 0,1 %-tnim Tween 20;
- (c) za otkrivanje vezanih protutijela dijelove se 60 minuta inkubira protutijelima konjugiranim alkalnom fosfatazom za kunići IgG. Nakon konačnog se ispiranja dodaju Fast Red (1 mg ml⁻¹) i Naphthol AS-MX fosfat (0,2 mg ml⁻¹) s 1 mM levamizola u 0,1 M TBS-a (pH 8,2) i razvija se 20 minuta. Dijelove se zatim ispiru vodom iz slavine prije protubojenja hematoksilinom Harris i stavlja u vodeni medij za uklapanje uzoraka. Dijelovi tkiva pozitivni na virus ISA-e i dijelovi tkiva negativni na virus ISA-e uključuju se kao kontrole u svakom slučaju.

3. Tumačenje rezultata IHC-a

Tumačenje rezultata ispitivanja IHC-om provodi se kako je utvrđeno u točkama (a) i (b):

- (a) kontrolne dijelove smatra se pozitivnima kad se zapazi da kontrolni dijelovi imaju jasno vidljiva crvena (crvenkasta) citoplazmatska i intranuklearna obojenja endotelnih stanica u krvnim žilama endokarda. Dio testnog uzorka smatra se pozitivnim samo ako se otkrije takvo jasno, intranuklearno crveno obojenje endotelnih stanica;
- (b) kontrolne dijelove smatra se negativnima ako nemaju nikakve znatne reakcije u pogledu obojenja.

Budući da je intranuklearna lokalizacija specifična za nukleoprotein ortomiksovirusa u fazi replikacije virusa, ali često je dominantno popratno citoplazmatsko obojenje, citoplazmatski i drugi uzorci obojenja bez intranuklearne lokalizacije smatraju se neodređenima ili nepotpunima.

Najjače pozitivne reakcije obojenja uobičajeno nastaju u endotelnim stanicama srca i bubrega. Reakcije endotelnog obojenja unutar vrlo velikih hemoragijskih lezija mogu biti male ili nepostojeće, a to je moguće zbog lize zaraženih endotelnih stanica.

DIO 4.

DETALJNE DIJAGNOSTIČKE METODE I POSTUPCI ZA NADZIRANJE I POTVRĐIVANJE ZARAZE MARTEILIJOM REFRINGENS**I. Detaljne dijagnostičke metode i postupci za nadziranje i potvrđivanje zaraze *Marteilijom refringens***

Pri uzorkovanju i laboratorijskom pretraživanju koja se provode u svrhu postizanja i održavanja određenog zdravstvenog statusa u pogledu zaraze *Marteilijom refringens* kako je utvrđeno u odjeljku I. dijela 4. Priloga I. ili u svrhu potvrđivanja prisutnosti te bolesti s popisa ili otklanjanja sumnje na njezinu prisutnost u skladu s člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u odjeljku II. dijela 4. Priloga I. primjenjuju se detaljne metode i postupci utvrđeni u točkama I.1., I.2. i I.3. ovog dijela.

I.1. Postupak uzorkovanja

Otvoreni ili svježe uginuli pojedinačni mekušci uzorkuju se u skladu s prioritetima kako bi se povećale šanse pronalaska zaraženih životinja.

Kamenice ili dagnje se nakon uzorkovanja održavaju na temperaturi od 4 °C ili na rashlađenom ledu najviše 24 sata ako su u uzorke uključeni otvoreni mekušci i najviše 72 sata ako nisu, u plastičnoj vrećici s etiketom na kojoj su navedene pojedinosti u pogledu vrste i podrijetla kamenica ili dagnji. Otvorene ili svježe uginule mekušce drži se odvojeno od ostalih mekušaca.

Dio tkiva debljine od 3 do 5 mm, uključujući tkivo škrge i srca, upotrebljava se za histološku dijagnozu *Marteilije refringens*. Dio probavne žlijezde upotrebljava se u određenim ispitivanjima, uključujući otiske i lančanu reakciju polimeraze (PCR).

I.2. Mikroskopske tehnike**I.2.1. Citologija (citologija otiska)**

Nakon sušenja tkiva probavne žlijezde na upijajućem papiru na staklenim pločicama radi se nekoliko otisaka. Pločice se suši na zraku, fiksira metanolom ili čistim etanolom te oboji upotrebom komercijalno dostupnog kompleta za bojenje krvi kao što je Diff-Quik®/Hemacolor®, u skladu s uputama proizvođača. Nakon ispiranja u vodi iz slavine i sušenja pločice se postavlja na mikroskop s pokrovnim stakalcem upotrebom odgovarajućeg sintetičkog ljepljiva. Pločice se promatra prvo pri povećanju od 200 puta, a zatim uranjanjem u ulje pri povećanju od 1 000 puta.

Rezultat je pozitivan ako se uoče stanice najveće veličine od između 30 i 40 µm. Citoplazma se boji bazofilno, a jezgra eozinofilno. Zapaženi su blijedi krugovi oko velikih, jako obojenih (refringentnih) zrnaca i, u većim stanicama, stanice unutar stanica.

Tehnika nije specifična za parazitne vrste.

I.2.2. Histologija

Dijelovi tkiva u koje su uključene škrge, probavna žlijezda, pokrov i gonade fiksiraju se najmanje 24 sata u Davidsonovu fiksiru nakon čega slijedi uobičajena obrada za parafinsku histologiju i bojenje, na primjer hematoksilinom i eozinom. Uzorak se promatra uvećavanjem povećanja do 1 000 puta.

Rezultat je pozitivan ako se uoče stanice veličine u rasponu od 4 do najviše 40 µm. Rane se faze sastoje od multinuklearnih stanica čiji je oblik u rasponu od sferičnog do izduljenog. One se uobičajeno nalaze u epitelu jednjaka i želuca, a ponekad u labijalnim zaliscima. U sporulaciju je uključena podjela stanica unutar stanica i odvija se u tubulusima i duktusima probavne žlijezde. Refringentna zrnca pojavljuju se tijekom sporulacije, ali ne primjećuje ih se u ranim fazama. U kasnim fazama zaraze primjećuju se slobodni sporangiji u šupljini probavnog trakta. Citoplazma se boji bazofilno, a jezgra eozinofilno. Boja zrnaca može biti u rasponu od intenzivno narančaste do intenzivno crvene.

Tehnika nije specifična za parazitne vrste.

I.3. Molekularne tehnike

I.3.1. Ekstrakcija DNA

DNA se ekstrahira u skladu sa standardnim postupcima.

Mogu se upotrebljavati kompleti za ekstrakciju DNA koji su komercijalno dostupni i kojima se uobičajeno dobiva DNA visoke kvalitete prikladan za upotrebu u protokolima za PCR navedenima u točki I.3.2.

I.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Razvijeno je i objavljeno nekoliko protokola za PCR.

Upotrebljavaju se PCR početnice usmjerene na područje unutarnje prepisujuće razmaknice (ITS1) jer je s pomoću njih moguće umnožiti samo *M. refringens*.

PCR se provodi u volumenu od 50 μ l. Mješavine za PCR sadržavaju pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 pri 25 °C] i 1 %-tni Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, mješavinu 0,2 mM dNTP, 1 μ M prednjih i stražnjih početnica, 0,02 jedinice μ l⁻¹ Taq DNA polimeraze i 10 do 100 ng ekstrahirane DNA. Nakon denaturacije DNA pet minuta na temperaturi od 94 °C, provodi se 30 ciklusa kako slijedi: denaturacija jednu minutu na 94 °C, prijanjanje jednu minutu na 55 °C te produživanje jednu minutu na 72 °C po paru kilobaze. Provodi se konačni korak produživanja od 10 minuta na 72 °C. Za otkrivanje *M. refringens* PCR se provodi s početnicama koje su usmjerene na područje ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' i 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Positivne se kontrole sastoje od genomske DNA iz vrlo zaraženog domaćina ili plazmidne DNA, uključujući ciljano područje.

Negativne se kontrole sastoje od genomske DNA iz nezaraženih domaćina i PCR reaktanata bez ciljane DNA.

Positivan rezultat čini pozitivno umnažanje PCR-om na očekivanoj veličini (412 bp), pri čemu su negativne kontrole negativne, a pozitivne kontrole pozitivne.

I.3.3. Hibridizacija in situ (ISH)

Razvijeno je i objavljeno nekoliko protokola za ISH.

Upotrebljava se sonda koja je usmjerena na malu podjedinicu genskog kompleksa ribosomskog RNA jer je validirana u odnosu na histologiju.

Dijelovi tkiva u koje su uključene škrge i probavna žlijezda fiksiraju se najmanje 24 sata u Davidsonovu fiksiru nakon čega slijedi uobičajena obrada za parafinsku histologiju. Dijelovi od 5 μ m režu se i stavljaju na pločice premazane aminoalkilsilanom koje se zatim preko noći zagrijava u pećnici na 40 °C. Dijelove se deparafinira uranjanjem u ksilen na 10 minuta. Taj se korak ponavlja jednom, a zatim se otapalo uklanja uranjanjem u dvije zastupne kupke od čistog etanola od po 10 minuta. Dijelove se zatim dehidrira uzastopnim uranjanjem u etanol rastuće koncentracije. Dijelove se tretira proteinazom K (100 μ g ml⁻¹) u TE puferu (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), 30 minuta na 37 °C. Pločice se dehidrira uzastopnim uranjanjem u etanol rastuće koncentracije te zatim suši na zraku. Dijelove se inkubira sa 100 μ l pufera za hibridizaciju (4 \times SSC [citrat standardne fiziološke otopine], 50 % formamida, 1 \times Denhardtove otopine, 250 μ g ml⁻¹ tRNA kvasca, 10 % dekstran sulfata) koji sadržava 10 ng (1 μ l PCR reaktanta pripremljenog kako je opisano u točki I.3.2. upotrebom početnica CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG i TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) sonde označene dioksigeninom. Dijelove se prekriva *in-situ* plastičnim pokrovnim stakalcima i stavlja na zagrijani blok pet minuta na 95 °C. Pločice se zatim hladi na ledu jednu minutu prije hibridizacije preko noći na 42 °C u vlažnoj komori. Dijelove se zatim dvaput ispire po pet minuta u 2 \times SSC na sobnoj temperaturi i jednom 10 minuta u 0,4 \times SSC na 42 °C. Koraci za otkrivanje provode se u skladu s uputama proizvođača. Pločice se zatim ispire u sterilnoj destiliranoj vodi (dH₂O). Dijelove se protuboji bojom *Bismarck Brown Yellow*, ispire u dH₂O te se na njih stavljaju pokrovnostakalca upotrebom vodenog medija za uklapanje uzoraka.

Positivne i negativne kontrole čine dijelovi iz domaćina koji su provjereno zaraženi odnosno nezaraženi.

Pozitivan rezultat dokazuje se ljubičastocrnim označivanjem stanica *M. refringens* bez poznatih ciljanih tkiva, pri čemu su sve negativne kontrole negativne, a sve pozitivne kontrole pozitivne.

I.3.4. Sekvenciranje

Sekvenciranje se provodi kao jedan od završnih koraka potvrdne dijagnostike. Ciljana su područja SSU rDNA i ITS1.

II. Detaljne dijagnostičke metode i postupci za nadziranje i potvrđivanje zaraze *Marteilijom refringens*

Za potrebe programa nadziranja i radi potvrđivanja prisutnosti zaraze *Marteilijom refringens* ili radi otklanjanja sumnje na tu bolest s popisa, u skladu sa zahtjevima utvrđenima u odjeljku II. dijela 4. Priloga I., dijagnostičke metode i odgovarajući postupci koji se upotrebljavaju u skladu sa smjernicama utvrđenima u tablici 4.1. u nastavku.

Tablica 4.1.

Smjernice za upotrebu dijagnostičkih metoda za programe nadziranja i za potvrđivanje ili otklanjanje sumnje na zarazu *Marteilijom refringens*

Metoda	Ciljano nadziranje	Vjerojatna dijagnoza	Potvrđena dijagnoza
Otisci probavne žlijezde	X	X	X, ili
Histopatologija	X		X, ili
Hibridizacija <i>in situ</i>			X i
PCR	X	X	X i
Sekvenciranje			X

DIO 5.

DETALJNE DIJAGNOSTIČKE METODE I POSTUPCI ZA NADZIRANJE I POTVRĐIVANJE ZARAZE *BONAMIJOM OSTREAEOM*

I. Postupci za dijagnozu zaraze *Bonamijom ostreaeom*

Pri uzorkovanju i laboratorijskom pretraživanju koja se provode u svrhu postizanja i održavanja određenog zdravstvenog statusa u pogledu *Bonamije ostreae* kako je utvrđeno u odjeljku I. dijela 5. Priloga I. ili u svrhu potvrđivanja prisutnosti te bolesti s popisa ili otklanjanja sumnje na njezinu prisutnost u skladu s člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u odjeljku II. dijela 5. Priloga I. primjenjuju se detaljne metode i postupci utvrđeni u točkama I.1., I.2. i I.3. u nastavku.

I.1. Postupak uzorkovanja

Otvoreni ili svježe uginuli pojedinačni mekušci uzorkuju se u skladu s prioritetima kako bi se povećale šanse pronalaska zaraženih životinja.

Kamenice se nakon uzorkovanja održavaju na temperaturi od 4 °C ili na rashlađenom ledu najviše 24 sata ako su u uzorke uključeni otvoreni mekušci i 72 sata ako nisu, u plastičnoj vrećici s etiketom na kojoj su navedene pojedinosti u pogledu vrste i podrijetla kamenica. Otvorene ili svježe uginule mekušce drži se odvojeno od ostalih mekušaca.

Dio tkiva debljine od 3 do 5 mm, uključujući tkivo škrgi i srca, upotrebljava se za histološku dijagnozu *Bonamije ostreae*. Dio probavne žlijezde upotrebljava se u određenim ispitivanjima, uključujući otiske i lančanu reakciju polimeraze (PCR).

I.2. Mikroskopske tehnike

I.2.1. Citologija (citologija otiska)

Nakon sušenja tkiva škrge ili srca na upijajućem papiru na staklenim pločicama radi se nekoliko otisaka. Pločice se suši na zraku, fiksira metanolom ili čistim etanolom te oboji upotrebom komercijalno dostupnog kompleta za bojenje krvi (kao što je Diff-Quik®/Hemacolor®) u skladu s uputama proizvođača. Nakon ispiranja u vodi iz slavine i sušenja pločice se postavlja na mikroskop s pokrovnim stalcem upotrebom odgovarajućeg sintetičkog ljepila. Pločice se promatra prvo pri povećanju od 200 puta, a zatim uranjanjem u ulje pri povećanju od 1 000 puta.

Rezultat je pozitivan ako su prisutni mali sferični ili jajoliki organizmi (široki od 2 do 5 µm) unutar hemocita. Međutim, parazit se može pojaviti i izvan stanice. Ti organizmi imaju bazofilnu citoplazmu i eozinofilnu jezgru (boje mogu varirati ovisno o upotrijebljenom bojilu) te se, zbog toga što se šire po pločici, mogu činiti širim na otiscima nego u histološkim pretraživanjima. Mogu se primijetiti i stanice s više jezgri. Tehnika nije specifična za parazitne vrste.

I.2.2. Histologija

Dijelovi tkiva u koje su uključene škrge i probavna žlijezda fiksiraju se najmanje 24 sata u Davidsonovu fiksiru nakon čega slijedi uobičajena obrada za parafinsku histologiju i bojenje, na primjer hematoksilinom i eozinom. Uzorak se promatra uvećavanjem povećanja do 1 000 puta.

Rezultat je pozitivan ako su prisutni paraziti vrlo malih stanica širine od 2 do 5 µm unutar hemocita ili slobodni u vezivnom tkivu ili sinusima škrge, utrobe i epitelu pokrova, što se često povezuje s jakom upalom. Radi izbjegavanja sumnji, parazit se promatra unutar hemocita radi pozitivne dijagnoze. Tehnika nije specifična za parazitne vrste.

I.3. Molekularne tehnike

I.3.1. Ekstrakcija DNA

DNA se ekstrahira u skladu sa standardnim postupcima.

Mogu se upotrebljavati kompleti za ekstrakciju DNA koji su komercijalno dostupni i kojima se uobičajeno dobiva DNA visoke kvalitete prikladan za upotrebu u protokolima za PCR opisanima u nastavku.

I.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Razvijeno je i objavljeno nekoliko protokola za PCR.

Mogu se upotrijebiti dva protokola za PCR usmjerena na malu podjedinicu (SSU) rDNA:

- (a) prvi je uobičajeni PCR kojim se umnožava nekoliko članova obitelji *Haplosporidia*, uključujući *Bonamiju* spp. Početnice označene kao Bo i Boas jesu 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CCG-GCC-GC-3' odnosno 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' te se njima umnožava produkt od 300 bp. Mješavine za PCR sadržavaju pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 pri 25 °C] i 1 %-tni Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, mješavinu 0,2 mM dNTP, 1 µM prednjih i stražnjih početnica, 0,02 jedinice µl⁻¹ Taq DNA polimeraze i 0,2 ng µl⁻¹ predložka DNA u ukupnom volumenu od 50 µl. Uzorke se denaturira u uređaju za PCR (*thermocycler*) pet minuta na 94 °C prije no što se na njima provede 30 ciklusa (jednu minutu na 94 °C, jednu minutu na 55 °C, jednu minutu na 72 °C) nakon čega slijedi konačno produljenje 10 minuta na 72 °C.

Pozitivne se kontrole sastoje od genomske DNA iz vrlo zaraženog domaćina ili plazmidne DNA, uključujući ciljano područje.

Negativne se kontrole sastoje od genomske DNA iz nezaraženih domaćina i PCR reaktanata bez ciljne DNA.

Pozitivan rezultat čini pozitivno umnažanje PCR-om na očekivanoj veličini (300 bp), s negativnim kontrolama koje su negativne i pozitivnim kontrolama koje su pozitivne;

- (b) drugi je protokol za test PCR SYBR® Green za PCR u stvarnom vremenu. Njime se omogućuje jasno otkrivanje *B. ostreae* (opisano u nastavku) te ga se može kombinirati s testom PCR SYBR® Green za PCR u stvarnom vremenu kojim se omogućuje jasno otkrivanje *B. exitiose* (Ramilo i sur., 2013.).

Početicama BOSTRE-F (5'- TTACGTCCCTGCCCTTGTA-3') i BOSTRE-R (5'- TCGCGGTTGAATTTATCGT-3') umnožava se produkt od 208 bp. Mješavine za PCR sadržavaju mješavinu SYBR® Green Master (1X), 0,3 µM prednjih i stražnjih početnica te 200 ng ekstrahirane DNA. Uzorke se denaturira u sustavu za otkrivanje u stvarnom vremenu 10 minuta na 95 °C prije no što se na njima provede 35 ciklusa (30 sekundi na 95 °C, 45 sekundi na 55 °C i jednu minutu na 72 °C). Analiza krivulje temperature taljenja provodi se uvećanjima temperature od 0,5 °C/s, počevši na 55 °C i završavajući na 95 °C te bilježenjem fluorescencije pri svakoj promjeni temperature.

Pozitivne se kontrole sastoje od genomskog DNA iz vrlo zaraženog domaćina ili plazmidnog DNA, uključujući ciljano područje.

Negativne se kontrole sastoje od genomskog DNA iz nezaraženih domaćina i PCR reaktanata bez ciljanog DNA.

Rezultat je pozitivan ako dođe do pozitivnog PCR umnažanja s jedinstvenim vrhuncem temperature taljenja ($78,25 \pm 0,25$ °C u uvjetima koje je objavio Ramilo i sur., 2013.), pri čemu su sve negativne kontrole negativne, a sve pozitivne kontrole pozitivne.

I.3.3. Hibridizacija *in situ* (ISH)

Razvijeno je i objavljeno nekoliko protokola za ISH.

Upotrebljava se sonda usmjerena na SSU genskog kompleksa rDNA iako je poznato da se pokazalo da unakrsno reagira s nekim drugim članovima obitelji *Haplosporidia*.

Dijelovi tkiva u koje su uključene škrge i probavna žlijezda fiksiraju se najmanje 24 sata u Davidsonovu fiksiru nakon čega slijedi uobičajena obrada za parafinsku histologiju. Dijelovi od 5 µm režu se i stavljaju na pločice premazane aminoalkilsilanom koje se zatim preko noći zagrijava u pećnici na 40 °C. Dijelove se deparafinira uranjanjem u ksilen na 10 minuta. Taj se korak ponavlja jednom, a zatim se otapalo uklanja uranjanjem u dvije zastupne kupke od čistog etanola od po 10 minuta. Dijelove se zatim dehidrira uzastopnim uranjanjem u etanol rastuće koncentracije. Dijelove se tretira proteinazom K ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) u TE puferu (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), 30 minuta na 37 °C. Pločice se dehidrira uzastopnim uranjanjem u etanol rastuće koncentracije te zatim suši na zraku. Dijelove se inkubira sa 100 µl pufera za hibridizaciju ($4 \times \text{SSC}$ [citrati standardne fiziološke otopine], 50 % formamida, $1 \times \text{Denhardtove otopine}$, $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ tRNA kvasca, 10 % dekstran sulfata) koji sadržava 20 ng (2 µl PCR reakcije pripremljene kako je opisano u točki I.3.2. upotrebom početnica Bo i Boas) sonde označene dioksigeninom. Dijelove se prekriva *in-situ* plastičnim pokrovnim stakalcima i stavlja na zagrijani blok pet minuta na 95 °C. Pločice se zatim hladi na ledu jednu minutu prije hibridizacije preko noći na 42 °C u vlažnoj komori. Dijelove se zatim dvaput ispiru po pet minuta u $2 \times \text{SSC}$ na sobnoj temperaturi i jednom 10 minuta u $0,4 \times \text{SSC}$ na 42 °C. Koraci za otkrivanje provode se u skladu s uputama proizvođača. Pločice se zatim ispiru u sterilnoj destiliranoj vodi (dH₂O). Dijelove se protuboji bojom *Bismarck Brown Yellow*, ispiru u dH₂O te se na njih stavljaju pokrovnica stakalca upotrebom vodenog medija za uklapanje uzoraka.

Pozitivne i negativne kontrole čine dijelovi iz domaćina koji su provjereno zaraženi odnosno nezaraženi.

Pozitivan rezultat odgovara označenim parazitima unutar hemocita, pri čemu su negativne kontrole negativne, a pozitivne kontrole pozitivne.

I.3.4. Sekvenciranje

Sekvenciranje se provodi kao jedan od završnih koraka potvrđne dijagnostike. Ciljana su područja SSU rDNA i ITS1.

II. Postupci za nadziranje i potvrđivanje zaraze *Bonamijom ostreaeom*

Za potrebe nadziranja i potvrđivanja prisutnosti zaraze *Bonamijom ostreaeom* ili radi otklanjanja sumnje na tu zarazu, u skladu sa zahtjevima utvrđenima u odjeljku II. dijela 5. Priloga I., dijagnostičke metode i odgovarajući postupci koji se upotrebljavaju u skladu su sa smjernicama utvrđenima u tablici 5.1. u nastavku.

Tablica 5.1.

Smjernice za upotrebu dijagnostičkih metoda za programe nadziranja i za otklanjanje sumnje na zarazu *Bonamijom ostreaeom* ili potvrđivanje te zaraze

Metoda	Ciljano nadziranje	Vjerojatna dijagnoza	Potvrđena dijagnoza
Otisci srca ili škrge	X	X	X, ili
Histopatologija	X		X, ili
Hibridizacija <i>in situ</i>			X i
PCR	X	X	X i
Sekvenciranje			X

DIO 6.

DETALJNE DIJAGNOSTIČKE METODE I POSTUPCI ZA NADZIRANJE I POTVRĐIVANJE BOLESTI BIJELIH PJEGA RAKOVA (WSD)

1. Dijagnostički postupci za otkrivanje WSSV-a

Pri uzorkovanju i laboratorijskom pretraživanju u svrhu programa nadziranja i iskorjenjivanja kako su utvrđeni u odjeljku I. dijela 6. Priloga I. i u svrhu potvrđivanja prisutnosti zaraze WSSV-om ili otklanjanja sumnje na njezinu prisutnost u skladu s člankom 57. točkom (b) Direktive 2006/88/EZ upotrebom dijagnostičkih metoda utvrđenih u odjeljku II. dijela 6. Priloga I. primjenjuju se detaljne dijagnostičke metode i postupci utvrđeni u točkama od 2. do 7. ovog dijela.

Metode i postupci opisani u ovom dijelu Priloga II. preuzeti su iz ispitivanja odobrenog u skladu s normom ISO 17025 koje se primjenjuje u Referentnom laboratoriju Europske unije za bolesti rakova. Mogu se primjenjivati alternativni pristupi, upotrebom istovrijednih uvjeta ili kompleta koje proizvode drugi proizvođači, ali koji imaju jednaku osjetljivost i specifičnost poput onih opisanih u ovom dijelu. U svakom se slučaju umnoženi produkt PCR-a sekvencira radi potvrde identiteta virusa sindroma bijelih pjega rakova (WSSV).

2. Postupak uzorkovanja

Tkiva (pleopodi i škrge) koja sadržavaju WSSV iz rakova mogu se pohraniti u etanolu, otopini RNAlater ili naglo zamrznuti na -80°C . Faze potrebne za identifikaciju WSSV-a iz uzoraka tkiva sljedeće su: homogenizacija tkiva, ekstrakcija DNA, specifično umnažanje DNA WSSV-a upotrebom PCR-a, vizualizacija umnoženog produkta na gelu, pročišćavanje DNA i sekvenciranje radi potvrđivanja identiteta patogena.

3. Homogenizacija tkiva

Kidanje tkiva i priprema homogenata u odgovarajućem puferu provodi se upotrebom uređaja za kidanje tkiva Fast Prep i epruveta Lysing matrix A (MP Biomedicals). Tkivo se važe, stavlja u epruvete Lysing Matrix A, razrjeđuje u omjeru 1:10 w/v ili u skladu s uputama proizvođača u odgovarajućem puferu (G2 i 10 μl proteinaze K za upotrebu s kompletom DNA Tissue (Qiagen)) i homogenizira dvije minute upotrebom homogenizatora Fast Prep 24. Homogenizirane uzorke inkubira se najmanje četiri sata ili preko noći na 56°C . Uzorke se vrtložno protresa, centrifugira na 9 000 rpm dvije minute te se 50 μl supernatanta ili volumena koji odgovara 5 mg tkiva (masa tkiva optimalna za upotrebu kompleta za ekstrakciju) dodaje u epruvetu s uzorkom radi ekstrakcije i volumena DNA do 200 μl upotrebom pufera G2.

4. Ekstrakcija DNA

Ukupan DNA ekstrahira se upotrebom kompleta za ekstrakciju DNA tkiva te s pomoću uređaja EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) u skladu s uputama proizvođača. Kontrola za ekstrakciju (DNA iz telećeg timusa) i negativna kontrola (pufer G2) upotrebljavaju se u svakoj seriji uzoraka. DNA se eluira u volumen od 50 µl. Kako bi se osigurala uspješna ekstrakcija, koncentracija DNA za sve uzorke i kontrole utvrđuje se upotrebom uređaja Nano Drop. Ekstrahirani DNA zamrzava se na – 20 °C ako nije namijenjen neposrednoj upotrebi.

5. Lančana reakcija polimerazom (PCR) za WSSV

Metoda koja se upotrebljava za otkrivanje WSSV-a jest protokol za otkrivanje WSSV-a ugniježđenim PCR-om opisanim u stavcima u nastavku kojim se umnožava produkt umnažanja od 1 447 bp i 848 bp gena 18s rRNA u prvom odnosno drugom krugu PCR-a.

Reakcija prvog kruga PCR-a postavlja se u volumenu od 50 µl koji sadržava konačne koncentracije od 1 × GoTaq pufera (Promega), 5 mM MgCl₂, 1 pmol/µl početnice 146 F1 WSSV-a, 1 pmol/µl početnice 146 R1 WSSV-a (tablica 1), 0,25 mM dNTP, 1,25 jedinice Taq polimeraze i 2,5 µl DNA. Svaki se uzorak obrađuje dvostruko uz negativnu kontrolu ekstrakcije, negativnu PCR kontrolu (2,5 µl H₂O dodane umjesto DNA) i pozitivnu kontrolu. Pozitivnu kontrolu čini razrijeđeni plazmid WSSV-a izrađen i validiran za internu upotrebu (dostupan u referentnom laboratoriju EU-a).

Drugi krug reakcije PCR-a za WSSV postavlja se na isti način kao i prvi krug, ali upotrebom niza početnica 146 F2/R2 WSSV-a te upotrebom druge pozitivne kontrole radi provjere uspješnosti ove faze PCR-a.

Početnica	Niz
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAAGTGGCCCTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

I prvi i drugi krug PCR-a provodi se upotrebom uvjeta ciklusa navedenih u nastavku u uređaju za PCR DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (ili jednakovrijednom uređaju). Početni korak denaturacije na 94 °C tijekom dvije minute nakon kojeg slijedi 30 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 62 °C, 30 sekundi na 72 °C, što se ponavlja u 30 ciklusa, produljenje tijekom dvije minute na 72 °C i održavanje na 4 °C.

6. Gel elektroforeza

Umnoženi produkti PCR-a iz prvog i drugog kruga PCR-a vizualiziraju se u 2 %-tnim agar gelovima napravljenima upotrebom TAE pufera. 15 µl svakog uzorka podvrgava se naponu od 120 volti približno 20 minuta i promatra pod UV svjetlom. Pozitivni uzorci proizvest će vrpce od 1 447 bp u prvom krugu PCR-a i od 848 bp u drugom krugu PCR-a. Uzorci te veličine izrezuju se i stavljaju u epruvetu za mikrocentrifugu od 1,5 ml. DNA sadržan u dijelovima gela pročišćava se upotrebom sustava Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up u skladu s uputama proizvođača. Koncentracija DNA procjenjuje se upotrebom uređaja Nano Drop. Pročišćeni DNA zamrzava se na – 20 °C ako nije namijenjen neposrednoj upotrebi.

7. Sekvenciranje produkata PCR-a

DNA se sekvencira upotrebom kompleta Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Ukupni volumen u svakoj reakciji iznosi 20 µl, pri čemu su konačne koncentracije 1 × Big Dye Terminator, 1 × pufer za sekvenciranje, 10 pmol/µl prednje ili stražnje početnice i 10 µl pročišćene DNA (razrijeđene na oko 10 ng/µl), obrađen upotrebom sljedećih uvjeta za cikluse u uređaju DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (ili jednakovrijednom uređaju): 30 sekundi na 94 °C, nakon čega slijedi 10 sekundi na 96 °C, 10 sekundi na 50 °C i četiri minute na 60 °C, pri čemu se posljednja tri koraka cikliraju 30 puta.

Produkti sekvenciranja PCR-a talože se metodom upotrebe natrijeva acetata pri kojoj se 20 µl DNA dodaje u 10 µl NaAc, 70 µl H₂O i 250 µl etanola, vrtložno protrese i centrifugira 20 minuta na 13 000 rpm, supernatant se uklanja, a talog ispiru u 200 µl čistog etanola, centrifugiranjem na 13 000 rpm pet minuta. Talog se suši pet minuta na 37 °C. 25 µl jako deioniziranog (*Hi-Di*) formamida dodaje se talozima, zagrijava na 95 °C dvije minute i temeljito vrtložno protresa. Uzorke se sekvencira upotrebom analizatora ABI3130xl Avant Genetic u skladu s uputama proizvođača. Rezultati sekvenciranja analiziraju se programom Sequencher te se nizovi povezuju s nizovima u bazi podataka NCBI-ja upotrebom funkcije BLAST.
