

II

(Nem jogalkotási aktusok)

HATÁROZATOK

A BIZOTTSÁG (EU) 2015/1554 VÉGREHAJTÁSI HATÁROZATA

(2015. szeptember 11.)

a 2006/88/EK irányelvnek a felügyeleti és diagnosztikai módszerekre vonatkozó követelmények tekintetében történő alkalmazására vonatkozó szabályok megállapításáról

(az értesítés a C(2015) 6188. számú dokumentummal történt)

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a tenyésztett víziállatokra és az azokból származó termékekre vonatkozó állat-egészségügyi követelményekről és a víziállatokban előforduló egyes betegségek megelőzéséről és az azok elleni védekezésről szóló, 2006. október 24-i 2006/88/EK tanácsi irányelvre ⁽¹⁾ és különösen annak 49. cikke (3) bekezdésére, 50. cikke (4) bekezdésére, 57. cikkének b) pontjára és 61. cikke (3) bekezdésére,

mivel:

- (1) A 2006/88/EK irányelv a IV. mellékletében meghatározott, jegyzékbe foglalt betegségek (a továbbiakban: jegyzékbe foglalt betegségek) víziállatoknál történő felügyeletére és korai kimutatására vonatkozóan megelőző minimumintézkedéseket állapít meg, továbbá megállapítja a jegyzékbe foglalt betegségek gyanúja vagy azok kitörése esetén alkalmazandó járványvédelmi intézkedéseket. Az irányelv megállapítja továbbá a tagállamok, illetve azok övezeti vagy területi egységei számára a betegségtől mentes státus megszerzésére vonatkozó követelményeket is.
- (2) A jegyzékbe foglalt betegségek felszámolásának, valamint a tagállamok, övezetek vagy területi egységek tekintetében a betegségtől mentes státus megszerzésének ugyanazonokon az elveken kell alapulnia, és ugyanazt a tudományos megközelítést kell követnie az Unió egész területén. Ezért uniós szinten külön követelményeket kell megállapítani a felszámolási és megfigyelési programokra vonatkozóan, valamint a betegségtől mentes státusnak egy tagállam teljes területére, illetve egy-egy övezetére vagy területi egységére irányulóan történő megszerzése érdekében a tagállamok által alkalmazandó mintavételi és diagnosztikai módszerekre vonatkozóan.
- (3) A jegyzékbe foglalt betegségek jelenlétének gyanúja vagy megerősítése esetén végrehajtandó laboratóriumi vizsgálatoknak uniós szinten azonosnak kell lenniük, és ugyanazokat a tudományos normákat és protokollokat kell követniük. A 2006/88/EK irányelvnek megfelelően meg kell állapítani a tagállamok illetékes hatóságai által erre a célra kijelölt laboratóriumok által alkalmazandó specifikus diagnosztikai módszereket és eljárásokat.
- (4) Az Állat-egészségügyi Világszervezet (OIE) által elfogadott Víziállat-egészségügyi Kódex (a továbbiakban: Víziállat-egészségügyi Kódex) előírásokat állapít meg a víziállatok egészségének és a tenyésztett halak jólétének világszerte történő javítása céljából, ideértve a víziállatok és az azokból származó termékek nemzetközi kereskedelmére vonatkozó előírásokat is. A Víziállat-egészségügyi Kódex több fejezete ajánlásokat fogalmaz meg bizonyos diagnosztikai vizsgálatok alkalmazására vonatkozóan. Ezeket az OIE által előírt vizsgálatokat a víziállatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok OIE által kiadott kézikönyve (a továbbiakban: víziállat-diagnosztikai kézikönyv) állapítja meg. Annak biztosítása érdekében, hogy a víziállat-betegségek diagnosztizálására vonatkozó uniós követelmények összhangban legyenek a nemzetközi előírásokkal, az e határozatban megállapított szabályoknak figyelembe kell venniük a Víziállat-egészségügyi Kódex előírásait és ajánlásait.

⁽¹⁾ HL L 328., 2006.11.24., 14. o.

- (5) Ebben a tekintetben a víziállat-diagnosztikai kézikönyv számos, jegyzékbe foglalt betegség esetében több, a laboratóriumi vizsgálatok során alkalmazandó vizsgálatot és eljárást sorol fel. A jegyzékbe foglalt betegségekre irányuló diagnosztikai munka tudományos alapjának uniós szintű egységesítése érdekében választani kell az OIE által ajánlott diagnosztikai vizsgálatok és eljárások közül, és pontosítani kell, hogy a megfigyelési programok végrehajtásakor, illetve a jegyzékbe foglalt betegségek gyanújának kizárása vagy jelenlétének megerősítése céljából mely vizsgálatokat kell kötelezően elvégezni a laboratóriumi vizsgálatok során. Bár egyes esetekben alternatív módszerekre és eljárásokra is szükség lesz, arra vonatkozó előírást és tudományos magyarázatot is kell adni, hogy az alternatív módszerek mikor és hogyan alkalmazhatók. Ez különösen a részletesebb diagnosztikai eljárások esetében szükséges.
- (6) A pontos és reprodukálható diagnosztikai eredmények felmutatása érdekében fontos, hogy az alkalmazandó részletes eljárások és protokollok érvényesítésére a 2006/88/EK irányelv VI. mellékletének I. részében említett, vonatkozó minőségi szabványokkal összhangban kerüljön sor. A kereskedelemben kapható vizsgálati készletek alkalmazása az e határozatban előírt diagnosztikai módszerek közül számos diagnosztikai módszer esetében a diagnosztikai protokollok szükséges része, és e vizsgálati készletek validálására az uniós referencialaboratóriumok által a megfelelő betegségek esetében akkreditált vizsgálatok keretében sor került. A jogbiztonság érdekében ebben a határozatban hivatkozni kell a validált kereskedelmi vizsgálati készletek kereskedelmi nevére.
- (7) Előfordulhat, hogy egyes tagállamok egy vagy több, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében nehezen szerzik meg a betegségtől mentes státust teljes területükre, illetve egy-egy övezetükre vagy területi egységükre vonatkozóan. Ilyen esetekben előfordulhat, hogy az adott tagállam az adott, jegyzékbe foglalt betegségek tekintetében nem kívánja megszerezni vagy visszaszerezni a betegségtől mentes státust. Az azokban az esetekben alkalmazandó járványvédelmi minimumintézkedéseknek, amikor az érintett tagállam nem kívánja megszerezni vagy visszaszerezni a betegségtől mentes státust, uniós szinten azonosaknak kell lenniük, és ugyanazokat a kritériumoknak kell megfelelniük. Ezért a 2006/88/EK irányelvnek megfelelően meg kell állapítani a jegyzékbe foglalt betegségek elszigetelésére vonatkozó részletes szabályokat és az ezen elszigetelési intézkedések feloldására vonatkozó minimumkövetelményeket.
- (8) A 2001/183/EK bizottsági határozat ⁽¹⁾ megállapítja a pisztrángfélék fertőző vérképzőszervi elhalása és a pisztrángok vírusos vérfertőzése nevű, jegyzékbe foglalt betegségek kimutatására és megállapítására szolgáló mintavételi tervekre és diagnosztikai módszerekre vonatkozó követelményeket. A 2003/466/EK bizottsági határozat ⁽²⁾ megállapítja a lazacok fertőző vérszegénységének kimutatására szolgáló mintavételi tervekre és diagnosztikai módszerekre, valamint az említett betegség gyanúját vagy megerősítését követően a körzetek kialakítására és a hatósági megfigyelésre vonatkozó követelményeket. A 2002/878/EK bizottsági határozat ⁽³⁾ megállapítja a puhatestű állatok bonamiosis és marteiliosis betegségeinek kimutatására és megállapítására szolgáló mintavételi tervekre és diagnosztikai módszerekre vonatkozó követelményeket. A követelmények naprakész tétele érdekében az említett három határozatot ezzel a határozattal kell felváltani. Ennek megfelelően a 2001/183/EK, a 2002/878/EK és a 2003/466/EK határozatot hatályon kívül kell helyezni.
- (9) Mivel egyes tagállamoknak időre van szükségük ahhoz, hogy az e határozatban megállapított követelmények teljesítése érdekében fejlesztéseket hajtsanak végre nemzeti referencialaboratóriumaikban, ez a határozat 2016. április 1-jétől alkalmazandó.
- (10) Az e határozatban megállapított intézkedések összhangban vannak a Növények, Állatok, Élelmiszerek és Takarmányok Állandó Bizottságának véleményével,

ELFOGADTA EZT A HATÁROZATOT:

1. cikk

Tárgy

Ez a határozat szabályokat állapít meg a következők tekintetében:

- a) a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt nem egzotikus állatbetegségek (a továbbiakban: jegyzékbe foglalt betegségek) tekintetében a tagállamok által teljes területük, illetve egy-egy övezetük vagy területi egységük betegségtől mentes státusával kapcsolatban alkalmazandó megfigyelés, pufferzónák, valamint mintavételi és diagnosztikai módszerek;

⁽¹⁾ A Bizottság 2001. február 22-i 2001/183/EK határozata az egyes halbetegségek kimutatására és megállapítására szolgáló mintavételi tervek és diagnosztikai módszerek meghatározásáról és a 92/532/EGK határozat hatályon kívül helyezéséről (HL L 67., 2001.3.9., 65. o.).

⁽²⁾ A Bizottság 2003. június 13-i 2003/466/EK határozata a lazacok fertőző vérszegénységének (ISA) gyanúját vagy megerősítését követően a körzetek kialakítására és a hatósági megfigyelésre vonatkozó kritériumok megállapításáról (HL L 156., 2003.6.25., 61. o.).

⁽³⁾ A Bizottság 2002. november 6-i 2002/878/EK határozata a puhatestű állatok bonamiosis (*Bonamia ostreae*) és marteiliosis (*Marteilia refringens*) betegségeinek kimutatására és megállapítására szolgáló mintavételi tervek és diagnosztikai módszerek létrehozásáról (HL L 305., 2002.11.7., 57. o.).

- b) a jegyzékbe foglalt betegségek jelenlétének gyanúja vagy megerősítése esetén a laboratóriumi vizsgálatok során alkalmazandó diagnosztikai módszerek; valamint
- c) valamely jegyzékbe foglalt betegségtől mentesnek nem nyilvánított tagállamban, övezetben vagy területi egységben a jegyzékbe foglalt betegség gyanúja vagy megerősítése esetén alkalmazandó járványvédelmi minimumintézkedések.

2. cikk

Fogalommeghatározások

E határozat alkalmazásában:

- a) „pisztrángok vírusos vérfertőzése” (VHS): a *Rhabdoviridae* család *Novirhabdovirus* nemzetségébe tartozó vírusos haemorrhagiás septicaemia-vírus (VHSV), más néven Egtved-vírus által okozott betegség;
- b) „pisztrángfélék fertőző vérképzőszervi elhalása” (IHN): a *Rhabdoviridae* család *Novirhabdovirus* nemzetségébe tartozó fertőző hematopoietic necrosis-vírus (IHNV) által okozott betegség;
- c) „koi-herpeszvírusbetegség” (KHVD): az *Alloherpesviridae* családba tartozó koiherpeszvírus által okozott betegség. Tudományos neve: cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3);
- d) „lazacok fertőző vérszegénysége” (ISA): az *Orthomyxoviridae* család *Isavirus* nemzetségébe tartozó, HPR-deletált lazacanámia-vírus (ISAV) általi fertőzés okozta betegség;
- e) „*Marteilia refringens*-fertőzés”: a *Marteilia refringens* egysejtű paramyxovírus általi fertőzés okozta betegség;
- f) „*Bonamia ostreae*-fertőzés”: a *Haplosporidia* családba tartozó *Bonamia ostreae* protozoon általi fertőzés okozta betegség;
- g) „White spot-betegség” (WSD): a White spot-betegségnek a *Nimaviridae* család *Whispovirus* nemzetségébe tartozó kettős DNS-szálú vírusa (WSSV) által okozott betegség.

3. cikk

A felszámolási és megfigyelési programokra vonatkozó minimumkövetelmények

A tagállamok gondoskodnak arról, hogy a betegségtől mentes státusnak az egy vagy több, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében teljes területükre, illetve egy-egy övezetükre vagy területi egységükre vonatkozóan történő megadásakor, visszavonásakor vagy visszaállításakor betartásra kerüljenek a megfigyelési és felszámolási programokra, a pufferzónákra, valamint a mintavételi és diagnosztikai módszerekre vonatkozó, I. mellékletben meghatározott szabályok, valamint a II. mellékletben meghatározott külön módszerek és részletes eljárások.

4. cikk

A diagnosztikai módszerekre és a külön eljárásokra vonatkozó minimumkövetelmények

A tagállamok gondoskodnak arról, hogy a jegyzékbe foglalt betegségek jelenlétének megerősítése vagy kizárása érdekében végzett laboratóriumi vizsgálatok elvégzésekor betartásra kerüljenek az I. mellékletben meghatározott védekezési módszerek, valamint a II. mellékletben meghatározott külön diagnosztikai módszerek és részletes eljárások.

5. cikk

A jegyzékbe foglalt betegségek elszigetelésére vonatkozó járványvédelmi minimumintézkedések, valamint az elszigetelési intézkedések feloldására vonatkozó minimumkövetelmények a jegyzékbe foglalt betegségtől mentesnek nem nyilvánított tagállamokban, övezetekben vagy területi egységben

A tagállamok gondoskodnak arról, hogy az egy vagy több, jegyzékbe foglalt betegségtől mentesnek nem nyilvánított területükön, övezetükben vagy területi egységükben az említett, jegyzékbe foglalt betegségekre vonatkozó járványvédelmi intézkedések végrehajtásakor és az azokra vonatkozó elszigetelési intézkedések feloldásakor betartásra kerüljenek az I. mellékletben meghatározott járványvédelmi minimumintézkedések és az elszigetelési intézkedések feloldására vonatkozó minimumkövetelmények.

*6. cikk***Hatályon kívül helyezés**

A 2001/183/EK, a 2002/878/EK és a 2003/466/EK határozat hatályát veszti.

*7. cikk***Az alkalmazás időpontja**

Ezt a határozatot 2016. április 1-jétől kell alkalmazni.

*8. cikk***Címzettek**

Ennek a határozatnak a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 2015. szeptember 11-én.

a Bizottság részéről
Vytenis ANDRIUKAITIS
a Bizottság tagja

I. MELLÉKLET

FELÜGYELETI ÉS VÉDEKEZÉSI MÓDSZEREK

I. Bevezetés

Ez a melléklet a következőket állapítja meg:

- a) a 2006/88/EK irányelv 44. cikkében előírt felszámolási és felügyeleti programokra vonatkozó követelmények, valamint a tagállamoknak, illetve azok övezeteinek vagy területi egységeinek az említett irányelv VII. fejezete szerint történő, betegségtől mentessé nyilvánítására alkalmazandó mintavételi és diagnosztikai módszerek;
- b) a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt nem egzotikus betegségek (a továbbiakban: jegyzékbe foglalt betegségek) gyanúja esetén és jelenlétének megerősítése érdekében elvégzendő, az irányelv 28. cikkének a) pontjában és 57. cikkének b) pontjában előírt laboratóriumi vizsgálatokhoz alkalmazandó mintavételi és diagnosztikai módszerek;
- c) a valamely jegyzékbe foglalt betegség jelenlétének megerősítése esetén meghozandó, a 2006/88/EK irányelv 39. cikkében előírt zárlati intézkedések, továbbá a korábban V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység III. kategória szerinti egészségügyi státusának megszerzése érdekében meghozandó intézkedések.

Az e mellékletben meghatározott követelmények a jegyzékbe foglalt betegségek közül a következőkre vonatkoznak:

1.	Pisztrángok vírusos vérfertőzése (VHS)	1. rész
2.	Pisztrángfélék fertőző vérképzőszervi elhalása (IHN)	1. rész
3.	Koi-herpeszvírusbetegség (KHV)	2. rész
4.	Lazacok fertőző vérszegénysége (ISA)	3. rész
5.	<i>Marteilia refringens</i> -fertőzés	4. rész
6.	<i>Bonamia ostreae</i> -fertőzés	5. rész
7.	White spot-betegség (WSD)	6. rész

II. Fogalommeghatározások

Az I. és a II. melléklet alkalmazásában a következő fogalommeghatározásokat kell alkalmazni:

- a) „kontinentális területi egység”: egy vagy több tagállam kontinentális részén elhelyezkedő, közös biológiai biztonsági rendszerbe tartozó és egy adott betegség tekintetében megkülönböztetett egészségügyi állapotú víziállat-populációnak otthont adó egy vagy több gazdaság;
- b) „kontinentális gazdaság”: egy tagállam területének kontinentális részén elhelyezkedő, tenyésztett víziállatokat tartó gazdaság;
- c) „kontinentális övezet”: egy vagy több tagállam kontinentális részén található, pontosan meghatározott földrajzi terület, amely olyan homogén vízellátó rendszerrel rendelkezik, amely a vízgyűjtő területnek a forrás(ok)tól addig a természetes vagy mesterséges akadályig húzódó részeiből áll, amely megakadályozza a vízgyűjtő terület alacsonyabb szakaszaiból a víziállatok felfelé irányuló migrációját, vagy amely az egész vízgyűjtő területet magában foglalja annak forrásától (forrásaitól) a torkolatáig, vagy amely egynél több vízgyűjtő területből áll, beleértve – a torkolaton keresztül a vízgyűjtő területek közötti járványügyi kapcsolat miatt – azok torkolatait;

- d) „hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaság”: olyan víziállattartó gazdaság, amelyben az illetékes hatóság a 2006/88/EK irányelv 28. cikke a) pontjának, 29. cikkének és 57. cikke b) pontjának megfelelően a jegyzékbe foglalt betegségek közül egyet vagy többet megerősített.
- e) „kontaktgazdaság”: olyan víziállattartó gazdaság, amely esetében bármely módon bizonyítható vagy erősen feltételezhető, hogy megfertőződtek egy hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaságból származó fertőző anyaggal.

1. RÉSZ

A PISZTRÁNGOK VÍRUSOS VÉRFEJTŐZÉSE (VHS) ÉS A PISZTRÁNGFÉLÉK FERTŐZŐ VÉRKÉPZŐSZERVI ELHALÁSA (IHN) ESETÉN ALKALMAZANDÓ FELÜGYELETI ÉS VÉDEKEZÉSI MÓDSZEREK

- I. **A VHS és az IHN tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését és fenntartását célzó felügyeleti és felszámolási programokra vonatkozó követelmények, valamint az említett jegyzékbe foglalt betegségekre irányuló zárlati intézkedések**
- I.1. A VHS-re és az IHN-re irányuló egészségügyi ellenőrzésekre és mintavételre vonatkozó általános követelmények:
- a) az egészségügyi ellenőrzéseket és adott esetben a mintavételt az évnek abban az időszakában kell elvégezni, amikor a vízhőmérséklet 14 °C alatti, vagy akkor, amikor a vízhőmérséklet valószínűsíthetően eléri a legalacsonyabb éves értéket;
- b) amennyiben a 2006/88/EK irányelv V. melléklete I. része 2. pontja második bekezdésének megfelelően a vadon élő populációkban célzott felügyelet szükséges, a mintavételi pontok számát és földrajzi eloszlását úgy kell meghatározni, hogy az megfelelő mértékben lefedje a tagállam, övezet vagy területi egység területét. A mintavételi pontoknak reprezentatívnak kell lenniük azon különböző ökoszisztémák tekintetében, amelyekben a fogékony fajok vadon élő populációi találhatóak;
- c) amennyiben a gazdaságokban vagy a vadon élő populációkban évente egynél több alkalommal kell egészségügyi ellenőrzést vagy mintavételt végezni, az egészségügyi ellenőrzések között és a mintagyűjtések között legalább négy hónapnak kell eltelnie, és azokat egymástól időben a lehető legtávolabb, az a) pontban előírt hőmérsékleti követelmények figyelembevételével kell elvégezni;
- d) minden termelési egységet (például tavat, tartályt, hálós ketrecet) egészségügyi ellenőrzéseknek kell alávetni az elhullott, legyengült vagy rendellenesen viselkedő halak jelenlétének megállapítása céljából. Különös figyelmet kell fordítani a vízkifolyás környékére, ahol a vízáramlás miatt a legyengült halak hajlamosak összegyűlni;
- e) A mintaként begyűjtendő, fogékony fajokhoz tartozó halak kiválasztása a következőképpen történik:
- i. ha szivárványos pisztráng is előfordul, akkor csak e faj egyedeit kell kiválogatni a mintavételhez, kivéve, ha egyéb fogékony fajok is előfordulnak, melyek a VHS vagy az IHN tipikus tüneteit mutatják; ha szivárványos pisztráng nem fordul elő, a mintának valamennyi egyéb előforduló fogékony fajra nézve reprezentatívnak kell lennie;
- ii. ha legyengült, rendellenesen viselkedő vagy frissen elhullott, de bomlásnak még nem indult halak is előfordulnak, akkor azokat kell kiválasztani; Ha egynél több vízforrást használnak halak tenyésztésére, minden vízforrás esetében mintát kell venni az ott található halakból;
- iii. a kiválasztott halak között lenniük kell oly módon begyűjtött halaknak, hogy azok a mintában arányosan képviselik a gazdaság minden részét és minden év állományát.
- I.2. A VHS és az IHN tekintetében betegségtől mentes státus (I. kategória) megszerzésére vonatkozó külön követelmények
- I.2.1. Felügyeleti programok:
- a) az a tagállam, övezet vagy területi egység, amely a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében a 2006/88/EK irányelv III. mellékletének B. részében említett III. kategória szerinti egészségügyi státussal rendelkezik, az említett, jegyzékbe foglalt betegségek tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaság eleget tesz az irányelv V. mellékletében megállapított követelményeknek, és amennyiben mindezekben a gazdaságokban és – az irányelv V. melléklete I. része 2. pontjának második bekezdésében előírt esetekben – a vadon élő populációk mintavételi pontjain végrehajtották az alábbi felügyeleti programok egyikét:

i. „A” modell – kétéves felügyeleti program:

A gazdaságokban vagy mintavételi pontokon a II. szakaszban található 1.A. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább két egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzéseket végeztek és mintákat vettek.

E kétéves időszakban valamennyi minta esetében a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatnak negatív eredményt kell adnia a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében, továbbá a VHS, az IHN vagy mindkettő gyanúját a II.3. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően ki kell zárni;

ii. „B” modell – csökkentett mintanagyságú négyéves felügyeleti program:

A gazdaságokban vagy mintavételi pontokon a II. szakaszban található 1.B. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább négy egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzéseket végeztek és mintákat vettek.

E négyéves időszakban valamennyi minta esetében a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatnak negatív eredményt kell adnia a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében, továbbá a VHS, az IHN vagy mindkettő gyanúját a II.3. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően ki kell zárni;

b) ha az a) pontban említett felügyeleti program végrehajtása során a programban részt vevő valamely gazdaságban megerősítést nyer a VHS-fertőzés, az IHN-fertőzés vagy mindkettő, és így a gazdaság II. kategória szerinti egészségügyi státusát visszavonják, az adott gazdaság azonnal visszaszerezheti a II. kategória szerinti egészségügyi státusát, és a betegségtől mentes státus megszerzése érdekében folytathatja a felügyeleti program végrehajtását az I.2.2. pontban meghatározott felszámolási program végrehajtása nélkül, amennyiben eleget tesz az alábbi feltételeknek:

- i. olyan kontinentális gazdaság, amelynek egészségügyi állapota – a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 3. pontjának megfelelően – a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében független a környező természetes vizekben élő víziállat-populációk egészségügyi állapotától;
- ii. a gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették; a pihentetési időszak hossza legalább hat hét;
- iii. olyan gazdaság, amelyben a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetektől vagy területi egységekből származó halakkal végeztek állomány-pótlást.

I.2.2. Felszámolási programok

I.2.2.1. Általános követelmények

A VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegségek tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban az a)–e) pontnak megfelelő felszámolási programot hajtottak végre:

a) Eredményesen alkalmazásra kerültek a 2006/88/EK irányelv V. mellékletének 4. szakaszában megállapított járványvédelmi minimumintézkedések, továbbá a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkét, jegyzékbe foglalt betegséggel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaság(ok) közelében védelmi körzetet és megfigyelési körzetet magában foglaló, az irányelv 32. cikkének b) pontjában említett elszigetelési területet hoztak létre.

Az elszigetelési területet eseti alapon kell meghatározni, a jegyzékbe foglalt betegség tenyésztett és vadon élő halakra való áttérjedésének kockázatát befolyásoló tényezők figyelembevételével, mint például: a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel fertőzött, elhullott halak száma, aránya és eloszlása; a szomszédos gazdaságok egymástól való távolsága és sűrűsége; a vágóhidakhoz való közelség; a kontaktgazdaságok; a gazdaságokban előforduló fajok; az érintett és az azokkal szomszédos gazdaságokban alkalmazott tenyésztési gyakorlatok; a hidrodinamikai feltételek és egyéb, járványügyi jelentőségű azonosított tényezők.

A védelmi és a megfigyelési körzetek létrehozásánál az alábbi minimumkövetelmények alkalmazandók az említett körzetek földrajzi határainak megállapítása tekintetében:

- i. a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkét, jegyzékbe foglalt betegséggel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaság közvetlen közelében védelmi körzetet kell létrehozni, amely a következőknek felel meg:
 1. part menti területeken: legalább az árapályövezet szélességének megfelelő vagy legalább 5 km sugarú kör területe (a nagyobb érték a mérvadó), amelynek közepe a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaság, vagy egy ennek megfelelő, a vonatkozó hidrodinamikai vagy járványügyi adatoknak megfelelően meghatározott terület;
 2. belvízi területeken: a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaság teljes vízgyűjtő területe; az illetékes hatóság a körzet kiterjedését a vízgyűjtő terület egyes részeire vagy a gazdaság területére korlátozhatja, amennyiben ez nem veszélyezteti a VHS, az IHN vagy mindkettő terjedésének megelőzését;
 - ii. az illetékes hatóság a védelmi körzet területén kívül megfigyelési körzetet hoz létre, amely a következőknek felel meg:
 1. part menti területeken: a védelmi körzetet körülvevő, egymást átfedő árapályövezetekből álló terület; vagy a védelmi körzetet körülvevő, a védelmi körzet középpontjától számított 10 km sugarú kör területe; vagy egy ennek megfelelő, a vonatkozó hidrodinamikai vagy járványügyi adatoknak megfelelően meghatározott terület;
 2. belvízi területeken: a létrehozott védelmi körzeten kívül eső kiterjesztett terület;
- b) A védelmi körzeten belül a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban, melyet nem nyilvánítottak hatóságilag fertőzöttnek a VHS, IHN vagy mindkettő tekintetében, legalább a következőkre kiterjedő hatósági vizsgálatot kell végezni:
- i. Vizsgálat céljából 10 halból álló minta vétele, amennyiben VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel való fertőzésre utaló klinikai vagy kóronctani elváltozások figyelhetők meg, vagy legalább 30 halból álló minta vétele, amennyiben klinikai vagy kóronctani elváltozások nem figyelhetők meg;
 - ii. egy alkalommal végzett egészségügyi ellenőrzés: azokban a gazdaságokban, amelyekben az i. alpontban említett vizsgálatok negatív eredményt adtak, a védelmi körzet 1.2.2.1. c) pont szerinti feloldásáig továbbra is havonta egyszer egészségügyi ellenőrzést kell végezni abban az időszakban, amikor a vízhőmérséklet 14 °C alatt van, kivéve, ha a halastavakat vagy hálós ketreceket jég borítja;
- c) A VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot ki kell üríteni, ki kell tisztítani, fertőtleníteni és pihentetni kell. A pihentetési időszak legalább hat hétig tart. Az ugyanazon a védelmi körzeten belüli, hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaság kiürítését követően legalább háromhetes párhuzamos pihentetési időszakot kell alkalmazni. Ez a bekezdés a felszámolási program végrehajtása során hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított új gazdaságokra is alkalmazandó.
- A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaságok pihentetése során a védelmi körzeteket megfigyelési körzetekké kell alakítani.
- Az illetékes hatóság elrendelheti a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található más gazdaságok kiürítését, tisztítását, fertőtlenítését és pihentetését. E gazdaságok esetében a pihentetési időszak hosszát eseti kockázatértékelést követően az illetékes hatóság állapítja meg;
- d) A VHS-sel, IHN-nel vagy e két jegyzékbe foglalt betegséggel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban és a c) pontban említett, létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található, valamennyi egyéb pihentetett gazdaságban a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében betegségtől mentes státusú (I. kategória szerinti) tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó halakkal kell állománypótlást végezni.

Állománypótlásra csak akkor kerülhet sor, ha a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot az I.2.2.1. c) pontnak megfelelően kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették;

- e) A felszámolási program hatálya alá tartozó tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságra és a vadon élő populációkban végzendő megfigyelés kötelezettsége esetén az I.1. pontnak megfelelően kiválasztott mintavételi pontokra vonatkozóan a későbbiekben az I.2.1. pontban foglalt felügyeleti rendszert kell alkalmazni.

- I.2.2.2. A korábban IHN-től, VHS-től vagy mindkettőtől mentesnek nyilvánított, egyetlen gazdaságot magukban foglaló kontinentális területi egységek betegségtől mentes státusának visszaszerzésére vonatkozó követelmények

Az a korábban VHS-től, IHN-től vagy mindkét jegyzékbe foglalt betegségtől mentesnek nyilvánított, egyetlen gazdaságot magában foglaló kontinentális területi egység, amelynek egészségügyi állapota az említett jegyzékbe foglalt betegségek tekintetében – a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 3. pontjának megfelelően – független a környező természetes vizek egészségügyi állapotától, és amelynek az I. kategória szerinti egészségügyi státusát az irányelv 53. cikkének (3) bekezdésének megfelelően visszavonták, közvetlenül azután visszaszerezheti az I. kategória szerinti egészségügyi státusát, miután az illetékes hatóság megerősítette az alábbi feltételek teljesülését:

- a) a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették; a pihentetési időszak legalább hat hét;
- b) a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaságban a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó halakkal végeztek állománypótlást.

- I.3. A VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében betegségtől mentes (I. kategória szerinti) státus fenntartására vonatkozó külön követelmények

Amennyiben az I. kategória szerinti egészségügyi státusnak a 2006/88/EK irányelv 52. cikke rendelkezései szerinti fenntartásához célzott felügyelet szükséges, az érintett tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az említett irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban egészségügyi ellenőrzést kell végezni, és a halakból az e rész II. szakaszában foglalt I.C. táblázatnak megfelelően a gazdaságok VHS-sel, IHN-nel vagy mindkét, jegyzékbe foglalt betegséggel való fertőződés tekintetében fennálló kockázati szintjének figyelembevételével mintát kell venni.

A kontinentális területeken található és a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 2. pontjának megfelelően a környező természetes vizek víziállat-populációinak egészségügyi állapotától függő, a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú területi egységekre vonatkozó egészségügyi ellenőrzés gyakoriságának meghatározásakor a VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel való fertőződés kockázata magasnak tekintendő.

A betegségtől mentes státus csak addig tartható fenn, amíg a II.2. pontban foglalt diagnosztikai módszerekkel vizsgált valamennyi minta negatív eredményt ad a VHS, az IHN vagy mindkét, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében, és amíg a II.3. pontban foglalt diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárják a VHS, az IHN vagy mindkettő gyanúját.

- I.4. A 2006/88/EK irányelv 39. cikkében előírt zárlati intézkedések feloldására, azaz az V. kategória szerinti egészségügyi státusról a III. kategória szerinti egészségügyi státusra való áttérésre vonatkozó követelmények

A VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státussal rendelkező tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegségek tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben:

- a) az I.2.2.1. szakasz a), b) és c) pontjában foglalt követelmények teljesülnek. Abban az esetben, ha a pihentetés technikailag nem lehetséges, az érintett gazdaságokra alternatív intézkedést kell alkalmazni, amely csaknem hasonló garanciát biztosít az IHN-nek, a VHS-nek vagy mindkettőnek a gazdaság környezetében való felszámolására;
- b) a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban, valamint a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belüli pihentetett, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezett valamennyi egyéb gazdaságban a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében I., II. vagy III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó halakkal végeztek állománypótlást;

- c) az állománypótlásra csak azt követően került sor, hogy a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezték.

II. Diagnosztikai és mintavételi módszerek

II.1. Mintázandó szervek:

A vizsgálandó szövetminta a lép, az elővese, valamint a szív vagy az agyvelő. A mintavételkor az anyaállománytól származó petefészek-folyadék vagy ondófoladék is megvizsgálható.

Zsenge ivadékok és a 4 cm-nél rövidebb egész halak esetében a végbélnyílás mögötti rész eltávolítása után steril ollóval vagy szikével feldarabolhatók. Ha a minta 4 és 6 cm közötti testhosszúságú egész halakból áll, akkor a zsigereket kell összegyűjteni, a vesét is beleértve.

Legfeljebb 10 halból származó szervdarabok vonhatók össze („poolozhatók”).

II.2. A VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére és fenntartására szolgáló diagnosztikai módszerek

A II. melléklet 1. részének I. pontjában foglalt jóváhagyott diagnosztikai módszereknek és eljárásoknak megfelelő, a VHS, az IHN vagy mindkettő tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére és fenntartására szolgáló diagnosztikai módszer:

- a) sejtenyészetekben végzett vírusizolálás, azt követően pedig enzimhez kötött immunszorbens próba (ELISA), indirekt fluoreszcens ellenanyag-vizsgálat (IFAT), vírusneutralizációs próba vagy valós idejű fordított transzkripció polimeráz láncreakció (RT-qPCR) útján történő vírusazonosítás; vagy
- b) RT-qPCR.

II.3. A VHS, az IHN vagy mindkettő jelenlétének kizárására vagy megerősítésére szolgáló mintavételi és diagnosztikai módszerek

Ha a VHS, az IHN vagy mindkettő gyanúját a 2006/88/EK irányelv 28. cikkének megfelelően meg kell erősíteni vagy ki kell zárni, az alábbi ellenőrzési, mintavételi és vizsgálati eljárások követendők:

- a) a gyanús gazdaságban legalább egy alkalommal egészségügyi ellenőrzést és egy alkalommal 10 halból álló minta vételét kell elvégezni, amennyiben VHS-sel, IHN-nel vagy mindkettővel való fertőzésre utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások figyelhetők meg, vagy legalább 30 halból álló minta vételét kell elvégezni, amennyiben nem figyelhetők meg klinikai vagy kórbonctani elváltozások. A mintákat az i. és ii. alpontban foglalt egy vagy több diagnosztikai módszerrel kell megvizsgálni a II. melléklet 1. részének II. szakaszában foglalt részletes diagnosztikai módszereknek és eljárásoknak megfelelően:
 - i. sejtenyészetekben végzett hagyományos vírusizolálás azt követő immunkémiai vagy molekuláris vírusazonosítással;
 - ii. RT-qPCR útján történő víruskimutatás;
 - iii. hasonló, bizonyított hatékonyságú egyéb diagnosztikai módszerek, például indirekt fluoreszcens ellenanyag-vizsgálat (IFAT), enzimhez kötött immunszorbens próba (ELISA), RT-PCR és immunhisztokémiai (IHC-) vizsgálat;
- b) a VHS jelenléte megerősítettnek tekintendő, ha e diagnosztikai módszerek közül egy vagy több pozitív a VHSV tekintetében. Az IHN jelenléte megerősítettnek tekintendő, ha e diagnosztikai módszerek közül egy vagy több pozitív az IHNV tekintetében. A VHS vagy IHN első esetének a korábban nem fertőzött tagállamokban, övezetekben vagy területi egységekben történő megerősítésére sejtenyészetekben végzett hagyományos vírusizoláláson vagy RT-qPCR-en alapuló vizsgálatot kell végezni;
- c) a VHSV vagy az IHNV előfordulásának gyanúja kizárható, ha a sejtenyésztes vagy az RT-qPCR-tesztek nem tárnak fel a VHSV, az IHNV vagy mindkettő jelenlétére utaló további bizonyítékot.

1.A. táblázat

Az I.2.1. szakasz a) pontjának i. alpontjában említett, a VHS, illetve az IHN tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző kétéves ellenőrzési időszakokra vonatkozó, övezetek és területi egységek felügyeleti rendszere

Gazdaság típusa	Egészségügyi ellenőrzések évenkénti (kétévenkénti) száma	Mintavételek évenkénti (kétévenkénti) száma	A mintában található halak száma ⁽¹⁾	
			Növendék halak száma	Az anyaállomány egyedeinek száma ⁽²⁾
a) Anyaállománnyal rendelkező gazdaságok	2	2	50 (első ellenőrzés) 75 (második ellenőrzés)	30 (első vagy második ellenőrzés) 0 (első vagy második ellenőrzés)
b) Csak anyaállománnyal rendelkező gazdaságok	2	1	0	75 (első vagy második ellenőrzés)
c) Anyaállománnyal nem rendelkező gazdaságok	2	2	75 ⁽³⁾ (első és második ellenőrzés)	0

A halak összevont mintánkénti maximális száma: 10

⁽¹⁾ A minták legkorábban a halak édesvízből sós vízbe történő áthelyezése után három héttel gyűjthetők.

⁽²⁾ Az anyaállományból származó petefészek- vagy ondófolvadékokat az ivarérettség elérésekor, a lefejjessel egy időben kell gyűjteni.

⁽³⁾ Annyi halból kell mintát venni, amennyi a vizsgálati elrendezés szerinti 5 %-os prevalencia mellett 95 %-os megbízhatósággal biztosítja a VHSV vagy az IHNV kimutatását.

1.B. táblázat

Az I.2.1. szakasz a) pontjának ii. alpontjában említett, a VHS, illetve az IHN tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző négyéves időszakokra vonatkozó, csökkentett mintanagyságú felügyeleti rendszer

Gazdaság típusa	Az egészségügyi ellenőrzések évenkénti száma	A mintavételek évenkénti száma	A mintában található halak száma ⁽¹⁾	
			Növendék halak száma	Az anyaállomány egyedeinek száma ⁽²⁾

A felügyeleti időszak első két éve

a) Anyaállománnyal rendelkező gazdaságok	2	1	0 (első ellenőrzés) 30 (második ellenőrzés)	0 (első ellenőrzés) 0 (második ellenőrzés)
b) Csak anyaállománnyal rendelkező gazdaságok	2	1	0	30 (első vagy második ellenőrzés)
c) Anyaállománnyal nem rendelkező gazdaságok	2	1	30 ⁽³⁾ (első vagy második ellenőrzés)	0

A felügyeleti időszak utolsó két éve

a) Anyaállománnyal rendelkező gazdaságok	2	2	30 (első ellenőrzés) 0 (második ellenőrzés)	0 (első ellenőrzés) 30 (második ellenőrzés)
--	---	---	--	--

Gazdaság típusa	Az egészségügyi ellenőrzések évenkénti száma	A mintavételek évenkénti száma	A mintában található halak száma ⁽¹⁾	
			Növendék halak száma	Az anyaállomány egyedeinek száma ⁽²⁾
b) Csak anyaállománnyal rendelkező gazdaságok	2	2		30 (első és második ellenőrzés)
c) Anyaállománnyal nem rendelkező gazdaságok	2	2	30 ⁽³⁾ (első és második ellenőrzés)	

A halak összevont mintánkénti maximális száma: 10

⁽¹⁾ A minták legkorábban a halak édesvízből sós vízbe történő áthelyezése után három héttel gyűjthetők.

⁽²⁾ Az anyaállományból származó petefészek- vagy ondófolyadékot az ivarérettség elérésekor, a lefejjéssel egy időben kell gyűjteni.

⁽³⁾ Annyi halból kell mintát venni, amennyi a vizsgálati elrendezés szerinti 10 %-os prevalencia mellett 95 %-os megbízhatósággal biztosítja a VHSV vagy az IHNV kimutatását.

1.C. táblázat

Az I.3. pontban említett, a VHS, illetve az IHN tekintetében betegségtől mentes státus fenntartására szolgáló övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszere

Kockázati szint	Egészségügyi ellenőrzések száma	A mintában található halak száma ⁽³⁾
magas	évente kétszer	30 ⁽¹⁾ ⁽²⁾
közepes	évente egyszer	30 ⁽¹⁾
alacsony	kétévente egyszer	30 ⁽¹⁾

A halak összevont mintánkénti maximális száma: 10

⁽¹⁾ A minták legkorábban a halak édesvízből sós vízbe történő áthelyezése után három héttel gyűjthetők.

⁽²⁾ Annyi halból kell mintát venni, amennyi a vizsgálati elrendezés szerinti 10 %-os prevalencia mellett 95 %-os megbízhatósággal biztosítja a VHSV vagy az IHNV kimutatását.

⁽³⁾ Minden egészségügyi ellenőrzés esetében venni kell legalább egy mintát.

2. RÉSZ

A KOI-HERPESZVÍRUSBETEGSÉG (KHVD) ESETÉN ALKALMAZANDÓ FELÜGYELETI ÉS VÉDEKEZÉSI MÓDSZEREK

I. **A koi-herpeszvírusbetegség (KHVD) tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését és fenntartását, valamint a koiherpeszvírussal történő fertőzés (KHV-fertőzés) megfékezését célzó felügyeleti és felszámolási programokra vonatkozó követelmények**

I.1. Általános követelmények

Amennyiben a 2006/88/EK irányelv V. melléklete I. része 2. pontja második bekezdésének megfelelően a vadon élő populációkban célzott felügyelet szükséges, a mintavételi pontok számát és földrajzi eloszlását úgy kell meghatározni, hogy az megfelelő mértékben lefedje a tagállam, övezet vagy területi egység területét. A mintavételi pontoknak a fogékony, vadon élő populációk előfordulási helye szerinti különböző – azaz a folyami és tavi – ökoszisztémák szempontjából is reprezentatívnak kell lenniük.

A célzott felügyeletnek a fogékony fajok tartó gazdaságok rendszeres ellenőrzésére kell épülnie. A gazdaságokat a betegség kialakulását lehetővé tevő (15 °C feletti) vízhőmérséklet elérésekor, de legkorábban az említett hőmérsékleti érték elérésének napjától számított két hét elteltével kell ellenőrizni. A gazdaságban található beteg vagy rendellenesen viselkedő halakból mintát kell venni, és azt meg kell vizsgálni.

Amennyiben lehetséges, a vírusnak kedvező hőmérsékleti tartományban hosszabb ideig – azaz 15–26 °C-on két-három hétig – tartott halakból kell mintát venni. Az alábbi megközelítés azonban szintén elfogadható:

- a) alpopuláció gyűjtése a telelő tavakból a termelő/tenyésztavakba történő áttelepítéskor, és a halak ugyanazon termelő/tenyésztavakban tartása a hőmérsékletre vonatkozó minimumkövetelmények teljesüléséig, vagy
- b) a lehalászáskor vagy a halak szokásos gazdálkodási gyakorlatok keretében végzett egyéb kezelése során történő mintagyűjtés. Amennyiben lehetséges, a KHV jobb kimutathatósága érdekében a mintákat az említett gazdálkodási gyakorlatokat követő 24–72 órán belül kell gyűjteni.

Amennyiben a gazdaságokban vagy a vadon élő populációkban évente egynél több alkalommal kell egészségügyi ellenőrzést vagy mintavételt végezni, az egészségügyi ellenőrzések, illetve a mintagyűjtések között a lehető leghosszabb időnek kell eltelnie abban az évszakban, amelyben a vízhőmérséklet valószínűsíthetően eléri az éves maximumát, de nem haladja meg a 28 °C-ot.

Minden termelési egységet (például tavat és tartályt) egészségügyi ellenőrzésnek kell alávetni az elhullott, legyengült vagy rendellenesen viselkedő halak jelenlétének megállapítása céljából.

A *Cyprinus carpio* fajt és hibridjeit (például *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*) be kell gyűjteni, ha azok előfordulnak a gazdaságban.

A mintaként begyűjtendő halak kiválasztása a következőképpen történik:

- i. ha legyengült, rendellenesen viselkedő vagy frissen elhullott (bomlásnak még nem indult) halak is előfordulnak, akkor azokat kell kiválasztani;
- ii. ha egynél több vízforrást használnak halak tenyésztésére, minden vízforrás esetében mintát kell venni az ott található halakból;
- iii. a kiválasztott halak között lenniük kell oly módon begyűjtött halaknak, hogy azok a mintában arányosan képviseljék a gazdaság minden részét és minden korosztály állományát.

I.2. A KHVD tekintetében betegségtől mentes státus (I. kategória) megszerzésére vonatkozó külön követelmények

I.2.1. Felügyeleti programok

- a) A KHVD tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, ha az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajok tartó valamennyi gazdaság eleget tesz a betegségtől mentes státusra vonatkozóan az irányelv V. mellékletében megállapított követelményeknek, és amennyiben mindezekben a gazdaságokban és – az említett melléklet I. része 2. pontjának második bekezdésében előírt esetekben – a vadon élő populációk mintavételi pontjain végrehajtották az alábbi felügyeleti programok egyikét:

- i. „A” modell – kétéves felügyeleti program:

A gazdaságokban vagy mintavételi pontokon a III. szakaszban található 2.A. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább két egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzéseket végeztek és mintákat vettek.

E kétéves időszakban valamennyi minta esetében a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatnak negatív eredményt kell adnia a KHV tekintetében, továbbá a KHVD gyanúját a III.2. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően ki kell zárni;

ii. „B” modell – csökkentett mintanagyságú négyéves felügyeleti program:

A gazdaságokban vagy mintavételi pontokon a III. szakaszban található 2.B. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább négy egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzéseket végeztek és mintákat vettek.

E négyéves időszakban valamennyi minta esetében a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatnak negatív eredményt kell adnia a KHV tekintetében, továbbá a KHVD gyanúját a III.2. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően ki kell zárni;

b) Ha az a) pontban említett négyéves felügyeleti program végrehajtása során a programban részt vevő valamely gazdaságban megerősítést nyer a KHV-fertőzés, és így a gazdaság II. kategória szerinti egészségügyi státusát visszavonják, az adott gazdaság azonnal visszaszerezheti a II. kategória szerinti egészségügyi státusát és a betegségtől mentes státus megszerzése érdekében folytathatja a felügyeleti program végrehajtását az I.2.2. pontban ismertetett felszámolási program végrehajtása nélkül, amennyiben eleget tesz az alábbi feltételeknek:

- i. olyan kontinentális gazdaság, amelynek egészségügyi állapota – a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 3. pontjának megfelelően – a KHVD tekintetében független a környező természetes vizekben élő víziállat-populációk egészségügyi állapotától;
- ii. a gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették; a pihentetési időszak hossza legalább hat hét;
- iii. olyan gazdaság, amelyben a KHVD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó halakkal végeztek állománypótlást.

I.2.2. Felszámolási programok

I.2.2.1. Általános követelmények

A KHVD tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban végrehajtották legalább az alábbi felszámolási programot:

- a) Eredményesen alkalmazásra kerültek a 2006/88/EK irányelv V. mellékletének 4. szakaszában megállapított járványvédelmi minimumintézkedések, továbbá a hatóságilag KHV-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság(ok) közelében védelmi körzetet és megfigyelési körzetet magában foglaló, az irányelv 32. cikkének b) pontjában említett elszigetelési területet hoztak létre.

Az elszigetelési területet eseti alapon kell meghatározni, a KHVD tenyésztett és vadon élő halakra való áterjedésének kockázatát befolyásoló tényezők figyelembevételével, mint például: a KHV-fertőzött gazdaságban tartott, elhullott halak száma, aránya és eloszlása; a szomszédos gazdaságok egymástól való távolsága és sűrűsége; a vágóhidakhoz való közelség; a kontaktgazdaságok; a gazdaságokban előforduló fajok; az érintett és a szomszédos gazdaságokban alkalmazott tenyésztési gyakorlatok; a hidrodinamikai feltételek és egyéb, járványügyi jelentőségű azonosított tényezők.

A védelmi és a megfigyelési körzetek létrehozásánál az alábbi minimumkövetelmények alkalmazandók az említett körzetek földrajzi határainak megállapítása tekintetében:

- i. a hatóságilag KHV-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság közvetlen közelében védelmi körzetet kell létrehozni, amely megfelel a hatóságilag KHV-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság teljes vízgyűjtő területének; az illetékes hatóság a körzet kiterjedését a vízgyűjtő terület egyes részeire korlátozhatja, amennyiben ez nem veszélyezteti a KHVD terjedésének megelőzését;
- ii. a védelmi körzet területén kívül megfigyelési körzetet kell létrehozni, amely a létrehozott védelmi körzeten kívülre terjedő területnek felel meg;

- b) A védelmi körzeten belül a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban, melyet nem nyilvánítottak hatóságilag KHV-fertőzöttnek, legalább a következőkre kiterjedő hatósági vizsgálatot kell végezni:
- i. 10 halból álló minta vétele vizsgálat céljából, amennyiben KHVD-re utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások figyelhetők meg, vagy legalább 30 halból álló minta vétele vizsgálat céljából, amennyiben klinikai vagy kórbonctani elváltozások nem figyelhetők meg;
 - ii. egy alkalommal végzett egészségügyi ellenőrzés: azokban a gazdaságokban, amelyekben a III.2. pontban említett vizsgálatok negatív eredményt adtak, a védelmi körzet I.2.2.1. c) pont szerinti feloldásáig továbbra is havonta egyszer egészségügyi ellenőrzést kell végezni abban az évszakban, amikor a vízhőmérséklet valószínűsíthetően eléri a 15 °C feletti értéket.
- c) A hatóságilag KHV-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot ki kell üríteni, ki kell tisztítani, fertőtleníteni és pihentetni kell. A pihentetési időszak hossza legalább hat hét. Az ugyanazon a védelmi körzeten belüli, hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaság kiürítését követően legalább háromhetes párhuzamos pihentetési időszakot kell alkalmazni. Ez a bekezdés a felszámolási program végrehajtása során hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított új gazdaságokra is alkalmazandó.

A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaságok pihentetése során a védelmi körzeteket megfigyelési körzetekké kell alakítani.

Az illetékes hatóság elrendelheti a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található más gazdaságok kiürítését, tisztítását, fertőtlenítését és pihentetését. A pihentetési időszak hosszát eseti kockázaterőtelést követően az illetékes hatóság állapítja meg.

- d) A hatóságilag KHV-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban és a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található, valamennyi egyéb pihentetett gazdaságban a következőképpen kerül sor állománypótlásra:
- i. a KHVD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetkből vagy területi egységekből származó halakkal; vagy
 - ii. a 2020. december 31-ig tartó átmeneti időszakban: jóváhagyott KHVD-felügyeleti programmal rendelkező tagállamokból, övezetkből vagy területi egységekből származó halakkal.

Állománypótlásra csak akkor kerül sor, ha a hatóságilag KHV-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot az I.2.2.1. c) pontnak megfelelően kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették.

- e) A felszámolási program hatálya alá tartozó tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságra és a vadon élő populációkban végzendő megfigyelés kötelezettsége esetén az I.1. pontnak megfelelően kiválasztott mintavételi pontokra vonatkozóan a későbbiekben az I.2.1. pontban foglalt felügyeleti programot kell alkalmazni.

I.2.2.2. A korábban KHVD-mentesnek nyilvánított egyetlen gazdaságot magukban foglaló kontinentális területi egységek betegségétől mentes státusának visszaszerzésére vonatkozó követelmények

Az a KHVD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú, egyetlen gazdaságot magában foglaló kontinentális területi egység, amelynek egészségügyi állapota a KHVD tekintetében – a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 3. pontjának megfelelően – független a környező természetes vizektől, és amelynek a KHVD tekintetében az I. kategória szerinti egészségügyi státusát az irányelv 53. cikkének (3) bekezdésével összhangban visszavonták, közvetlenül azután visszaszerezheti az I. kategória szerinti egészségügyi státust, miután az illetékes hatóság megerősítette, hogy elegendő tesz az alábbi feltételeknek:

- a) a gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették; a pihentetési időszak hossza legalább hat hét;
- b) a gazdaságban a KHVD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetkből vagy területi egységekből vagy jóváhagyott KHVD-felügyeleti programmal rendelkező (II. kategória szerinti egészségügyi státusú) területi egységekből származó halakkal végeztek állománypótlást.

I.3. A KHVD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státus fenntartására vonatkozó külön követelmények

Amennyiben az I. kategória szerinti egészségügyi státusnak a 2006/88/EK tanácsi irányelv 52. cikkében foglalt rendelkezések szerinti fenntartásához célzott felügyelet szükséges, az érintett tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az említett irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban egészségügyi ellenőrzést kell végezni, és ott az e rész II. szakaszában foglalt 2.B. táblázatnak megfelelően a gazdaságok KHV-fertőződés tekintetében fennálló kockázati szintjének figyelembevételével mintát kell venni.

A kontinentális területeken található és a KHVD tekintetében a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 2. pontjának megfelelően a környező természetes vizeknek az említett, jegyzékbe foglalt betegséggel kapcsolatos egészségügyi állapotától függő egészségügyi állapotú gazdaságo(ka)t magukban foglaló, a KHVD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú területi egységekre vonatkozó egészségügyi ellenőrzés gyakorisága megfelel a 2.C. táblázat szerinti, magas kockázati szintre megállapított számnak.

Azokban a tagállamokban, övezetekben vagy területi egységekben, ahol kevés gazdaság található, és e gazdaságok célzott felügyelete nem biztosít elegendő járványügyi adatot, a betegségtől mentes státus fenntartását célzó felügyeleti rendszereknek ki kell terjedniük az I.1. pontban foglalt követelményeknek megfelelően kiválasztott mintavételi pontokra.

A mintavételi pontokon oly módon kell ellenőrzést és mintavételt végezni, hogy azok 50 %-a évente cserélődjön. A mintavételt a III. szakaszban található 2.C. táblázatnak megfelelően kell elvégezni. A mintákat a II. szakaszban ismertetett módon kell kiválasztani, előkészíteni és megvizsgálni, és a laboratóriumi vizsgálatoknak a KHVD-kórokozó jelenlétét tekintve negatívnak kell lenniük.

A betegségtől mentes státus csak addig tartható fenn, amíg a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel vizsgált valamennyi minta negatív eredményt ad a KHVD tekintetében; a KHVD gyanúját a III.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszereknek megfelelően ki kell zárni.

I.4. A KHVD tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokban, területi egységekben vagy övezetekben a KHVD tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státus megszerzése érdekében a 2006/88/EK irányelv 39. cikkében előírt zárlati intézkedések feloldására vonatkozó külön követelmények

A KHVD tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben:

- a) az I.2.2.1. szakasz a), b) és c) pontjában foglalt követelmények teljesülnek. Abban az esetben, ha a pihentetés technikailag nem lehetséges, az érintett gazdaságokra alternatív intézkedést kell alkalmazni, amely csaknem hasonló garanciát biztosít a KHV-nek a gazdaság környezetében való felszámolására;
- b) a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban, valamint a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belüli pihentetett, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezett valamennyi egyéb gazdaságban a KHVD tekintetében I., II. vagy III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó halakkal végeztek állománypótlást;
- c) állománypótlásra csak akkor került sor, ha a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezték.

II. **A KHVD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére és fenntartására szolgáló, felügyeleti célú diagnosztikai és mintavételi módszerek**

II.1. Minták

A vizsgálandó szövetminták a kopoltyú és a vese egyes részei. Legfeljebb két halból származó szervdarabok vonhatók össze („poolozhatók”).

II.2. A KHVD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére és fenntartására szolgáló, felügyeleti célú diagnosztikai módszerek

A II. melléklet 2. részének II. pontjában foglalt részletes diagnosztikai módszereknek és eljárásoknak megfelelő, a KHVD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére vagy fenntartására szolgáló diagnosztikai módszer a valós idejű PCR (qPCR).

III. A KHVD gyanújának megerősítésére vagy kizárására irányuló hatósági vizsgálatok esetében alkalmazandó diagnosztikai és mintavételi módszerek

III.1. Minták

A vizsgálandó szövetminták a kopoltyú és a vese egyes részei. Legfeljebb két halból származó szervdarabok vonhatók össze („poolozhatók”).

III.2. A KHV-fertőzés jelenlétének kizárására és megerősítésére szolgáló hatósági vizsgálati és diagnosztikai módszerek

Ha a KHVD gyanúját a 2006/88/EK irányelv 28. cikkének megfelelően meg kell erősíteni vagy ki kell zárni, az alábbi ellenőrzési, mintavételi és vizsgálati eljárás követendő:

- a) hatósági vizsgálat, mely legalább egy alkalommal végzett egészségügyi ellenőrzést és egy alkalommal 10 halból álló minta vételét foglalja magában, amennyiben KHV-fertőzésre utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások figyelhetők meg, vagy 30 halból álló minta vételét, amennyiben nem figyelhetők meg klinikai vagy kórbonctani elváltozások. A mintákat a b) pontban foglalt diagnosztikai módszerrel kell megvizsgálni a II. melléklet 2. részének II. pontjában foglalt részletes diagnosztikai módszereknek és eljárásoknak megfelelően;
- b) a KHV-fertőzés jelenléte megerősítettnek tekintendő, ha a KHV kimutatása polimeráz láncreakció (PCR) útján történik;

a KHVD gyanúja kizárható, ha ez a vizsgálat nem tár fel a KHV jelenlétére utaló további bizonyítékot.

2.A. táblázat

Az I.2.1. pontban említett, a KHVD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző kétéves ellenőrzési időszakra vonatkozó, övezetek és területi egységek felügyeleti rendszere

		A klinikai vizsgálatok évenkénti (kétévenkénti) száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti (kétévenkénti) száma	A mintában található halak száma
Gazdaságok/mintavételi helyek	A felügyeleti időszak első két éve	2	2	75 ⁽¹⁾
	A halak összevont mintánkénti maximális száma: 2			

⁽¹⁾ Annyi halból kell mintát venni, amennyi a vizsgálati elrendezés szerinti 5 %-os prevalencia mellett 95 %-os megbízhatósággal biztosítja a KHV kimutatását.

2.B. táblázat

Az I.2.1. pontban említett, a KHVD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző négyéves ellenőrzési időszakra vonatkozó, övezetek és területi egységek felügyeleti rendszere

		A klinikai vizsgálatok évenkénti száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti száma	A mintában található halak száma
Gazdaságok/mintavételi helyek	A felügyeleti időszak első két éve	1	1	30
Gazdaságok/mintavételi helyek	A felügyeleti időszak utolsó két éve	2	2	30
	A halak összevont mintánkénti maximális száma: 2			

2.C. táblázat

Az I.3. pontban említett, a KHVD tekintetében betegségtől mentes státus fenntartására szolgáló, övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszere

Kockázati szint	Egészségügyi ellenőrzések száma	A mintában található halak száma
magas	évente kétszer	30
közepes	évente egyszer	30
alacsony	kétévente egyszer	30

A halak összevont mintánkénti maximális száma: 2

2.D. táblázat

A KHVD tekintetében betegségtől mentes státus fenntartására szolgáló, az I.3. pontban előírt felügyeleti rendszer azokban a tagállamokban, övezetekben vagy területi egységekben, amelyekben kevés gazdaság található, és e gazdaságok célzott felügyelete nem biztosít elegendő járványügyi adatot

	A klinikai vizsgálatok évenkénti száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti száma	A mintában található halak száma
Mintavételi pontok	kétévente egyszer	kétévente egyszer	30

A halak összevont mintánkénti maximális száma: 2

3. RÉSZ

A LAZACOK FERTŐZŐ VÉRSZEGÉNYSÉGE (ISA) ESETÉN ALKALMAZANDÓ FELÜGYELETI ÉS VÉDEKEZÉSI MÓDSZEREK**I. Az ISA tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését és fenntartását, valamint a HPR-deletált ISAV-fertőzések megfékezését célzó felügyeleti és felszámolási programokra vonatkozó követelmények****I.1. Általános követelmények**

Amennyiben a 2006/88/EK irányelv V. melléklete I. része 2. pontja második bekezdésének megfelelően a gazdaságokban évente egynél több alkalommal kell egészségügyi ellenőrzést és mintavételt végezni, az egészségügyi ellenőrzések között, illetve a mintagyűjtések között a lehető legtöbb időnek kell eltelnie.

Amennyiben a 2006/88/EK irányelv V. melléklete I. része 2. pontja második bekezdésének megfelelően a vadon élő populációkban célzott felügyelet szükséges, a mintavételi pontok számát és földrajzi eloszlását úgy kell meghatározni, hogy az megfelelő mértékben lefedje a tagállam, övezet vagy területi egység területét. A mintavételi pontoknak azon különböző ökoszisztémák szempontjából is reprezentatívnak kell lenniük, amelyekben a fogékony, vadon élő populációk találhatóak.

Az egészségügyi ellenőrzéseket minden termelési egységben (például tavakban, tartályokban, hálós ketrecekben) el kell végezni az elhullott, legyengült vagy rendellenesen viselkedő halak jelenlétének megállapítása céljából. Különös figyelmet kell fordítani a vízkifolyás környékére, ahol a vízáramlás miatt a legyengült halak hajlamosak összegyűlni.

A mintaként begyűjtendő halak kiválasztása a következőképpen történik:

- a) Csak elhulláshoz közeli (moribund) állapotban lévő vagy frissen elhullott, de bomlásnak még nem indult halakat kell kiválasztani; elsősorban a vérszegénységet, vérzéseket vagy egyéb, keringési zavarokra utaló klinikai tüneteket mutató halakat kell begyűjteni.
- b) Ha a mintavételi helyen található fogékony fajok között van atlanti lazac, akkor elsősorban atlanti lazacokból kell mintát venni. Ha a halgazdaságban nincs atlanti lazac, más fogékony fajokból kell mintát venni.
- c) Ha egynél több vízforrást használnak halak tenyésztésére, minden vízforrás esetében mintát kell venni az ott található halakból;
- d) A kiválasztott halak között lenniük kell oly módon begyűjtött halaknak, hogy azok a mintában arányosan képviseljék a gazdaság valamennyi termelési egységét (például hálós ketrezeit, tartályait és tavait) és minden év állományát.

I.2. Az ISA tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státus megszerzésére vonatkozó külön követelmények

I.2.1. Felügyeleti programok

Az a tagállam, övezet vagy területi egység, amely az ISA tekintetében a 2006/88/EK irányelv III. melléklete B. részének megfelelő III. kategória szerinti egészségügyi státussal rendelkezik, az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaság eleget tesz az irányelv V. melléklete vonatkozó követelményeinek, és amennyiben mindezekben a gazdaságokban és – az irányelv V. melléklete I. része 2. pontjának második bekezdésében előírt esetekben – az említett pontnak megfelelően kiválasztott vadon élő populációk mintavételi pontjain végrehajtották az alábbi felügyeleti programot:

- a) a gazdaságokban vagy mintavételi pontokon a II. szakaszban található 3.A. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább két egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzéseket végeztek és mintákat vettek;
- b) e kétéves időszakban valamennyi minta esetében a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatnak negatív eredményt kell adnia a HPR-deletált ISAV tekintetében, továbbá az ISA gyanúját a II.3. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően ki kell zárni;
- c) ha a felügyeleti program végrehajtása során a programban részt vevő valamely gazdaságban az ISA megerősítést nyer, és így a gazdaság II. kategória szerinti egészségügyi státusát visszavonják, az I.2.2. pontnak megfelelően felszámolási programot kell végrehajtani.

I.2.2. Felszámolási programok

I.2.2.1. Általános követelmények

Az ISA tekintetében korábban V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban az alábbi a)–e) pontnak megfelelő felszámolási programot hajtottak végre:

- a) Eredményesen alkalmazásra kerültek a 2006/88/EK irányelv V. mellékletének 3. szakaszában megállapított járványvédelmi minimumintézkedések, továbbá a hatóságilag HPR-deletált ISAV-val vagy megerősítetten ISA-val fertőzöttnek nyilvánított gazdaság(ok) közelében védelmi körzetet és megfigyelési körzetet magában foglaló, az irányelv 32. cikkének b) pontjában említett elszigetelési területet hoztak létre.

Az elszigetelési területet eseti alapon kell meghatározni, az ISA tenyésztett vagy vadon élő halakra való áttérjedésének kockázatát befolyásoló tényezők figyelembevételével, mint például: a HPR-deletált ISAV-val vagy megerősítetten ISA-val fertőzött gazdaságban tartott, elhullott halak száma, aránya és eloszlása; a szomszédos gazdaságok egymástól való távolsága és sűrűsége; a vágóhidakhoz való közelség; a kontaktgazdaságok; a gazdaságokban előforduló fajok; az érintett és a szomszédos gazdaságokban alkalmazott tenyésztési gyakorlatok; a hidrodinamikai feltételek és egyéb, járványügyi jelentőségű azonosított tényezők.

A védelmi és a megfigyelési körzetek létrehozásánál az alábbi minimumkövetelmények alkalmazandók az említett körzetek földrajzi határainak megállapítása tekintetében:

i. a hatóságilag ISA-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság közvetlen közelében védelmi körzetet kell létrehozni, amely a következőknek felel meg:

1. part menti területeken: legalább az árapályövezet szélességének megfelelő vagy legalább 5 km sugarú kör területe (a nagyobb érték a mérvadó), amelynek közepe a hatóságilag ISA-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság, vagy egy ennek megfelelő, a vonatkozó hidrodinamikai vagy járványügyi adatoknak megfelelően meghatározott terület;

2. belvízi területeken: a hatóságilag ISA-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság teljes vízgyűjtő területe; az illetékes hatóság a körzet kiterjedését a vízgyűjtő terület egyes részeire korlátozhatja, amennyiben ez nem veszélyezteti az ISA terjedésének megelőzését;

ii. a védelmi körzet területén kívül megfigyelési körzetet kell létrehozni, amely a következőknek felel meg:

1. part menti területeken: a védelmi körzetet körülvevő, egymást átfedő árapályövezetekből álló terület; vagy a védelmi körzetet körülvevő, a védelmi körzet középpontjától számított 10 km sugarú kör területe; vagy egy ennek megfelelő, a vonatkozó hidrodinamikai vagy járványügyi adatoknak megfelelően meghatározott terület; vagy

2. belvízi területeken: a létrehozott védelmi körzeten kívül eső kiterjesztett terület.

b) A védelmi körzeten belül a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban, melyet nem nyilvánítottak hatóságilag ISA-fertőzöttnek, legalább a következőkre kiterjedő hatósági vizsgálatot kell végezni:

i. legalább 10 elhulláshoz közeli (moribund) állapotban lévő halból álló minta vétele vizsgálat céljából, amennyiben ISA-ra utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások figyelhetők meg, vagy legalább 30 hal vizsgálata céljából végzett mintagyűjtés, amennyiben klinikai vagy kórbonctani elváltozások nem figyelhetők meg;

ii. egy alkalommal végzett egészségügyi ellenőrzés: azokban a gazdaságokban, amelyekben az i. alpontban említett vizsgálatok negatív eredményt adtak, a védelmi körzet I.2.2.1. c) pont szerinti feloldásáig továbbra is havonta egyszer kell egészségügyi ellenőrzést végezni;

c) A HPR-deletált ISAV-val vagy megerősítetten ISA-val hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot ki kell üríteni, ki kell tisztítani, fertőtleníteni kell és legalább három hónapig pihentetni kell. A védelmi és a megfigyelési körzetek feloldhatók, ha a védelmi körzeten belüli valamennyi gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették, és azokra legalább hathetes párhuzamos pihentetési időszakot alkalmaztak.

A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaságok pihentetése során a védelmi körzeteket megfigyelési körzetekké kell alakítani.

Az illetékes hatóság elrendelheti a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található más gazdaságok kiürítését, tisztítását, fertőtlenítését és pihentetését. E gazdaságok esetében a pihentetési időszak hosszát eseti kockázatértékelést követően az illetékes hatóság állapítja meg;

d) A HPR-deletált ISAV-val vagy megerősítetten ISA-val hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban, valamint a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található valamennyi egyéb pihentetett gazdaságban az ISA tekintetében I. kategória szerinti tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó halakkal kell állománypótlást végezni.

Állománypótlásra csak akkor kerülhet sor, ha a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot az I.2.2.1. c) pontnak megfelelően kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették;

e) A felszámolási program hatálya alá tartozó tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságra és a vadon élő populációkban végzendő megfigyelés kötelezettsége esetén az I.1. pontnak megfelelően kiválasztott mintavételi pontokra vonatkozóan a későbbiekben az I.2.1. pontban foglalt felügyeleti rendszert kell alkalmazni.

- I.2.2.2. A korábban I. kategória szerinti egészségügyi státusú, egyetlen gazdaságot magukban foglaló kontinentális területi egységek betegségtől mentes státusának visszaszerzésére vonatkozó követelmények

Az ISA tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú, egyetlen gazdaságot magában foglaló azon kontinentális területi egység, amelynek egészségügyi állapota – a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 3. pontjának megfelelően – független a környező természetes vizektől, és amelynek az I. kategória szerinti egészségügyi státusát az irányelv 53. cikke (3) bekezdésének megfelelően visszavonták, közvetlenül azután visszaszerezheti a státust, miután az illetékes hatóság megerősítette az alábbi feltételek teljesülését:

- a) a gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették; a pihentetési időszak hossza legalább hat hét;
- b) olyan gazdaság, amelyben az ISA tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetektől vagy területi egységekből származó halakkal végeztek állománypótlást.

- I.3. Az ISA tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státus fenntartására vonatkozó járványvédelmi minimumintézkedések

Amennyiben az I. kategória szerinti egészségügyi státusnak a 2006/88/EK tanácsi irányelv 52. cikkében foglalt rendelkezések szerinti fenntartásához célzott felügyelet szükséges, az érintett tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban egészségügyi ellenőrzéseket kell végezni és mintákat kell venni az e rész II. szakaszában foglalt 3.B. táblázatnak ⁽¹⁾ megfelelően, a gazdaságok ISA-fertőződés tekintetében fennálló kockázati szintjének figyelembevételével.

A kontinentális területeken található, és az ISA tekintetében a környező, atlanti lazacnak (*Salmo salar*) otthont adó természetes vizek egészségügyi állapotától függő egészségügyi státusú területi egységekre vonatkozóan az ISA tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státus megszerzésére irányuló egészségügyi ellenőrzés gyakoriságának meghatározásakor az ISA-fertőződés kockázatát magasnak kell tekinteni.

Az ISA tekintetében betegségtől mentes státus csak addig tartható fenn, amíg a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel vizsgált valamennyi minta negatív eredményt ad a HPR-deletált ISAV tekintetében, és az ISA gyanúját a II.3. pontban meghatározott diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárták.

- I.4. A korábban V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokban, övezetekben vagy területi egységekben a HPR-deletált ISAV tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státus megszerzésére vonatkozó külön követelmények

Az ISA tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység III. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben:

- a) az I.2.2.1. szakasz a), b) és c) pontjában foglalt követelmények teljesülnek. Abban az esetben, ha a pihentetés technikailag nem lehetséges, a gazdaságokra alternatív intézkedést kell alkalmazni, amely csaknem hasonló garanciát biztosít az ISAV-nak a gazdaság környezetében való felszámolására;
- b) a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban, valamint a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belüli pihentetett, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezett valamennyi egyéb gazdaságban az ISA tekintetében I., II. vagy III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetektől vagy területi egységekből származó halakkal végeztek állománypótlást;
- c) az állománypótlásra csak azt követően került sor, hogy a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezték;
- d) az a), b) és c) pontban említett intézkedések lezárását követő kétéves időszakban nem erősítették meg HPR-deletált ISAV előfordulását, és a szóban forgó időszakban a II.3. pontban foglalt eljárásoknak megfelelően ennek gyanúját kizárták.

⁽¹⁾ Nem vonatkozik azokra a csak szivárványos pisztrángot (*Oncorhynchus mykiss*) vagy csak sebes pisztrángot (*Salmo trutta*) vagy mindkettőt tartó gazdaságokra, amelyek vízellátása kizárólag olyan édesvízi forrásokon alapul, amelyekben nem található atlanti lazac (*Salmo salar*).

II. Diagnosztikai módszerek és hatósági vizsgálatok

II.1. Minták

A vizsgálandó szövetminták a következők:

- a) szövettani vizsgálat: fejtüske, máj, szív, hasnyálmirigy, belek, lép és kopolyú;
- b) immunhisztokémiai vizsgálat: közepüske és szív, beleértve a szívbillentyűket és az aortahagymát (*bulbus arteriosus*) is;
- c) RT-qPCR-elemzés: közepüske és szív;
- d) vírustenyészet: közepüske, szív, máj és lép.

Legfeljebb öt halból származó szervdarabok vonhatók össze („poolozhatók”).

II.2. Az ISA tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére vagy fenntartására szolgáló diagnosztikai módszerek

Az ISA tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére vagy fenntartására szolgáló diagnosztikai módszer az I.2. és I.3. pontnak megfelelően az RT-qPCR, valamint azt követően a pozitív minták szekvenálása a II. melléklet 3. részében foglalt részletes módszereknek és eljárásoknak megfelelően.

Az RT-qPCR pozitív eredménye esetén a 2006/88/EK irányelv 28. cikkében előírt kezdeti járványvédelmi intézkedések végrehajtása előtt további mintákat kell vizsgálni.

A minták vizsgálata a II. melléklet 3. részében foglalt részletes módszereknek és eljárásoknak megfelelően, a következőképpen történik:

- a) a minták RT-qPCR útján történő szűrése, ideértve a HE-gén HPR-deletálás igazolása érdekében végzett szekvenálását is;
valamint
- b) ISAV-val szembeni specifikus ellenanyagokkal végzett szövetpreparátum-vizsgálat (azaz meghatározott metszeteken végzett IHC vagy szövetlenyomatokon végzett IFAT); vagy
- c) az ISAV izolációja és azonosítása a gazdaságban található bármely hal legalább egy mintájából származó sejtenyészetben.

II.3. Az ISA jelenlétének kizárására és megerősítésére szolgáló hatósági vizsgálati és diagnosztikai módszerek

Ha az ISA gyanúját a 2006/88/EK irányelv 28. cikkének megfelelően meg kell erősíteni vagy ki kell zárni, az alábbi ellenőrzési, mintavételi és vizsgálati eljárás követendő:

- a) hatósági vizsgálat, mely legalább egy alkalommal végzett egészségügyi ellenőrzést és egy alkalommal 10 elhulláshoz közeli (moribund) állapotban lévő halból álló minta vételét foglalja magában, amennyiben ISA-ra utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások figyelhetők meg. Ha az ISA-ra utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások nem figyelhetők meg, az I.1. pontnak megfelelően az egészségügyi ellenőrzést legalább 30 elhulláshoz közeli (moribund) állapotban lévő vagy friss kórbonctani elváltozásokat mutató, szabályos alkatú halból álló minta célzott vétele követi. A mintákat a b) pontban foglalt diagnosztikai módszereknek megfelelően kell megvizsgálni.
- b) A HPR-deletált ISAV-ra vonatkozó RT-qPCR pozitív eredménye esetén a 2006/88/EK irányelv 28. cikkében előírt kezdeti járványvédelmi intézkedések végrehajtása előtt további mintákat kell vizsgálni. Az ISA-fertőzés gyanúját az alábbi kritériumok szerint, a II. melléklet 3. részében foglalt részletes módszerek és eljárások segítségével kell megerősíteni:
 - i. az ISAV RT-qPCR útján történő kimutatása, ezen belül a HPR-deletálás igazolása érdekében a HE-gén szekvenálása, továbbá az ISAV szövetpreparátumokban történő kimutatása ISAV-val szembeni specifikus ellenanyagokkal (azaz fixált metszeteken végzett IHC vagy szövetlenyomatokon végzett IFAT);

vagy

ii. az ISAV RT-qPCR útján történő kimutatása, ideértve a HE-gén HPR-deletálás igazolása érdekében végzett szekvenálását, és

az ISAV izolációja és azonosítása a gazdaságban található bármely hal legalább egy mintájából származó sejtenyészetben.

c) Amennyiben az ISA-ra utaló klinikai, makroszkopikus patológiás elváltozások vagy kórszöveti jelek figyelhetők meg, a leleteket a II. melléklet 3. részének megfelelően két, egymástól független kimutatási elveket alkalmazó diagnosztikai módszerrel – például RT-qPCR és IHC segítségével – végzett víruskimutatással kell megerősíteni.

Az ISA gyanúja kizárható, ha a gyanú felmerülésének időpontjától számított 12 hónapos időszakban végzett ellenőrzések és vizsgálatok alapján megállapítható, hogy azok nem tárnak fel az ISA jelenlétére utaló további bizonyítékokat.

3.A. táblázat

Az I.2.1. pontban említett, az ISA tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző kétéves ellenőrzési időszakra vonatkozó, övezetek és területi egységek felügyeleti rendszere

Felügyeleti év	Az egészségügyi ellenőrzések évenkénti (kétévenkénti) száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti (kétévenkénti) száma	A mintavételbe bevonandó halak évenkénti száma
1. év	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾
2. év	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾

⁽¹⁾ A mintákat két, egy-egy hónapig tartó (mégpedig tavaszi és őszi) vizsgálati időszakban, vagy adott esetben gyakorlati megfontolásoknak megfelelően kell gyűjteni, tárolni és megvizsgálni.

⁽²⁾ A halak összevont mintánkénti maximális száma: 5.

3.B. táblázat

Az I.3. pontban említett, az ISA tekintetében betegségtől mentes státus fenntartására szolgáló, övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszere ⁽²⁾

Kockázati szint	Az egészségügyi ellenőrzések évenkénti száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti száma	A mintavételbe bevonandó halak évenkénti száma
magas	2	2 ⁽¹⁾	2 * 30
közepes	1	1 ⁽¹⁾	30
alacsony	kétévente egyszer	kétévente egyszer	kétévente 30-szor

⁽¹⁾ A mintákat két, egy-egy hónapig tartó (mégpedig tavaszi és őszi) vizsgálati időszakban, vagy adott esetben gyakorlati megfontolásoknak megfelelően kell gyűjteni és vizsgálni.

⁽²⁾ Nem vonatkozik azokra a csak szivárványos pisztrángot (*Oncorhynchus mykiss*) vagy csak sebes pisztrángot (*Salmo trutta*) vagy mindkettőt tartó gazdaságokra, amelyek vízellátása kizárólag olyan édesvízi forrásokon alapul, amelyekben nem található atlanti lazac (*Salmo salar*).

4. RÉSZ

A MARTEILIA REFRINGENS-FERTŐZÉS ESETÉN ALKALMAZANDÓ FELÜGYELETI ÉS VÉDEKEZÉSI MÓDSZEREK

I. **A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését és fenntartását célzó felügyeleti és felszámolási programokra vonatkozó követelmények**

I.1. Általános követelmények

Az egészségügyi ellenőrzéseket és adott esetben a laboratóriumi vizsgálat céljából történő mintavételt az évnek abban az időszakában kell végezni, amikor az élősködőnek a tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli előfordulási gyakorisága az ismeretek szerint a legmagasabb. Ilyen adatok elérhetőségének hiányában a mintavételt közvetlenül azután kell elvégezni, miután a vízhőmérséklet meghaladta a 17 °C-ot.

Ha a puhatestűekből a 4. részben meghatározott követelményeknek megfelelően kell mintát venni, az alábbi kritériumok alkalmazandók:

- a) Ha a termelési egységekben vagy a termelési területen előfordul *Ostrea* spp. és *Mytilus* spp., mindkét nemzetségből ugyanakkora méretű mintát kell venni. Ha e nemzetségekből csak az egyik fordul elő, abból a nemzetségből kell mintát venni. Ha sem az *Ostrea*, sem a *Mytilus* nemzetség nem fordul elő, a mintának minden egyéb előforduló fogékony fajra nézve reprezentatívnak kell lennie.
- b) Ha a termelési egységekben előfordulnak legyengült, nyitott vagy frissen elhullott, de bomlásnak még nem indult puhatestűek, elsődlegesen azokat kell kiválasztani. Ha ilyen puhatestűek nem fordulnak elő, a kiválasztott puhatestűek között szerepelniük kell a legidősebb egészséges puhatestűeknek.
- c) A puhatestűek tenyésztéséhez egynél több vízforrást használó puhatestű-tenyésztő gazdaságokban végzett mintavételkor minden vízforrás esetében mintát kell venni az ott található puhatestűekből oly módon, hogy azok arányosan képviseljék a gazdaság minden részét.
- d) A puhatestű-tenyésztési területeken végzett mintavételkor elegendő számú mintavételi pontról származó puhatestűt kell a mintába felvenni oly módon, hogy azok a mintában arányosan képviseljék a puhatestű-tenyésztési terület minden részét. E mintavételi pontok kiválasztásakor figyelembe veendő fő tényezők a következők: azok a korábbi mintavételi pontok, ahol kimutatták a *Marteilia refringens*-fertőzést, az állomány-sűrűség, a vízáramlatok, a fogékony fajok jelenléte, a vektorfajok jelenléte, a batimetria és a gazdálkodási gyakorlatok. A mintavételnek ki kell terjednie a puhatestűek természetes telepeire.

I.2. A *Marteilia refringens* tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státus megszerzésére vonatkozó külön követelmények

I.2.1. Felügyeleti programok

A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen végrehajtották legalább az alábbi, egészségügyi ellenőrzéseket és vizsgálati célú mintagyűjtést tartalmazó felügyeleti programot.

Kétéves felügyeleti program:

- a) A gazdaságokban vagy puhatestű-tenyésztési területeken a II. szakaszban található 4.A. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább két egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzést végeztek és mintákat vettek.
- b) E kétéves időszakban valamennyi mintának a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálata negatív eredményt adott a *Marteilia refringens* tekintetében, továbbá a *Marteilia refringens* gyanúját a III.3. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárták.
- c) Ha I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamból, övezetből vagy területi egységből származó *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* vagy *Mytilus galloprovincialis* fajhoz tartozó puhatestűeket kell a mintába felvenni, ehhez olyan egyedeket kell kiválasztani, amelyeket már legalább a felügyeleti program végrehajtását megelőző tavasszal betelepítettek a gazdaságba vagy a puhatestű-tenyésztési területre.

I.2.2. Felszámolási programok

A *Marteilia refringens* felszámolása a legtöbb esetben lehetetlennek tekinthető, de ha a tagállam megvalósíthatónak ítéli, a felszámolási program alábbi modellje alkalmazandó.

A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, ha az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen végrehajtották legalább az alábbi felszámolási programot:

- a) Eredményesen alkalmazásra kerültek a 2006/88/EK irányelv V. mellékletének 3. szakaszában megállapított intézkedések, továbbá a hatóságilag *Marteilia refringens*-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság(ok) vagy puhatestű-tenyésztési terület(ek) közelében védelmi körzetet és megfigyelési körzetet magában foglaló, az irányelv 32. cikkének b) pontjában említett elszigetelési területet hoztak létre.

Az elszigetelési területet eseti alapon kell meghatározni, a *Marteilia refringens* terjedésének kockázatát befolyásoló tényezők figyelembevételével, mint például: a *Marteilia refringens*-fertőzött gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen elhullott puhatestűek száma, aránya, életkora és eloszlása, beleértve a vadon élő puhatestűeket is; a szomszédos gazdaságok vagy puhatestű-tenyésztési területek távolsága és sűrűsége, beleértve a vadon élő puhatestűeket is; a feldolgozó létesítményekhez, a kontaktgazdaságokhoz vagy a puhatestű-tenyésztési területekhez való közelség; a gazdaságokban vagy a puhatestű-tenyésztési területeken előforduló fajok, különösen a fogékony fajok és a vektorfajok; az érintett és szomszédos gazdaságokban és puhatestű-tenyésztési területeken alkalmazott tenyésztési gyakorlatok; a hidrodinamikai feltételek és egyéb, járványügyi jelentőségű azonosított tényezők.

A védelmi és a megfigyelési körzetek létrehozásánál az alábbi minimumkövetelmények alkalmazandók:

- i. a hatóságilag *Marteilia refringens*-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság vagy puhatestű-tenyésztési terület közvetlen közelében védelmi körzetet kell létrehozni, amely a megfelelő hidrodinamikai vagy járványügyi adatok függvényében meghatározott területnek felel meg;
 - ii. a védelmi körzet területén kívül megfigyelési körzetet kell létrehozni, amely a védelmi körzetet körülvevő, a megfelelő hidrodinamikai vagy járványügyi adatok függvényében meghatározott területnek felel meg.
- b) A védelmi körzeten belül a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban és puhatestű-tenyésztési területen, melyet nem nyilvánítottak hatóságilag *Marteilia refringens*-fertőzöttnek, hatósági vizsgálatot kell végezni, amely a *Marteilia refringens* átviteli időszakának kezdetét követően legalább 150 puhatestű vizsgálata céljából végzett mintagyűjtést foglal magában. Amennyiben az átviteli időszak nem ismert, a mintavételt abban az időszakban kell megkezdeni, amikor a vízhőmérséklet meghaladja a 17 °C-ot.
- c) A hatóságilag *Marteilia refringens*-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot és puhatestű-tenyésztési területet ki kell üríteni, pihentetni kell, és lehetőség szerint ki kell tisztítani és fertőtleníteni kell.

A pihentetési időszak hossza legalább:

- i. a környező vizekkel korlátozott összeköttetésben álló gazdaságok és puhatestű-tenyésztési területek (például keltető- és nevelőállomások) esetében két hónap;
- ii. a környező vizekkel korlátlan összeköttetésben álló gazdaságok és puhatestű-tenyésztési területek esetében két hónap, amennyiben a fogékony fajokhoz tartozó fertőzött puhatestűeket, valamint a fertőzött gazdasággal vagy puhatestű-tenyésztési területtel járványügyi kapcsolatban álló, fogékony fajokhoz tartozó puhatestűeket az évnek azon időszaka előtt gyűjtötték be vagy távolították el, amikor a *Marteilia refringens* prevalenciája az ismeretek szerint a legmagasabb, vagy ha ez az időszak nem ismert, azon időszak előtt, amikor a vízhőmérséklet meghaladja a 17 °C-ot;
- iii. a környező vizekkel korlátlan összeköttetésben álló gazdaságok és puhatestű-tenyésztési területek esetében tizennégy hónap, amennyiben a fogékony fajokhoz tartozó fertőzött puhatestűeket, valamint a fertőzött gazdasággal vagy puhatestű-tenyésztési területtel járványügyi kapcsolatban álló, fogékony fajokhoz tartozó puhatestűeket nem gyűjtötték be vagy távolították el az évnek azon időszaka előtt, amikor a *Marteilia refringens* prevalenciája az ismeretek szerint a legmagasabb, vagy ha ez az adat nem ismert, amennyiben a fogékony fajokhoz tartozó puhatestűeket nem fogták ki vagy távolították el azon időszak előtt, amikor a vízhőmérséklet meghaladja a 17 °C-ot.

A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaság és puhatestű-tenyésztési terület kiürítését követően legalább négyhetes párhuzamos pihentetési időszakot kell alkalmazni.

Az illetékes hatóság elrendelheti a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található más gazdaságok vagy puhatestű-tenyésztési területek kiürítését, tisztítását, fertőtlenítését és pihentetését. A pihentetési időszak hosszát eseti kockázatértékelést követően az illetékes hatóság állapítja meg.

- d) A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen, továbbá a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található valamennyi egyéb pihentetett gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen a *Marteilia refringens* tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból vagy területi egységekből származó puhatestűekkel kell állománypótlást végezni.

Állománypótlásra csak akkor kerülhet sor, ha a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot az I.2.2. szakasz c) pontjának megfelelően kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették.

- e) A felszámolási program hatálya alá tartozó tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságra és puhatestű-tenyésztési területre vonatkozóan a későbbiekben végre kell hajtani az e szakasz I.2.1. pontjában foglalt felügyeleti rendszert.

- I.3. A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes (I. kategória szerinti) státus fenntartására vonatkozó külön követelmények

Amennyiben az I. kategória szerinti egészségügyi státusnak a 2006/88/EK irányelv 52. cikke rendelkezései szerinti fenntartásához célzott felügyelet szükséges, az érintett tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen egészségügyi ellenőrzéseket kell végezni és mintákat kell venni a II. szakaszban foglalt 4. B. táblázatnak megfelelően, a gazdaságok vagy puhatestű-tenyésztési területek *Marteilia refringens*-fertőződés tekintetében fennálló kockázati szintjének figyelembevételével.

A betegségtől mentes státus csak akkor tartható fenn, ha a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel valamennyi minta negatív eredményt ad a *Marteilia refringens* tekintetében, és a *Marteilia refringens* gyanúját a II.3. pontban meghatározott diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárják.

- I.4. A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében a 2006/88/EK irányelv 39. cikkében előírt zárlati intézkedések feloldására (az V. kategória szerinti egészségügyi státusról a III. kategória szerinti egészségügyi státusra való áttérésre) vonatkozó követelmények

A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben:

- a) Az I.2.2. szakasz a), b) és c) pontjában foglalt követelmények teljesülnek. Abban az esetben, ha a pihentetés technikailag nem lehetséges, a gazdaságokra alternatív intézkedést kell alkalmazni, amely csaknem hasonló garanciát biztosít a *Marteilia refringens*-nek a gazdaság környezetében való felszámolására.
- b) A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen, valamint a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belüli pihentetett vagy az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezett valamennyi egyéb gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen a *Marteilia refringens* tekintetében I., II. vagy III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó puhatestűekkel állománypótlást végeztek.
- c) Állománypótlásra csak akkor került sor, ha a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot vagy puhatestű-tenyésztési területet kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették vagy az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezték.
- d) Az a), b) és c) pontban említett intézkedések lezárását követő két éves időszakban nem erősítették meg a *Marteilia refringens*-fertőzés előfordulását, és a szóban forgó időszakban a II.3. pontban foglalt eljárásoknak megfelelően ennek gyanúját kizárták.

II. Diagnosztikai módszerek és hatósági vizsgálatok

II.1. Minták

A II.2. és II.3. pontban előírt diagnosztikai vizsgálatok elvégzése céljából az állatokat egyben kell laboratóriumba küldeni.

- II.2. A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére vagy fenntartására szolgáló diagnosztikai módszerek

A II. melléklet 4. részében megállapított részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alapján a *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes státus megszerzése vagy fenntartása esetén alkalmazandó diagnosztikai módszerek: kórszövetten, szövetlenyomat vagy PCR.

II.3. A *Marteilia refringens*-fertőzés jelenlétének megerősítésére vagy gyanújának kizárására szolgáló hatósági vizsgálati és diagnosztikai módszerek

Ha a *Marteilia refringens*-fertőzés gyanúját a 2006/88/EK irányelv 28. cikkének megfelelően meg kell erősíteni vagy ki kell zárni, az alábbi ellenőrzési, mintavételi és vizsgálati eljárás követendő:

- a) A hatósági vizsgálat egy legalább 30 egyedtel számláló, fogékony fajokhoz tartozó puhatestűekből vett mintára terjed ki, ha a gyanú mortalitási jelentésen alapul, vagy a *Marteilia refringens* átviteli időszakának kezdetét követően 150 egyedtel számláló, fogékony fajokhoz tartozó puhatestűekből vett mintára terjed ki, ha a gyanú nem mortalitási jelentésen alapul. Amennyiben az átviteli időszak nem ismert, a mintavételt abban az időszakban kell megkezdeni, amikor a vízhőmérséklet meghaladja a 17 °C-ot.
- b) A mintákat az i. alpontban foglalt diagnosztikai módszerekkel, a II. melléklet 4. részének I. szakaszában foglalt részletes diagnosztikai módszerek és eljárások szerint kell megvizsgálni:
 - i. a *Marteilia refringens* jelenléte akkor tekintendő megerősítettnek, ha kórszövettani vizsgálat, szövetlenyomat-vizsgálat vagy *in situ* hibridizáció pozitív eredménye mellett a szekvenálással végzett PCR eredménye is pozitív;
 - ii. a *Marteilia refringens*-fertőzés gyanúja akkor zárható ki, ha az i. alpontban említett vizsgálatok nem tárnak fel a *Marteilia refringens* jelenlétére utaló további bizonyítékot.

4.A. táblázat

Az I.2.1. pontban említett, a *Marteilia refringens* tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző ellenőrzési időszakra vonatkozó, tagállamok, övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszere

	Az egészségügyi ellenőrzések évenkénti száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti száma	A mintában található puhatestűek száma
Gazdaságok/puhatestű-tenyésztési területek	1	1	150

4.B. táblázat

Az I.3. pontban említett, a *Marteilia refringens* tekintetében betegségtől mentes státus fenntartására szolgáló, tagállamok, övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszere

Kockázati szint	Egészségügyi ellenőrzések száma	Laboratóriumi vizsgálatok száma	A mintában található puhatestűek száma
magas	évente egyszer	kétévente egyszer	150
közepes	kétévente egyszer	kétévente egyszer	150
alacsony	kétévente egyszer	négyévente egyszer	150

5. RÉSZ

A BONAMIA OSTREAE-FERTŐZÉS ESETÉN ALKALMAZANDÓ FELÜGYELETI ÉS VÉDEKEZÉSI MÓDSZEREK

I. A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését és fenntartását célzó felügyeleti vagy felszámolási programokra vonatkozó követelmények

I.1. Általános követelmények

A termelési egységekben az egészségügyi ellenőrzéseket és adott esetben a mintavételt az évnél abban az időszakában kell végezni, amikor a *Bonamia ostreae* tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli előfordulási gyakorisága az ismeretek szerint a legmagasabb. Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, a mintavételt télen vagy tavasz elején kell elvégezni.

Ha a puhatestűekből a 5. részben meghatározott követelményeknek megfelelően kell mintát venni, az alábbi kritériumok alkalmazandók:

- a) Ha *Ostrea edulis* is előfordul, akkor csak ezen osztrigafaj egyedeit kell kiválogatni a mintavételhez. Ha *Ostrea edulis* nem fordul elő, a mintának minden egyéb előforduló fogékony fajra nézve reprezentatívnak kell lennie.
- b) Legyengült, nyitott vagy frissen elhullott, de bomlásnak még nem indult puhatestűek előfordulása esetén elsődlegesen azokat kell kiválasztani. Ha ilyen puhatestűek nem fordulnak elő, a kiválasztott puhatestűek között szerepelniük kell a legidősebb egészséges puhatestűeknek.
- c) A puhatestűek tenyésztéséhez egynél több vízforrást használó gazdaságokban végzett mintavételkor minden vízforrás esetében mintát kell venni az ott található puhatestűekből oly módon, hogy azok arányosan képviseljék a gazdaság minden részét.
- d) A puhatestű-tenyésztési területeken végzett mintavételkor elegendő számú mintavételi pontról származó puhatestűt kell a mintába felvenni. E mintavételi pontok kiválasztásakor figyelembe veendő fő tényezők a következők: azok a korábbi mintavételi pontok, ahol kimutatták a *Bonamia ostreae*-fertőzést, az állomány-sűrűség, a vízáramlatok, a fogékony fajok jelenléte, a vektorfajok jelenléte, a batimetria és a gazdálkodási gyakorlatok. A mintavételnek ki kell terjednie a tenyésztési területeken belül vagy azok közelében található természetes telepekre is.

I.2. A *Bonamia ostreae* tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státus megszerzésére vonatkozó külön követelmények

I.2.1. Felügyeleti programok

A *Bonamia ostreae* tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében visszaszerezheti az I. kategória szerinti egészségügyi státust, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban végrehajtották legalább az alábbi, egészségügyi ellenőrzéseket tartalmazó felügyeleti programot és vizsgálati célú mintagyűjtést végeztek.

Kétéves felügyeleti program:

- a) A 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó gazdaságokban vagy puhatestű-tenyésztési területeken az e részben található 5.A. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább két egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzést végeztek és mintákat vettek.
- b) E kétéves időszakban valamennyi mintának a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálata negatív eredményt adott a *Bonamia ostreae* tekintetében, továbbá a *Bonamia ostreae* gyanúját a II.3. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárták.
- c) Ha I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamból, övezetből vagy területi egységből származó *Ostrea edulis* fajhoz tartozó osztrigákat kell a mintába felvenni, ehhez olyan egyedeket kell kiválasztani, amelyeket már legalább a felügyeleti program végrehajtását megelőző ősszel betelepítettek a gazdaságba vagy a puhatestű-tenyésztési területre.

I.2.2. Felszámolási programok

A *Bonamia ostreae* felszámolása a legtöbb esetben lehetetlennek tekinthető, de ha a tagállam megvalósíthatónak ítéli, a felszámolási program alábbi modellje alkalmazandó.

A *Bonamia ostreae* tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, ha az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen végrehajtották legalább az alábbi felszámolási programot:

- a) Eredményesen alkalmazásra kerültek a 2006/88/EK irányelv V. mellékletének 3. szakaszában megállapított járványvédelmi minimumintézkedések, továbbá a hatóságilag *Bonamia ostreae*-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság(ok) vagy puhatestű-tenyésztési terület(ek) közelében védelmi körzetet és megfigyelési körzetet magában foglaló, az irányelv 32. cikkének b) pontjában említett elszigetelési területet hoztak létre.

Az elszigetelési területet eseti alapon kell meghatározni, az említett, jegyzékbe foglalt betegség terjedésének kockázatát befolyásoló tényezők figyelembevételével, mint például: a *Bonamia ostreae*-fertőzött gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen elhullott puhatestűek száma, aránya, életkora és eloszlása, beleértve a vadon élő puhatestűeket is; a szomszédos gazdaságok vagy puhatestű-tenyésztési területek távolsága és sűrűsége, beleértve a vadon élő puhatestűeket is; a feldolgozó létesítményekhez, a kontaktgazdaságokhoz vagy a puhatestű-tenyésztési területekhez való közelség; a gazdaságokban vagy puhatestű-tenyésztési területeken előforduló fajok, különösen a fogékony fajok és a vektorfajok; az érintett és szomszédos gazdaságokban vagy puhatestű-tenyésztési területeken alkalmazott tenyésztési gyakorlatok; a hidrodinamikai feltételek és egyéb, jelentőségű azonosított tényezők.

A védelmi és a megfigyelési körzetek létrehozásánál az alábbi minimumkövetelmények alkalmazandók:

- i. a hatóságilag *Bonamia ostreae*-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság vagy puhatestű-tenyésztési terület közvetlen közelében védelmi körzetet kell létrehozni, amely a megfelelő hidrodinamikai vagy járványügyi adatok függvényében meghatározott területnek felel meg;
 - ii. a védelmi körzet területén kívül megfigyelési körzetet kell létrehozni, amely a védelmi körzetet körülvevő, a megfelelő hidrodinamikai vagy járványügyi adatok függvényében meghatározott területnek felel meg.
- b) A védelmi körzeten belül a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban és puhatestű-tenyésztési területen, melyet nem nyilvánítottak hatóságilag *Bonamia ostreae*-fertőzöttnek, hatósági vizsgálatot kell végezni, amely egy legalább 150 egyedre számláló, fogékony fajokhoz tartozó puhatestűek vizsgálata céljából végzett, a *Bonamia ostreae* átviteli időszakának kezdetét követően zajló mintagyűjtést foglal magában. Ha az átviteli időszak nem ismert, a mintagyűjtést télen vagy tavasz elején kell elkezdni.
- c) A hatóságilag *Bonamia ostreae*-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot és puhatestű-tenyésztési területet ki kell üríteni, pihentetni kell, és lehetőség szerint ki kell tisztítani és fertőtleníteni kell. A pihentetési időszak hossza legalább hat hónap.

A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaság vagy puhatestű-tenyésztési terület kiürítését követően legalább négyhetes párhuzamos pihentetési időszakot kell alkalmazni.

Az illetékes hatóság elrendelheti a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található más gazdaságok vagy puhatestű-tenyésztési területek kiürítését, tisztítását, fertőtlenítését és pihentetését. A pihentetési időszak hosszát eseti kockázatértékelést követően az illetékes hatóság állapítja meg.

- d) A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen, továbbá a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található valamennyi egyéb pihentetett gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen a *Bonamia ostreae* tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, körzetekből vagy területi egységekből származó puhatestűekkel kell állománypótlást végezni. Állománypótlásra csak akkor kerülhet sor, ha a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot az I.2.2. szakasz c) pontjának megfelelően kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették.
- e) A felszámolási program hatálya alá tartozó tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságra és puhatestű-tenyésztési területre vonatkozóan a későbbiekben végre kell hajtani az I.2. pontban foglalt felügyeleti programot.
- I.3. A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes (I. kategória szerinti) státus fenntartására vonatkozó külön követelmények

Amennyiben az I. kategória szerinti egészségügyi státusnak a 2006/88/EK irányelv 52. cikke szerinti fenntartásához célzott felügyelet szükséges, az érintett tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen egészségügyi ellenőrzéseket kell végezni és mintákat kell venni az e rész II. szakaszában található 5. B. táblázatnak megfelelően, a gazdaságok vagy puhatestű-tenyésztési területek *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében fennálló kockázati szintjének figyelembevételével.

A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes státus csak akkor tartható fenn, ha a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel valamennyi minta negatív eredményt ad a *Bonamia ostreae* tekintetében, és a *Bonamia ostreae* gyanúját a II.3. pontban meghatározott diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárták.

- I.4. A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében a 2006/88/EK irányelv 39. cikkében előírt zárlati intézkedések feloldására (az V. kategória szerinti egészségügyi státusról a III. kategória szerinti egészségügyi státusra való áttérésre) vonatkozó követelmények.

A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett betegség tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben:

- a) Az I.2.2. szakasz a), b) és c) pontjában foglalt követelmények teljesülnek. Abban az esetben, ha a pihentetés technikailag nem lehetséges, a gazdaságokra alternatív intézkedést kell alkalmazni, amely csaknem hasonló garanciát biztosít a *Bonamia ostreae*-nek a gazdaság környezetében való felszámolására.
- b) A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen, valamint a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belüli pihentetett, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezett valamennyi egyéb gazdaságban vagy puhatestű-tenyésztési területen a *Bonamia ostreae* tekintetében I., II. vagy III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból vagy területi egységekből származó puhatestűekkel végeztek állománypótlást.
- c) Az állománypótlásra csak akkor került sor, ha a hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot vagy puhatestű-tenyésztési területet kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezték.
- d) Az a), b) és c) pontban említett intézkedések lezárását követő kétéves időszakban nem erősítették meg a *Bonamia ostreae*-fertőzés előfordulását, és a szóban forgó időszakban a II.3. pontban foglalt eljárásoknak megfelelően ennek gyanúját kizárták.

II. Diagnosztikai módszerek és diagnosztikai kritériumok

II.1. Minták

A II.2. és II.3. pontban előírt diagnosztikai vizsgálatok elvégzése céljából az állatokat egyben kell laboratóriumba küldeni.

II.2. A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére vagy fenntartására szolgáló diagnosztikai módszerek

A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében betegségtől mentes státus megszerzése vagy fenntartása esetén alkalmazandó diagnosztikai módszerek: kórszövettan, szövetlenyomat vagy PCR. E diagnosztikai módszerek alkalmazásakor az e tekintetben a II. melléklet 5. részében megállapított részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

II.3. A *Bonamia ostreae*-fertőzés jelenlétének megerősítésére vagy gyanújának kizárására alkalmazandó diagnosztikai kritériumok

Ha a *Bonamia ostreae*-fertőzés gyanúját a 2006/88/EK irányelv 28. cikkének megfelelően meg kell erősíteni vagy ki kell zárni, az alábbi ellenőrzési, mintavételi és vizsgálati eljárás követendő:

A hatósági vizsgálat egy legalább 30 egyedtel szemlélő, fogékony fajokhoz tartozó puhatestűekből vett mintára terjed ki, ha a gyanú mortalitási jelentéssel alapul, vagy a *Bonamia ostreae* átviteli időszakának kezdetét követően 150 egyedtel szemlélő, fogékony fajokhoz tartozó puhatestűekből vett mintára terjed ki, ha a gyanú nem mortalitási jelentéssel alapul. Ha az átviteli időszak nem ismert, a mintagyűjtést télen vagy tavasz elején kell elkezdeni. A mintákat az i. alpontban foglalt diagnosztikai módszerekkel kell megvizsgálni a II. melléklet 5. részének I. szakaszában foglalt részletes diagnosztikai módszerek és eljárások szerint:

- i. a *Bonamia ostreae* jelenléte akkor tekintendő megerősítettnek, ha – a II. melléklet 5. részének I. pontjában foglalt jóváhagyott módszereknek és eljárásoknak megfelelően – kórszövetteni vizsgálat, szövetlenyomat-vizsgálat vagy *in situ* hibridizáció pozitív eredménye mellett a szekvenálással végzett PCR eredménye is pozitív;
- ii. a *Bonamia ostreae*-fertőzés jelenlétének gyanúja kizárható, ha ezek a vizsgálatok nem tárnak fel a *Bonamia ostreae* jelenlétére utaló további bizonyítékot.

5.A. táblázat

Az I.2.1. pontban említett, a *Bonamia ostreae* tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző ellenőrzési időszakokra vonatkozó, tagállamok, övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszere

	Az egészségügyi ellenőrzések évenkénti száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti száma	A mintában található puhatestűek száma
Gazdaságok/puhatestű-tenyésztési területek	1	1	150

5.B. táblázat

Az I.3. pontban említett, a *Bonamia ostreae* tekintetében betegségtől mentes státus fenntartására szolgáló, tagállamok, övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszere

Kockázati szint	Egészségügyi ellenőrzések száma	Laboratóriumi vizsgálatok száma	A mintában található puhatestűek száma
magas	évente egyszer	kétévente egyszer	150
közepes	kétévente egyszer	kétévente egyszer	150
alacsony	kétévente egyszer	négyévente egyszer	150

6. RÉSZ

A WHITE SPOT-BETEGSÉG (WSD) ESETÉN ALKALMAZANDÓ FELÜGYELETI ÉS VÉDEKEZÉSI MÓDSZEREK

I. **A WSD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését és fenntartását, valamint a WSSV-fertőzés megfékezését célzó felügyeleti és felszámolási programokra vonatkozó követelmények**

I.1. Az ellenőrzésekre és a mintavételre vonatkozó általános követelmények

A rákfélékből laboratóriumi vizsgálat céljából akkor kell mintát venni, amikor a víz hőmérséklet valószínűsíthetően eléri az éves maximumát. Ez a víz hőmérsékletre vonatkozó követelmény az egészségügyi ellenőrzésekre is alkalmazandó, ha azok kivitelezhetők és megfelelőek.

Ha tenyésztett rákfélékből az e részben meghatározott követelményeknek megfelelően kell mintát venni, az alábbi kritériumok alkalmazandók:

- Ha a termelési egységekben előfordulnak legyengült vagy elhullásközeli állapotban lévő rákfélék, elsősorban ezeket az egyedeket kell kiválasztani. Ha ilyen rákfélék nem fordulnak elő, a kiválasztott rákfélék között lenniük kell a kiválasztott fogékony fajok különböző méretcsoportjához tartozó – azaz növendék és kifejlett – egyedeknek oly módon, hogy azok arányosan képviseljék az adott csoportot a mintában.
- Ha egynél több vízforrást használnak ráktenyésztésre, minden vízforrás esetében mintát kell venni az ott található fogékony rákfélékből.

Amennyiben a 2006/88/EK irányelv V. melléklete I. része 2. pontja második albekezdésének megfelelően a vadon élő populációkban felügyelet szükséges, a mintavételi pontok számát és földrajzi eloszlását úgy kell meghatározni, hogy az megfelelő mértékben lefedje a tagállam, övezet vagy területi egység területét. A mintavételi pontoknak azon – tengeri, torkolatvidéki, folyami és tavi – ökoszisztémák szempontjából is reprezentatívnak kell lenniük, amelyekben a fogékony fajok vadon élő populációi találhatóak.

Amennyiben a 2006/88/EK irányelv V. melléklete I. része 2. pontja második albekezdésének megfelelően a vadon élő populációkban felügyelet szükséges, a mintaként begyűjtendő rákfélék egyedeit a következőképpen kell kiválasztani:

- i. A tengeri és torkolatvidéki ökoszisztémák területein a következő fajokból kell egyet vagy többet kiválasztani: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* vagy oszorosgarnéla-fajok, azaz a *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus* fajok. Ha ezek a fajok nem fordulnak elő, a mintának a tízlábú rákok rendjébe tartozó egyéb előforduló fogékony fajok szempontjából kell reprezentatívnak lennie. A fogékony gazdaállatok széles körére tekintettel a tízlábú rákok rendjébe sorolt azon nemzetségekhez vagy családokhoz tartozó gazdaállatok választhatók ki, amelyeknél a fogékonyság kísérlet útján vagy természetes úton bizonyítást nyert.
- ii. Folyami és tavi ökoszisztémákban a következő fajokból kell egyet vagy többet kiválasztani: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* vagy *Orconectes limosus*. Ha ezek a fajok nem fordulnak elő, a mintának a tízlábú rákok rendjébe tartozó egyéb előforduló fogékony fajok szempontjából kell reprezentatívnak lennie. A fogékony gazdaállatok széles körére tekintettel a tízlábú rákok rendjébe sorolt azon nemzetségekhez vagy családokhoz tartozó gazdaállatok választhatók ki, amelyeknél a fogékonyság kísérlet útján vagy természetes úton bizonyítást nyert.
- iii. Ha előfordulnak legyengült vagy elhullásközeli állapotban lévő rákfélék, elsősorban ezeket az egyedeket kell kiválasztani. Ha ilyen rákfélék nem fordulnak elő, a kiválasztott rákfélék között lenniük kell a kiválasztott fogékony fajok különböző méretcsoportokhoz tartozó – azaz növendék és kifejlett – egyedeinek oly módon, hogy azok arányosan képviseljék az adott csoportot a mintában.

I.2. A WSD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státus megszerzésére vonatkozó külön követelmények

I.2.1. Felügyeleti programok

- a) Az a tagállam, övezet vagy területi egység, amely a WSD tekintetében a 2006/88/EK irányelv III. melléklete B. részének megfelelő III. kategória szerinti egészségügyi státussal rendelkezik, az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaság eleget tesz a 2006/88/EK irányelv V. melléklete vonatkozó követelményeinek, és amennyiben mindezekben a gazdaságokban és – az V. melléklet I. része 2. pontjának második bekezdésében előírt esetekben – az említett pontnak megfelelően kiválasztott vadon élő populációk mintavételi pontjain végrehajtották az alábbi, egészségügyi ellenőrzéseket és vizsgálati célú mintagyűjtést magában foglaló kétéves felügyeleti programot.

A gazdaságokban vagy mintavételi pontokon a II. szakaszban található 6.A. táblázatban foglaltaknak megfelelően legalább két egymást követő évre kiterjedő időszakon át egészségügyi ellenőrzést végeztek és mintát vettek.

E kétéves időszakban valamennyi mintának a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálata negatív eredményt adott a WSD-fertőzés tekintetében, továbbá a WSD gyanúját a II.3. pontban meghatározott mintavételi és diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárták.

- b) Ha az a) pontban említett felügyeleti program végrehajtása során a programban részt vevő valamely gazdaságban megerősítést nyer a WSSV-fertőzés, és így a gazdaság II. kategória szerinti egészségügyi státusát visszavonják, az adott gazdaság azonnal visszaszerezheti a II. kategória szerinti egészségügyi státusát, és a betegségtől mentes státus megszerzése érdekében folytathatja a felügyeleti program végrehajtását az I.2.2. pontban meghatározott felszámolási program végrehajtása nélkül, amennyiben:
 - i. olyan kontinentális gazdaság, amelynek egészségügyi állapota – a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 3. pontjának megfelelően – a WSD tekintetében független a környező természetes vizek egészségügyi állapotától;
 - ii. a gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették; a pihentetési időszak hossza legalább hat hét;
 - iii. olyan gazdaság, amelyben a WSD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó rákfélékkel végeztek állománypótlást.

I.2.2. Felszámolási programok

I.2.2.1. Általános követelmények

A WSD tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben az adott tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban végrehajtották legalább az alábbi felszámolási programot:

- a) Eredményesen alkalmazásra kerültek a 2006/88/EK irányelv V. mellékletének 4. szakaszában megállapított járványvédelmi minimumintézkedések, továbbá a hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság(ok) közelében védelmi körzetet és megfigyelési körzetet magában foglaló, az irányelv 32. cikkének b) pontjában említett elszigetelési területet hoztak létre.

Az elszigetelési területet eseti alapon kell meghatározni, a WSD tenyésztett és vadon élő rákfélékre való áttérjedésének kockázatát befolyásoló tényezők figyelembevételével, mint például: a WSD-vel fertőzött gazdaságban tartott, elhullott rákok száma, aránya és eloszlása; a szomszédos gazdaságok egymástól való távolsága és sűrűsége; a kontaktgazdaságok; a gazdaságokban előforduló fajok; az érintett és a szomszédos gazdaságokban alkalmazott tenyésztési gyakorlatok; a hidrodinamikai feltételek és az egyéb, jelentőségű azonosított tényezők.

A védelmi és a megfigyelési körzetek létrehozásánál az alábbi minimumkövetelmények alkalmazandók:

- i. a hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság közvetlen közelében védelmi körzetet kell létrehozni, amely a következőknek felel meg:

1. tengeri és torkolatvidéki területeken: legalább az árapályövezet szélességének megfelelő vagy legalább 5 km (a nagyobb érték a mérvadó) sugarú kör területe, amelynek közepe a hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság, vagy egy ennek megfelelő, a vonatkozó hidrodinamikai vagy járványügyi adatoknak megfelelően meghatározott terület; vagy
2. édesvizekben: a hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított gazdaság teljes vízgyűjtő területe; az illetékes hatóság a védelmi körzet kiterjedését a vízgyűjtő terület egyes részeire korlátozhatja, amennyiben ez nem veszélyezteti a WSD terjedésének megelőzését;

- ii. a védelmi körzet területén kívül megfigyelési körzetet kell létrehozni, amely a következőknek felel meg:

1. tengeri területeken: a védelmi körzetet körülvevő, egymást átfedő árapályövezetekből álló terület; vagy a védelmi körzetet körülvevő, a védelmi körzet középpontjától számított 10 km sugarú kör területe; vagy egy ennek megfelelő, a vonatkozó hidrodinamikai vagy járványügyi adatoknak megfelelően meghatározott terület; vagy
2. édesvizekben: a létrehozott védelmi körzeten kívül eső kiterjesztett terület;

- b) A védelmi körzeten belül a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban, melyet nem nyilvánítottak hatóságilag WSD-fertőzöttnek, legalább a következőkre kiterjedő hatósági vizsgálatot kell végezni:

- i. 10 rák vizsgálata céljából végzett mintagyűjtés, amennyiben WSD-re utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások figyelhetők meg, vagy legalább 150 rák vizsgálata céljából végzett mintagyűjtés, amennyiben nem figyelhetők meg klinikai vagy kórbonctani elváltozások; valamint
- ii. egy alkalommal végzett egészségügyi ellenőrzés: azokban a gazdaságokban, amelyekben az i. alpontban említett vizsgálatok negatív eredményt adtak, a védelmi körzet I.2.2.1. c) pont szerinti feloldásáig továbbra is havonta egyszer egészségügyi ellenőrzést kell végezni abban az évszakban, amikor a vízhőmérséklet valószínűsíthetően eléri az éves maximumát.

- c) A hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot ki kell üríteni, ki kell tisztítani, fertőtleníteni és pihentetni kell. A pihentetési időszak hossza legalább hat hét. A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaság kiürítését követően legalább háromhetes párhuzamos pihentetési időszakot kell alkalmazni. Ez a bekezdés a felszámolási program végrehajtása során hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított új gazdaságokra is alkalmazandó.

A hatóságilag fertőzöttnek nyilvánított gazdaságok pihentetése során a védelmi körzeteket megfigyelési körzetekké kell alakítani.

Az illetékes hatóság elrendelheti a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található más gazdaságok kiürítését, tisztítását, fertőtlenítését és pihentetését. A pihentetési időszak hosszát eseti kockázaterőtelést követően az illetékes hatóság állapítja meg.

- d) A hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban és a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belül található, valamennyi egyéb pihentetett gazdaságban a következőképpen kerül sor állománypótlásra:
- a WSD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetkből vagy területi egységekből származó rákfélékkel; vagy
 - a 2020. december 31-ig tartó átmeneti időszakban: jóváhagyott WSD-felügyeleti programmal rendelkező tagállamokból, övezetkből vagy területi egységekből származó rákfélékkel.

Állománypótlásra csak akkor kerül sor, ha a hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot az I.2.2.1. c) pontnak megfelelően kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették.

- e) A felszámolási program hatálya alá tartozó tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságra és a vadon élő populációkban végzendő megfigyelés kötelezettsége esetén az említett irányelv V. melléklete I. része 2. pontja második bekezdésének megfelelően kiválasztott mintavételi pontokra vonatkozóan a későbbiekben legalább az I.2.1. pontban foglalt felügyeleti programot kell alkalmazni.

I.2.2.2. A korábban WSD-mentesnek nyilvánított, egyetlen gazdaságot magukban foglaló kontinentális területi egységek WSD tekintetében betegségtől mentes státusának visszaszerzésére vonatkozó követelmények

A WSD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú, egyetlen gazdaságot magában foglaló azon kontinentális területi egység, amelynek egészségügyi státusa az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében – a 2006/88/EK irányelv V. melléklete II. része 3. pontjának megfelelően – független a környező természetes vizektől, és amelynek az I. kategória szerinti egészségügyi státusát az irányelv 53. cikkének (3) bekezdésével összhangban visszavonták, közvetlenül azután visszaszerezheti az I. kategória szerinti egészségügyi státust, miután az illetékes hatóság megerősítette, hogy eleget tesz az alábbi feltételeknek:

- a WSD-vel fertőzött gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették; a pihentetési időszak hossza legalább hat hét;
- olyan gazdaság, amelyben a WSD tekintetében I. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetkből vagy területi egységekből származó rákfélékkel végeztek állománypótlást.

I.3. A WSD tekintetében betegségtől mentes (I. kategória szerinti) státus fenntartására vonatkozó külön követelmények

Amennyiben az I. kategória szerinti egészségügyi státusnak a 2006/88/EK irányelv 52. cikkében foglalt fenntartásához célzott felügyelet szükséges, az érintett tagállamon, övezeten vagy területi egységen belüli, az irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt fogékony fajokat tartó valamennyi gazdaságban egészségügyi ellenőrzést kell végezni és mintákat kell venni a II. szakaszban foglalt 6.B. táblázatnak megfelelően, a gazdaságok WSD-fertőződés tekintetében fennálló kockázati szintjének figyelembevételével.

Azokban a tagállamokban, övezetekben vagy területi egységekben, ahol kevés gazdaság található, és e gazdaságok célzott felügyelete nem biztosít elegendő járványügyi adatot, a betegségtől mentes státus fenntartását célzó felügyeleti programoknak ki kell terjedniük az I.1. pontban foglalt követelményeknek megfelelően kiválasztott mintavételi pontokra.

A mintavételi pontokon oly módon kell ellenőrzést és mintavételt végezni, hogy azok 50 %-a évente cserélődjön. A mintavételt a II. szakaszban található 6.B. táblázatnak megfelelően kell elvégezni. A mintákat a II. szakaszban ismertetett diagnosztikai és mintavételi módszereknek megfelelően kell kiválasztani, előkészíteni és megvizsgálni, és a laboratóriumi vizsgálatoknak a WSD-kórokozó tekintetében negatív eredményűnek kell lenniük.

A betegségtől mentes státus csak akkor tartható fenn, ha a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai és mintavételi módszerekkel vizsgált valamennyi minta negatív eredményt ad a WSD tekintetében, és a WSD gyanúját a II.3. pontban meghatározott hatósági vizsgálati és diagnosztikai módszereknek megfelelően kizárták.

- I.4. A WSD tekintetében a 2006/88/EK irányelv 39. cikkében előírt zárlati intézkedések feloldására (az V. kategória szerinti egészségügyi státusról a III. kategória szerinti egészségügyi státusra való áttérésre) vonatkozó követelmények

A WSD tekintetében V. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállam, övezet vagy területi egység az említett, jegyzékbe foglalt betegség tekintetében III. kategória szerinti egészségügyi státust szerezhet, amennyiben:

- a) az I.2.2.1. szakasz a), b) és c) pontjában foglalt követelmények teljesülnek. Abban az esetben, ha a pihentetés technikailag nem lehetséges, a gazdaságokra alternatív intézkedést kell alkalmazni, amely csaknem hasonló garanciát biztosít a WSSV-nek a gazdaság környezetében való felszámolására.
- b) A hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságban, valamint a létrehozott védelmi és megfigyelési körzeteken belüli pihentetett, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezett valamennyi egyéb gazdaságban a WSD tekintetében I., II. vagy III. kategória szerinti egészségügyi státusú tagállamokból, övezetekből vagy területi egységekből származó rákfélékkel állománypótlást végeztek.
- c) Az állománypótlásra csak akkor került sor, ha a hatóságilag WSD-fertőzöttnek nyilvánított összes gazdaságot kiürítették, kitisztították, fertőtlenítették és pihentették, illetve az a) pontnak megfelelően alternatív intézkedések hatálya alá helyezték.
- d) Az a) és b) pontban említett intézkedések lezárását követő kétéves időszakban nem mutatták ki a WSD előfordulását, és a szóban forgó időszakban a II.3. pontban foglalt eljárásoknak megfelelően ennek gyanúját kizárták.

II. **Diagnosztikai és mintavételi módszerek**

II.1. **Minták**

A vizsgált állat boncolásából származó, illetve a járólábain, úszólábain, szájrészein vagy kopolyúin található integumentális epidermiszből vett mintákat a kétlépcsős PCR-re való előkészítésük előtt 95 %-os etanolban kell fixálni.

Szövetteni vizsgálat és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat céljából fixált egyéb minták a PCR-ből származó diagnosztikai adatok alátámasztása érdekében gyűjthetők.

- II.2. A WSD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzésére vagy fenntartására szolgáló diagnosztikai módszerek

A II. melléklet 6. részében megállapított részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alapján a WSD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzése vagy fenntartása esetén alkalmazandó diagnosztikai módszer a kétlépcsős PCR.

A kétlépcsős PCR pozitív eredménye esetén az eredményt a 2006/88/EK irányelv 28. cikkében előírt kezdeti járványvédelmi intézkedések végrehajtása előtt az amplikon szekvenálásával kell – lehetőleg gyakorlati körülmények között – megerősíteni, ha a kiválasztott fogékony gazdaállatokban a WSD patognomikus tüneteinek szövetteni és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat útján történő igazolásával az adott körülmények között megvalósítható.

- II.3. A WSD-fertőzés gyanújának kizárására vagy jelenlétének megerősítésére szolgáló hatósági vizsgálati és diagnosztikai módszerek

Ha a 2006/88/EK irányelv 28. cikkének megfelelően a WSD-fertőzés jelenlétét meg kell erősíteni vagy a gyanúját ki kell zárni, az alábbi ellenőrzési, mintavételi és vizsgálati eljárás követendő:

- a) hatósági vizsgálat, mely legalább egy alkalommal végzett egészségügyi ellenőrzést és a II.2. pontban meghatározott diagnosztikai módszerrel (kétlépcsős PCR) végzett vizsgálat keretében egy 10 rákból álló minta vételét foglalja magában, amennyiben WSD-fertőzésre utaló klinikai vagy kórbonctani elváltozások figyelhetők meg, vagy egy 150 rákból álló minta vételét, amennyiben klinikai vagy kórbonctani elváltozások nem figyelhetők meg.

- b) A WSD jelenléte megerősítettnek tekintendő, ha a II. melléklet 6. részében meghatározott részletes módszerek és eljárások alapján kétlépcsős PCR-rel, majd szekvenálással pozitív eredmény születik a WSSV tekintetében, és ha a WSD patognomikus tünetei jelentkeznek a kiválasztott gazdaállatokon.

A WSD gyanúja kizárható, ha ezek a vizsgálatok nem tárnak fel a WSD jelenlétére utaló további bizonyítékot.

6.A. táblázat

Az I.2.1. pontban említett, a WSD tekintetében betegségtől mentes státus megszerzését megelőző kétéves ellenőrzési időszakra vonatkozó, tagállamok, övezetek és területi egységek felügyeleti rendszere

	A klinikai vizsgálatok évenkénti száma	A laboratóriumi vizsgálatok évenkénti száma	A mintában található rákfélék száma
Gazdaságok/mintavételi helyek	1	1	150

6.B. táblázat

Az I.3. pontban említett, a WSD tekintetében betegségtől mentes státus fenntartására szolgáló, tagállamok, övezetek vagy területi egységek felügyeleti rendszerek

Kockázati szint	Egészségügyi ellenőrzések száma	Laboratóriumi vizsgálatok száma	A mintában található rákfélék száma
magas	évente egyszer	kétévente egyszer	150
közepes	kétévente egyszer	kétévente egyszer	150
alacsony	kétévente egyszer	négyévente egyszer	150

II. MELLÉKLET

RÉSZLETES DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK

I. Bevezetés

Ez a melléklet az e határozat I. mellékletében meghatározott felszámolási és felügyeleti programok keretében végzendő laboratóriumi vizsgálatok diagnosztikai módszereihez, valamint a 2006/88/EK irányelv IV. mellékletének II. részében felsorolt, az alábbi nem egzotikus betegségek (a továbbiakban: jegyzékbe foglalt betegségek) gyanítható jelenlétének megerősítése vagy kizárása érdekében alkalmazandó, az említett irányelv 57. cikkének b) pontja szerinti diagnosztikai módszerekhez kapcsolódó részletes eljárásokat állapítja meg:

1.	Pisztrángok vírusos vérfertőzése (VHS)	1. rész
2.	Pisztrángfélék fertőző vérképzőszervi elhalása (IHN)	1. rész
3.	Koi-herpeszvírusbetegség (KHV)	2. rész
4.	Lazacok fertőző vérszegénysége (ISA)	3. rész
5.	<i>Marteilia refringens</i> -fertőzés	4. rész
6.	<i>Bonamia ostreae</i> -fertőzés	5. rész
7.	White spot-betegség (WSD)	6. rész

II. Fogalom meghatározások

E melléklet alkalmazásában „szállító tápfolyadék”: 10 % borjúsérumot, valamint milliliterenként 200 nemzetközi egység (NE) penicillint, 200 µg sztreptomocint és 200 µg kanamicint vagy más, bizonyítottan hatékony antibiotikumot is magában foglaló sejtenyészítő tápfolyadék.

1. RÉSZ

AZ IHN ÉS A VHS FELÜGYELETÉRE ÉS MEGERŐSÍTÉSÉRE SZOLGÁLÓ RÉSZLETES DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK

I. A VHS és az IHN felügyeletére szolgáló diagnosztikai módszerek és eljárások

Az I. melléklet 1. részének I. szakaszában meghatározott, az IHN vagy a VHS tekintetében betegségtől mentes státus megszerzése vagy fenntartása céljából az említett melléklet 1. részének II.1. és II.2. szakaszában foglalt diagnosztikai módszerekkel végzett mintavétel és laboratóriumi vizsgálat során az I.1–I.6. pontban meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

I.1. A halakból származó minták előkészítése és szállítása

I.1.1. Sejtenyészeten végzett virológiai vizsgálatokhoz felhasznált szövetek

A laboratóriumba szállítás vagy átvitel előtt a vizsgálandó szervek darabjait steril bonceszközökkel kell eltávolítani a halakból, és azokat szállító tápfolyadékot tartalmazó steril műanyag csövekbe kell helyezni.

A sejtenyészeten végzett virológiai vizsgálatra, valamint RT-qPCR vizsgálatra alkalmas halanyag mennyisége a halak méretétől függ. Így a frissen kikelt (4 cm-nél kisebb testhosszúságú) halak esetében egészben lévő ivadékoknak, (4 és 6 cm közötti testhosszúságú halak esetében) belső szerveknek, többek között vesének, nagyobb méretű halak esetében pedig vesének, lépnek, szívnek és/vagy agyvelőnek, valamint anyahalak íváskori petefészek-folyadékának kell lennie a szövetmintában.

Legfeljebb 10 halból származó petefészek-folyadékot, ondófoladékot vagy szervdarabokat lehet egy steril csőbe gyűjteni, amely legalább 4 ml szállító tápfolyadékot tartalmaz, és ez alkot egy összevont mintát. Az egyes szövetmintáknak legalább 0,5 gramm (g) tömegűnek kell lenniük.

A sejtenyészeten végzett virológiai vizsgálatot minél hamarabb, legkésőbb a minták gyűjtését követő 48 órán belül el kell kezdeni. Kivételes esetekben a virológiai vizsgálat legkésőbb az anyag gyűjtését követő 72 órán belül is elkezdhető, feltéve, hogy a vizsgálati anyag szállító tápfolyadékkal védett, és a szállítás alatti hőmérsékleti követelmények teljesíthetők.

I.1.2. Fordított transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR vagy RT-qPCR) segítségével végzett vizsgálathoz vett minták

A halakból az I.1.1. pontban ismertetett eljárásnak megfelelően, steril eszközzel kell mintát venni, és azt szállító tápfolyadékot tartalmazó steril műanyag csőbe kell helyezni. 10 halból származó szövetek egy csőbe gyűjthetők, amelyek így egy összevont mintát alkotnak. Ha azonban az inokulum mennyisége kicsi, akár öt hal szövetei is felhasználhatók. Alternatív lehetőségként a minták RNS-stabilizáló reagensben – például a gyártók ajánlása szerinti 0,2 g szövet/ml mennyiségű reagensben – összevonhatók, bár az egyes halakat egyenként kell feldolgozni, és a minták a kivonáshoz használt anyag kis mennyisége miatt nem vonhatók össze.

Egész halak is küldhetők a laboratóriumba.

I.2. A halakból származó minták szállítása

A sejtenyésztésre vagy RT-PCR-/RT-qPCR-elemzésre szánt halszöveteket tartalmazó csöveket szigetelt tartályokba kell helyezni (például vastag falú polisztiroldobozokba), elegendő jéggel vagy más, hasonló hűtő hatással bíró hűtőközeggel ahhoz, hogy a laboratóriumig történő szállítás során a minták hűtése biztosítható legyen. A minták fagyasztása azonban kerülendő. A minták szállítás alatti hőmérséklete nem haladhatja meg a 10 °C-ot, és átvételkor a szállítódobozban még lennie kell jégnek, illetve egy vagy több jégakkunak részben vagy egészen továbbra is fagyottnak kell lennie.

Egész halak akkor küldhetők a laboratóriumba, ha az első bekezdésben említett, szállítás alatti hőmérsékleti követelmények teljesíthetők. Az egész halak nedvszívó papírba csomagolva, műanyag tasakban szállítandók. Élő halak is szállíthatók.

I.3. Kiegészítő diagnosztikai anyag gyűjtése

A diagnosztikai laboratórium jóváhagyása esetén más halszövet is gyűjthető és kiegészítő vizsgálatokra előkészíthető.

I.4. A minták előkészítése sejtenyésztés-vizsgálatra és RT-qPCR-vizsgálatra

I.4.1. Fagyasztás kivételes esetekben

Olyan gyakorlati nehézségek felmerülése esetén, amelyek lehetetlenné teszik a minták feldolgozását a halszövetek gyűjtését követő 48 órán belül, elfogadható az is, ha a szövetmintákat – 20 °C-on vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten szállító tápfolyadékban lefagyasztják, és a virológiai vizsgálatokat 14 napon belül elvégzik. A halszövetek a vizsgálat előtt azonban csak egyszer fagyaszthatók le és olvaszthatók fel. A halszövetminták lefagyasztásának okáról részletes feljegyzéseket kell vezetni.

I.4.2. A szervek homogenizálása

A laboratóriumban a csövekben lévő halszöveteket teljesen homogenizálni kell (Stomacher készülékkel, elegyítővel vagy steril homokkal teli mozsárban mozsártörővel), és azután az eredeti szállító tápfolyadékban kell szuszpendálni.

Ha a minta 4 cm-nél kisebb hosszúságú egész halakból áll, azokat a végbélnyílás mögötti rész eltávolítása után steril ollóval vagy szikével fel kell darabolni. Ha a minta 4 és 6 cm közötti testhosszúságú egész halakból áll, a belső szerveket kell összegyűjteni, a vesét is beleértve. Ha a minta 6 cm-nél hosszabb egész halakat tartalmaz, a szövetmintákat az I.1. pontban leírtak szerint kell gyűjteni. A szövetmintákat steril ollóval vagy szikével fel kell darabolni, azokat az első bekezdésben ismertetett módon homogenizálni kell, és szállító tápfolyadékban kell szuszpendálni.

A szövetminta és a szállító tápfolyadék közötti végső arányt a laboratóriumban kell beállítani 1:10 értékre.

I.4.3. A homogenizátum centrifugálása

A homogenizátumot hűtött centrifugában, 2 °C és 5 °C között, 2 000–4 000 × g fordulaton, 15 percen át kell centrifugálni, a felülúszót össze kell gyűjteni, amely azután 15 °C-on négy órán át, vagy 4–8 °C-on egész éjszakán át antibiotikummal kezelhető. Ha a minta szállítása szállító tápfolyadékban történt, a felülúszó antibiotikus kezelése elhagyható.

Olyan gyakorlati nehézségek (pl. az inkubátor meghibásodása vagy sejtenyészetekkel kapcsolatos problémák) felmerülése esetén, amelyek lehetetlenné teszik a sejtek beoltását a halszövetminták gyűjtését követő 48 órán belül, a felülúszó lefagyasztható – 80 °C-ra, és a virológiai vizsgálat elvégezhető 14 napon belül.

Ha az összegyűjtött felülúszót – 80 °C-on tárolják, az a mintavételt követő 48 órán belül egyszer újra felhasználható virológiai vizsgálatokhoz.

A sejtek beoltása előtt a felülúszót össze kell keverni a fertőző hasnyálmirigy-elhalás vírusának (IPN-vírus) endemikusan előforduló szerotípusaival szembeni, megfelelően hígított, a felülúszóval azonos mennyiségű antiszérummal, és azzal legalább egy órán keresztül 15 °C-on vagy legfeljebb 18 órán át 4 °C-on inkubálni kell. Az antiszérum titerének legalább 1:2 000 arányúnak kell lennie 50 %-os plakkredukciós vírusneutralizációs próba során.

Az inokulumoknak az IPN-vírus elleni antiszérummal végzett kezelése azt a célt szolgálja, hogy a beoltott sejtenyészetekben megakadályozható legyen az IPN-vírus okozta citopatogén hatás (CPE) kialakulása. Ez csökkenti a virológiai vizsgálatok időtartamát, valamint azon esetek számát, amelyekben a CPE előfordulását a VHSV-re vagy az IHN-re utaló esetleges jelként kellene értékelni.

Ha a minták IPN-től mentesnek minősülő termelési egységekből származnak, az inokulumok IPN-vírus elleni antiszérummal végzett kezelése elhagyható.

I.4.4. Minták előkészítése RT-PCR-en és RT-qPCR-en alapuló felügyeleti programokhoz

Ha a mintákat szállító tápfolyadékban gyűjtötték, az I.4.2. és I.4.3. pontban meghatározott eljárást kell végrehajtani. Centrifugálást követően a felülúszót össze kell gyűjteni és az RNS-t ki kell vonni. Ha közvetlenül a centrifugálás után nem kerül sor további vizsgálatra, a mintákat azonnal le kell fagyasztani – 20 °C-ra vagy annál alacsonyabb hőmérsékletre.

Az RNS-stabilizáló reagensben tartósított halszövetek elemzéséhez a különböző hőmérsékleten tárolt minták esetében az alábbi időintervallumokon belül kell a további műveleteket elvégezni:

37 °C-on tárolt minták: egy nap;

25 °C-on tárolt minták: egy hét;

4 °C-on tárolt minták: egy hónap;

– 20 °C-on tárolt minták: határozatlan idő.

Az RNS-stabilizáló reagensben összevont minták RNS-stabilizáló reagensben lévő egyedi mintaként kezelendők. Az RNS-stabilizáló reagensben összevont minták esetében a mintamennyiség nem haladhatja meg a gyártó által az RNS kivonására szolgáló készleteknél – például Quiagen RNeasy Mini vagy hasonló – ajánlott mennyiséget. Nagyobb minták összevonása esetén a kivonási készleteknek vagy módszereknek igazodniuk kell az összevonáshoz.

Az RNS-stabilizáló reagensben gyűjtött minták nem használhatók sejtenyészteshez.

I.4.5. Minták összevonása RT-qPCR-vizsgálathoz

Mivel a megadott RT-qPCR-protokollok hasonló vagy nagyobb érzékenységgűek, mint a sejtenyésztes módszerek, elfogadható lehet a PCR-hez olyan felülúszót használni sejtenyésztes tápfolyadékban, amely legfeljebb 10 hal összevont szerveiből származó homogenizált halszövetmintából ered. Mivel azonban a PCR-hez használt inokulum sokkal kisebb a sejtenyészteshez használt inokulumnál, az anyagok kivonás céljából történő összegyűjtése előtt minden halszövetet körültekintően homogenizálni kell.

Ugyanez az elv alkalmazandó akkor is, ha a mintagyűjtés RNS-stabilizáló reagensekben történik. Ebben az esetben azonban gyakran nehezen gyűjthető reprezentatív anyag egy csőben akár 10 halból, az összevont mintánkénti halak számát ezért 2–5 egyedre kell csökkenteni.

I.5. Sejtenyészeten végzett virológiai vizsgálat

I.5.1. Sejtenyészetek és tápfolyadékok

Naphalivadék – 2 sejtvonalat (BF-2) vagy szívárványospisztráng-ivarszerv – 2 sejtvonalat (RTG-2), illetve ponty epitheliomából vagy tűzcseleléből származó sejteket (EPC-, ill. FHM-sejtek) kell tenyészteni 20–30 °C-on, megfelelő tápfolyadékban, nevezetesen Eagle-féle tápfolyadékban (MEM) vagy annak módosított változataiban, amelyeket 10 %-os magzati borjúszerummal és állandó koncentrációjú antibiotikumokkal kell kiegészíteni.

A sejtek zárt ampullákban történő tenyésztése esetén a tápfolyadékot bikarbonáttal kell pufferolni. A nyitott egységekben lévő sejttenyésztő tápfolyadékok trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid (Trisz-HCl) (23 mM) és nátrium-bikarbonáttal (6 mM) pufferolhatók. A pH-értéknek $7,6 \pm 0,2$ -nek kell lennie.

A halszövetmintával végzendő beoltásra használt sejttenyészeteknek frissnek, szokásos esetben – amennyiben lehetséges – egynapos, egyrétegű sejttenyészeteknek kell lenniük, azonban a 4–48 órás sejttenyészetek is elfogadhatók. A sejteknek a beoltás során aktív növekedési fázisban kell lenniük.

I.5.2. A sejttenyészetek beoltása

Az antibiotikummal kezelt szervszuszpenziót két hígításban – mégpedig az elsődleges hígításban és azon kívül annak 1:10 arányú hígításaként – kell beoltani a sejttenyészetekbe, így a szövetminta 1:100, illetve 1:1 000 arányú végső hígítását elérve a sejttenyésztő tápfolyadékban (a homológ interferencia elkerülése érdekében). Az I.5.1. pontban foglaltaknak megfelelően legalább két sejtvonalat kell beoltani. Az inokulum mérete és a sejttenyésztő tápfolyadék mennyisége közötti aránynak 1:10 körülnek kell lennie.

Minden hígításhoz és minden sejtvonalhoz egy legalább 2 cm²-es területet – egy 24 lyukú sejttenyésztő lemez egy vájulatának megfelelő területet – kell használni. Amennyiben lehetséges, sejttenyésztő lemezeket kell használni.

I.5.3. A sejttenyészetek inkubálása

A beoltott sejttenyészeteket 15 °C-on, hét–tíz napig kell inkubálni. Ha a sejttenyésztő tápfolyadék színe pirosról sárgára változik, az a tápfolyadék savasodását jelzi; ekkor a pH-értéket steril bikarbonátoldattal vagy ennek megfelelő anyaggal be kell állítani a sejtek vírusfertőzés iránti fogékonyságának biztosítása érdekében.

Legalább hathavonként – vagy amennyiben a sejtek fogékonyságának csökkenése gyanítható – el kell végezni a fagyasztott VHSV- és IHNV-törzsek titrálását a sejttenyészetek fertőzés iránti fogékonyságának ellenőrzése céljából. Lehetőség szerint a III. szakaszban meghatározott eljárást kell alkalmazni.

I.5.4. Mikroszkópos vizsgálat

A beoltott sejttenyészeteket a CPE előfordulásának megállapítása céljából rendszeresen, legalább hetente háromszor kell vizsgálni 40–150-szeres nagyításban. Nyilvánvaló CPE észlelése esetén a vírusazonosítási eljárást az I.6. pontnak megfelelően azonnal meg kell kezdeni.

I.5.5. Passzálás

Ha az elsődleges, 7–10 napos inkubálást követően nem alakul ki CPE, akkor friss sejttenyészetekkel passzálást kell végezni, amelynek során az elsődleges sejttenyészetekéhez hasonló területet kell használni.

Az elsődleges tenyészetet képező összes tenyésztő/tenyésztőlemez-vájulatból származó tápfolyadék (felülúszó) azonos mennyiségeit 7–10 napos beoltást követően a sejtvonalaknak megfelelően össze kell gyűjteni. Az összegyűjtött anyagot ezt követően be kell oltani hígítatlanul és az I.5.2. pontban foglaltak szerint 1:10 arányban hígítva az eredetivel megegyező sejttenyészetekbe (amely a felülúszó 1:10, illetve 1:100 arányú végső hígítását eredményezi). Másik lehetőségként az elsődleges tenyészet azonos mennyiségeit képező tápfolyadék 10 %-át közvetlenül be kell oltani a friss sejttenyészetet tartalmazó vájulatba (vájulatból vájulatba történő passzálással). A beoltást megelőzheti a hígítások IPN-vírus elleni, az I.4.3. pontban foglaltak szerinti, megfelelően hígított antiszérummal végzett előinkubálása.

A beoltott sejttenyészeteket ezt követően 7–10 napig 15 °C-on inkubálni kell és az I.5.4. pontnak megfelelően meg kell vizsgálni.

Ha az inkubálás első három napjában toxikus CPE fordul elő, akkor már ebben a stádiumban passzálást kell végezni, de azután a sejteket hét napon át inkubálni kell, majd újra passzálást kell végezni, további hét napig tartó inkubálással. Ha három nap után alakul ki toxikus CPE, a sejteket egyszer passzálni kell, és az elsődleges beoltástól számított 14 napos időtartam eléréseig inkubálni kell. Az inkubáció utolsó hét napján nem mutatkozhat toxicitásra utaló jel.

Ha az antibiotikummal való kezelés ellenére előfordul bakteriális fertőzés, akkor a passzálás előtt 15–30 percig 2–5 °C-on és 2 000–4 000 × g fordulaton centrifugálást kell végezni, vagy a felülúszót 0,45 µm-es szűrőn (alacsony fehérjekötő-képességű membránon) át kell szűrni, vagy mindkét műveletet el kell végezni. Ezenkívül a passzálást ugyanazzal az eljárással kell végezni, mint a toxikus CPE észlelésekor az e pont negyedik bekezdésében ismertetett esetben.

Ha nem fordul elő CPE, a próba negatívnak nyilvánítható.

I.6. Vírusazonosítás

Ha a sejtenyészetben CPE észlelhető, a tápfolyadékot (felülúszót) össze kell gyűjteni és a következő módszerek legalább egyikével kell megvizsgálni: enzimhez kötött immunszorbens próba (ELISA), immunfluoreszcens (IF-) próba, neutralizáció, reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR) vagy valós idejű reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-qPCR). Ha e próbák nem teszik lehetővé a vírus egy héten belüli pontos azonosítását, akkor a felülúszót azonnali azonosítás céljából továbbítani kell a nemzeti referencialaboratóriumba vagy a 2006/88/EK irányelv VI. mellékletében említett, halbetegségekkel foglalkozó uniós referencialaboratóriumba.

I.6.1. ELISA

A vírus izolátum azonosításához kettősellenanyag-szendvics-ELISA próbát kell végezni. A mikrotiterlemezeket vájulatónként 50 µl (0,9 pg), IHNV vagy VHSV elleni nyúlantiszérumból származó, 15 mM nátrium-azidot tartalmazó (9,6 pH-értékű) karbonátpufferben hígított, bizonyított minőségű, A-proteinnel tisztított immunglobulinokkal kell érzékenyíteni, és 18 órától két hétig terjedő időszakra 4 °C-on inkubálni kell.

Az 1 % Triton X-100-at tartalmazó minták mindegyikét és a pozitív kontrollokat hígító lemezen négyféle hígításban – hígítatlan, 1:4, 1:16 és 1:64 arányban – pufferoldattal (foszfáttal pufferelt sóoldattal, (PBS)-T-BSA, 1 %-os BSA) kell hígítani. Az ELISA-lemezeket 0,05 % Tween-20 (PBS-T) detergenst tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldatban kell mosni, és minden hígításból 50 µl-t át kell mérni a hígító lemezről a mosott és érzékenyített ELISA-lemezre.

Az ELISA-lemezeket ezután 37 °C-on 30 percig inkubálni kell. Ezt követően a lemezeket mosni kell és 37 °C-on 30 percig speciális monoklonális ellenanyagokkal (a VHSV kimutatásához IP5B11 típusú, az IHNV kimutatásához Hyb 136-3 típusú ellenanyagokkal) inkubálni kell. 50 µl, 1:1 000 arányban PBS-T-BSA-ban hígított, tormaperoxidázzal (HRP-) konjugált nyúl antigeér-ellenanyagokat kell átvenni az ELISA-lemezre.

Végezetül az újabb mosást követően vájulatónként 50 µl ortofenilén-diamin (OPD) hozzáadásával kell láthatóvá tenni a reakciókat. Az ELISA-lemezeket 20 percig szobahőmérsékleten, sötétben kell inkubálni, és a reakciót vájulatónként 100 µl mennyiségű 0,5 M H₂SO₄ hozzáadásával le kell állítani.

Az abszorbanciát ELISA-leolvasóban, 492–620 nm hullámhosszon kell mérni. A minták a vizsgálati eredményeknek, valamint a pozitív és a negatív kontrollok abszorbanciaértékeinek az összevetését követően nyilváníthatók pozitívnak vagy negatívnak. A hígítatlan anyag esetében 0,5-nél alacsonyabb kombinált abszorbanciájú (A) minták negatívnak, a 0,5 és 1,0 közötti A-értékekkel rendelkező minták kétesnek, az 1,0-nál magasabb A-értékkel rendelkező minták pedig pozitívnak tekintendők.

Az e pontban említett ELISA próbák helyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú ELISA próbák is alkalmazhatók.

I.6.2. Immunfluoreszcens (IF-) próba

A VHSV és az IHNV jegyzékbe foglalt kórokozók azonosítását „Black” típusú 96 lyukú lemezekben, hagyományos 24 lyukú lemezekben vagy 24 lyukú lemezek vájulataiban lévő fedőlemezekben elszaporított sejtek fertőzésével kell végezni. Az IHNV-nek, a VHSV-nek vagy mindkettőnek a sejtek fedőlemezekben történő megfertőzésével végzett azonosítása esetén az alábbi protokoll alkalmazandó:

- A fedőlemezekben a sejteket olyan sűrűségben kell beoltani, amely 24 órás tenyésztés után 60–90 %-os összefüggő sejtréteg kialakulásához vezet. Amennyiben lehetséges, erre a célra EPC-sejteket kell használni az üvegfelületekhez való erős tapadásuk miatt, de más sejt vonalak, például a BF-2, az RTG-2 vagy az FHM is használhatók. 150 µl sejtenyészet-felülúszót két különböző (1:10 és 1:1 000 arányú) hígításban két példányban egynapos monorétegekre kell oltani és 15 °C-on 24 órán át inkubálni kell.
- Ezt követően a sejtenyésztő tápfolyadékot el kell távolítani, és a fertőzött sejt-monorétegeket 0,5 ml jéghideg (80 tömegszázalékos) vizes acetondalattal kell fixálni. A fixálást vegyifülkében, 15 percig szobahőmérsékleten kell végezni, majd az acetondalattot el kell távolítani, és a fedőlemezeket legalább 30 percig levegőn kell szárítani. Ebben a szakaszban a lemezeket vagy azonnal fel kell dolgozni, vagy további felhasználás céljából – 20 °C-on kell tárolni.
- Speciális monoklonális ellenanyagokat (a VHSV kimutatásához MAb IP5B11 típusú, az IHNV kimutatásához Hyb 136-3 típusú ellenanyagokat) 7,2 pH-értékű, a monoklonális ellenanyaggyártó által ajánlott hígítású 0,01 M PBST-ben kell hígítani; a fixált monoréteghez vájulatónként 50–100 µl-t kell adni, és a lemezeket 37 °C-on egy órán keresztül nedves kamrában kell inkubálni.

- d) A fedőlemezeket 0,05 % Tween-20-at tartalmazó PBS-ben (PBS-T) háromszor óvatosan meg kell mosni, és a puffert az utolsó öblítés után teljesen el kell távolítani. A sejteket ezt követően 37 °C-on egy órán keresztül elsődleges ellenanyagként fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) – vagy tetrametil-rodamin-5(-és-6-)izotiocianáttal (TRITC) konjugált – antigein immunoglobulin-ellenanyagokkal kell inkubálni, a beszállító útmutatása szerint kell hígítani, PBS-T-ben újra meg kell mosni, majd meg kell szárítani. A megfestett tenyészeteket glicerines sóoldattal fedett üveg tárgylemezekre kell helyezni, és azokat beeső ultraibolya (UV) fényben meg kell vizsgálni. Ehhez 10-, illetve 12-szeres okulárt és 25- vagy 40-szeres objektívet kell használni, > 0,7-es, illetve > 1,3-as numerikus rekeszértékkel.

A sejtenyészetek, a fixálás és a referenciaminőségű ellenanyagok tekintetében más, igazoltan hasonló hatékonyságú IF-módszerek is alkalmazhatók.

I.6.3. Neutralizáció

A sejteket az összegyűjtött felülúszóból centrifugálással (2 000–4 000 × g) vagy alacsony fehérjekötő-képességű membránon (0,45 µm) keresztüli szűréssel kell eltávolítani, és a felülúszót a sejtenyésztő tápfolyadékban 1:100 és 1:10 000 arányban kell hígítani.

A legalább kétféle felülúszó-hígítás egyenlő mennyiségeit a következő reagensek azonos mennyiségeivel össze kell keverni, és azokat 15 °C-on 60 percig külön-külön inkubálni kell:

- VHSV-vel szembeni csoportspecifikus ellenanyagot tartalmazó szérum 1:50 (V/V) hígításban;
- IHNV-vel szembeni csoportspecifikus ellenanyagot tartalmazó szérum 1:50 (V/V) hígításban;
- az IPNV endemikusan előforduló szerotípusai ellen termelt antiszérumok elegye 1:50 (V/V) hígításban;
- a tápfolyadék önmagában (pozitív kontroll).

A vírusokat tartalmazó felülúszó-szérumok elegyének mindegyikéből legalább két sejtenyészetet 50–50 µl inokulummal be kell oltani, majd 15 °C-on inkubálni kell. A CPE kialakulását az I.5.4. pontban foglaltaknak megfelelően kell ellenőrizni.

A neutralizációs próbákra nem reagáló VHSV-törzseket és -izolátumokat IF vagy ELISA segítségével kell kimutatni.

Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú neutralizációs próbák is alkalmazhatók.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. A vírus-RNS előkészítése

Az RNS-sel kapcsolatos összes műveletet jégen, kesztyűben kell végezni.

Az RNS-t – a gyártó útmutatása szerint – a fenol-kloroform módszerrel vagy RNS-affinitásoszlop segítségével kell kivonni. Az alábbi pontokban részletezett RT-PCR-protokolloknál történő felhasználásra alkalmas kiváló minőségű RNS-t előállító, kereskedelmi forgalomban kapható RNS-kivonási készletek használata megengedett.

Az RNS-t RNáz-mentes desztillált vízben (konkrétan 0,1 % dietil-pirokarbonáttal kezelt vízben) vagy megfelelő elúciós pufferben újra kell szuszpendálni.

I.6.4.2. RT-PCR

Az IHNV kimutatásához a következő primereket kell alkalmazni:

forward primer: 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3';

reverz primer: 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

A következő ciklusokat kell alkalmazni (egylépcsős RT-PCR): 1 ciklus 50 °C-on 30 percig; 1 ciklus 95 °C-on 2 percig; 30 ciklus 95 °C-on 30 másodpercig, 50 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 60 másodpercig; 1 ciklus 72 °C-on 7 percig és 4 °C-on áztatás.

A VHSV kimutatásához a következő primereket kell alkalmazni:

VN forward primer: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3';

VN reverz primer: 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3'.

A következő ciklusokat kell alkalmazni (egylépcsős RT-PCR): 50 °C-on 30 percig, 95 °C-on 15 percig, 35 ciklus 94 °C-on 30 másodpercig, 55 °C-on 30 másodpercig és 68 °C-on 60 másodpercig. Ezt követően a reakciót 68 °C-on 7 percig fenn kell tartani.

Az RT-PCR reakciók mennyiségét és specifikusságát etidium-bromiddal festett 1,5 %-os agarózgélén végzett gélelektroforézissel kell értékelni és UV-átvilágítással kell megfigyelni. Az IHNV esetében 693 bp méretű PCR-amplikon figyelhető meg. A VHSV esetében ez a méret 505 bp.

A PCR eredményei a műveletek elvégzésének körülményeitől függően változhatnak, azaz a használt PCR-készüléktől függően előfordulhat, hogy a hőmérsékleti protokollok optimalizálásra szorulnak. Ezenfelül fals primer-kötődés vagy kontamináció miatt előfordulhatnak fals pozitív eredmények. Ezért a kétségek elkerülése érdekében megfelelő pozitív és negatív kontrollokat és szekvenált amplikonokat is alkalmazni kell. A VHSV-primerek esetében különösen gondosan kell eljárni a BF-2 sejtek használatakor, mivel a primerek reakcióba léphetnek a DNS-/RNS-sejtvonalakkal, és hasonló méretű hamis pozitív eredményeket hozhatnak. A BF-2 sejtekből származó felülűszó vizsgálatok az amplifikált PCR-fragmenseket szekvenálni kell.

I.6.4.3. A VHSV esetében alkalmazott RT-qPCR

A VHSV esetén az amplifikációt a következő primerekkel és próbával kell végezni:

forward primer: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3';

reverz primer: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3';

valamint próba: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Egylépcsős RT-qPCR:

Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ciklusparaméterek: 50 °C-on 30 percig, 95 °C-on 15 percig, 40 ciklus 94 °C-on 15 másodpercig, 60 °C-on 40 másodpercig, 72 °C-on 20 másodpercig; szükség esetén kiigazítandó. Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú RT-PCR- vagy RT-qPCR-változatok is alkalmazhatók.

I.6.4.4. Az IHNV esetében alkalmazott RT-qPCR

Az IHNV esetén az amplifikációt a következő primerekkel és próbával kell végezni:

forward primer: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3';

reverz primer: 5'-TTCTTTGCGGCTTGTTGA-3';

valamint próba: 5' 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Kétlépcsős RT-qPCR:

Mivel a következő próba kétlépcsős amplifikáción alapul, a fertőzés megakadályozása érdekében a csövek egyik reakcióból a másikba mozgatásakor különös gondossággal kell eljárni.

Ciklusparaméterek (az RT-lépcsőt követően): 50 °C-on 2 percig, 95 °C-on 10 percig, azt követően 40 ciklus 95 °C-on 15 másodpercig és 60 °C-on 1 percig; szükség esetén kiigazítandó.

Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú RT-PCR- vagy RT-qPCR-változatok is alkalmazhatók.

II. Járványkitörés gyanúja esetén alkalmazandó, a VHS, az IHN vagy mindkettő gyanújának megerősítésére vagy kizárására szolgáló részletes diagnosztikai módszerek és eljárások

Amennyiben a 2006/88/EK irányelv 57. cikke b) pontjának megfelelően laboratóriumi vizsgálat szükséges az IHN, a VHS vagy mindkettő jelenlétének az I. melléklet 1. részének II.3. pontjában meghatározott diagnosztikai módszerekkel történő megerősítéséhez vagy kizárásához, az alábbi részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók:

- hagyományos vírusizolálás, majd szérumneutralizáció, valamint immunkémiai vagy molekuláris vírusazonosítás;
- RT-PCR vagy RT-qPCR útján végzett víruskimutatás;
- egyéb diagnosztikai módszerek, például IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

- II.1. Hagyományos vírusizolálás azt követő vírusazonosítással
- II.1.1. Minták kiválasztása
Legalább 10, az IHN vagy a VHS tipikus tüneteit mutató halat kell vizsgálatra kiválasztani.
- II.1.2. A halakból származó minták előkészítése és szállítása
A hagyományos vírusizolálás céljából történő előkészítéskor és szállításkor az I.2. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.1.3. Kiegészítő diagnosztikai anyag gyűjtése
A kiegészítő diagnosztikai anyag hagyományos vírusizolálás céljából végzett gyűjtésekor az I.3. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.1.4. A minták sejtenyészet-vizsgálatra történő előkészítése
A minták hagyományos vírusizolálás céljából végzett sejtenyészet-vizsgálatra történő előkészítésekor az I.4. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.1.5. Sejtenyészeten végzett virológiai vizsgálat
A hagyományos vírusizolálás céljából végzett virológiai vizsgálatkor az I.5. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.1.6. Vírusazonosítás
A hagyományos vírusizolálás céljából végzett vírusazonosításkor az I.6. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.2. RT-qPCR útján történő víruskimutatás
- II.2.1. Minták kiválasztása
A minták RT-qPCR útján végzendő víruskimutatás céljából történő kiválasztásakor az I.1.2. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.2.2. A halakból származó minták előkészítése és szállítása
Az RT-qPCR útján végzendő víruskimutatás céljából történő előkészítéskor és szállításkor az I.2. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.2.3. Kiegészítő diagnosztikai anyag gyűjtése
A kiegészítő diagnosztikai anyag RT-qPCR útján végzendő víruskimutatás céljából történő gyűjtésekor az I.3. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.2.4. Minták előkészítése RT-qPCR céljára
A minták RT-qPCR útján végzendő víruskimutatás céljából történő előkészítésekor az I.6.4.1. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.2.5. RT-qPCR
Az RT-qPCR útján történő víruskimutatáskor az I.6.4.1., I.6.4.3. és I.6.4.4. pontban ismertetett módszereket és eljárásokat kell követni.
- II.3. Más diagnosztikai módszerek
Az I.4.3. pontban foglaltak szerint előkészített felülúszó az I.6.1. pontnak megfelelően továbbítható ELISA próbára, az I.6.2. pontnak megfelelően továbbítható indirekt fluoreszcens ellenanyag-vizsgálatra (IFAT), illetve az I.6.4. pontnak megfelelően továbbítható RT-PCR-vizsgálatra. A szövetminta alávethető más diagnosztikai módszereknek is, például fagyasztott metszeteken végzett IFAT-vizsgálatnak és formalinban fixált szövetmintán végzett immunhisztokémiai vizsgálatnak. E gyors módszerek mellett a II.a) vagy a II.b) pontnak megfelelően a mintavételt követő 48 órán belül virológiai vizsgálatot kell végezni, amennyiben:
- negatív eredmény mutatható ki, vagy
 - pozitív eredmény mutatható ki a VHS vagy IHN előfordulásának első eseténél vett anyaggal.

III. A sejttenyészetek fertőzés iránti fogékonyságának ellenőrzésére irányuló titrálási eljárás

A sejttenyészetek fertőzés iránti fogékonyságának ellenőrzésére irányuló, az I.5.3. pontban említett titráláskor az e pont alábbi bekezdéseiben meghatározott eljárások követendők.

Legalább két VHSV- és egy IHNV-izolátumot kell használni. Az izolátumoknak az Európai Unió belső előforduló vírusok fő csoportját kell képviselniük, mégpedig a VHSV esetében egy édesvízi, a szivárványos pisztrángból származó kórokozó izolátumát, valamint egy tengeri, a nagy rombuszhalat megbetegítő izolátumot, az IHNV esetében pedig egy, a szivárványos pisztrángot megbetegítő, Európai Unió belüli törzs izolátumát. A tagállamokból származó, pontosan meghatározott izolátumokat kell használni. Alacsony passzázsszámú sejt kultúrán, sejttenyésztő palackban, a VHSV esetében BF-2 vagy RTG-2 sejteken, az IHNV esetében EPC- vagy FHM-sejteken kell szaporítani a vírustörzseket. Legalább 10 % szérumot tartalmazó sejttenyésztő tápfolyadékot kell használni. A beoltáshoz alacsony MOI érték (< 1) alkalmazandó.

Teljes CPE esetén a vírust a sejttenyészet felülúszójának $2\ 000 \times g$ fordulaton, 15 percig végzett centrifugálásával le kell fejtetni, $0,45\ \mu\text{m}$ -es membránszűrőn át kell szűrni és megjelölt fagyasztócsövekbe kell adagolni. A vírust $-80\ ^\circ\text{C}$ -on kell tárolni.

A fagyasztás után egy héttel minden víusból három párhuzamos ampullát hideg vízben fel kell olvasztani, és azokat a megfelelő sejt vonalon titrálni kell. Legalább hathavonként vagy a sejt vonal fogékonysága csökkenésének gyanúja esetén minden vírusizolátumot fel kell olvasztani és titrálni kell.

A titrálási eljárást részletesen le kell írni és mindig ugyanazon eljárást kell követni.

A végpontig történő titrálás során minden hígítási lépésnél legalább hat párhuzamos ampullát kell alkalmazni. A titereket össze kell hasonlítani a korábban kapott titerekkel. Ha a három vírusizolátum bármelyikének titere egy vagy több \log_2 értékkel csökken az eredeti titerhez képest, akkor a sejt vonal többé nem használható felügyeleti célokra.

Ha a laboratóriumban különböző sejt vonalakat tartanak, akkor minden vonalat külön-külön vizsgálni kell.

A nyilvántartásokat legalább tíz évig meg kell őrizni.

2. RÉSZ

A KOI-HERPESZVÍRUSBETEGSÉG (KHVD) FELÜGYELETÉRE ÉS MEGERŐSÍTÉSÉRE SZOLGÁLÓ RÉSZLETES DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK

I. A KHVD jelenlétének megerősítésére vagy gyanújának kizárására szolgáló részletes diagnosztikai módszerek és eljárások

Amennyiben a 2006/88/EK irányelv 57. cikke b) pontjának megfelelően laboratóriumi vizsgálat szükséges a KHVD jelenlétének megerősítéséhez vagy gyanújának az I. melléklet 2. részének III. szakaszában meghatározott diagnosztikai módszerekkel történő kizárásához, az e rész I.1–I.2. pontjában meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

I.1. A halakból származó minták előkészítése

Diagnosztikai célra a halak elküldhetők élve vagy leölve, lezárt aseptikus tárolóedényekbe külön-külön csomagolva, illetve alternatív megoldásként 80–100 %-os alkoholban vagy vírusszállító tápfolyadékban tartósított (a begyűjtést követően 48 órán belül feldolgozandó) fagyasztott szervek vagy szervdarabok is felhasználhatók a hagyományos PCR- vagy qPCR-alapú módszerekkel végzett vizsgálathoz.

A KHV kimutatásához kopolyút és vesét kell gyűjteni; ezenfelül lép, agyvelő és bél kerülhet egy további külön mintába. Akut esetekben legfeljebb öt halból származó szövetminta összevonható.

Ezen túlmenően egyes esetekben nem letális minták, például vér, kopolyútból vett tamponminták, kopolyútbiopsziás minta és nyálkahártya-kaparek is felhasználható (azaz a KHV jelenlétének gyanúja esetén nagyon értékes halak is felhasználhatók).

I.1.1. DNS-kivonás

A DNS kivonását szabványműveleti eljárásoknak megfelelően kell végezni.

Az I.2. pontban említett PCR-protokollokkal való felhasználásra alkalmas kiváló minőségű DNS-t előállító, kereskedelmi forgalomban kapható DNS-kivonási készletek használata megengedett.

I.2. Polimeráz láncreakción (PCR) alapuló kórokozó-kimutatás és -azonosítás

I.2.1. KHV-kimutatásra szolgáló qPCR

A KHV qPCR útján történő kimutatásához az alábbi qPCR-próba alkalmazandó:

forward primer (KHV-86f): 5'-GACGCCGGAGACCTTGTG-3';

reverz primer (KHV-163r): 5'-CGGGTCTTATTTTGTCTTGT-3';

valamint próba (KHV-109p): 5'-FAM-CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-3'.

Ciklusparaméterek: 1 ciklus 95 °C-on 15 percig, azt követően 40 ciklus 94 °C-on 15 másodpercig és 60 °C-on 60 másodpercig. Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú qPCR-változatok is alkalmazhatók.

I.2.2. KHV-kimutatásra szolgáló hagyományos PCR

Az e pontban ismertetett, a KHV timidin-kináz (TK) génjére irányuló próba alkalmazandó. Az itt ismertetett PCR-módszer helyett azonban igazoltan hasonló érzékenységgű és specificitású egyéb PCR-rendszerek is alkalmazhatók.

Forward primer (KHV-TKf): 5'-GGTTACCTGTAC GAG-3';

Reverz primer (KHV-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Ciklusparaméterek: 1 ciklus 95 °C-on 5 percig, azt követően 35 ciklus 95 °C-on 30 másodpercig, 52 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 1 percig és 1 ciklus 72 °C-on 10 percig. A termék méretének 409 bp-nak kell lennie.

A PCR eredményei a műveletek elvégzésének körülményeitől függően változhatnak, azaz a használt PCR-készüléktől függően előfordulhat, hogy a hőmérsékleti protokollok optimalizálásra szorulnak. Ezenfelül fals primerkötődés vagy kontamináció miatt előfordulhatnak fals pozitív eredmények. Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú PCR-változatok is alkalmazhatók.

Egy adott területen belüli első kimutatást szekvenálással kell megerősíteni, vagy egy nemzeti referencialaboratóriumba vagy a 2006/88/EK irányelv VI. mellékletében említett, halbetegségekkel foglalkozó uniós referencialaboratóriumba kell küldeni.

II. A KHVD felügyeletére szolgáló részletes diagnosztikai módszerek és eljárások

A KHVD-re vonatkozó bizonyos egészségügyi státusoknak az I. melléklet 2. része I. szakaszában meghatározott megszerzése vagy fenntartása céljából – az említett melléklet 2. részének II. vagy III. szakaszában foglalt diagnosztikai módszerekkel – végzett mintavétel és laboratóriumi vizsgálat során az e rész alábbi II.1. és II.2. pontjában meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

II.1. A halakból származó minták előkészítése

Amennyiben lehetséges, a vírusnak kedvező hőmérsékleti tartományban hosszabb ideig (azaz 15–26 °C-on két-három hétig) tartott halakból kell mintát venni. Amennyiben lehetséges, a KHV kimutathatóságának javítása érdekében a mintákat a vírushordozó státusú halakban a vírus reaktiválását esetlegesen kiváltó gazdálkodási gyakorlatokat, például a háló kivetését vagy a szállítást követő 24 órán belül, de legkésőbb 72 órán belül kell gyűjteni.

A KHVD felügyelete céljából a halak elküldhetők élve vagy leölve, lezárt aszeptikus tárolóedényekbe külön-külön csomagolva, illetve alternatív megoldásként 80–100 %-os alkoholban vagy vírusszállító tápfolyadékban tartósított (a begyűjtést követően 48 órán belül feldolgozandó) fagyasztott szervek vagy szervdarabok is felhasználhatók a hagyományos PCR-alapú módszerekkel végzett vizsgálathoz. A KHVD felügyeletéhez kopolytű- és veseszövetet kell gyűjteni.

A KHVD felügyelete céljából a minták összevonása lehetőleg kerülendő. Ha szükséges az összevonás, legfeljebb két halból származó szövetminta vonható össze. A nagyobb mintákat mozsárban mozsártörővel vagy Stomacher készülékkel kell homogenizálni, a részmintákat pedig a derítés előtt ki kell nyerni a DNS-kimutatáshoz. Alternatív megoldásként a mintába felvett és feltároló csőbe (líziscsőbe) helyezett szövetek mindegyikéből gyűjthető rész minta.

II.1.1. DNS-kivonás

A DNS kivonását szabványműveleti eljárásoknak megfelelően kell végezni. A II.2. pontban meghatározott PCR-protokollokkal való felhasználásra alkalmas kiváló minőségű DNS-t előállító, kereskedelmi forgalomban kapható DNS-kivonási készletek használata megengedett.

Az elfogadható szövet/tápfolyadék arány 1:9 w/v. A vizsgálatokhoz 20–25 mg szövetmintát kell felhasználni.

II.2. A KHVD PCR-alapú módszerekkel végzett felügyelete

A KHV felügyeletéhez qPCR alkalmazandó. Ha korábban pozitívként nem megerősített területen pozitív minták jelennek meg, a vizsgálati eredményeket az alábbiak valamelyikével kell megerősíteni:

a) a mintákból származó PCR-termék vagy fészek PCR-termék szekvenálásával.

A létrejött tiszta konszenzusszekvenciának (legalább 98 %-ban) illeszkednie kell ezekhez a referenciaszekvenciákhoz;

b) vagy a minták megerősítés céljából nemzeti referencialaboratóriumba is küldhetők.

II.2.1. KHV-kimutatásra szolgáló qPCR

Az alábbiakban ismertetett qPCR alkalmazandó:

forward primer (KHV-86f): 5'-GACGCCGAGACCTTGTG-3';

reverz primer (KHV-163r): 5'-CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3';

valamint próba (KHV-109p): 5'-FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-3'.

Ciklusparaméterek: 1 ciklus 95 °C-on 15 percig, azt követően 50 ciklus 94 °C-on 15 másodpercig és 60 °C-on 60 másodpercig.

A qPCR eredményei a műveletek elvégzésének körülményeitől függően változhatnak, azaz a használt PCR-készüléktől függően előfordulhat, hogy a hőmérsékleti protokollok optimalizálásra szorulnak. Ezenfelül fals primerkötődés vagy kontamináció miatt előfordulhatnak fals pozitív eredmények. Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú qPCR-változatok is alkalmazhatók.

II.2.2. A KHV kimutatásának megerősítésére szolgáló hagyományos PCR

A KHV-fertőzés jelenlétének megerősítéséhez az alábbi 2.1. táblázatban ismertetett generikus fészek-PCR, majd az amplifikált termék szekvenálása alkalmazandó.

2.1. táblázat

Primerek, valamint az összes cyprinid-herpeszvírusra (CyHV-1, CyHV-2 és CyHV-3) irányuló fészek PCR-próba feltételei

Primer neve	Szekvencia	Ciklusparaméterek	Termék mérete
CyHVpol-forward	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	PCR első köre	362 bp
CyHVpol-reverz	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'	1 ciklus: 95 °C-on 2 percig 40 ciklus: 95 °C-on 30 másodpercig 55 °C-on 30 másodpercig 72 °C-on 45 másodpercig 1 ciklus: 72 °C-on 10 percig	

Primer neve	Szekvencia	Ciklusparaméterek	Termék mérete
CyHVpol-belső forward	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	PCR második köre 1 ciklus: 95 °C-on 2 percig	339 bp
CyHVpol-belső reverz	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3'	40 ciklus: 95 °C-on 30 másodpercig 55 °C-on 30 másodpercig 72 °C-on 45 másodpercig 1 ciklus: 72 °C-on 10 percig	

A PCR eredményei a műveletek elvégzésének körülményeitől függően változhatnak, azaz a használt PCR-készüléktől függően előfordulhat, hogy a hőmérsékleti protokollok optimalizálásra szorulnak. Ezenfelül fals primerkötődés vagy kontamináció miatt előfordulhatnak fals pozitív eredmények. Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ehelyett igazoltan hasonló hatékonyságú qPCR-változatok is alkalmazhatók.

A szekvenálást a laboratórium vagy szekvenálásra szakosodott külső cégek végezhetik el. A szekvenálás eredményeit a szekvenciák ismert KHV-referenciaszekvenciákhoz (Gen Bank hozzáférési számok: AP008984, DQ657948 és DQ177346) illesztésével kell elemezni. A létrejött tiszta konszenzusszekvenciának legalább 98 %-ban egyeznie kell ezekkel a referenciaszekvenciákkal.

3. RÉSZ

A LAZACOK FERTŐZŐ VÉRSZEGÉNYSÉGÉNEK (ISA) FELÜGYELETÉRE ÉS MEGERŐSÍTÉSÉRE SZOLGÁLÓ RÉSZLETES DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK

I. Az ISA felügyeletére és az ellene való védekezésre szolgáló mintavételi eljárások

A mintavétel és a laboratóriumi vizsgálat során az I. melléklet 3. részében meghatározott felügyeleti vagy felszámolási programokhoz, illetve az ISA jelenlétének a 2006/88/EK irányelv 57. cikke b) pontja szerinti megerősítéséhez vagy kizárásához az e szakasz I.1., I.2 és I.3. pontjában meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

I.1. A halakból származó minták előkészítése

Az ISA jelenlétének laboratóriumi vizsgálatához a halminták összevonása lehetőség szerint kerülendő. Az ISA felügyelete céljából azonban 2–5 halból származó minta összevonása elfogadható.

A mintául szolgáló összes halból szövetet kell venni a fordított transzkripció polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) végzendő elemzéshez. Steril eszközt használva egy darabot ki kell venni a halak középveséjéből és 1 ml igazolt hatékonyságú RNS-stabilizáló oldatot tartalmazó mikrocentrifuga-csőbe kell helyezni. Egy szállítóoldatot tartalmazó csőbe legfeljebb öt halból származó szövet gyűjthető, amely így egy összevont mintát alkot. Egy mintában a szövetek tömegének 0,5 g-nak kell lennie. Ha a halak az előírt tömegű minta vételéhez túl kicsik, vese-, szív-, lép-, máj- vagy *pyloric caeca*-darabok vehetők – ilyen sorrendben – a 0,5 g eléréséig.

A szövettani vizsgálatra szánt minták csak az ISA jelenlétére utaló klinikai tüneteket vagy kórbonctani elváltozásokat mutató, szabályos alkatú, frissen leölt halakból vehetők. Mintát kell venni bármilyen külső vagy belső sérülésből, valamint szike segítségével minden esetben mintát kell venni az egyes halak középveséjéből, szívéből, májából, hasnyálmirigyéből, beleiből, kopoltyúiból és lépéből, amelyet 8–10 térfogat-százalékos puffertartalmú formalinos sóoldatba kell helyezni. A fixáló szövethez viszonyított arányának a szövet kielégítő tartósságának biztosítása érdekében legalább 20:1-nek kell lennie. Az immunhisztokémiai (IHC-) vizsgálatokhoz a középveséből és a szívből kell mintát venni.

A mintául szolgáló összes halból szövetet kell venni sejtenyészetben végzett virológiai vizsgálathoz. Steril eszközt használva darabokat kell venni a halak májából, elő- vagy középveséjéből, szívéből és lépéből, és ezeket 9 ml szállító tápfolyadékot tartalmazó műanyag csövekbe kell helyezni. Egy szállítóoldatot tartalmazó csöbe legfeljebb 5 halból vett szövet tehető, amely így egy összevont mintát alkot. Egy mintában a szövetek tömegének $1,0 \pm 0,5$ g-nak kell lennie.

I.2. A halakból származó minták szállítása

Egész halak is szállíthatók a laboratóriumba, ha az e szakasz 3. pontjában ismertetett hőmérsékleti követelmények a szállítás során teljesíthetők. Az egész halakat nedvszívó papírba kell csomagolni, és műanyag tasakban, az említett pontban foglaltaknak megfelelően hűtve kell szállítani.

Élő halak is szállíthatók, de csak a halbetegségekkel foglalkozó nemzeti referencialaboratórium felügyelete mellett és az élő halak szállításakor felmerülő további fertőtlenítési és biológiai biztonsági szempontok figyelembevételével.

A vérmintákat és a halak virológiai vizsgálatra vagy RT-PCR-elemzésre szánt szöveteit tartalmazó csöveket szigetelt tartályokba, például vastag falú polisztirol-dobozokba kell helyezni, elegendő jéggel vagy jégakkumulációval, hogy a laboratóriumig történő szállítás során a minták hűtése biztosítható legyen. A fagyasztás kerülendő, és átvételkor a szállítódobozban még lennie kell jégnek, illetve egy vagy több jégakkumulációs részben vagy egészen továbbra is fagyottnak kell lennie. Kivételes körülmények között az RT-PCR elemzésre szánt minták és a virológiai vizsgálatra szánt minták gyorsfagyaszthatók, és -20 °C vagy az alatti hőmérsékleten is a laboratóriumba szállíthatók.

Az RT-PCR-elemzéshez RNAlater oldatban tartósított szövetek esetében az RNS kivonását a minták tárolási hőmérsékletétől függően az alábbi időn belül el kell végezni:

37 °C-on tárolt minták: egy nap;

25 °C-on tárolt minták: egy hét;

4 °C-on tárolt minták: egy hónap;

-20 °C-on tárolt minták: határozatlan idő.

Ha a halszöveteket fixálóban szállítják szövettani vizsgálatra, azokat ütésálló tartályokba helyezett szivárgásmentes csövekben kell szállítani. E minták fagyasztása kerülendő.

A sejtenyészetben végzett virológiai vizsgálatot minél hamarabb, legkésőbb a minták gyűjtését követő 48 órán belül el kell kezdeni. Kivételes esetekben a virológiai vizsgálat legkésőbb az anyag gyűjtését követő 72 órán belül is elkezdhető, feltéve, hogy a vizsgálati anyag szállító tápfolyadékkal védett, és a szállítás alatti hőmérsékleti követelmények teljesíthetők.

I.3. Kiegészítő diagnosztikai anyag gyűjtése

A diagnosztikai laboratórium beleegyezésével kiegészítő vizsgálatok céljára az I.1. pontban említettől eltérő halszöveteket is lehet gyűjteni és elő lehet készíteni.

II. Az ISA felügyeletére, valamint jelenlétének megerősítésére vagy gyanújának kizárására szolgáló részletes diagnosztikai módszerek és eljárások

Az ISA-ra vonatkozó bizonyos egészségügyi státusoknak az I. melléklet 3. része I. szakaszában meghatározott megszerzése vagy fenntartása céljából, illetve az ISA jelenlétének megerősítése vagy gyanújának kizárása céljából a 2006/88/EK irányelv 57. cikke b) pontja szerint – az I. melléklet 3. részének II. szakaszában foglalt diagnosztikai módszerekkel – végzett laboratóriumi vizsgálat során a II.1–II.5. pontban meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

II.1. A minták vizsgálata RT-PCR módszerrel

Az ISAV kiszűréséhez alkalmazandó diagnosztikai módszer az RT-qPCR. Mivel az RT-qPCR eredményei a művelet elvégzésének körülményeitől függően változhatnak, a kétségek elkerülése érdekében megfelelő pozitív és negatív kontrollokat és amplikonokat is figyelembe kell venni.

II.1.1. Az összes RNS kivonása

Az RNS-sel kapcsolatos összes műveletet jégen, kesztyűben kell végezni.

Az összes RNS-t – a gyártó útmutatása szerint – a fenol-kloroform módszerrel vagy RNS-affinitásoszlopok segítségével kell kivonni.

A tisztított RNS-t RNáz-mentes desztillált vízben (0,1 % dietil-pirokarbonáttal kezelt vízben) újra kell szuszpendálni.

A kivont RNS koncentrációját és tisztaságát az optikai sűrűség 260 nm-en és 280 nm-en végzett mérésével kell megbecsülni. Alternatív módszerként a II.1.3. pontban foglaltaknak megfelelően a vírusgenomot célzó belső kontrollok is alkalmazhatók.

II.1.2. Az ISAV kimutatására szolgáló RT-PCR

Az ISAV-genom amplifikálásához különféle RT-PCR módszerek alkalmazhatók. Végezhető kétlépcsős RT-PCR, amelynek során a reverz transzkriptáz és a polimeráz láncreakció lépcsőinek lefuttatása két különálló csőben történik. Végezhető azonban egylépcsős reakció is, amelynek során a két reakció lefuttatása egy csőben történik. Lehetőség szerint az egylépcsős módszert kell alkalmazni, mivel az egycsöves próba minimálisra csökkenti a keresztfertőzés kockázatát, mivel a csövek tartalmát nem kell áthelyezni; ez a módszer ugyanolyan érzékenyűnek tekintendő, mint a kétlépcsős módszer.

Az e pontban ismertetett primereket és próbát, azaz a 8. szegmenst célzó, valamint az ISAV kitörésekor és a kórokozó-hordozó halakban történő kimutatására alkalmasnak talált ILA1, illetve ILA2 primerpárt kell alkalmazni. Az ILA2 reverz primer nem egyezik az észak-amerikai izolátumokkal; azokban az esetekben alternatív primerkészletet kell alkalmazni.

Forward primer (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3';

reverz primer (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Ciklusparaméterek: 1 ciklus 50 °C-on 30 percig, 1 ciklus 94 °C-on 15 percig, 40 ciklus 94 °C-on 30 másodpercig, 55 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 60 másodpercig, 1 ciklus 72 °C-on 5 percig. A termék mérete 155 bp.

A PCR eredményei a műveletek elvégzésének körülményeitől függően változhatnak, azaz a használt PCR-készüléktől függően előfordulhat, hogy a hőmérsékleti protokollok optimalizálásra szorulnak. Ezenfelül fals primerkötődés vagy kontamináció miatt előfordulhatnak fals pozitív eredmények. Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú RT-PCR-változatok is alkalmazhatók.

II.1.3. Az ISAV kimutatására szolgáló RT-qPCR

Az RT-qPCR alkalmazása javíthatja a specifikusságot és adott esetben az érzékenységet is. E módszerrel a művelet gyorsabban elvégezhető, mivel nincs szükség gélelektroforézises lépésre, és a módszer csökkenti a keresztfertőzés kockázatát, mivel megbecsülhető a mintatartó csőben lévő vírusgenom-RNS mennyisége. Az RT-qPCR próba hátránya, hogy az amplifikált termékek gyakran nem szekvenálhatók. Az amplifikált termék specifikusságát illető gyanú felmerülése esetén mindenesetre másik ISAV-specifikus próbát kell végezni az eredmény ellenőrzése érdekében.

Az e pontban ismertetett, a 8. szegmenst célzó próbát kell alkalmazni. Ennek a próbának az Európai Unióból, az Európai Szabadkereskedelmi Társulásból és az Észak-Amerikából származó izolátumokra kell kiterjednie. Lehetőség szerint az egylépcsős módszert kell alkalmazni, ugyanis az egycsöves próba csökkenti a keresztfertőzés kockázatát.

Forward primer: 5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3';

reverz primer: 5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3';

valamint próba: 5'-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – MGBNFQ-3'.

Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ciklusparaméterek: 1 ciklus 50 °C-on 30 percig, 1 ciklus 95 °C-on 15 percig, 40 ciklus 94 °C-on 15 másodpercig, 60 °C-on 60 másodpercig; szükség esetén kiigazítandó. Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú RT-PCR- vagy RT-qPCR-változatok is alkalmazhatók.

II.1.4. PCR-termékek amplifikált szekvenálása

Forward primer (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA-3';

reverz primer (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA-3'.

Minden végigfuttatott lemeznek templátnegatív és pozitív kontrollokat is tartalmaznia kell. Ciklusparaméterek (egylépcsős RT-PCR): 1 ciklus 50 °C-on 30 percig, 1 ciklus 94 °C-on 15 percig, 40 ciklus 94 °C-on 30 másodpercig, 55 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 60 másodpercig, 1 ciklus 72 °C-on 5 percig; szükség esetén kiigazítandó. Ehelyett más, igazoltan hasonló hatékonyságú RT-PCR- vagy RT-qPCR-változatok is alkalmazhatók.

Alternatív módszerként a HPR 6. szegmensben történő szekvenálására szolgáló módszer is alkalmazható:

forward primer: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3';

reverz primer: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'.

A termék mérete: HPR0 esetén 304 nt.

Az e pontban ismertetett próbákéhoz hasonló érzékenységgű és specifikusságú RT-PCR-próbák is alkalmazhatók.

Az amplifikált RT-PCR-termék tisztaságát a szekvenálás előtt gélelektroforézissel kell ellenőrizni. Ha csak egy tiszta fragmens jelenik meg, azt közvetlenül a polimeráz láncreakcióból kell megtisztítani. Ha több amplifikált fragmens fordul elő, a lényeges fragmenst gélelektroforézissel kell megtisztítani. A PCR-fragmensek oldatokból vagy agarózgélből történő kitisztítását a gyártó útmutatása szerint PCR-fragmensekhez alkalmazott affinitásoszlopok segítségével kell végezni.

A szekvenálást szekvenálásra szakosodott külső cégeknél kell végezni amplifikált primerek használatával. A szekvenálás eredményeit a szekvenciákra és az USA Országos Biotechnológiai Információs Központjának (NCMI) nukleotid-adatbázisában lévő egyéb ismert szekvenciákkal való összehasonlításra irányuló BLAST keresés segítségével kell elemezni.

A szekvenálásnak el kell oszlatnia az amplifikált RT-PCR-termék specifikusságával kapcsolatos kétségeket.

II.2. Az ISAV sejtenyészeteken végzett izolálása

II.2.1. Minták előkészítése

A szövetek – 80 °C-on tárolhatók. A szöveteket a vizsgálat előtt csak egyszer lehet lefagyasztani és felolvasztani. Felügyeleti és járványvédelmi okokból vizsgálatot a lehető leggyorsabban el kell végezni.

Minden mintát (szállítóoldatban tárolt szöveteleget) validált homogenizáló készülék segítségével teljesen homogenizálni kell, majd és 0–6 °C között 2 000–4 000 × g fordulaton 15 percig centrifugálni kell, a felülúszót le kell szűrni (0,45 µm), és az IPNV endemikusan előforduló szerotípusai elleni antiszérumból összeállított, megfelelően hígított ugyanilyen térfogatú eleggyel inkubálni kell. 50 %-os plakkredukciós vírusneutralizációs próbában az antiszérumból titerének legalább 1:2 000-nek kell lennie. A keveréket egy óráig kell inkubálni 15 °C-on. Ez adja az inokulumot.

Az összes inokulumnak a fertőző hasnyálmirigy-elhalás vírus (IPN-vírus) (Európa egyes részein a halminták 50 %-ában előforduló vírus) elleni antiszérumbal végzett kezelése az IPN-vírus által előidéztet citopatógen hatás (CPE) kialakulásának megelőzését célozza a beoltott sejtenyészetekben. Ilyen kezelés a virológiai vizsgálatok időtartamának, valamint azon esetek számának csökkentése érdekében végezhető, amikor a CPE előfordulását az ISAV-ra utaló esetleges jelzésként kellene értékelni. Ha a minták IPN-től mentesnek minősülő termelési egységekből származnak, az inokulumok IPN-vírus elleni antiszérumbal végzett kezelése elhagyható.

II.2.2. Sejtenyészetekre oltás

Az ISAV elsődleges izolálásához atlanti lazac veséjéből vett sejteket (ASK-sejteket) kell használni. Más, igazolt hatékonyságú és érzékenységgű sejtvonalak is használhatók az ISAV izolálására, figyelembe véve a törzsek változékonyságát és a különböző törzsek azon képességét, hogy különböző sejtvonalakban szaporodjanak. Úgy tűnik, hogy az ASK-sejtek alacsony passzási szint alkalmazása esetén elősegítik a jelenleg ismert vírusizolátumok izolációját és növekedését. Az ASK-sejtekben erőteljesebb citopatógen hatás (CPE) jelentkezik, mint más fogékony sejtvonalaknál, például az SHK-1 sejtvonalnál (a lazac fejveséje-1).

ASK-sejteket (legfeljebb 65 passzázsszámú) kell növeszteni mikrotiterlemezeken 10 % magzati borjúszerűmot, 2 térfogatszázalék 200 mM L-glutamint és 0,08 térfogatszázalék 50 mM 2-merkaptóetanolt tartalmazó L-15 tápfolyadékban. Az antiszérummal kezelt szervszuszpenziót fiatal, aktívan növekvő sejtenyészetekbe kell oltani úgy, hogy a szövetszuszpenzió hígítása a tápoldatban 1:1 000 legyen. Minden szervszuszpenzióból 40 µl inokulumot kell a 2 ml tápfolyadékot tartalmazó vájulatba adagolni. A keresztfertőzés kockázatának minimalizálása érdekében külön 12 vagy 24 lyukú lemezeket kell használni a különböző halgazdaságokból származó mintákhoz.

Egy lemezt beoltatlanul kell hagyni, amely negatív kontrollként fog szolgálni. Pozitív kontrollként egy külön lemezt be kell oltani az ISAV referenciaizolatumával, a következők szerint. 100 µl ISAV-törzspreparátumot (minimális titer: 10^7 szövettényeszet-fertőző adag az 50 %-os végpontnál ($\text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$)) be kell oltani az első vájulatba, majd el kell keverni. Ezen anyag adott mennyiségét át kell helyezni az első vájulatból a második vájulatba, hogy 1:10 hígítást adjon, és el kell keverni. Ezt a műveletet az egész lemezen meg kell ismételni, hogy hat 10-szeres hígítás keletkezzen. A törzs-ISAV – 80 °C-on legalább két évig tárolható, de a felolvasztást követően három napon belül fel kell használni. Ügyelni kell a vizsgálati lemezek pozitív kontrollanyaggal való keresztfertőzésének megakadályozására. E kockázat elkerülése érdekében a pozitív kontrollokat a vizsgálati lemezekről elkülönítve kell elkészíteni és kezelni. Az ASK-sejtek ISAV-izolatumokkal szembeni érzékenységére irányuló, hathavonkénti vizsgálat felválthatja a pozitív kontroll minden egyes beoltáskor történő alkalmazását.

A mintákat 15 ± 2 °C-on kell inkubálni legfeljebb 15 napig. Mikroszkóp használatával az inkubálást követő 5–7. és 12–14. napon a sejtenyészeteket kétszer meg kell vizsgálni a CPE tekintetében. Ha bármely elegendő CPE-t mutat, a vírusazonosítási eljárást a II.2.4. pontnak megfelelően azonnal meg kell kezdeni. Ha a 14. napig nem figyelhető meg CPE, indirekt fluoreszcens ellenanyag-vizsgálatot (IFAT), hemadszorpciós próbát vagy RT-PCR-t kell végezni.

II.2.3. Passzálás

A 13–15. nap között passzálást kell végezni. A tenyészetből származó felülúszót megfelelő hígításban (1:10) a mikrotiterlemezek friss, aktívan növekvő sejteket tartalmazó vájulataiba kell tenni, majd 14 ± 2 °C-on legfeljebb 18 napig inkubálni kell. A sejtenyészeteket a CPE tekintetében kétszer, a beoltást követő 5–7. és a 14–18. nap között mikroszkóp alatt meg kell vizsgálni. Ha bármely elegendő CPE-t mutat, a vírusazonosítási eljárást a II.2.4. pontnak megfelelően azonnal meg kell kezdeni. Ha a 14–18. napig nem figyelhető meg CPE, hemadszorpciós próbát vagy RT-PCR-t kell végezni.

Ha az inkubálás első hét napjában citotoxicitás alakul ki, már ebben a stádiumban passzálást kell végezni, és a sejteket 14–18 napon át inkubálni kell, majd újra passzálást kell végezni, és a sejteket 14–18 napig ismét inkubálni kell. Ha a citotoxicitás hét nap után alakul ki, egyszer kell passzálást végezni, és a sejteket az első beoltástól számított 28–36 napos teljes inkubációs idő eléréseig kell inkubálni.

Ha bakteriális fertőzés alakul ki az elsődleges tenyészetben, a tesztet ismét el kell végezni a – 80 °C-on tárolt szövethomogenizátum felhasználásával. A beoltást megelőzően a szövethomogenizátumot $4\,000 \times g$ fordulaton, 15–30 percig, 0–6 °C közötti hőmérsékleten centrifugálni kell, és a felülúszót 0,22 µm-es szűrőn át kell szűrni. Ha a bakteriális fertőzés a passzálási szakaszban lép fel, a felülúszót 0,22 µm-es szűrőn át kell szűrni, friss sejtekre kell oltani, és további 14–18 napig inkubálni kell.

II.2.4. Vírusazonosítási vizsgálatok

Ha bármely szakaszban CPE jelei mutatkoznak, vagy ha egy hemadszorpciós próba pozitív, vírusazonosítást kell végezni. Az ISAV azonosítására szolgáló módszerként a II.1. pont szerinti RT-PCR vagy a II.2.6. pont szerinti immunfluoreszcens (IF-) próba választható. Ha úgy tűnik, hogy más vírusok is jelen lehetnek, kiegészítő vírusazonosítási vizsgálatokat kell végezni. Ha e vizsgálatok eredményeként a vírus végleges azonosítása sikertelen, akkor a felülúszót azonnali azonosítás céljából továbbítani kell:

- a) az Állat-egészségügyi Világszervezet (OIE) ISA-val foglalkozó referencialaboratóriumába, vagy
- b) egy nemzeti referencialaboratóriumba vagy a 2006/88/EK irányelv VI. mellékletében említett, halbetegségekkel foglalkozó uniós referencialaboratóriumba.

II.2.5. Hemadszorpció

Az ISAV sejtenyészetben történő szaporítása nem mindig eredményez CPE-t, ezért minden vájulatot az e pontban foglaltak szerint RT-PCR-próbának vagy hemadszorpciós próbának, vagy a II.2.6. pontban foglaltak szerinti IF-próbának kell alávetni.

A sejtenyészítő tápfolyadékot minden vajúlatból – beleértve a pozitív és negatív kontrollokat is – ki kell venni, és felcímkezett steril csövekbe kell helyezni. Minden vajúlathoz 500 µl 0,2 térfogat-százalékos mosott nyúl- vagy lóvörösvértest-szuszpenziót vagy 0,05 térfogat-százalékos mosott szivárványospisztráng- vagy atlantilazacvörösvértest-szuszpenziót kell adni, és szobahőmérsékleten 45 percig kell inkubálni. A vörösvértesteket el kell távolítani és minden vajúlatot kétszer át kell mosni L-15 tápfolyadékkal. Mikroszkóp alatt minden vajúlatot meg kell vizsgálni.

Az ASK-sejtek felületére tapadó vörösvértest-csoportok az ortomixovírussal történt valószínű fertőződést jeleznek. Ha a hemadszorpciós próba pozitív, a II.2.4. pontnak megfelelően azonnal el kell végezni a vírusazonosítási vizsgálatot.

II.2.6. Immunfluoreszcens (IF-) próba

ASK-sejteket (legfeljebb 65 passzázsszámú) kell növesztetni mikrotiterlemezeken 10 % magzati borjúsérumot, 2 térfogatszázalék 200 mM L-glutamint és 0,08 térfogatszázalék 50 mM 2-merkaptóetanolt tartalmazó L-15 tápfolyadékban, és azokat 50 %-nál nagyobb konfluencia esetén kell felhasználni. Más, igazolt hatékonyságú sejtvonalak vagy tápfolyadékok is használhatók. Egyenként 225 µl vélelmezten vírusfertőzött tenyészetből származó felülúszót kell bevinni két vajúlatba, össze kell keverni, majd 225 µl-t – 1:5 arányú hígításban – át kell vinni két másik vajúlatba. Két további vajúlatot kontroll céljára beoltatlanul kell hagyni. Az egyes halgazdaságokból származó mintákat külön lemezekben kell kezelni, csakúgy, mint a víruskontrollt. A víruskontrollt az ISAV referenciaizolatának felhasználásával kell létrehozni.

A lemezeket 14 ± 2 °C-on inkubálni kell és mikroszkóppal legfeljebb hét napig kell vizsgálni. Ha korai CPE állapítható meg, vagy ha hét napon belül nem figyelhető meg CPE, a következő lépés a fixálás. A vajúlatokat foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) át kell mosni, és 80 %-os acetonban, szobahőmérsékleten, 20 percig végzett inkubálással kell fixálni. A lemezeket levegőn meg kell szárítani, és azonnal meg kell festeni, vagy megfestés előtt 0–6 °C között legfeljebb 24 óráig kell tárolni.

A párhuzamos vajúlatokat meg kell festeni ISAV-val szembeni 3H6F8 és 10C9F5 monoklonális ellenanyag keverékével vagy más, igazoltan hatékony és specifikus monoklonális ellenanyaggal, PBS-sel kell hígítani és 37 ± 4 °C-on 30 percig inkubálni kell. A monoklonális ellenanyagot el kell távolítani, és a lemezeket 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-sel háromszor át kell mosni. PBS-sel hígított antiégér IgG fluoreszcein-izotiocianát (FITC) konjugátumot kell adni minden vajúlathoz, és 37 ± 4 °C-on 30 percig inkubálni kell. A monoklonális ellenanyag és az FITC-konjugátum különböző tételeinek hígítását minden laboratóriumban optimalizálni kell. Az ellenanyagot el kell távolítani és a lemezeket 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-sel háromszor át kell mosni.

A vajúlatokat haladéktalanul meg kell vizsgálni az FITC gerjesztéséhez megfelelő szűrővel felszerelt, fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatra előkészített inverz mikroszkóppal. A próbát pozitívnak kell tekinteni, ha fluoreszcens sejtek figyelhetők meg. Ahhoz, hogy a próba érvényes legyen, a pozitív kontrolloknak pozitív, a negatívoknak negatív eredményűnek kell lenniük.

II.3. Egyéb szövetek vizsgálata

A II.2.6. pontban említett módszer halakból származó más szöveteken, például májból, lépéből és szívből származó szöveteken is alkalmazható, feltéve, hogy megfelelő mennyiségű endotél sejtet, leukocitát vagy limfocitát lehet a tárgylemezre felvinni. A festési eljárás minden szövet esetében ugyanaz, bár egyes szöveteknél előnyös lehet a propidium-jodiddal végzett festés elhagyása, és a lenyomatban található sejtípusok meghatározásához ilyenkor a fáziskontraszt-megvilágításra kell támaszkodni.

II.4. Szövetteni vizsgálat

A paraffinba ágyazott metszeteket 5 µm vastagságúra kell vágni, majd azokat hematoxin és eozin használatával meg kell festeni.

A klinikailag beteg atlanti lazacok szövetteni változásai különfélék, de többek között a következők lehetnek:

- a) számos vörösvértest a szív vénás öblében és a kopolyú lemezes szerkezetű hajszerkezetben, miközben a hajszerkezetekben vörösvértesttrombusok is képződnek;
- b) multifokálisról konfluensig terjedő bőrvérzés vagy hepatocita nekrosis vagy mindkettő a máj nagyobb edényeitől bizonyos távolságra; vörösvértestek multifokális halmozódása a máj kitágult szinuszoideiben;

- c) vörösvértetek felhalmozódása a belek kötőszöveti rétegének véredényeiben, és végső esetben a kötőszöveti rétegben fellépő vérzés;
- d) a lép kötőszöveti vázának kitágulása a vörösvértetek felhalmozódása miatt;
- e) enyhe multifokális szövetközi vérzés, illetve kiterjedt, diffúz szövetközi vérzés és tubuláris nekrozis a vérzéses területeken, vörösvértetek felhalmozódása a gomolyokban és a vesében;
- f) eritrofagocitózis a lépben, valamint másodlagos vérzések a májban és a vesében.

II.5. Immunhisztokémiai vizsgálat (IHC)

A formalinban fixált szövetekből származó paraffinmetszeteken ISAV-nukleoproteinnel szembeni poliklonális ellenanyagot kell használni. A vizsgálandó szervek a következők: középvese és szív (a mindhárom kamrát és a billentyűket magában foglaló átmeneti terület). A patológiai tünetek miatt gyanús eseteket pozitív IHC segítségével kell ellenőrizni. A szövettani metszeteket standard módszereknek megfelelően kell előkészíteni.

1. A szövetmetszetek előkészítése

A szöveteket standard protokollok szerint semleges, foszfáttal pufferelt 10 %-os formalinban legalább egy napig kell fixálni, fokozatos etanolsorozatban kell vízteleníteni, xilénben kell kitisztítani és paraffinba kell ágyazni. Megközelítőleg 5 µm vastagságú (IHC esetében poli-L-lizin bevonatú lemezekre helyezett) szöveteket 56–58 °C-on (legfeljebb 60 °C-on) 20 percig kell hevíteni, xilénben kell viasztalanítani, fokozatos etanolsorozatban kell rehidratálni, és a (2) pontnak megfelelően patomorfológiai és IHC-vizsgálat céljából hematoxillinnel és eozinnal kell megfesteni.

2. Az IHC esetében alkalmazandó festési eljárás

Ha e határozat másként nem rendelkezik, minden inkubációt szobahőmérsékleten, mozgó platformon kell elvégezni:

- a) az antigént a metszetek 6,0 pH-értékű, 0,1 M citrátpufferben 2 × 6 percig történő forralásával, majd 50 mM TBS-ben (TBS; Trisz-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH: 7,6) feloldott 5 % zsírimmentes tejjel és 2 % kecskeszérummal 20 percig történő blokkolásával kell kinyerni;
- b) a metszeteket ezt követően egy éjszakán át 1 % zsírimmentes tejjel kevert TBS-ben hígított elsődleges ellenanyaggal (ISAV-nukleoproteinnel szembeni monospecifikus nyúl ellenanyaggal) kell inkubálni, majd 0,1 %-os Tween 20-szal TBS-ben háromszor át kell mosni;
- c) a kötött ellenanyagok kimutatásához a metszeteket nyúl immunglobulinnal szembeni, alkalikus foszfatázzal konjugált ellenanyagokkal kell inkubálni 60 percig. A végső mosást követően Fast Red (1 mg ml⁻¹) oldószert és naftol AS-MX foszfátot (0,2 mg ml⁻¹), valamint 0,1 M TBS-ben (pH: 8,2) 1 mM levamizolt kell hozzáadni, és 20 percig állni kell hagyni. A metszeteket ezt követően a Harris-féle hematoxilinnel történő kontrasztfestés előtt csapvízben át kell mosni és vizes beágyazó tápfolyadékba kell helyezni. Az ISAV-pozitív és ISAV-negatív szövetmetszeteket minden konfigurációba fel kell venni kontrollként.

3. Az IHC eredményének értelmezése

Az IHC-vizsgálat eredményének értelmezése az a) és b) pontban foglaltak szerint történik:

- a) a kontrollmetszetek pozitívnak tekintendők, ha megfigyelhető, hogy a kontrollmetszetek citoplazmatikusan és intranukleárisan jól láthatóan vörös(es) színűre festődnek a szívbelhártya véredényeiben lévő endotél sejtekkel. A vizsgálati mintaként használt metszet csak akkor tekintendő pozitívnak, ha megállapítható, hogy az endotél sejtek intranukleárisan egyértelműen vörösre festődnek;
- b) a kontrollmetszetek akkor tekintendők negatívnak, ha nem megy végbe jelentős színreakció.

Mivel az intranukleáris elhelyezkedés az ortomixovírus nukleoproteinjének a vírus egyik szaporodási szakasza során jelentkező sajátossága, de a citoplazma párhuzamosan bekövetkező festődése gyakran domináns, a citoplazmatikus és az egyéb, nem intranukleáris elhelyezkedésű festődési mintázatok nem tekintendők specifikusnak és meggyőzőnek.

A legerőteljesebb pozitív festődési reakciók rendszerint a szív és a vese endotél sejtjeiben következnek be. Elképzelhető, hogy az igen nagy kiterjedésű vérzéses sérüléseken belül az endotél sejtek lízise miatt csupán enyhe endotél festődési reakció megy végbe, de ez akár el is maradhat.

4. RÉSZ

A *Marteilia refringens*-FERTŐZÉS FELÜGYELETÉRE ÉS MEGERŐSÍTÉSÉRE SZOLGÁLÓ RÉSZLETES DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK

I. *A Marteilia refringens*-fertőzés diagnosztizálására szolgáló részletes diagnosztikai módszerek és eljárások

A *Marteilia refringens*-fertőzés tekintetében bizonyos egészségügyi státusoknak az I. melléklet 4. része I. szakaszában meghatározott megszerzése vagy fenntartása céljából, illetve az említett, jegyzékbe foglalt betegség jelenlétének megerősítése vagy gyanújának kizárása céljából a 2006/88/EK irányelv 57. cikkének b) pontja szerint – az I. melléklet 4. részének III. szakaszában foglalt diagnosztikai módszerekkel – végzett mintavétel és laboratóriumi vizsgálat során az e rész I.1., I.2. és I.3. pontjában meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

I.1. Mintavételi eljárás

Annak érdekében, hogy nagyobb eséllyel lehessen találni fertőzött állatokat, elsősorban nyitott vagy frissen elhullott puhatestű egyedekből kell mintát venni.

A mintavételt követően az osztrigákat vagy kékkagylókat – ha a mintában vannak nyitott puhatestűek – legfeljebb 24 óráig vagy – ha a mintában nincsenek nyitott puhatestűek – legfeljebb 72 óráig 4 °C-on vagy hűtött jégen, az osztrigák vagy kékkagylók jellegére és származására vonatkozó részletes adatokkal felcímkézett műanyag tasakban kell tárolni. A nyitott vagy frissen elhullott puhatestűeket más puhatestűektől elkülönítetten kell tárolni.

A *Marteilia refringens* szövettani vizsgálattal végzett diagnosztizálásához többek között kopoltyú- és szívszövetek 3–5 mm vastagságú metszetét kell használni. Egyes vizsgálatokhoz, többek között a szövetlenyomat-vizsgálathoz és a polimeráz láncreakcióhoz (PCR) emésztőmirigy-darabot kell használni.

I.2. Mikroszkópos módszerek

I.2.1. Citológiai vizsgálat (lenyomatok citológiai vizsgálata)

Az emésztőmirigy-szövetek nedvszívó papíron történő szárítását követően üveg tárgylemezen több lenyomatot kell készíteni. A tárgylemezeket – a gyártó útmutatásának megfelelően – levegőn kell megszáritani, metanolban vagy abszolút etanolban kell fixálni, és kereskedelmi forgalomban kapható vérfestő készlettel (például Diff-Quick®/Hemacolor®) kell megfesteni. A tárgylemezekre csapvízben történő öblítésüket és szárításukat követően megfelelő szintetikus gyantával fedőlemezt kell helyezni. A tárgylemezeket először 200-szoros nagyításban, azt követően pedig olajimmerzió alkalmazásával 1 000-szeres nagyításban kell megfigyelni.

Pozitív eredménynek az számít, ha 30–40 µm méretű sejtek figyelhetők meg. A citoplazma festődése bazofil, a sejtmagé eozinofil. A nagy, erősen megfestődött (fénytörő) szemcsék körül hASKány gyűrűk, a nagyobb sejtekben sejten belüli sejtek formációja figyelhető meg.

A módszer nem kórokozóspezifikus.

I.2.2. Szövettani vizsgálat

A kopoltyúból, az emésztőmirigyből, a köpenyből és az ivarmirigyből származó szövetek metszeteit legalább 24 óráig Davidson-féle fixálóban kell fixálni, ezt paraffinbeágyazásos szövettani vizsgálat és (például hematoxi-linnel és eozinnal való) festés céljából történő rendes feldolgozás követi. A megfigyeléseket egyre részletesebb, legfeljebb 1 000-szeres nagyításban kell végezni.

Pozitív eredménynek az számít, ha 4–40 µm méretű sejtek figyelhetők meg. A korai szakaszokban sokmagvú, gömb alakútól hosszúkásig változó alakú sejtek alakulnak ki. Ezek főként a nyelőcső hámszövetében és a gyomorban, néha pedig a szájvitorlákban találhatóak. A spóráképződés sejten belüli sejtosztódással jár, és az emésztőmirigy csövecskéiben és vezetékeiben megy végbe. A spóráképződés során fénytörő szemcsék jelennek meg, de a korai szakaszokban nem figyelhetők meg. A fertőzés késői szakaszaiban spóratokok figyelhetők meg szabadon az emésztőszervek belső üregeiben. A citoplazma festődése bazofil, a sejtmagé eozinofil. A szemcsék színe sötét narancssárgától mélyvörösig terjedhet.

A módszer nem kórokozóspezifikus.

I.3. Molekuláris módszerek

I.3.1. DNS-kivonás

A DNS kivonását szabványműveleti eljárásoknak megfelelően kell végezni.

Az I.3.2. pontban ismertetett PCR-protokollokkal való felhasználásra alkalmas és általában kiváló minőségű DNS-t előállító, kereskedelmi forgalomban kapható DNS-kivonási készletek használata megengedett.

I.3.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

Számos PCR-protokoll kidolgozására és közzétételére került sor.

A belső átíródozó génszakasz (ITS1) régióját célzó PCR-primerek alkalmazandók, mivel azok csak a *Marteilia refringens* kórokozót képesek amplifikálni.

A PCR-t 50 µl térfogatban kell elvégezni. A PCR-elegyek puffert (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH: 25 °C-on 9,0] és 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂-t, 0,2 mM dNTP-keveréket, 1 µM forward és reverz primert, 0,02 egység µl⁻¹ Taq DNS-polimerázt és 10–100 ng kivont DNS-t tartalmaznak. A DNS 94 °C-on öt percig végzett denaturálását követően 30 ciklust kell lefuttatni az alábbiak szerint: 94 °C-on egy percig végzett denaturálás, 55 °C-on egy percig tartó primerkötődés, valamint 72 °C-on egy percig végzett elongáció kilobázis-páronként. 72 °C-on 10 percig tartó végső elongációs szakaszt kell végrehajtani. A *Marteilia refringens* kimutathatásához az ITS1 régiót célzó primerekkel (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' és 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3') kell PCR-t végrehajtani.

A pozitív kontrolloknak erősen fertőzött gazdaszervezetből származó genomikus DNS-ből vagy a célzott régióra kiterjedő gyűrűs DNS-ből kell állniuk.

A negatív kontrolloknak nem fertőzött gazdaszervezetekből származó genomikus DNS-ből és cél-DNS nélküli PCR-reagensekből kell állniuk.

Pozitív eredmény a várt méretben (412 bp) jelentkező pozitív PCR-amplifikáció; mindemellett valamennyi negatív kontrollnak negatívnak és valamennyi pozitív kontrollnak pozitívnak kell lennie.

I.3.3. In situ hibridizáció (ISH)

Számos ISH-protokoll kidolgozására és közzétételére került sor.

Az rRNS génkomplexum kis alegységét (SSU) célzó próba alkalmazandó, mivel az a szövettani vizsgálat vonatkozásában validált próba.

A kopolyúkból és az emésztőmirigyből származó szövetek metszeteit legalább 24 óráig Davidson-féle fixálóban kell fixálni, ezt paraffinbeágyazásos szövettani vizsgálat céljából történő rendes feldolgozás követi. 5 µm nagyságú metszeteket kell vágni és azokat amino-alkil-szilán bevonatú tárgylemezre kell helyezni, amelyeket ezt követően egy éjszakán át 40 °C-on sütőben kell sütni. A metszeteket 10 percre xilénbe merítve viasztalanítani kell. Ezt a lépést egyszer meg kell ismételni, majd az oldószert egymás után kétszer 10 percig abszolút-etanol-fürdőben merítéssel kell eltávolítani. A metszeteket ezt követően fokozatos etanolsorozatba merítéssel kell dehidratálni. A metszeteket TE-pufferben (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) K-proteinázzal (100 µg ml⁻¹) kell kezelni 37 °C-on 30 percig. A tárgylemezeket fokozatos etanolsorozatba merítéssel kell vízteleníteni, és azt követően levegőn kell megszáritani. A metszeteket 100 µl hibridizációs pufferrel (4 × SSC [standard citrát-só-oldat], 50 % formamid, 1 × Denhardt-féle oldat, 250 µg ml⁻¹ élesztő tRNS, 10 % dextrán-szulfát) kell inkubálni, amely a digoxigenin-jelölt próbából 10 ng-t (az I.3.2. pontban ismertetett módon, a CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG és a TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC primerek használatával előkészített PCR-reakció-elegyből 1 µl-t) tartalmaz. A metszeteket *in situ* műanyag fedőlemezzel kell bevonni és 95 °C-on öt percre hevítőblokkra kell helyezni. Ezt követően a tárgylemezeket a 42 °C-on nedves kamrában végzendő éjszakai hibridizáció előtt egy percig jégen kell hűteni. A metszeteket kétszer öt percig 2 × SSC oldatban szobahőmérsékleten, valamint 42 °C-on egyszer 10 percig 0,4 × SSC oldatban át kell mosni. A kimutató lépéseket a gyártó útmutatásának megfelelően kell végrehajtani. A tárgylemezeket ezt követően steril desztillált vízben (dH₂O) át kell öblíteni. A metszeteken Bismarck Brown Yellow festékkel kontrasztfestést kell végezni, azokat desztillált vízben át kell öblíteni, és vizes beágyazó tápoldatot alkalmazva fedőlemezeket kell rájuk helyezni.

Pozitív kontrollként az ismerten fertőzött gazdaszervezetekből származó metszeteket, negatív kontrollként az ismerten nem fertőzött gazdaszervezetekből származó metszeteket kell használni.

Pozitív eredménynek minősül a lila-fekete jelölésű *Marteilia refringens*-sejtek jelenléte az ismert célszöveteken belül; mindemellett valamennyi negatív kontrollnak negatívnak és valamennyi pozitív kontrollnak pozitívnak kell lennie.

I.3.4. Szekvenálás

A szekvenálást a megerősítő diagnosztika egyik végső lépéseként kell elvégezni. A célzott régiók: SSU rDNS és ITS1.

II. A *Marteilia refringens*-fertőzés felügyeletére és megerősítésére szolgáló részletes diagnosztikai módszerek és eljárások

A *Marteilia refringens*-fertőzésre vonatkozó felügyeleti programokhoz, valamint az említett, jegyzékbe foglalt betegség jelenlétének megerősítéséhez vagy gyanújának kizárásához az I. melléklet 4. részének II. szakaszában foglalt követelményeknek megfelelően alkalmazandó diagnosztikai módszerek és kapcsolódó eljárások a 4.1. táblázat szerinti iránymutatásokkal összhangban a következők:

4.1. táblázat

A felügyeleti programokhoz kapcsolódó diagnosztikai módszerek alkalmazására és a *Marteilia refringens*-fertőzés megerősítésére vagy kizárására vonatkozó iránymutatások

Módszer	Célzott felügyelet	Vélelmezett diagnózis	Megerősítő diagnózis
Emésztőmirigy-lenyomatok	X	X	X vagy
Kórszövetten	X		X vagy
<i>In situ</i> hibridizáció			X és
PCR	X	X	X és
Szekvenálás			X

5. RÉSZ

A BONAMIA OSTREAE-FERTŐZÉS FELÜGYELETÉRE ÉS MEGERŐSÍTÉSÉRE SZOLGÁLÓ RÉSZLETES DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK

I. A *Bonamia ostreae*-fertőzés diagnosztizálására szolgáló eljárások

A *Bonamia ostreae*-fertőzés tekintetében bizonyos egészségügyi státusoknak az I. melléklet 5. része I. szakaszában meghatározott megszerzése vagy fenntartása céljából, illetve az említett, jegyzékbe foglalt betegség jelenlétének a 2006/88/EK irányelv 57. cikkének b) pontja szerinti megerősítése vagy kizárása céljából – az I. melléklet 5. részének II. szakaszában foglalt diagnosztikai módszerekkel – végzett mintavétel és laboratóriumi vizsgálat során az alábbi I.1., I.2. és I.3. pontban meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

I.1. Mintavételi eljárás

Annak érdekében, hogy nagyobb eséllyel lehessen találni fertőzött állatokat, elsősorban nyitott vagy frissen elhullott puhatestű egyedekből kell mintát venni.

A mintavételt követően az osztrigákat – ha a mintában vannak nyitott puhatestűek – legfeljebb 24 óráig vagy – ha a mintában nincsenek nyitott puhatestűek – legfeljebb 72 óráig 4 °C-on vagy hűtött jégen, az osztrigák jellegére és származására vonatkozó részletes adatokkal felcímkézett műanyag tasakban kell tárolni. A nyitott vagy frissen elhullott puhatestűeket más puhatestűektől elkülönítetten kell tárolni.

A *Bonamia ostreae* szövettani vizsgálattal végzett diagnosztizálásához többek között kopoltyú- és szívszövetek 3–5 mm vastagságú metszetét kell használni. Egyes vizsgálatokhoz, többek között a szövetlenyomat-vizsgálathoz és a polimeráz láncreakcióhoz (PCR) emésztőmirigy-darabot kell használni.

I.2. Mikroszkópos módszerek

I.2.1. Citológiai vizsgálat (lenyomatok citológiai vizsgálata)

A kopolytú- vagy szívszövetek nedvszívó papíron történő szárítását követően üveg tárgylemezen több lenyomatot kell készíteni. A tárgylemezeket – a gyártó útmutatásának megfelelően – levegőn kell megszáritani, metanolban vagy abszolút etanolban kell fixálni, és kereskedelmi forgalomban kapható vérfestő készlettel (például Diff-Quick®/Hemacolor®) kell megfesteni. A tárgylemezekre csapvízben történő öblítésüket és szárításukat követően megfelelő szintetikus gyantával fedőlemezt kell helyezni. A tárgylemezeket először 200-szoros nagyításban, azt követően pedig olajimmerzió alkalmazásával 1 000-szoros nagyításban kell megfigyelni.

Pozitív eredménynek az számít, ha a vérsejteken belül kisméretű, gömb vagy tojásdad alakú (2–5 µm szélességű) szervezetek figyelhetők meg. A kórokozó azonban a sejten kívül is előfordulhat. Ezek a szervezetek bazofil citoplazmával és eozinofil sejtmaggal rendelkeznek (a színek a használt festéktől függően változhatnak), és mivel terjeszkednek a tárgylemezen, szélesebbnek tűnhetnek a szövetlenyomat-, mint a szövettani vizsgálaton. Előfordulhat, hogy sokmagvú sejtek is megfigyelhetők. A módszer nem kórokozóspezifikus.

I.2.2. Szövettani vizsgálat

A kopolytúból és az emésztőmirigyből származó szövetek metszeteit legalább 24 óráig Davidson-féle fixálóban kell fixálni, ezt paraffinbeágyazásos szövettani vizsgálat és (például hematoxilinnel és eozinnal való) festés céljából történő rendes feldolgozás követi. A megfigyeléseket egyre részletesebb, legfeljebb 1 000-szoros nagyításban kell végezni.

Pozitív eredménynek minősül, ha a kórokozók nagyon kis méretű, 2–5 µm szélességű sejtekként vannak jelen a vérsejteken, illetve szabadon a kopolytú, a bél és a köpeny epitéliumának kötőszöveteiben vagy szinuszokban, és ehhez gyakran intenzív gyulladásos reakció társul. A kétségek elkerülése érdekében a pozitív diagnózishoz a kórokozót a vérsejten belül kell megfigyelni. A módszer nem parazita-faj-specifikus.

I.3. Molekuláris módszerek

I.3.1. DNS-kivonás

A DNS kivonását szabványműveleti eljárásoknak megfelelően kell végezni.

Az alábbiakban ismertetett PCR-protokollokkal való felhasználásra alkalmas és általában kiváló minőségű DNS-t előállító, kereskedelmi forgalomban kapható DNS-kivonási készletek használata megengedett.

I.3.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

Számos PCR-protokoll kidolgozására és közzétételére került sor.

Az rDNS kis alegységét (SSU) célzó két PCR-protokoll alkalmazható:

- Az első olyan hagyományos PCR, amely a *Haplosporidia* család több tagját, többek között a *Bonamia* spp.-t amplifikálja. A Bo elnevezésű primer: 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3', a Boas elnevezésű primer: 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3', e primerek 300 bp terméket amplifikálnak. A PCR-elegyek puffert (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH: 25 °C-on 9,0] és 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂-t, 0,2 mM dNTP-keveréket, 1 µM forward és reverz primert, 0,02 egység µl – 1 Taq DNS-polimerázt és 0,2 ng µl – 1 DNS-templátot tartalmaznak összesen 50 µl térfogatban. A templátokat PCR-készülékben 94 °C-on öt percig kell denaturálni, majd 30 (94 °C-on egy percig, 55 °C-on egy percig, 72 °C-on egy percig tartó) ciklust kell lefuttatni rajtuk, ezt követően pedig 72 °C-on 10 percig tartó végleges extenzió következik.

A pozitív kontrolloknak erősen fertőzött gazdaszervezetből származó genomikus DNS-ből vagy a célzott régióra kiterjedő gyűrés DNS-ből kell állniuk.

A negatív kontrolloknak nem fertőzött gazdaszervezetekből származó genomikus DNS-ből és cél-DNS nélküli PCR-reagenskből kell állniuk.

Pozitív eredmény a várt méretben (300 bp) jelentkező pozitív PCR-amplifikáció; mindemellett valamennyi negatív kontrollnak negatívnak és valamennyi pozitív kontrollnak pozitívnak kell lennie.

- b) A második PCR-protokoll SYBR® Green valós idejű PCR-próba. Ez lehetővé teszi a *Bonamia ostreae* (alábbiakban ismertetett) külön kimutatását és ötvözhető a *Bonamia exitiosa* külön kimutatását lehetővé tevő SYBR® Green valós idejű PCR-próbával (Ramilo et al., 2013).

A BOSTRE-F (5'-TTACGTCCCTGCCCTTGTGA-3') és a BOSTRE-R (5'-TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3') primer 208 bp terméket amplifikál. A PCR-elegyek SYBR® Green Master Mix (1X) oldatot, 0,3 µM forward és reverz primert, valamint 200 ng kivont DNS-t tartalmaznak. A templátokat valós idejű kimutatási rendszerben 95 °C-on 10 percig kell denaturálni, majd 35 (95 °C-on 30 másodpercig, 55 °C-on 45 másodpercig és 72 °C-on egy percig tartó) ciklust kell lefuttatni rajtuk. Az olvadáspontgörbét 55 °C és 95 °C között 0,5 °C-os lépésenként emelkedő hőmérsékleti skálán kell elemezni, és ennek során a fluoreszcenciát a hőmérséklet minden egyes változásakor fel kell jegyezni.

A pozitív kontrolloknak erősen fertőzött gazdaszervezetből származó genomikus DNS-ből vagy a célzott régióra kiterjedő gyűrűs DNS-ből kell állniuk.

A negatív kontrolloknak nem fertőzött gazdaszervezetekből származó genomikus DNS-ből és cél-DNS nélküli PCR-reagenskből kell állniuk.

Pozitív eredménynek minősül az egyetlen olvadáspont-csúcsértékkel ($78,25 \pm 0,25$ °C a Ramilo és társai által 2013-ban közzétett feltételek mellett) végzett pozitív PCR-amplifikálás; mindemellett valamennyi negatív kontrollnak negatívnak és valamennyi pozitív kontrollnak pozitívnak kell lennie.

I.3.3. *In situ* hibridizáció (ISH)

Számos ISH-protokoll kidolgozására és közzétételére került sor.

Az rDNS génkomplexum kis alegységét (SSU) célzó próba alkalmazandó, bár ennél kimutatták, hogy keresztreakcióba lép a *Haplosporidia* család néhány más tagjával.

A kopoltyúból és az emésztőmirigyből származó szövetek metszeteit legalább 24 óráig Davidson-féle fixálóban kell fixálni, ezt paraffinbeágyazásos szövettani vizsgálat céljából történő rendes feldolgozás követi. 5 µm nagyságú metszeteket kell vágni és azokat amino-alkil-szilán bevonatú tárgylemezre kell helyezni, amelyeket ezt követően egy éjszakán át 40 °C-on sütőben kell sütni. A metszeteket 10 percre xilénbe merítve viaszalánítani kell. Ezt a lépést egyszer meg kell ismételni, majd az oldószert egymás után kétszer 10 percig abszolút-etanol-fürdőben merítéssel kell eltávolítani. A metszeteket ezt követően fokozatos etanolsorozatba merítéssel kell rehidratálni. A metszeteket TE-pufferben (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) K-proteinázzal (100 µg ml⁻¹) kell kezelni 37 °C-on 30 percig. A tárgylemezeket fokozatos etanolsorozatba merítéssel kell vízteleníteni, és azt követően levegőn kell megszáritani. A metszeteket 100 µl hibridizációs pufferrel (4 × SSC [standard citrátsó-oldat], 50 % formamid, 1 × Denhardt-féle oldat, 250 µg ml⁻¹ élesztő tRNS, 10 % dextranszulfát) kell inkubálni, amely a digoxigenin-jelölt próbából 20 ng-ot (a I.3.2. pontban ismertetett módon, a Bo és a Boas primerrel készített PCR-reakcióelegyből 2 µl-t) tartalmaz. A metszeteket *in situ* műanyag fedőlemezzel kell bevonni és 95 °C-on öt percre hevítőblokkra kell helyezni. Ezt követően a tárgylemezeket a 42 °C-on nedves kamrában végzendő éjszakai hibridizáció előtt egy percig jégen kell hűteni. A metszeteket kétszer öt percig 2 × SSC oldatban szobahőmérsékleten, valamint 42 °C-on egyszer 10 percig 0,4 × SSC oldatban át kell mosni. A kimutatási lépéseket a gyártó útmutatásának megfelelően kell végrehajtani. A tárgylemezeket ezt követően steril desztillált vízben (dH₂O) át kell öblíteni. A metszeteken Bismarck Brown Yellow festékkel kontrasztfestést kell végezni, azokat desztillált vízben át kell öblíteni, és vizes beágyazó tápfolyadékot alkalmazva fedőlemezeket kell rájuk helyezni.

Pozitív kontrollként az ismerten fertőzött gazdaszervezetekből származó metszeteket, negatív kontrollként az ismerten nem fertőzött gazdaszervezetekből származó metszeteket kell használni.

Pozitív eredménynek minősül, ha a véresejtek belsejében jelölt kórokozók figyelhetők meg, mindemellett valamennyi negatív kontrollnak negatív és valamennyi pozitív kontrollnak pozitívnak kell lennie.

I.3.4. Szekvenálás

A szekvenálást a megerősítő diagnosztika egyik végső lépéseként kell elvégezni. A célzott régiók: SSU rDNS és ITS1.

II. A *Bonamia ostreae*-fertőzés felügyeletére és megerősítésére szolgáló eljárások

A *Bonamia ostreae* felügyeletéhez, valamint jelenlétének megerősítéséhez vagy gyanújának kizárásához az I. melléklet 5. részének II. szakaszában foglalt követelményeknek megfelelően az alábbi 5.1. táblázatban meghatározott iránymutatások szerinti diagnosztikai módszerek és kapcsolódó eljárások alkalmazandók.

5.1. táblázat

A felügyeleti programokhoz kapcsolódó diagnosztikai módszerek alkalmazására és a *Bonamia ostreae*-fertőzés kizárására vagy megerősítésére vonatkozó iránymutatások

Módszer	Célzott felügyelet	Vélelmezett diagnózis	Megerősítő diagnózis
Szív- vagy kopoltyúlenyomat	X	X	X vagy
Kórszövetten	X		X vagy
<i>In situ</i> hibridizáció			X és
PCR	X	X	X és
Szekvenálás			X

6. RÉSZ

A WHITE SPOT-BETEGSÉG (WSD) FELÜGYELETÉRE ÉS MEGERŐSÍTÉSÉRE SZOLGÁLÓ RÉSZLETES DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK

1. A WSSV kimutatására szolgáló diagnosztikai eljárások

Az I. melléklet 6. részének I. szakaszában meghatározott felügyeleti és felszámolási programok céljából, valamint a WSSV jelenlétének megerősítése vagy gyanújának kizárása céljából a 2006/88/EK irányelv 57. cikke b) pontja szerint – az I. melléklet 6. részének II. szakaszában meghatározott diagnosztikai módszerekkel – végzett mintavétel és laboratóriumi vizsgálat során az e rész 2–7. pontjában meghatározott részletes diagnosztikai módszerek és eljárások alkalmazandók.

A II. melléklet e részében ismertetett módszerek és eljárások a rákfélék betegségeivel foglalkozó európai uniós referencialaboratóriumban alkalmazott, az ISO 17025 szabvány alapján akkreditált vizsgálatból átültetett módszerek és eljárások. Más megközelítések is alkalmazhatók, amelyek során egyenértékű feltételek állnak fenn és más gyártók által előállított készletek használatára kerül sor, azonban az e részben ismertetettekkel egyenértékű érzékenységet és specifikusságot ezekben az esetekben is biztosítani kell. A PCR-amplifikált termékeket minden esetben szekvenálni kell a White spot-betegség vírusa (WSSV) fajtájának megerősítése érdekében.

2. Mintavételi eljárás

A rákfélék WSSV-t tartalmazó (úszólábakból és kopoltyúból származó) szövetei etanolban, RNAlater oldatban vagy – 80 °C-on gyorsfagyasztott állapotban tárolhatók. A WSSV szövetmintákból történő azonosításához szükséges szakaszok a következők: a szövet homogenizálása, a DNS kivonása, a WSSV-DNS PCR segítségével végzett célzott amplifikálása, az amplifikált termék gélen történő vizualizálása, a DNS tisztítása, valamint a kórokozó azonosítása céljából végzett szekvenálás.

3. Szövetek homogenizálása

A szövetek roncsolását és a homogenátum megfelelő pufferben történő előkészítését Fast Prep szövetroncsolóval és Lysing Matrix A csövekkel (MP Biomedicals) kell végezni. A szövetek tömegét meg kell mérni, majd a szöveteket Lysing Matrix A csövekbe kell helyezni, 1:10 w/v arányban vagy a gyártó útmutatásának megfelelő pufferben (DNS szövetkészlettel (Qiagen) történő használatra szánt G2 és 10 µl K-proteináz pufferben) hígítani kell, majd Fast Prep 24 homogenizátorban két percig homogenizálni kell. A homogenizált mintákat 56 °C-on legalább négy órán keresztül vagy egy éjszakán át inkubálni kell. A mintákat vortex keverővel össze kell keverni, 9 000 fordulat/perc fordulatszámom két percig centrifugálni kell, és 50 µl felülúszót vagy 5 mg szövetnek megfelelő mennyiséget (a kivonási készlethez optimális szövettömeget) kell DNS kivonására szolgáló mintatartó csöbe helyezni, és G2 puffer használatával a mennyiséget 200 µl-re kell növelni.

4. DNS-kivonás

DNS-kivonó készlet és az EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) készülék segítségével, a gyártó útmutatása alapján az összes DNS-t ki kell vonni. Minden egyes mintatétellel együtt kivonási kontrollt (borjúcsecsemőmirigy-DNS) és negatív kontrollt (G2 puffer) kell futtatni. A DNS-t 50 µl térfogatban kell eluálni. A kivonás sikerességének biztosítása érdekében valamennyi minta és kontroll DNS-koncentrációját Nano Drop készülékkel kell meghatározni. A kivont DNS-t – 20 °C-on le kell fagyasztani, ha nincs rá szükség azonnal.

5. WSSV kimutatására szolgáló polimeráz láncreakció (PCR)

A WSSV kimutatásához alkalmazandó módszer az alábbi bekezdésekben meghatározott, fészek-PCR-rel végzendő WSSV-kimutatói protokoll, amely a PCR-ek első és második körében a 18s rRNS gén 1 447 bp, illetve 848 bp méretű ampliconját amplifikálja.

A PCR-reakció első körét 50 µl térfogatban kell kialakítani, amelynek végső koncentrációja a következő: 1 × GoTaq puffer (Promega), 5 mM MgCl₂, 1 pmol/µl WSSV 146 F1 primer, 1 pmol/µl WSSV 146 R1 primer (1. táblázat), 0,25 mM dNTPs, 1,25 egység Taq polimeráz és 2,5 µl DNS. Minden mintát két példányban kell futtatni egy negatív kivonási kontroll, egy negatív PCR-kontroll (DNS helyett 2,5 µl H₂O hozzáadásával) és egy pozitív kontroll mellett. Pozitív kontrollként belső használatra előállított és validált hígított WSSV-plazmidot kell használni (az európai uniós referencialaboratóriumtól beszerezhető).

A WSSV kimutatására szolgáló PCR-reakció második körét az első körrel megegyező módon kell kialakítani, de a WSSV 146F2/R2 primerkészlet és egy második pozitív kontroll használatával annak ellenőrzése érdekében, hogy a PCR e szakasza működött.

Primer	Szekvencia
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAAGTCCCCCTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

A PCR-ek első és második körét az alábbi Ciklusparaméterek alkalmazásával, DNA Engine Tetrad 2 Peltier (vagy azzal egyenértékű) PCR-készülékben kell lefuttatni. Az első lépés denaturálás 94 °C-on két percig, majd 30 ciklus 94 °C-on 30 másodpercig, 62 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 30 másodpercig, ezt követően extenzió 72 °C-on két percig és tartás 4 °C-on.

6. Gélelektroforézis

A PCR-ek első és második köréből származó amplifikált PCR-termékeket TAE pufferrel készített 2 %-os agarózgélben kell vizualizálni. Minden mintából 15 µl-t kell 120 V feszültségen kb. 20 percig futtatni és UV-fényben vizsgálni. A pozitív minták a PCR első körében 1 447 bp sávszélességet, a PCR második körében 848 bp sávszélességet alakítanak ki. Az ekkora méretű mintákat ki kell vágni és 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe kell helyezni. A géldarabokban található DNS-t Promega Wizard® SV géllal és PCR-tisztító rendszerrel kell kitisztítani a gyártó útmutatása szerint. A DNS koncentrációját Nano Drop készülék segítségével kell megbecsülni. A tisztított DNS-t – 20 °C-on le kell fagyasztani, ha nem kerül sor azonnali felhasználására.

7. Szekvenáló PCR-termékek

A DNS-t a Big Dye Terminator Kit 3.1 (Applied Biosystems) használatával kell szekvenálni. Az össztérfogat minden egyes reakcióban 20 µl, a végső koncentráció 1 × Big Dye Terminator, 1 × szekvenáló puffer, 10 pmol/µl forward vagy reverz primer, valamint 10 µl (kb. 10 ng/µl-re hígított) tisztított DNS, amelyet az alábbi DNS-Ciklusparaméterekkel kell lefuttatni DNA Engine Tetrad 2 Peltier (vagy azzal egyenértékű) PCR-készülékben: 94 °C-on 30 másodpercig, majd 30 ciklus 96 °C-on 10 másodpercig, 50 °C-on 10 másodpercig és 60 °C-on 4 percig.

A szekvenáló PCR-termékeket nátrium-acetát alkalmazásával kell leülepíteni; ennek során 20 µl DNS-t kell adni 10 µl NaAc-hoz, 70 µl H₂O-hoz és 250 µl etanolhoz, vortex készülékben össze kell keverni és 13 000 fordulat/perc fordulatszámon 20 percig kell centrifugálni, a felülúszót el kell távolítani, a pelletet 200 µl abszolút etanolban meg kell mosni és 13 000 fordulat/perc fordulatszámon 5 percig kell centrifugálni. A pelletet 37 °C-on öt percig kell szárítani. A pellethez 25 µl Hi-Di formamidot kell adni, 95 °C-on két percig kell hevíteni és vortex készülékben alaposan össze kell keverni. A mintákat ABI3130xl Avant Genetic Analyser készülékkel kell szekvenálni a gyártó útmutatása szerint. A szekvenálás eredményeit a Sequencher szoftverrel kell elemezni, és a szekvenciákat BLAST keresés segítségével össze kell vetni az NCBI adatbázisban lévő szekvenciákkal.
