

II

(Atos não legislativos)

DECISÕES

DECISÃO DE EXECUÇÃO (UE) 2015/1554 DA COMISSÃO

de 11 de setembro de 2015

que estabelece normas de execução da Diretiva 2006/88/CE no que se refere aos requisitos de vigilância e aos métodos de diagnóstico

[notificada com o número C(2015) 6188]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta a Diretiva 2006/88/CE do Conselho, de 24 de outubro de 2006, relativa aos requisitos zoossanitários aplicáveis aos animais de aquicultura e produtos derivados, assim como à prevenção e à luta contra certas doenças dos animais aquáticos ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 49.º, n.º 3, o artigo 50.º, n.º 4, o artigo 57.º, alínea b), e o artigo 61.º, n.º 3,

Considerando o seguinte:

- (1) A Diretiva 2006/88/CE estabelece as medidas de prevenção mínimas para a vigilância e a deteção precoce nos animais aquáticos das doenças constantes do seu anexo IV (as «doenças enumeradas») e as medidas de luta a aplicar em caso de suspeita de surto de uma das doenças enumeradas. Também estabelece os requisitos necessários para alcançar o estatuto de indemnidade para os Estados-Membros ou para as respetivas zonas ou compartimentos.
- (2) A erradicação das doenças enumeradas e a obtenção do estatuto de indemnidade para um Estado-Membro, zona ou compartimento deve basear-se nos mesmos princípios e seguir a mesma abordagem científica por toda a União. Por esse motivo, é necessário estabelecer, ao nível da União, requisitos específicos para os sistemas de erradicação e vigilância bem como para os métodos de amostragem e diagnóstico a utilizar pelos Estados-Membros a fim de obter o estatuto de indemnidade para a totalidade de um Estado-Membro ou para uma sua zona ou compartimento.
- (3) Os exames laboratoriais a efetuar em caso de suspeita ou confirmação da presença das doenças enumeradas devem ser os mesmos ao nível da União e devem obedecer aos mesmos padrões e protocolos científicos. Em conformidade com a Diretiva 2006/88/CE, é necessário estabelecer métodos de diagnóstico e procedimentos específicos a utilizar pelos laboratórios designados para o efeito pelas autoridades competentes dos Estados-Membros.
- (4) O Código Sanitário para os Animais Aquáticos adotado pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) («Código Sanitário Aquático») estabelece normas para a melhoria da saúde dos animais aquáticos e do bem-estar dos peixes de aquicultura em todo o mundo, incluindo normas para o comércio internacional seguro de animais aquáticos e respetivos produtos. Vários capítulos do Código Sanitário Aquático contêm recomendações sobre a utilização de determinados testes de diagnóstico. Esses testes, providenciados pela OIE, estão estabelecidos no Manual de Testes de Diagnóstico para os Animais Aquáticos da OIE («Manual Aquático»). A fim de assegurar que os requisitos da União em matéria de diagnóstico de doenças dos animais aquáticos são coerentes com as normas internacionais, as regras previstas na presente decisão devem atender às normas e recomendações do Código Sanitário Aquático.

⁽¹⁾ JO L 328 de 24.11.2006, p. 14.

- (5) A este respeito, para muitas das doenças enumeradas, o Manual Aquático contém vários testes e procedimentos a usar nos exames laboratoriais. No sentido de uniformizar a base científica para o trabalho de diagnóstico das doenças enumeradas ao nível da União, é necessário fazer uma escolha de entre os testes de diagnóstico e os procedimentos recomendados pela OIE e especificar quais os testes obrigatórios no exame laboratorial para efeitos dos programas de vigilância e para excluir a suspeita ou confirmar a presença das doenças enumeradas. Afigurando-se que também serão necessários métodos e procedimentos alternativos em determinados casos, devem proporcionar-se descrições e algumas explicações científicas para decidir quando e como aplicar os métodos alternativos. Tal é particularmente necessário para os procedimentos de diagnóstico mais detalhados.
- (6) Para produzir resultados de diagnóstico precisos e reprodutíveis, é importante que os procedimentos e protocolos detalhados a utilizar sejam validados de acordo com as normas de qualidade pertinentes referidas no anexo VI, parte I, da Diretiva 2006/88/CE. Para muitos dos métodos de diagnóstico referidos na presente decisão, a utilização de *kits* de teste comerciais constitui uma parte necessária dos protocolos de diagnóstico e esses *kits* de teste foram validados em testes de acreditação pelos laboratórios de referência da União Europeia (LRUE) para as doenças respetivas. A bem da certeza jurídica, os nomes comerciais desses *kits* de teste comerciais validados devem ser referidos na presente decisão.
- (7) Para determinados Estados-Membros, pode ser difícil atingir o estatuto de indemnidade para a totalidade do país ou para uma sua zona ou compartimento no respeitante a uma ou várias das doenças enumeradas. Nessas circunstâncias, o Estado-Membro pode não desejar obter ou recuperar o estatuto de indemnidade das doenças enumeradas. As medidas mínimas de controlo a aplicar quando o Estado-Membro em causa não desejar obter ou recuperar o estatuto de indemnidade devem ser as mesmas em toda a União e obedecer aos mesmos critérios. É pois necessário, em conformidade com a Diretiva 2006/88/CE, estabelecer normas pormenorizadas para o confinamento dessas doenças enumeradas e requisitos mínimos para o levantamento das medidas de confinamento.
- (8) A Decisão 2001/183/CE da Comissão ⁽¹⁾ estabelece os requisitos relativos aos planos de amostragem e aos métodos de diagnóstico para a deteção e a confirmação da necrose hematopoiética infecciosa e da septicemia hemorrágica viral, que fazem parte das doenças enumeradas. A Decisão 2003/466/CE da Comissão ⁽²⁾ estabelece os requisitos relativos aos planos de amostragem e aos métodos de diagnóstico para a deteção da anemia infecciosa do salmão, bem como os critérios de definição de zonas e vigilância oficial na sequência da suspeita ou confirmação da presença dessa doença. A Decisão 2002/878/CE da Comissão ⁽³⁾ estabelece os requisitos relativos aos planos de amostragem e aos métodos de diagnóstico para a deteção e a confirmação das doenças dos moluscos Bonamiose e Marteiliose. A fim de atualizar os requisitos, essas três decisões devem ser substituídas pela presente decisão. Consequentemente, devem ser revogadas as Decisões 2001/183/CE, 2002/878/CE e 2003/466/CE.
- (9) Uma vez que determinados Estados-Membros necessitam de tempo para a atualização dos seus laboratórios nacionais de referência a fim de dar cumprimento aos requisitos da presente decisão, a mesma deve ser aplicável a partir de 1 de abril de 2016.
- (10) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Vegetais, Animais e Alimentos para Consumo Humano e Animal,

ADOTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

Objeto

A presente decisão estabelece normas para:

- a) a vigilância, o estabelecimento de zonas-tampão, a amostragem e os métodos de diagnóstico a aplicar pelos Estados-Membros no âmbito do estatuto sanitário dos Estados-Membros ou das suas zonas ou compartimentos para as doenças dos animais aquáticos não exóticos enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE (as «doenças enumeradas»);

⁽¹⁾ Decisão 2001/183/CE da Comissão, de 22 de fevereiro de 2001, que estabelece os planos de amostragem e os métodos de diagnóstico para deteção e confirmação de certas doenças dos peixes e revoga a Decisão 92/532/CEE (JO L 67 de 9.3.2001, p. 65).

⁽²⁾ Decisão 2003/466/CE da Comissão, de 13 de junho de 2003, que estabelece critérios de definição de zonas e vigilância oficial na sequência da suspeita ou confirmação da ocorrência de anemia infecciosa do salmão (ISA) (JO L 156 de 25.6.2003, p. 61).

⁽³⁾ Decisão 2002/878/CE da Comissão, de 6 de novembro de 2002, que estabelece planos de colheita de amostras e métodos de diagnóstico para a deteção e a confirmação da Bonamiose (*Bonamia ostreae*) e da Marteiliose (*Marteilia refringens*) nos moluscos (JO L 305 de 7.11.2002, p. 57).

- b) os métodos de diagnóstico a utilizar nos exames laboratoriais em caso de suspeita ou confirmação da presença das doenças enumeradas; e
- c) as medidas mínimas de controlo a aplicar em caso de suspeita ou confirmação de uma das doenças enumeradas num Estado-Membro, zona ou compartimento não declarado indenne da doença enumerada em causa.

Artigo 2.º

Definições

Para efeitos da presente decisão, entende-se por:

- a) «Septicemia hemorrágica viral» («SHV»), uma doença causada pelo vírus da septicemia hemorrágica viral (VSHV), também conhecido como vírus Egtved, pertencente ao género *Novirhabdovirus*, da família *Rhabdoviridae*;
- b) «Necrose hematopoiética infecciosa» («NHI»), uma doença causada pelo vírus da necrose hematopoiética infecciosa (VNHI), pertencente ao género *Novirhabdovirus*, da família *Rhabdoviridae*;
- c) «Herpesvirose da carpa koi» («HCK»), uma doença causada pelo herpesvírus da carpa koi, pertencente à família *Alloherpesviridae*. O seu nome científico é herpesvírus 3 ciprinídeo (CyHV-3);
- d) «Anemia infecciosa do salmão» («AIS»), uma doença causada por uma infeção com o vírus da anemia infecciosa do salmão (VAIS) com supressão da região altamente polimórfica (HPR), pertencente ao género *Isavirus*, da família *Orthomyxoviridae*;
- e) «Infeção por *Marteilia refringens*», uma doença causada por uma infeção com o protozoário *Marteilia refringens* da ordem *Paramyxida*;
- f) «Infeção por *Bonamia ostreae*», uma doença causada por uma infeção com o protozoário haplosporídio *Bonamia ostreae*;
- g) «Doença da mancha branca» («DMB»), uma doença causada pelo vírus da síndrome da mancha branca (VSMB), um vírus com dupla cadeia de ADN pertencente ao género *Whispovirus*, da família *Nimaviridae*.

Artigo 3.º

Requisitos mínimos para os programas de erradicação e vigilância

Os Estados-Membros devem garantir o respeito das regras relativas aos programas de vigilância e erradicação, às zonas-tampão, à amostragem e aos métodos de diagnóstico estabelecidos no anexo I, bem como aos métodos específicos e procedimentos detalhados estabelecidos no anexo II, quando da concessão, retirada ou recuperação do estatuto de indemnidade para um Estado-Membro ou uma sua zona ou compartimento no respeitante a uma ou mais das doenças enumeradas.

Artigo 4.º

Requisitos mínimos para os métodos de diagnóstico e os procedimentos específicos

Os Estados-Membros devem garantir o respeito dos métodos de controlo estabelecidos no anexo I e dos métodos específicos de diagnóstico e procedimentos detalhados estabelecidos no anexo II quando da realização dos exames laboratoriais para confirmar ou excluir a presença de uma doença enumerada.

Artigo 5.º

Medidas mínimas de controlo para o confinamento das doenças enumeradas e requisitos mínimos para o levantamento das medidas de confinamento nos Estados-Membros, zonas ou compartimentos não declarados indemnes de doenças enumeradas

Os Estados-Membros devem garantir o respeito das medidas mínimas de controlo e dos requisitos mínimos para o levantamento das medidas de confinamento estabelecidas no anexo I quando da aplicação de medidas de controlo e do levantamento de medidas de confinamento relativamente a uma ou mais das doenças enumeradas num Estado-Membro ou numa sua zona ou compartimento não declarado indenne das doenças enumeradas em causa.

*Artigo 6.º***Revogações**

São revogadas as Decisões 2001/183/CE, 2002/878/CE e 2003/466/CE.

*Artigo 7.º***Data de aplicação**

A presente decisão é aplicável a partir de 1 de abril de 2016.

*Artigo 8.º***Destinatários**

Os destinatários da presente decisão são os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 11 de setembro de 2015.

Pela Comissão
Vytenis ANDRIUKAITIS
Membro da Comissão

ANEXO I

VIGILÂNCIA E MÉTODOS DE CONTROLO

I. Introdução

O presente anexo estabelece:

- a) requisitos para os programas de erradicação e vigilância, tal como se estabelece no artigo 44.º da Diretiva 2006/88/CE, bem como para os métodos de amostragem e de diagnóstico a utilizar para declarar o estatuto de indemnidade de Estados-Membros, suas zonas ou compartimentos, tal como se estabelece no capítulo VII da referida diretiva;
- b) métodos de amostragem e diagnóstico a utilizar nos exames laboratoriais em caso de suspeita e para a confirmação da presença das doenças não exóticas enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE (as «doenças enumeradas»), tal como se estabelece no artigo 28.º, alínea a), e no artigo 57.º, alínea b), da referida diretiva;
- c) medidas de confinamento a aplicar em caso de confirmação da presença de uma das doenças enumeradas, tal como se estabelece no artigo 39.º da Diretiva 2006/88/CE, bem como medidas a aplicar para obter o estatuto sanitário da categoria III por um Estado-Membro, zona ou compartimento que detém o estatuto sanitário da categoria V.

Os requisitos estabelecidos no presente anexo abrangem as seguintes doenças enumeradas:

1.	Septicemia hemorrágica viral (SHV)	Parte 1
2.	Necrose hematopoiética infecciosa (NHI)	Parte 1
3.	Herpesvirose da carpa koi (HCK)	Parte 2
4.	Anemia infecciosa do salmão (AIS)	Parte 3
5.	Infeção por <i>Marteilia refringens</i>	Parte 4
6.	Infeção por <i>Bonamia ostreae</i>	Parte 5
7.	Doença da mancha branca (DMB)	Parte 6

II. Definições

Para efeitos dos anexos I e II, entende-se por:

- a) «Compartimento continental», uma ou várias explorações situadas na parte continental de um ou vários Estados-Membros, constituindo um sistema comum de biossegurança e contendo uma população de animais aquáticos com um estatuto sanitário distinto no respeitante a uma determinada doença;
- b) «Exploração continental», uma exploração com animais de aquicultura situada na parte continental do território de um Estado-Membro;
- c) «Zona continental», uma área geográfica definida, situada na parte continental de um ou vários Estados-Membros, com um sistema hidrológico homogéneo, que compreende partes de uma bacia hidrográfica desde a(s) nascente(s) até uma barreira natural ou artificial que impeça a migração, para montante, dos animais aquáticos a partir das zonas inferiores da bacia hidrográfica; uma bacia hidrográfica completa desde a(s) nascente(s) até ao respetivo estuário; ou mais de uma bacia hidrográfica, incluindo os respetivos estuários, devido ao nexo epidemiológico entre bacias hidrográficas através do estuário;

- d) «Exploração oficialmente declarada como infetada», uma exploração com animais aquáticos onde a autoridade competente confirmou a presença de uma ou várias doenças enumeradas, em conformidade com o artigo 28.º, alínea a), o artigo 29.º e o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE.
- e) «Exploração em contacto», uma exploração com animais aquáticos relativamente à qual está provado ou existem fortes suspeitas de que foi contaminada por material infeccioso em proveniência de uma exploração oficialmente declarada como infetada.

PARTE 1

VIGILÂNCIA E MÉTODOS DE CONTROLO DA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL (SHV) E DA NECROSE HEMATOPOIÉTICA INFECCIOSA (NHI)**I. Requisitos para os programas de vigilância e erradicação destinados a obter e manter o estatuto de indemnidade de SHV e de NHI e medidas de confinamento para essas doenças****I.1. Requisitos gerais para as inspeções sanitárias e para a amostragem da SHV e da NHI:**

- a) as inspeções sanitárias e, se for caso disso, a amostragem, devem efetuar-se na época do ano em que a temperatura da água é inferior a 14 °C ou sempre que a temperatura da água seja suscetível de atingir o seu valor mais baixo anual;
- b) sempre que seja necessário efetuar uma vigilância orientada em populações selvagens, de acordo com o anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da Diretiva 2006/88/CE, o número e a distribuição geográfica dos pontos de amostragem devem ser determinados por forma a obter uma cobertura razoável do Estado-Membro, da zona ou do compartimento. Os pontos de amostragem devem ser representativos dos diferentes ecossistemas onde se localizam as populações selvagens das espécies sensíveis;
- c) sempre que as explorações ou as populações selvagens devam ser submetidas a inspeções sanitárias ou a amostragem mais do que uma vez por ano, o tempo que medeia entre as inspeções sanitárias e entre as colheitas de amostras deve ser o maior possível, com um mínimo de quatro meses, tendo em conta os requisitos de temperatura da alínea a);
- d) todas as unidades de produção, como lagos, tanques e gaiolas de rede, devem ser submetidas a inspeções sanitárias para detetar a presença de peixes mortos, fracos ou com um comportamento anormal. Deve ser dada especial atenção à zona de escoamento da água, onde os peixes fracos têm tendência a acumular-se devido ao fluxo de água;
- e) as amostras de peixes de espécies sensíveis devem ser selecionadas do seguinte modo:
 - i) se a truta arco-íris estiver presente, só devem ser selecionados peixes dessa espécie, a menos que estejam presentes outras espécies sensíveis que exibam sinais típicos de SHV ou de NHI; se a truta arco-íris não estiver presente, a amostra deve ser representativa de todas as espécies sensíveis presentes,
 - ii) no caso de estarem presentes peixes fracos, com um comportamento anormal ou mortos recentemente, mas não em decomposição, é necessária a sua inclusão na amostra; se for utilizada mais do que uma fonte hídrica na produção de peixe, devem estar presentes na amostra peixes representativos de todas as fontes hídricas,
 - iii) os peixes selecionados devem ser recolhidos de modo a fornecer uma representação proporcional na amostra de todas as partes da exploração, bem como de todas as classes anuais.

I.2. Requisitos específicos para a obtenção do estatuto sanitário de indemnidade (categoria I) no que respeita à SHV e à NHI**I.2.1. Programas de vigilância:**

- a) um Estado-Membro, uma zona ou um compartimento que detém o estatuto sanitário de categoria III, tal como referido no anexo III, parte B, da Diretiva 2006/88/CE, no que respeita à SHV, à NHI ou a ambas, pode alcançar o estatuto sanitário da categoria I em relação a essas doenças se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da referida diretiva, nesse Estado-Membro, zona ou compartimento, cumprirem os requisitos estabelecidos no anexo V da mesma diretiva e todas essas explorações bem como, quando exigido pelo anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da mesma diretiva, os pontos de amostragem em populações selvagens, selecionados de acordo com essa parte, tenham sido sujeitos a um dos seguintes programas de vigilância:

i) modelo A — programa de vigilância bienal:

As explorações ou os pontos de amostragem devem ter sido submetidos a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de dois anos consecutivos, como estabelecido no quadro 1.A da secção II.

Durante esse período de dois anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para a SHV, a NHI ou para ambas, e qualquer suspeita de SHV, NHI ou de ambas deve ter sido excluída de acordo com os métodos de amostragem e diagnóstico estabelecidos no ponto II.3,

ii) modelo B — programa de vigilância quadrienal com amostras de dimensão reduzida:

As explorações ou os pontos de amostragem devem ter sido submetidos a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de quatro anos consecutivos, como estabelecido no quadro 1.B da secção II.

Durante esse período de quatro anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para a SHV, a NHI ou para ambas, e qualquer suspeita de SHV, NHI ou de ambas deve ter sido excluída de acordo com os métodos de amostragem e diagnóstico estabelecidos no ponto II.3;

b) se, no decurso da aplicação do programa de vigilância referido na alínea a), se confirmar, numa exploração incluída nesse programa de vigilância, uma infeção com SHV, NHI ou ambas, tendo portanto sido retirado à exploração o estatuto sanitário de categoria II, a exploração pode recuperar imediatamente esse estatuto e continuar a aplicar o programa de vigilância a fim de obter o estatuto de indemnidade sem aplicar um programa de erradicação, tal como estabelecido no ponto I.2.2, se cumprir as seguintes condições:

i) é uma exploração continental cujo estatuto sanitário referente à SHV, à NHI ou a ambas é independente do estatuto sanitário das populações de animais aquáticos nas águas naturais circundantes relativamente a essas doenças enumeradas, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 3, da Diretiva 2006/88/CE,

ii) é esvaziada, limpa, desinfetada e sujeita a vazio sanitário, cuja duração mínima é de seis semanas,

iii) é repovoada com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à SHV, à NHI ou a ambas.

I.2.2. Programas de erradicação

I.2.2.1. Requisitos gerais

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com um estatuto sanitário de categoria V no que respeita à SHV, à NHI ou a ambas pode alcançar o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essas doenças se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas a um programa de erradicação conforme com as alíneas a) a e):

a) devem ter sido aplicadas com eficácia as medidas mínimas de controlo estabelecidas no capítulo V, secção 4, da Diretiva 2006/88/CE e deve ter sido estabelecida, na vizinhança da ou das explorações oficialmente declaradas como infetadas com SHV, NHI ou ambas, uma zona de confinamento, como se refere no artigo 32.º, alínea b), da referida diretiva, incluindo uma zona de proteção e uma zona de vigilância.

A zona de confinamento deve ter sido definida caso a caso atendendo a fatores que influenciam os riscos de propagação das doenças enumeradas aos peixes de criação e selvagens, tais como: o número, a taxa e a distribuição da mortalidade dos peixes na exploração infetada com SHV, NHI ou ambas; a distância em relação às explorações vizinhas e a densidade populacional das mesmas; a proximidade com matadouros; as explorações em contacto; as espécies presentes nas explorações; as práticas de criação aplicadas nas explorações afetadas e nas explorações vizinhas; as condições hidrodinâmicas e outros fatores identificados com significância a nível epidemiológico.

Para o estabelecimento das zonas de proteção e vigilância, devem aplicar-se os requisitos mínimos seguintes no que respeita à demarcação geográfica dessas zonas:

- i) deve estabelecer-se uma zona de proteção na vizinhança imediata de uma exploração oficialmente declarada como infetada com SHV, NHI ou ambas, que deve corresponder a:
 - 1) em zonas costeiras: uma área inscrita num círculo de raio mínimo igual a uma excursão de maré, ou de, pelo menos, 5 km, consoante a distância que for maior, centrado na exploração oficialmente declarada como infetada com SHV, NHI ou ambas, ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados;
 - 2) em zonas interiores: a totalidade da bacia hidrográfica da exploração oficialmente declarada como infetada com SHV, NHI ou ambas; a autoridade competente pode limitar a extensão da zona a partes da bacia hidrográfica ou à área da exploração, desde que a prevenção da propagação da SHV, da NHI ou de ambas não fique comprometida,
- ii) a autoridade competente deve estabelecer uma zona de vigilância no exterior da zona de proteção, que deve corresponder a:
 - 1) em zonas costeiras: uma área que circunda a zona de proteção, com sobreposição de zonas de excursão de maré; ou uma área que circunda a zona de proteção, inscrita num círculo com 10 km de raio a partir do centro da zona de proteção; ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados;
 - 2) em zonas interiores: uma área alargada no exterior da zona de proteção estabelecida;
- b) todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE situadas dentro da zona de proteção e não oficialmente declaradas como infetadas com SHV, NHI ou ambas devem ser sujeitas a uma investigação oficial que inclua pelo menos os seguintes elementos:
 - i) a colheita de amostras para análise de 10 peixes, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a infeção com SHV, NHI ou ambas, ou de, pelo menos, 30 peixes quando não forem observados aqueles sinais clínicos ou *post mortem*,
 - ii) uma inspeção sanitária nas explorações onde as análises referidas na subalínea i) tenham produzido resultados negativos; as inspeções sanitárias devem continuar a realizar-se uma vez por mês durante o período em que a temperatura da água é inferior a 14 °C, exceto quando os tanques ou as gaiolas de rede estiverem cobertos com gelo, até que a zona de proteção seja retirada em conformidade com o ponto I.2.2.1, alínea c);
- c) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com SHV, NHI ou ambas devem ser esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário. A duração mínima do vazio sanitário é de seis semanas. Quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas na mesma zona de proteção forem esvaziadas, devem realizar-se pelo menos três semanas de vazio sanitário sincronizado. A presente alínea também se aplica às novas explorações oficialmente declaradas como infetadas durante a aplicação do programa de erradicação.

Quando se processa o vazio sanitário das explorações oficialmente declaradas como infetadas, as zonas de proteção são convertidas em zonas de vigilância.

A autoridade competente pode decidir requerer o esvaziamento, limpeza, desinfeção e vazio sanitário de outras explorações dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas. A duração do período de vazio sanitário nessas explorações deve ser determinada pela autoridade competente após uma avaliação de riscos caso a caso;

- d) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com SHV, NHI ou ambas, e todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas, tal como referido na alínea c), devem ser repovoadas com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de indemnidade (categoria I) no respeitante à SHV, à NHI ou a ambas.

O repovoamento só deve ocorrer quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas tiverem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário de acordo com o ponto I.2.2.1, alínea c);

- e) Todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE do Estado-Membro, zona ou compartimento abrangido pelo programa de erradicação e, quando exigida a vigilância nas populações selvagens, os pontos de amostragem selecionados de acordo com o ponto I.1, devem subsequentemente ser submetidos ao sistema de vigilância estabelecido no ponto I.2.1.

I.2.2.2. Requisitos para a recuperação do estatuto de indemnidade para os compartimentos continentais que incluam uma única exploração previamente declarada indemne de SHV, NHI ou ambas

Um compartimento continental com uma única exploração previamente declarada indemne de SHV, NHI ou ambas, cujo estatuto sanitário em relação a essas doenças enumeradas seja independente das águas naturais circundantes, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 3, da Diretiva 2006/88/CE, e cujo estatuto sanitário de categoria I tenha sido retirado em conformidade com o artigo 53.º, n.º 3, daquela diretiva, pode recuperar o estatuto sanitário de categoria I imediatamente depois de a autoridade competente ter confirmado que estão satisfeitas as seguintes condições:

- a) a exploração oficialmente confirmada como infetada com SHV, NHI ou ambas deve ter sido esvaziada, limpa, desinfetada e sujeita a vazio sanitário com uma duração mínima de seis semanas;
- b) a exploração oficialmente confirmada como infetada com SHV, NHI ou ambas foi repovoada com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à SHV, à NHI ou a ambas.

I.3. Requisitos específicos para a manutenção do estatuto sanitário de indemnidade (categoria I) no que respeita à SHV, à NHI ou a ambas

Sempre que seja necessário efetuar uma vigilância orientada a fim de manter o estatuto sanitário de categoria I, tal como previsto no artigo 52.º da Diretiva 2006/88/CE, todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, daquela diretiva no Estado-Membro, zona ou compartimento em causa devem ser sujeitas a uma inspeção sanitária e os peixes devem ser amostrados em conformidade com o quadro 1.C da secção II da presente parte, tendo em conta o nível de risco da exploração para a contração da SHV, da NHI ou de ambas.

Ao determinar a frequência das inspeções sanitárias para os compartimentos com estatuto sanitário de categoria I no respeitante à SHV, à NHI ou a ambas, situados em zonas continentais onde o estatuto sanitário relativo à SHV e à NHI está dependente do estatuto sanitário das populações de animais aquáticos nas águas naturais circundantes, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 2, da Diretiva 2006/88/CE, o risco de contração de SHV, de NHI ou de ambas deve ser considerado elevado.

O estatuto de indemnidade só deve ser mantido enquanto todas as amostras analisadas com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 produzirem resultados negativos para a SHV, a NHI ou ambas e qualquer suspeita de SHV, de NHI ou de ambas for excluída recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3.

I.4. Requisitos para o levantamento das medidas de confinamento previstas no artigo 39.º da Diretiva 2006/88/CE, designadamente a mudança de estatuto sanitário da categoria V para a categoria III

Um Estado-Membro, zona ou compartimento que detém o estatuto sanitário de categoria V relativamente à SHV, à NHI ou a ambas pode obter o estatuto sanitário de categoria III em relação a essas doenças enumeradas, desde que:

- a) estejam cumpridos os requisitos estabelecidos no ponto I.2.2.1, alíneas a), b) e c). Se o vazio sanitário não for tecnicamente possível, as explorações em causa devem ser submetidas a uma medida alternativa que forneça garantias quase semelhantes para a exterminação do VSHV, do VNHI ou de ambos do ambiente da exploração;
- b) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a) nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas tenham sido repovoadas com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I, II ou III no respeitante à SHV, à NHI ou a ambas;

- c) o repovoamento só tenha ocorrido depois de todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas terem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a).

II. Métodos de diagnóstico e de amostragem

II.1. Órgãos a amostrar:

O material tecidual a examinar é constituído pelo baço, o rim anterior e ainda o coração ou o encéfalo. Ao amostrar peixes reprodutores, pode também examinar-se fluido seminal ou ovariano.

No caso dos juvenis, os peixes inteiros com menos de 4 cm de comprimento podem ser picados com uma tesoura ou um bisturi esterilizados após remoção da parte do corpo posterior à cloaca. Caso a amostra seja constituída por peixes inteiros de comprimento compreendido entre 4 e 6 cm, deve colher-se as vísceras, incluindo os rins.

Pode agregar-se órgãos de um máximo de 10 peixes.

II.2. Métodos de diagnóstico para a obtenção e a manutenção do estatuto de indemnidade de SHV, de NHI ou de ambas

O método de diagnóstico, em conformidade com os métodos de diagnóstico e procedimentos aprovados estabelecidos no anexo II, parte 1, ponto I, para obter ou manter o estatuto de indemnidade de SHV, NHI ou ambas deve ser um dos seguintes:

- a) isolamento de vírus em cultura celular seguido de identificação por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), teste de imunofluorescência indireta (IFAT), teste de neutralização de vírus ou reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR); ou
- b) RT-qPCR.

II.3. Métodos de amostragem e diagnóstico para excluir ou confirmar a presença de SHV ou de NHI

Sempre que, nos termos do artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE, seja necessário confirmar ou excluir uma suspeita de SHV, de NHI ou de ambas, deve cumprir-se os seguintes procedimentos de inspeção, amostragem e análise:

- a) a exploração sob suspeita deve ser sujeita a pelo menos uma inspeção sanitária e devem ser amostrados 10 peixes, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a infeção por SHV, NHI ou ambas, ou, pelo menos, 30 peixes quando não forem observados aqueles sinais clínicos ou *post mortem*. As amostras devem ser analisadas recorrendo a um ou vários dos métodos de diagnóstico estabelecidos nas subalíneas i) e ii) de acordo com os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes do anexo II, parte 1, secção II:
 - i) isolamento de vírus convencional em cultura celular com subsequente identificação do vírus por via imunológica ou molecular,
 - ii) deteção do vírus por RT-qPCR,
 - iii) outras técnicas de diagnóstico de eficácia comprovadamente semelhante, como teste de imunofluorescência indireta (IFAT), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), RT-PCR e imuno-histoquímica (IHC);
- b) considera-se confirmada a presença de SHV se um ou mais métodos de diagnóstico tiverem resultado positivo para o VSHV. Considera-se confirmada a presença de NHI se um ou mais métodos de diagnóstico tiverem resultado positivo para o VNHI. A confirmação do primeiro caso de SHV ou de NHI num Estado-Membro, zona ou compartimento anteriormente não infetado deve basear-se no isolamento de vírus convencional em cultura celular ou em RT-qPCR;
- c) a suspeita de VSHV ou VNHI ou de ambos pode ser excluída se a cultura celular ou os testes RT-qPCR não revelarem provas da presença do VSHV, do VNHI ou de ambos.

Quadro 1.A

Sistema de vigilância para as zonas e compartimentos para o período de controlo de dois anos referido no ponto I.2.1, alínea a), subalínea i), que precede a obtenção do estatuto de indemnidade de SHV ou NHI

Tipo de exploração	Número de inspeções sanitárias por ano (dois anos)	Número de amostras por ano (dois anos)	Número de peixes na amostra ⁽¹⁾	
			Número de peixes em crescimento	Número de peixes reprodutores ⁽²⁾
a) Explorações com peixes reprodutores	2	2	50 (primeira inspeção) 75 (segunda inspeção)	30 (primeira ou segunda inspeção) 0 (primeira ou segunda inspeção)
b) Explorações unicamente com peixes reprodutores	2	1	0	75 (primeira ou segunda inspeção)
c) Explorações sem peixes reprodutores	2	2	75 ⁽³⁾ (primeira e segunda inspeções)	0

Número máximo de peixes por agregado: 10

⁽¹⁾ As amostras só podem ser colhidas decorridas três semanas após a transferência dos peixes da água doce para a salgada.

⁽²⁾ O fluido seminal ou ovariano dos peixes reprodutores deve ser colhido na altura da maturação, ao fazer-se a extração (*stripping*).

⁽³⁾ As amostras devem ser colhidas de um número de peixes que assegure a deteção do VSHV e do VNHI com um grau de confiança de 95 % com uma prevalência de projeto de 5 %.

Quadro 1.B

Sistema de vigilância com amostras de dimensão reduzida para o período de controlo de quatro anos referido no ponto I.2.1, alínea a), subalínea ii), que precede a obtenção do estatuto de indemnidade de SHV ou NHI

Tipo de exploração	Número de inspeções sanitárias por ano	Número de amostras por ano	Número de peixes na amostra ⁽¹⁾	
			Número de peixes em crescimento	Número de peixes reprodutores ⁽²⁾
Primeiros dois anos do período de vigilância				
a) Explorações com peixes reprodutores	2	1	0 (primeira inspeção) 30 (segunda inspeção)	0 (primeira inspeção) 0 (segunda inspeção)
b) Explorações unicamente com peixes reprodutores	2	1	0	30 (primeira ou segunda inspeção)
c) Explorações sem peixes reprodutores	2	1	30 ⁽³⁾ (primeira ou segunda inspeção)	0
Últimos dois anos do período de vigilância				
a) Explorações com peixes reprodutores	2	2	30 (primeira inspeção) 0 (segunda inspeção)	0 (primeira inspeção) 30 (segunda inspeção)

Tipo de exploração	Número de inspeções sanitárias por ano	Número de amostras por ano	Número de peixes na amostra ⁽¹⁾	
			Número de peixes em crescimento	Número de peixes reprodutores ⁽²⁾
b) Explorações unicamente com peixes reprodutores	2	2		30 (primeira e segunda inspeções)
c) Explorações sem peixes reprodutores	2	2	30 ⁽³⁾ (primeira e segunda inspeções)	

Número máximo de peixes por agregado: 10

⁽¹⁾ As amostras só podem ser colhidas decorridas três semanas após a transferência dos peixes da água doce para a salgada.

⁽²⁾ O fluido seminal ou ovariano dos peixes reprodutores deve ser colhido na altura da maturação, ao fazer-se a extração (*stripping*).

⁽³⁾ As amostras devem ser colhidas de um número de peixes que assegure a deteção do VSHV e do VNHI com um grau de confiança de 95 % com uma prevalência de projeto de 10 %.

Quadro 1.C

Sistema de vigilância para as zonas e compartimentos destinado a manter o estatuto de indemnidade de SHV ou NHI, tal como referido no ponto I.3

Nível de risco	Número de inspeções sanitárias	Número de peixes na amostra ⁽³⁾
Elevado	2 vezes por ano	30 ⁽¹⁾ ⁽²⁾
Médio	1 vez por ano	30 ⁽¹⁾
Reduzido	1 vez de 2 em 2 anos	30 ⁽¹⁾

Número máximo de peixes por agregado: 10

⁽¹⁾ As amostras só podem ser colhidas decorridas três semanas após a transferência dos peixes da água doce para a salgada.

⁽²⁾ As amostras devem ser colhidas de um número de peixes que assegure a deteção do VSHV e do VNHI com um grau de confiança de 95 % com uma prevalência de projeto de 10 %.

⁽³⁾ Por cada inspeção sanitária, deve colher-se, no mínimo, uma amostra.

PARTE 2

VIGILÂNCIA E MÉTODOS DE CONTROLO DA HERPESVIROSE DA CARPA KOI (HCK)

I. Requisitos para os programas de vigilância e erradicação destinados a obter e manter o estatuto de indemnidade da HCK e a confinar a infeção com o herpesvírus da carpa koi (HVCK)

I.1. Requisitos gerais

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada em populações selvagens, de acordo com o anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da Diretiva 2006/88/CE, o número e a distribuição geográfica dos pontos de amostragem devem ser determinados por forma a obter uma cobertura razoável do Estado-Membro, da zona ou do compartimento. Os pontos de amostragem devem também ser representativos dos diferentes ecossistemas onde se situam as populações selvagens sensíveis, nomeadamente sistemas fluviais e lagos.

A vigilância orientada deve basear-se na monitorização regular dos locais com espécies sensíveis. Os locais devem ser monitorizados quando a temperatura das águas tiver alcançado níveis que favoreçam o desenvolvimento das doenças ($> 15^{\circ}\text{C}$) e não antes de decorridas duas semanas após a data em que essas temperaturas foram atingidas. Todos os peixes doentes ou que exibam um comportamento anormal encontrados no local devem ser amostrados e testados.

Sempre que possível, devem amostrar-se os peixes mantidos por um período prolongado no intervalo de temperaturas que favorece a presença do vírus, designadamente duas a três semanas entre 15°C e 26°C . No entanto, pode ser aceitável a seguinte abordagem:

- a) colher uma subpopulação quando da transferência dos tanques de inverno para os de verão e manter os peixes na mesma massa de água dos tanques de verão até que sejam atingidos os requisitos mínimos de temperatura; ou
- b) colher amostras quando da captura dos peixes ou durante outras operações de manipulação dos peixes enquanto prática normal de gestão. Se possível, as amostras devem ser colhidas entre 24 e 72 horas após essas práticas de gestão a fim de melhorar as hipóteses de deteção do HVCK.

Sempre que as explorações ou as populações selvagens devam ser submetidas a inspeções sanitárias ou colheita de amostras mais do que uma vez por ano, o intervalo entre as inspeções sanitárias ou a colheita de amostras deve ser o mais longo possível dentro da estação em que é mais provável que a temperatura da água atinja o valor anual mais elevado, sem ultrapassar o limite de 28°C .

Todas as unidades de produção, como lagos e tanques, devem ser submetidas a inspeções sanitárias para detetar a presença de peixes mortos, fracos ou com um comportamento anormal.

Quando presentes na exploração, devem colher-se *Cyprinus carpio* e os seus híbridos, tais como *Cyprinus carpio* \times *Carassius auratus*.

As amostras de peixes devem ser seleccionadas do seguinte modo:

- i) no caso de estarem presentes peixes fracos, com um comportamento anormal ou mortos recentemente, mas não em decomposição, é necessária a sua inclusão na amostra;
- ii) se for utilizada mais do que uma fonte hídrica na produção de peixe, devem estar presentes na amostra peixes representativos de todas as fontes hídricas;
- iii) os peixes seleccionados devem ser recolhidos de modo a fornecer uma representação proporcional na amostra de todas as partes da exploração, bem como de todas as classes anuais.

I.2. Requisitos específicos para a obtenção do estatuto sanitário de indemnidade (categoria I) no que respeita à HCK

I.2.1. Programas de vigilância

- a) um Estado-Membro, uma zona ou um compartimento com o estatuto sanitário de categoria III no que respeita à HCK, pode alcançar o estatuto sanitário da categoria I se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE, nesse Estado-Membro, zona ou compartimento, cumprirem os requisitos para o estatuto de indemnidade estabelecidos no anexo V da mesma diretiva e todas essas explorações bem como, quando exigido na parte I, ponto 2, segundo parágrafo, do mesmo anexo, os pontos de amostragem em populações selvagens, seleccionados de acordo com essa parte, tenham sido sujeitos a um dos seguintes programas de vigilância:

- i) modelo A — programa de vigilância bienal:

As explorações ou os pontos de amostragem devem ter sido submetidos a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de dois anos consecutivos, como estabelecido no quadro 2.^A da secção III.

Durante esse período de dois anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para a HCK e quaisquer suspeitas dessa doença devem ter sido excluídas de acordo com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto III.2,

- ii) modelo B — programa de vigilância quadrienal com amostras de dimensão reduzida:

As explorações ou os pontos de amostragem devem ter sido submetidos a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de quatro anos consecutivos, como estabelecido no quadro 2.B da secção III.

Durante esse período de quatro anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para a HCK e quaisquer suspeitas dessa doença devem ter sido excluídas de acordo com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto III.2;

- b) se, no decurso da aplicação do programa de vigilância quadrienal referido na alínea a), se confirmar, numa exploração incluída nesse programa de vigilância, uma infeção por HCK, tendo portanto sido retirado à exploração o estatuto sanitário de categoria II, a exploração pode recuperar imediatamente esse estatuto e continuar a aplicar o programa de vigilância a fim de obter o estatuto de indemnidade sem aplicar um programa de erradicação, tal como estabelecido no ponto I.2.2, se cumprir as seguintes condições:
- i) é uma exploração continental cujo estatuto sanitário referente à HCK é independente do estatuto sanitário das populações de animais aquáticos nas águas naturais circundantes relativamente a essa doença enumerada, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 3, da Diretiva 2006/88/CE,
 - ii) foi esvaziada, limpa, desinfetada e sujeita a vazio sanitário com uma duração mínima de seis semanas,
 - iii) foi repovoada com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à HCK.

I.2.2. Programas de erradicação

I.2.2.1. Requisitos gerais

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com o estatuto sanitário de categoria V no que respeita à HCK pode alcançar o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essa doença se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas, pelo menos, ao seguinte programa de erradicação:

- a) foram aplicadas com eficácia as medidas mínimas de controlo estabelecidas no capítulo V, secção 4, da Diretiva 2006/88/CE e foi estabelecida, na vizinhança da ou das explorações oficialmente declaradas como infetadas com HCK, uma zona de confinamento, como se refere no artigo 32.º, alínea b), da referida diretiva, incluindo uma zona de proteção e uma zona de vigilância.

A zona de confinamento deve ter sido definida caso a caso atendendo a fatores que influenciam os riscos de propagação de HCK aos peixes de criação e selvagens, tais como: o número, a taxa e a distribuição da mortalidade dos peixes na exploração infetada com HCK; a distância em relação às explorações vizinhas e a densidade populacional das mesmas; a proximidade com matadouros; as explorações em contacto; as espécies presentes nas explorações; as práticas de criação aplicadas na exploração afetada e nas explorações vizinhas; as condições hidrodinâmicas e outros fatores identificados com significância a nível epidemiológico.

Para o estabelecimento das zonas de proteção e vigilância, devem aplicar-se os requisitos mínimos seguintes no que respeita à demarcação geográfica dessas zonas:

- i) deve estabelecer-se uma zona de proteção na vizinhança imediata de uma exploração oficialmente declarada como infetada com HCK, que deve corresponder à totalidade da bacia hidrográfica da exploração oficialmente declarada como infetada com HCK; a autoridade competente pode limitar a extensão da zona a partes da bacia hidrográfica, desde que a prevenção da propagação da HCK não fique comprometida,
- ii) deve estabelecer-se uma zona de vigilância no exterior da zona de proteção, correspondente a uma área alargada que circunda a zona de proteção estabelecida;

- b) todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE situadas dentro da zona de proteção e não oficialmente declaradas como infetadas com HCK devem ser sujeitas a uma investigação oficial que inclua pelo menos os seguintes elementos:
- i) a colheita de amostras para análise de 10 peixes, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a HCK, ou de 30 peixes quando não forem observados aqueles sinais clínicos ou *post mortem*,
 - ii) uma inspeção sanitária nas explorações onde as análises referidas no ponto III.2 tenham produzido resultados negativos; as inspeções sanitárias devem continuar a realizar-se uma vez por mês durante a estação em que é mais provável que a temperatura da água atinja $> 15^{\circ}\text{C}$, até que a zona de proteção seja retirada em conformidade com o ponto I.2.2.1, alínea c);
- c) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com HCK devem ser esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário. A duração mínima do vazio sanitário é de seis semanas. Quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas na mesma zona de proteção forem esvaziadas, devem realizar-se pelo menos três semanas de vazio sanitário sincronizado. A presente alínea também se aplica às novas explorações oficialmente declaradas como infetadas durante a aplicação do programa de erradicação.

Após a realização do vazio sanitário das explorações oficialmente declaradas como infetadas, as zonas de proteção são convertidas em zonas de vigilância.

A autoridade competente pode decidir requerer o esvaziamento, limpeza, desinfecção e vazio sanitário de outras explorações dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas. A duração do período de vazio sanitário deve ser determinada pela autoridade competente após uma avaliação de riscos caso a caso;

- d) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com HCK e todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas devem ser repovoadas:
- i) com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à HCK, ou
 - ii) durante um período transitório até 31 de dezembro de 2020, com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um programa de vigilância da HCK aprovado.

O repovoamento só deve ocorrer quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com HCK tiverem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário de acordo com o ponto I.2.2.1, alínea c);

- e) todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE do Estado-Membro, zona ou compartimento abrangido pelo programa de erradicação e, quando exigida a vigilância nas populações selvagens, os pontos de amostragem selecionados de acordo com o ponto I.1, devem subsequentemente ter sido submetidos, pelo menos, ao programa de vigilância estabelecido no ponto I.2.1.

I.2.2.2. Requisitos para a recuperação do estatuto de indemnidade para os compartimentos continentais que incluam uma única exploração previamente declarada indemne de HCK

Um compartimento continental com uma única exploração com o estatuto sanitário de categoria I no que respeita à HCK, cujo estatuto sanitário em relação à HCK seja independente das águas naturais circundantes, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 3, da Diretiva 2006/88/CE, e cujo estatuto sanitário de categoria I tenha sido retirado em conformidade com o artigo 53.º, n.º 3, daquela diretiva, pode recuperar o estatuto sanitário de categoria I em relação à HCK imediatamente depois de a autoridade competente ter confirmado que estão satisfeitas as seguintes condições:

- a) foi esvaziada, limpa, desinfetada e sujeita a vazio sanitário com a duração mínima de seis semanas;
- b) foi repovoada com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I ou de compartimentos com um programa de vigilância da HCK aprovado (estatuto sanitário de categoria II).

I.3. Requisitos específicos para a manutenção do estatuto sanitário de categoria I no que respeita à HCK

Sempre que seja necessário efetuar uma vigilância orientada a fim de manter o estatuto sanitário de categoria I, tal como previsto no artigo 52.º da Diretiva 2006/88/CE, todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, daquela diretiva no Estado-Membro, zona ou compartimento em causa devem ser sujeitas a uma inspeção sanitária e colheita de amostras em conformidade com o quadro 2.B da secção III da presente parte, tendo em conta o nível de risco da exploração para a contração da HCK.

A frequência das inspeções sanitárias para os compartimentos com estatuto sanitário de categoria I no respeitante à HCK, situados em zonas continentais e incluindo uma ou várias explorações cujo estatuto sanitário relativo à HCK está dependente do estatuto sanitário das águas naturais circundantes relativamente a essa doença enumerada, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 2, da Diretiva 2006/88/CE, deve estar de acordo com o número fixado para o nível de risco elevado no quadro 2.C.

Nos Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um número limitado de explorações e em que a vigilância orientada dessas explorações não proporciona dados epidemiológicos suficientes, os sistemas de vigilância para manter o estatuto de indemnidade devem incluir pontos de amostragem selecionados de acordo com os requisitos estabelecidos no ponto I.1.

Esses pontos de amostragem devem ser inspecionados e amostrados por rotação de 50 % dos pontos de amostragem cada ano. A amostragem deve realizar-se de acordo com o quadro 2.C da secção III. As amostras devem ser selecionadas, preparadas e examinadas tal como descrito na secção II e os exames laboratoriais devem ser negativos no que respeita à presença do agente da HCK.

O estatuto de indemnidade só deve ser mantido enquanto todas as amostras analisadas com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 produzirem resultados negativos para a HCK e qualquer suspeita de HCK for excluída recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto III.2.

I.4. Requisitos específicos para o levantamento das medidas de confinamento previstas no artigo 39.º da Diretiva 2006/88/CE para a obtenção do estatuto sanitário de categoria III no que respeita à HCK em Estados-Membros, zonas ou compartimentos com o estatuto sanitário de categoria V

Um Estado-Membro, zona ou compartimento que detém o estatuto sanitário de categoria V relativamente à HCK pode obter o estatuto sanitário de categoria III em relação a essa doença enumerada, desde que:

- a) estejam cumpridos os requisitos estabelecidos no ponto I.2.2.1, alíneas a), b) e c). Se o vazio sanitário não for tecnicamente possível, as explorações em causa devem ser submetidas a uma medida alternativa que forneça garantias quase semelhantes para a exterminação do HVCK do ambiente da exploração;
- b) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a) nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas tenham sido repovoadas com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I, II ou III no respeitante à HCK;
- c) o repovoamento só tenha ocorrido depois de todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas terem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a).

II. **Métodos de diagnóstico e de amostragem para a vigilância destinada a obter e manter o estatuto de indemnidade relativamente à HCK**

II.1. Amostragem

O material tecidual a examinar deve ser constituído por partes de tecido das brânquias e dos rins. Pode agregar-se órgãos de um máximo de dois peixes.

II.2. Métodos de diagnóstico para a vigilância destinada a obter e manter o estatuto de indemnidade relativamente à HCK

O método de diagnóstico destinado a alcançar ou a manter o estatuto de indemnidade da HCK deve ser a PCR em tempo real (qPCR) de acordo com os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes do anexo II, parte 2, secção II.

III. Métodos de diagnóstico e de amostragem para as investigações oficiais destinadas a confirmar ou excluir uma suspeita de HCK

III.1. Amostras

O material tecidular a examinar deve ser constituído por partes das brânquias e dos rins. Pode agregar-se órgãos de um máximo de dois peixes.

III.2. Investigação oficial e métodos de diagnóstico para excluir ou confirmar a presença de infeção por HVCK

Sempre que, nos termos do artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE, seja necessário confirmar ou excluir uma suspeita de HCK, devem cumprir-se os seguintes procedimentos de inspeção, amostragem e análise:

- a) a investigação oficial deve incluir pelo menos uma inspeção sanitária e uma amostragem de 10 peixes, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a infeção por HVCK, ou de 30 peixes quando não forem observados aqueles sinais clínicos ou *post mortem*. As amostras devem ser analisadas recorrendo ao método de diagnóstico estabelecido na alínea b) de acordo com os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes do anexo II, parte 2, secção II;
 - b) a presença da infeção por HVCK deve ser considerada como confirmada se o HVCK for detetado por PCR;
- a suspeita de HCK pode ser excluída se os testes não revelarem mais provas da presença do HVCK.

Quadro 2.A

Sistema de vigilância para zonas e compartimentos para o período de controlo de dois anos que precede a obtenção do estatuto de indemnidade no que respeita à HCK, como referido no ponto I.2.1

		Número de inspeções clínicas por ano (dois anos)	Número de exames laboratoriais por ano (dois anos)	Número de peixes na amostra
Explorações/locais de amostragem	Primeiros dois anos do período de vigilância	2	2	75 ⁽¹⁾
	Número máximo de peixes por agregado: 2			

⁽¹⁾ As amostras devem ser colhidas de um número de peixes que assegure a deteção do HVCK com um grau de confiança de 95 % com uma prevalência de projeto de 5 %.

Quadro 2.B

Sistema de vigilância para zonas e compartimentos para o período de controlo de quatro anos que precede a obtenção do estatuto de indemnidade no que respeita à HCK, como referido no ponto I.2.1

		Número de inspeções clínicas por ano	Número de exames laboratoriais por ano	Número de peixes na amostra
Explorações/locais de amostragem	Primeiros dois anos do período de vigilância	1	1	30
Explorações/locais de amostragem	Últimos dois anos do período de vigilância	2	2	30
	Número máximo de peixes por agregado: 2			

Quadro 2.C

Sistema de vigilância para as zonas e compartimentos destinado a manter o estatuto de indemnidade de HCK, tal como referido no ponto I.3

Nível de risco	Número de inspeções sanitárias	Número de peixes na amostra
Elevado	2 vezes por ano	30
Médio	1 vez por ano	30
Reduzido	1 vez de 2 em 2 anos	30

Número máximo de peixes por agregado: 2

Quadro 2.D

Sistema de vigilância destinado a manter o estatuto de indemnidade de HCK em Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um número limitado de explorações e em que a vigilância orientada dessas explorações não proporciona dados epidemiológicos suficientes, tal como referido no ponto I.3

	Número de inspeções clínicas por ano	Número de exames laboratoriais por ano	Número de peixes na amostra
Pontos de amostragem	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 2 em 2 anos	30

Número máximo de peixes por agregado: 2

PARTE 3

VIGILÂNCIA E MÉTODOS DE CONTROLO DA ANEMIA INFECIOSA DO SALMÃO (AIS)**I. Requisitos para os programas de vigilância e erradicação destinados a obter e manter o estatuto de indemnidade da AIS e a confinar a infeção por VAIS com supressão da HPR****I.1. Requisitos gerais**

Sempre que for exigido que as explorações sejam submetidas a inspeções sanitárias ou colheita de amostras, em conformidade com o anexo V, parte I, ponto 2, da Diretiva 2006/88/CE, mais do que uma vez por ano, o intervalo entre as inspeções sanitárias ou a colheita de amostras deve ser o mais longo possível.

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada em populações selvagens, de acordo com o anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da Diretiva 2006/88/CE, o número e a distribuição geográfica dos pontos de amostragem devem ser determinados por forma a obter uma cobertura razoável do Estado-Membro, da zona ou do compartimento. Os pontos de amostragem devem também ser representativos dos diferentes ecossistemas onde se situam as populações selvagens sensíveis.

As inspeções sanitárias devem realizar-se em todas as unidades de produção, tais como lagos, tanques e gaiolas de rede, para detetar a presença de peixes mortos, fracos ou com um comportamento anormal. Deve ser dada especial atenção à zona de escoamento da água, onde os peixes fracos têm tendência a acumular-se devido ao fluxo de água.

As amostras de peixes devem ser selecionadas do seguinte modo:

- a) deve selecionar-se apenas os peixes moribundos ou mortos recentemente, mas não em decomposição; em especial, deve dar-se prioridade à recolha dos peixes com sinais de anemia, sangramentos ou outros sinais clínicos que sugiram perturbações circulatórias;
- b) se o salmão-do-atlântico estiver entre as espécies sensíveis no local, deve dar-se prioridade às amostras de salmão-do-atlântico. Se não estiver presente salmão-do-atlântico na exploração piscícola, deve amostrar-se outras espécies sensíveis;
- c) se for utilizada mais do que uma fonte hídrica na produção de peixe, devem estar presentes na amostra peixes representativos de todas as fontes hídricas;
- d) os peixes selecionados devem ser recolhidos de modo a fornecer uma representação proporcional na amostra de todas as unidades de produção da exploração, tais como lagos, tanques e gaiolas de rede, bem como de todas as classes anuais.

I.2. Requisitos específicos para a obtenção do estatuto sanitário de categoria I no que respeita à AIS

I.2.1. Programas de vigilância

Um Estado-Membro, uma zona ou um compartimento que detém o estatuto sanitário de categoria III, em conformidade com o anexo III, parte B, da Diretiva 2006/88/CE, no que respeita à AIS, pode alcançar o estatuto sanitário da categoria I em relação a essa doença se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da referida diretiva, nesse Estado-Membro, zona ou compartimento, cumprirem os requisitos relevantes estabelecidos no anexo V da mesma diretiva e todas essas explorações bem como, quando exigido pelo anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da mesma diretiva, os pontos de amostragem em populações selvagens, selecionados de acordo com esse ponto, tenham sido sujeitos ao seguinte programa de vigilância:

- a) as explorações ou os pontos de amostragem foram submetidos a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de dois anos consecutivos, como estabelecido no quadro 3.^a da secção II;
- b) durante esse período de dois anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para o VAIS com supressão da HPR e quaisquer suspeitas de AIS devem ter sido excluídas de acordo com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3;
- c) se, durante a aplicação do programa de vigilância, se confirmar a AIS numa exploração incluída nesse programa de vigilância, com a consequente retirada do estatuto sanitário de categoria II, deve realizar-se um programa de erradicação de acordo com o ponto I.2.2.

I.2.2. Programas de erradicação

I.2.2.1. Requisitos gerais

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com um estatuto sanitário de categoria V no que respeita à AIS pode alcançar o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essa doença se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas a um programa de erradicação conforme com as seguintes alíneas a) a e):

- a) foram aplicadas com eficácia as medidas mínimas de controlo estabelecidas no capítulo V, secção 3, da Diretiva 2006/88/CE e, em especial, foi estabelecida, na vizinhança da ou das explorações oficialmente declaradas como infetadas com VAIS com supressão da HPR ou em que se confirmou a AIS, uma zona de confinamento, como se refere no artigo 32.º, alínea b), da referida diretiva, incluindo uma zona de proteção e uma zona de vigilância.

A zona de confinamento deve ter sido definida caso a caso atendendo a fatores que influenciam os riscos de propagação de AIS aos peixes de criação e selvagens, tais como: o número, a taxa e a distribuição da mortalidade dos peixes na exploração infetada com VAIS com supressão da HPR ou em que se confirmou a AIS; a distância em relação às explorações vizinhas e a densidade populacional das mesmas; a proximidade com matadouros; as explorações em contacto; as espécies presentes nas explorações; as práticas de criação aplicadas na exploração afetada e nas explorações vizinhas; as condições hidrodinâmicas e outros fatores identificados com significância a nível epidemiológico.

Para o estabelecimento das zonas de proteção e vigilância, devem aplicar-se os requisitos mínimos seguintes no que respeita à demarcação geográfica dessas zonas:

- i) deve estabelecer-se uma zona de proteção na vizinhança imediata de uma exploração oficialmente declarada como infetada com AIS, que deve corresponder a:
 - 1) em zonas costeiras: uma área inscrita num círculo de raio mínimo igual a uma excursão de maré ou de, pelo menos, 5 km, consoante a distância que for maior, centrado na exploração oficialmente declarada como infetada com AIS, ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados;
 - 2) em zonas interiores: a totalidade da bacia hidrográfica da exploração oficialmente declarada como infetada com AIS; a autoridade competente pode limitar a extensão da zona a partes da bacia hidrográfica, desde que a prevenção da propagação da AIS não fique comprometida,
- ii) deve estabelecer-se uma zona de vigilância no exterior da zona de proteção, que deve corresponder a:
 - 1) em zonas costeiras: uma área que circunda a zona de proteção, com sobreposição de zonas de excursão de maré; ou uma área que circunda a zona de proteção, inscrita num círculo com 10 km de raio a partir do centro da zona de proteção; ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados; ou
 - 2) em zonas interiores: uma área alargada no exterior da zona de proteção estabelecida;
- b) todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE situadas dentro da zona de proteção e não oficialmente declaradas como infetadas com AIS devem ser sujeitas a uma investigação oficial que inclua pelo menos os seguintes elementos:
 - i) a colheita de amostras para análise de, no mínimo, 10 peixes moribundos, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a infeção por AIS, ou de, no mínimo, 30 peixes quando não forem observados aqueles sinais clínicos ou *post mortem*,
 - ii) uma inspeção sanitária nas explorações em que as análises referidas na subalínea i) tiverem produzido resultados negativos, as inspeções sanitárias devem prosseguir uma vez por mês até que a zona de proteção seja retirada em conformidade com o ponto I.2.2.1, alínea c);
- c) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com o VAIS com supressão da HPR ou em que tiver sido confirmada a AIS devem ser esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário por um período mínimo de três meses. Poderá proceder-se ao levantamento das zonas de proteção e vigilância quando todas as explorações na zona de proteção tiverem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a um vazio sanitário sincronizado por um período mínimo de seis semanas.

Após a realização do vazio sanitário das explorações oficialmente declaradas como infetadas, as zonas de proteção são convertidas em zonas de vigilância.

A autoridade competente pode decidir requerer o esvaziamento, limpeza, desinfecção e vazio sanitário de outras explorações dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas. A duração do período de vazio sanitário nessas explorações deve ser determinada pela autoridade competente após uma avaliação de riscos caso a caso;

- d) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com VAIS com supressão da HPR ou em que se confirmou a AIS, bem como todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas, devem ser repovoadas com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à AIS.

O repovoamento só deve ocorrer quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas tiverem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário de acordo com o ponto I.2.2.1, alínea c);

- e) todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE do Estado-Membro, zona ou compartimento abrangido pelo programa de erradicação e, quando exigida a vigilância nas populações selvagens, os pontos de amostragem selecionados de acordo com o ponto I.1, devem subsequentemente ser submetidos ao sistema de vigilância estabelecido no ponto I.2.1.

- I.2.2.2. Requisitos para a recuperação do estatuto de indemnidade para os compartimentos continentais que incluam uma única exploração previamente declarada com o estatuto sanitário de categoria I

Um compartimento continental com uma única exploração com o estatuto sanitário de categoria I no que respeita à AIS, cujo estatuto sanitário seja independente das águas naturais circundantes, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 3, da Diretiva 2006/88/CE, e cujo estatuto sanitário de categoria I tenha sido retirado em conformidade com o artigo 53.º, n.º 3, daquela diretiva, pode recuperar esse estatuto imediatamente depois de a autoridade competente ter confirmado que cumpre as seguintes condições:

- a) foi esvaziada, limpa, desinfetada e sujeita a vazio sanitário com uma duração mínima de seis semanas;
- b) foi repovoada com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à AIS.

- I.3. Medidas mínimas de controlo para a manutenção do estatuto sanitário de categoria I no que respeita à AIS

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada a fim de manter o estatuto sanitário de categoria I, tal como previsto no artigo 52.º da Diretiva 2006/88/CE, todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, daquela diretiva no Estado-Membro, zona ou compartimento em causa devem ser sujeitas a inspeções sanitárias e colheita de amostras em conformidade com o quadro 3.B ⁽¹⁾ da secção II da presente parte, tendo em conta o nível de risco da exploração para a contração da AIS.

Ao determinar a frequência das inspeções sanitárias para os compartimentos com estatuto sanitário de categoria I no respeitante à AIS, situados em zonas continentais onde o estatuto sanitário relativo à AIS está dependente do estatuto sanitário das águas naturais circundantes onde está presente salmão-do-atlântico (*Salmo salar*), o risco de contração de AIS deve ser considerado elevado.

O estatuto de indemnidade de AIS só pode ser mantido enquanto todas as amostras analisadas com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 produzirem resultados negativos para o VAIS com supressão da HPR e qualquer suspeita de AIS for excluída recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3.

- I.4. Requisitos específicos para a obtenção do estatuto sanitário de categoria III no que respeita ao VAIS com supressão da HPR em Estados-Membros, zonas ou compartimentos que gozavam anteriormente do estatuto sanitário da categoria V

Um Estado-Membro, zona ou compartimento que detém o estatuto sanitário de categoria V relativamente à AIS pode obter o estatuto sanitário de categoria III desde que:

- a) estejam cumpridos os requisitos estabelecidos no ponto I.2.2.1, alíneas a), b) e c). Se o vazio sanitário não for tecnicamente possível, as explorações devem ser submetidas a uma medida alternativa que forneça garantias quase semelhantes para a exterminação do VAIS do ambiente da exploração;
- b) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a) nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas tenham sido repovoadas com peixes provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I, II ou III no respeitante à AIS;
- c) o referido repovoamento só tenha ocorrido depois de todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas terem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a);
- d) não se tenha confirmado qualquer presença de VAIS com supressão da HPR durante o período de dois anos subsequente à conclusão das medidas referidas nas alíneas a), b) e c) e quaisquer suspeitas durante esse período tenham sido excluídas de acordo com os procedimentos estabelecidos no ponto III.3.

⁽¹⁾ Não se aplica às explorações que criam exclusivamente truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e/ou truta comum (*Salmo trutta*) e em que o abastecimento de água se baseia exclusivamente em fontes de água doce onde não esteja presente salmão-do-atlântico (*Salmo salar*).

II. Métodos de diagnóstico e investigações oficiais

II.1. Amostras

O material tecidular a examinar deve ser o seguinte:

- a) histologia: rim anterior, fígado, pâncreas, intestino, baço e brânquias;
- b) imuno-histoquímica: rim médio e coração, incluindo as válvulas e o *bulbus arteriosus*;
- c) análise por RT-qPCR: rim médio e coração;
- d) culturas de vírus: rim médio, coração, fígado e baço.

Pode agregar-se órgãos de um máximo de cinco peixes.

II.2. Métodos de diagnóstico para obter ou manter o estatuto de indemnidade relativamente à AIS

O método de diagnóstico a utilizar a fim de obter ou de manter o estatuto de indemnidade em relação à AIS em conformidade com os pontos I.2 e I.3 é a RT-qPCR, seguida de sequenciação das amostras positivas em conformidade com os métodos e procedimentos detalhados estabelecidos no anexo II, parte 3.

Em caso de resultado positivo na RT-qPCR, devem testar-se mais amostras antes da aplicação das medidas de controlo iniciais estabelecidas no artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE.

Essas amostras devem ser testadas do seguinte modo, de acordo com os métodos e procedimentos detalhados estabelecidos no anexo II, parte 3:

- a) rastreio das amostras por RT-qPCR, incluindo sequenciação do gene HE para verificar a supressão na HPR;
- e
- b) exame de preparações tecidulares através de anticorpos específicos contra o VAIS (designadamente imuno-histoquímica em secções fixadas ou imunofluorescência indireta em impressões tecidulares); ou
- c) isolamento e identificação do VAIS numa cultura celular de, pelo menos, uma amostra de um peixe da exploração.

II.3. Investigação oficial e métodos de diagnóstico para excluir ou confirmar a presença de AIS

Sempre que, nos termos do artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE, seja necessário confirmar ou excluir uma suspeita de AIS, deve cumprir-se os seguintes procedimentos de inspeção, amostragem e análise:

- a) a investigação oficial deve incluir pelo menos uma inspeção sanitária e uma amostragem de 10 peixes moribundos, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a AIS. Se não se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a AIS, a inspeção sanitária deve ser seguida de amostragem direcionada de, no mínimo, 30 peixes moribundos ou mortos recentemente, com uma constituição normal em conformidade com o ponto I.1. As amostras devem ser analisadas de acordo com os métodos de diagnóstico estabelecidos na alínea b);
- b) em caso de resultado positivo na RT-qPCR para o VAIS com supressão da HPR, deve testar-se mais amostras antes da aplicação das medidas de controlo iniciais estabelecidas no artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE. Um caso suspeito de infeção por AIS deve ser confirmado de acordo com os seguintes critérios, usando os métodos e procedimentos detalhados estabelecidos no anexo II, parte 3:
 - i) deteção do VAIS por RT-qPCR, incluindo sequenciação do gene HE para verificar a supressão da HPR, e deteção do VAIS em preparações tecidulares através de anticorpos específicos contra o VAIS (designadamente imuno-histoquímica em secções fixadas ou imunofluorescência indireta em impressões tecidulares),

ou

- ii) deteção do VAIS por RT-qPCR, incluindo sequenciação do gene HE para verificar a supressão na HPR, e isolamento e identificação do VAIS numa cultura celular de, pelo menos, uma amostra de qualquer peixe da exploração;
- c) sempre que se observar a presença de sinais clínicos, alterações patológicas macroscópicas ou constatações histopatológicas coerentes com a AIS, essas constatações devem ser corroboradas pela deteção do vírus através de dois métodos de diagnóstico com princípios de deteção independentes, como sejam RT-qPCR e IHC, em conformidade com o anexo II, parte 3.

A suspeita de AIS pode ser excluída se os testes e as inspeções ao longo de um período de 12 meses a partir da data da suspeita não revelarem mais provas da presença de AIS.

Quadro 3.A

Sistema de vigilância para zonas e compartimentos para o período de controlo de dois anos que precede a obtenção do estatuto de indemnidade no que respeita à AIS, como referido no ponto I.2.1

Ano da vigilância	Número de inspeções sanitárias por ano (dois anos)	Número de exames laboratoriais por ano (dois anos)	Número de peixes a amostrar por ano
Ano 1	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾
Ano 2	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾

⁽¹⁾ As amostras devem ser colhidas, armazenadas e examinadas durante dois períodos de teste anuais de um mês (designadamente na primavera e no outono) ou quando for adequado em conformidade com considerações práticas.

⁽²⁾ Número máximo de peixes por agregado: 5.

Quadro 3.B

Sistema de vigilância para as zonas e compartimentos destinado a manter o estatuto de indemnidade de AIS, tal como referido no ponto I.3 ⁽²⁾

Nível de risco	Número de inspeções sanitárias por ano	Número de exames laboratoriais por ano	Número de peixes a amostrar por ano
Elevado	2	2 ⁽¹⁾	2 * 30
Médio	1	1 ⁽¹⁾	30
Reduzido	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 2 em 2 anos	30 de 2 em 2 anos

⁽¹⁾ As amostras devem ser colhidas e examinadas durante dois períodos de teste anuais de um mês (designadamente na primavera e no outono) ou quando for adequado em conformidade com considerações práticas.

⁽²⁾ Não se aplica às explorações que criam exclusivamente truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e/ou truta comum (*Salmo trutta*) e em que o abastecimento de água se baseia exclusivamente em fontes de água doce onde não esteja presente salmão-do-atlântico (*Salmo salar*).

PARTE 4

VIGILÂNCIA E MÉTODOS DE CONTROLO DA INFEÇÃO POR MARTEILIA REFRINGENS

I. Requisitos para os programas de vigilância e erradicação destinados a obter e manter o estatuto de indemnidade da infeção por *Marteilia refringens*

I.1. Requisitos gerais

As inspeções sanitárias e, se for caso disso, a amostragem para exame laboratorial, devem efetuar-se na época do ano em que se saiba que a prevalência do parasita no Estado-Membro, zona ou compartimento está no seu máximo. Se esses dados não estiverem disponíveis, a amostragem deve efetuar-se logo após a temperatura da água ter ultrapassado 17 °C.

Se for necessário amostrar moluscos em conformidade com os requisitos estabelecidos na parte 4, aplicam-se os seguintes critérios:

- a) se estiverem presentes *Ostrea* spp. e *Mytilus* spp. nas unidades de produção ou na zona de produção, ambos os géneros devem ser igualmente representados na dimensão da amostra. Se estiver presente apenas um desses géneros, esse género deve ser amostrado. Se não estiverem presentes espécies dos géneros *Ostrea* nem *Mytilus*, a amostra deve ser representativa de todas as outras espécies sensíveis presentes;
- b) se estiverem presentes nas unidades de produção moluscos fracos, mortos recentemente, mas não em decomposição, ou conchas abertas, devem selecionar-se esses moluscos em primeiro lugar. Se não estiverem presentes, devem selecionar-se os moluscos saudáveis que sejam mais velhos;
- c) ao efetuar a colheita de amostras em explorações de moluscos em que são usadas várias fontes hídricas na produção, a amostra deve incluir moluscos representativos de todas as fontes hídricas utilizadas, de tal forma que todas as partes da exploração estejam proporcionalmente representadas na amostra;
- d) ao efetuar a colheita de amostras em zonas de produção de moluscos, devem incluir-se na amostra moluscos colhidos num número suficiente de pontos de amostragem, de tal forma que todas as partes da zona de produção estejam proporcionalmente representadas na amostra. Os principais fatores a considerar na seleção destes pontos de amostragem são os locais onde foi detetada anteriormente *Marteilia refringens*, a densidade populacional, as correntes de água, a presença de espécies sensíveis, a presença de espécies vectoras, a batimetria e as práticas de gestão. Os bancos naturais devem ser incluídos na amostragem.

I.2. Requisitos específicos para a obtenção do estatuto sanitário de categoria I no que respeita à *Marteilia refringens*

I.2.1. Programas de vigilância

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com um estatuto sanitário de categoria III no que respeita à infeção por *Marteilia refringens* pode alcançar o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essa doença se todas as explorações ou zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas, pelo menos, ao seguinte programa de vigilância, incluindo inspeções sanitárias e colheita de amostras para análise.

Programa de vigilância bienal:

- a) as explorações ou as zonas de produção de moluscos devem ter sido submetidos a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de dois anos consecutivos, como estabelecido no quadro 4.^A da secção II;
- b) durante esse período de dois anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para a *Marteilia refringens* e quaisquer suspeitas de *Marteilia refringens* devem ter sido excluídas de acordo com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3;
- c) se for necessário incluir na amostra *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis* provenientes de um Estado-Membro, zona ou compartimento com um estatuto sanitário de categoria I, devem ter sido introduzidos na exploração ou na zona de produção de moluscos pelo menos na primavera imediatamente anterior ao período de vigência do programa de vigilância.

I.2.2. Programas de erradicação

Na maioria dos casos, a erradicação de *Marteilia refringens* é considerada impossível, mas, se o Estado-Membro a julgar viável, deve aplicar o modelo de programa de erradicação enunciado a seguir.

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com o estatuto sanitário de categoria V no que respeita à infeção por *Marteilia refringens* pode alcançar o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essa doença se todas as explorações ou zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas, pelo menos, ao seguinte programa de erradicação:

- a) foram aplicadas com eficácia as medidas estabelecidas no capítulo V, secção 3, da Diretiva 2006/88/CE e, em especial, foi estabelecida, na vizinhança da ou das explorações ou zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas com *Marteilia refringens*, uma zona de confinamento, como se refere no artigo 32.º, alínea b), da referida diretiva, incluindo uma zona de proteção e uma zona de vigilância.

A zona de confinamento deve ser definida caso a caso atendendo a fatores que influenciam os riscos de propagação de *Marteilia refringens*, tais como: o número, a idade, a taxa e a distribuição da mortalidade dos moluscos na exploração ou na zona de produção de moluscos infetada com *Marteilia refringens*, incluindo os moluscos selvagens; a distância em relação às explorações ou zonas de produção de moluscos vizinhas, incluindo de moluscos selvagens, e a densidade populacional das mesmas; a proximidade com estabelecimentos de transformação, explorações ou zonas de produção de moluscos em contacto; as espécies presentes nas explorações ou zonas de produção de moluscos, especialmente se se tratar de espécies sensíveis ou de espécies vetoras; as práticas de criação aplicadas na exploração ou zona de produção de moluscos afetada e nas explorações ou zonas de produção de moluscos vizinhas; as condições hidrodinâmicas e outros fatores identificados com significância a nível epidemiológico.

Para o estabelecimento das zonas de proteção e vigilância, devem aplicar-se os requisitos mínimos seguintes:

- i) deve estabelecer-se uma zona de proteção na vizinhança imediata de uma exploração ou de uma zona de produção de moluscos oficialmente declarada como infetada com *Marteilia refringens*, correspondente a uma área determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados,
 - ii) deve estabelecer-se uma zona de vigilância no exterior da zona de proteção, correspondente a uma área que circunda a zona de proteção, determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados;
- b) todas as explorações e zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE situadas dentro da zona de proteção e não oficialmente declaradas como infetadas com *Marteilia refringens* devem ser sujeitas a uma investigação oficial que inclua, pelo menos, a colheita de amostras para análise de 150 moluscos após o início do período de transmissão de *Marteilia refringens*. Se se desconhecer o período de transmissão, a amostragem deve começar no período após a temperatura da água ultrapassar 17 °C;
- c) todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas com *Marteilia refringens* devem ser esvaziadas, sujeitas a vazio sanitário e, se possível, limpas e desinfetadas.

A duração mínima do vazio sanitário deve ser de:

- i) dois meses no caso das explorações e zonas de produção de moluscos com ligações limitadas às águas circundantes, como é o caso das incubadoras e dos berçários,
- ii) dois meses no caso das explorações e das zonas de produção de moluscos com ligações ilimitadas às águas circundantes, desde que os moluscos infetados das espécies sensíveis e os moluscos de espécies sensíveis com ligações epidemiológicas à exploração infetada ou à zona de produção de moluscos tenham sido apanhados ou retirados antes do período do ano em que se sabe que a prevalência de *Marteilia refringens* está no seu máximo ou, se esse período não for conhecido, antes do período em que a temperatura da água ultrapassa 17 °C,
- iii) 14 meses no caso das explorações e das zonas de produção de moluscos com ligações ilimitadas às águas circundantes, desde que os moluscos infetados das espécies sensíveis e os moluscos de espécies sensíveis com ligações epidemiológicas à exploração infetada ou à zona de produção de moluscos não tenham sido apanhados nem retirados antes do período do ano em que se sabe que a prevalência de *Marteilia refringens* está no seu máximo ou, se esse período não for conhecido, antes do período em que a temperatura da água ultrapassa 17 °C.

Quando todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas forem esvaziadas, devem realizar-se pelo menos quatro semanas de vazio sanitário sincronizado.

A autoridade competente pode decidir requerer o esvaziamento, limpeza, desinfecção e vazio sanitário de outras explorações ou zonas de produção de moluscos, conforme adequado, dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas. A duração do período de vazio sanitário deve ser determinada pela autoridade competente após uma avaliação de riscos caso a caso;

- d) todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações e zonas de produção de moluscos sujeitas a vazio sanitário nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas devem ser repovoadas com moluscos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à infeção por *Marteilia refringens*.

O repovoamento só deve ocorrer quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas tiverem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário de acordo com o ponto I.2.2, alínea c);

- e) todas as explorações e zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE do Estado-Membro, zona ou compartimento abrangido pelo programa de erradicação devem subsequentemente ser submetidas ao sistema de vigilância estabelecido no ponto I.2.1 da presente parte.

I.3. Requisitos específicos para a manutenção do estatuto sanitário de indemnidade (categoria I) no que respeita à infeção por *Marteilia refringens*

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada a fim de manter o estatuto sanitário de categoria I, tal como previsto no artigo 52.º da Diretiva 2006/88/CE, todas as explorações e zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, daquela diretiva no Estado-Membro, zona ou compartimento em causa devem ser sujeitas a inspeções sanitárias e colheita de amostras em conformidade com o quadro 4.B da secção II, tendo em conta o nível de risco da exploração ou da zona de produção de moluscos para a contração de *Marteilia refringens*.

O estatuto de indemnidade só pode ser mantido enquanto todas as amostras analisadas com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 produzirem resultados negativos para a *Marteilia refringens* e qualquer suspeita de *Marteilia refringens* for excluída recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3.

I.4. Requisitos para o levantamento das medidas de confinamento previstas no artigo 39.º da Diretiva 2006/88/CE (mudança de estatuto sanitário da categoria V para a categoria III) no que respeita à infeção por *Marteilia refringens*

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com o estatuto sanitário de categoria V relativamente à *Marteilia refringens* pode obter o estatuto sanitário de categoria III em relação a essa doença enumerada, desde que:

- a) estejam cumpridos os requisitos estabelecidos no ponto I.2.2, alíneas a), b) e c). Se o vazio sanitário não for tecnicamente possível, as explorações devem ser submetidas a uma medida alternativa que forneça garantias quase semelhantes para a exterminação de *Marteilia refringens* do ambiente da exploração;
- b) todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações e zonas de produção de moluscos sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a) nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas tenham sido repovoadas com moluscos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I, II ou III no respeitante à infeção por *Marteilia refringens*;
- c) o repovoamento só tenha ocorrido depois de todas as explorações ou zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas terem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a);
- d) não se tenha confirmado qualquer infeção por *Marteilia refringens* durante o período de dois anos subsequente à conclusão das medidas referidas nas alíneas a), b) e c) e quaisquer suspeitas durante esse período tenham sido excluídas de acordo com os procedimentos estabelecidos no ponto II.3.

II. Métodos de diagnóstico e investigações oficiais

II.1. Amostras

Devem ser enviados para laboratório os animais inteiros a fim de se realizar os testes de diagnósticos referidos nos pontos II.2 e II.3.

II.2. Métodos de diagnóstico para obter ou manter o estatuto de indemnidade relativamente à infeção por *Marteilia refringens*

Os métodos de diagnóstico a utilizar para obter ou manter o estatuto de indemnidade relativamente à infeção por *Marteilia refringens*, de acordo com os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes do anexo II, parte 4, são a histopatologia, as impressões tecidulares ou a PCR.

II.3. Investigação oficial e métodos de diagnóstico para confirmar a presença ou excluir a suspeita de infeção por *Marteilia refringens*

Sempre que, nos termos do artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE, seja necessário confirmar ou excluir uma suspeita de infeção por *Marteilia refringens*, devem cumprir-se os seguintes procedimentos de inspeção, amostragem e análise:

- a) a investigação oficial deve incluir pelo menos uma amostragem de 30 moluscos de espécies sensíveis se a suspeita se basear num relatório de mortalidade ou, caso contrário, de 150 moluscos de espécies sensíveis após o início do período de transmissão de *Marteilia refringens*. Se se desconhecer o período de transmissão, a amostragem deve começar no período após a temperatura da água ultrapassar 17 °C;
- b) as amostras devem ser analisadas recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos na subalínea i) de acordo com os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes do anexo II, parte 4, secção I;
 - i) a presença de *Marteilia refringens* deve ser considerada confirmada sempre que um resultado positivo por histopatologia, impressão tecidular ou hibridização *in situ* for combinado com um resultado positivo por PCR completada por sequenciação,
 - ii) a suspeita de infeção por *Marteilia refringens* pode ser excluída se os testes referidos na subalínea i) não revelarem provas suplementares da presença de *Marteilia refringens*.

Quadro 4.A

Sistema de vigilância para Estados-Membros, zonas e compartimentos para o período de controlo que precede a obtenção do estatuto de indemnidade no que respeita à *Marteilia refringens*, como referido no ponto I.2.1

	Número de inspeções sanitárias por ano	Número de exames laboratoriais por ano	Número de moluscos na amostra
Explorações/zonas de produção de moluscos	1	1	150

Quadro 4.B

Sistema de vigilância para Estados-Membros, zonas e compartimentos destinado a manter o estatuto de indemnidade de *Marteilia refringens*, tal como referido no ponto I.3

Nível de risco	Número de inspeções sanitárias	Número de exames laboratoriais	Número de moluscos na amostra
Elevado	1 vez por ano	1 vez de 2 em 2 anos	150
Médio	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 2 em 2 anos	150
Reduzido	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 4 em 4 anos	150

PARTE 5

VIGILÂNCIA E MÉTODOS DE CONTROLO DA INFEÇÃO POR *BONAMIA OSTREAE*

I. **Requisitos para os programas de vigilância e erradicação destinados a obter e manter o estatuto de indemnidade da infeção por *Bonamia ostreae***

I.1. **Requisitos gerais**

As inspeções sanitárias e, se for caso disso, a amostragem das unidades de produção, devem efetuar-se na época do ano em que se saiba que a prevalência de *Bonamia ostreae* no Estado-Membro, zona ou compartimento está no seu máximo. Se esses dados não estiverem disponíveis, a amostragem deve efetuar-se durante o inverno ou no início da primavera.

Se for necessário amostrar moluscos em conformidade com os requisitos estabelecidos na parte 5, aplica-se os seguintes critérios:

- a) se estiver presente *Ostrea edulis*, a totalidade da amostra deve ser constituída por ostras desta espécie. Se a *Ostrea edulis* não estiver presente, a amostra deve ser representativa de todas as espécies sensíveis presentes;
- b) se estiverem presentes moluscos fracos, mortos recentemente, mas não em decomposição, ou conchas abertas, devem selecionar-se esses moluscos em primeiro lugar. Se não estiverem presentes, devem selecionar-se os moluscos saudáveis que sejam mais velhos;
- c) ao efetuar a colheita de amostras em explorações em que são usadas várias fontes hídricas na produção de moluscos, a amostra deve incluir moluscos representativos de todas as fontes hídricas utilizadas, de tal forma que todas as partes da exploração estejam proporcionalmente representadas na amostra;
- d) ao efetuar a colheita de amostras em zonas de produção de moluscos, devem incluir-se na amostra moluscos de um número suficiente de pontos de amostragem. Os principais fatores a considerar na seleção destes pontos de amostragem são os locais onde foi detetada anteriormente *Bonamia ostreae*, a densidade populacional, as correntes de água, a presença de espécies sensíveis, a presença de espécies vetoras, a batimetria e as práticas de gestão. Os bancos naturais situados nas zonas de produção ou na sua vizinhança devem ser incluídos na amostra.

I.2. Requisitos específicos para a obtenção do estatuto sanitário de categoria I no que respeita à *Bonamia ostreae*

I.2.1. Programas de vigilância

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com um estatuto sanitário de categoria III no que respeita à *Bonamia ostreae* pode alcançar de novo o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essa doença se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas, pelo menos, ao seguinte programa de vigilância, incluindo inspeções sanitárias e colheita de amostras para análise.

Programa de vigilância bienal:

- a) as explorações e as zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE devem ter sido submetidas a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de dois anos consecutivos, como estabelecido no quadro 5.^A da presente parte;
- b) durante esse período de dois anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para a *Bonamia ostreae* e quaisquer suspeitas de *Bonamia ostreae* devem ter sido excluídas de acordo com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3;
- c) se for necessário incluir na amostra *Ostrea edulis* provenientes de um Estado-Membro, zona ou compartimento com um estatuto sanitário de categoria I, devem ter sido introduzidas na exploração ou na zona de produção de moluscos pelo menos no outono imediatamente anterior ao período de vigência do programa de vigilância.

I.2.2. Programas de erradicação

Na maioria dos casos, a erradicação de *Bonamia ostreae* é considerada impossível, mas, se o Estado-Membro a julgar viável, deve aplicar o modelo de programa de erradicação enunciado a seguir.

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com o estatuto sanitário de categoria V no que respeita à *Bonamia ostreae* pode alcançar de novo o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essa doença se todas as explorações ou zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas, pelo menos, ao seguinte programa de erradicação:

- a) foram aplicadas com eficácia as medidas mínimas de controlo estabelecidas no capítulo V, secção 3, da Diretiva 2006/88/CE e, em especial, foi estabelecida, na vizinhança da ou das explorações ou zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas com *Bonamia ostreae*, uma zona de confinamento, como se refere no artigo 32.º, alínea b), da referida diretiva, incluindo uma zona de proteção e uma zona de vigilância.

A zona de confinamento deve ser definida caso a caso atendendo a fatores que influenciam os riscos de propagação da doença enumerada em causa, tais como: o número, a taxa, a idade e a distribuição da mortalidade dos moluscos na exploração ou na zona de produção de moluscos infetada com *Bonamia ostreae*, incluindo os moluscos selvagens; a distância em relação às explorações ou zonas de produção de moluscos vizinhas, incluindo de moluscos selvagens, e a densidade populacional das mesmas; a proximidade com estabelecimentos de transformação, explorações ou zonas de produção de moluscos em contacto; as espécies presentes nas explorações ou zonas de produção de moluscos, especialmente se se tratar de espécies sensíveis ou de espécies vectoras; as práticas de criação aplicadas na exploração ou zona de exploração de moluscos afetada e nas explorações ou zonas de exploração de moluscos vizinhas; as condições hidrodinâmicas e outros fatores identificados com significância a nível epidemiológico.

Para o estabelecimento das zonas de proteção e vigilância, devem aplicar-se os requisitos mínimos seguintes:

- i) deve estabelecer-se uma zona de proteção na vizinhança imediata de uma exploração ou de uma zona de produção de moluscos oficialmente declarada como infetada com *Bonamia ostreae*, correspondente a uma área determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados,
 - ii) deve estabelecer-se uma zona de vigilância no exterior da zona de proteção, correspondente a uma área que circunda a zona de proteção, determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados;
- b) todas as explorações e zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE situadas dentro da zona de proteção e não oficialmente declaradas como infetadas com *Bonamia ostreae* devem ser sujeitas a uma investigação oficial que inclua, pelo menos, a colheita de amostras para análise de 150 moluscos de espécies sensíveis após o início do período de transmissão de *Bonamia ostreae*. Se se desconhecer o período de transmissão, a amostragem deve começar no inverno ou no início da primavera;
- c) todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas com *Bonamia ostreae* devem ser esvaziadas, sujeitas a vazio sanitário e, se possível, limpas e desinfetadas. A duração mínima do vazio sanitário deve ser de seis semanas.

Quando todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas forem esvaziadas, devem realizar-se pelo menos quatro semanas de vazio sanitário sincronizado.

A autoridade competente pode decidir requerer o esvaziamento, limpeza, desinfecção e vazio sanitário de outras explorações ou zonas de produção de moluscos, conforme adequado, dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas. A duração do período de vazio sanitário deve ser determinada pela autoridade competente após uma avaliação de riscos caso a caso;

- d) todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações e zonas de produção de moluscos sujeitas a vazio sanitário nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas devem ser repovoadas com moluscos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à infeção por *Bonamia ostreae*. O repovoamento só deve ocorrer quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas tiverem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário de acordo com o ponto I.2.2, alínea c);
- e) todas as explorações e zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE do Estado-Membro, zona ou compartimento abrangido pelo programa de erradicação devem subsequentemente ser submetidas ao programa de vigilância estabelecido no ponto I.2.
- I.3. Requisitos específicos para a manutenção do estatuto sanitário de indemnidade (categoria I) no que respeita à infeção por *Bonamia ostreae*

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada a fim de manter o estatuto sanitário de categoria I, tal como previsto no artigo 52.º da Diretiva 2006/88/CE, todas as explorações e zonas de produção de moluscos com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, daquela diretiva no Estado-Membro, zona ou compartimento em causa devem ser sujeitas a inspeções sanitárias e colheita de amostras em conformidade com o quadro 5.B da secção II da presente parte, tendo em conta o nível de risco da exploração ou da zona de produção de moluscos para a contração da infeção por *Bonamia ostreae*.

O estatuto de indemnidade da infeção por *Bonamia ostreae* só pode ser mantido enquanto todas as amostras analisadas com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 produzirem resultados negativos para a *Bonamia ostreae* e qualquer suspeita de *Bonamia ostreae* for excluída recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3.

- I.4. Requisitos para o levantamento das medidas de confinamento previstas no artigo 39.º da Diretiva 2006/88/CE (mudança de estatuto sanitário da categoria V para a categoria III) no que respeita à infeção por *Bonamia ostreae*.

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com o estatuto sanitário de categoria V relativamente à infeção por *Bonamia ostreae* pode obter o estatuto sanitário de categoria III em relação a essa doença, desde que:

- a) estejam cumpridos os requisitos estabelecidos no ponto I.2.2, alíneas a), b) e c). Se o vazio sanitário não for tecnicamente possível, as explorações devem ser submetidas a uma medida alternativa que forneça garantias quase semelhantes para a exterminação de *Bonamia ostreae* do ambiente da exploração;
- b) todas as explorações e zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações e zonas de produção de moluscos sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a) nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas tenham sido repovoadas com moluscos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I, II ou III no respeitante à infeção por *Bonamia ostreae*;
- c) o repovoamento só tenha ocorrido depois de todas as explorações ou zonas de produção de moluscos oficialmente declaradas como infetadas terem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a);
- d) não se tenha confirmado qualquer infeção por *Bonamia ostreae* durante o período de dois anos subsequente à conclusão das medidas referidas nas alíneas a), b) e c) e quaisquer suspeitas durante esse período tenham sido excluídas de acordo com os procedimentos estabelecidos no ponto II.3.

II. Métodos de diagnóstico e critérios de diagnóstico

II.1. Amostras

Devem ser enviados para laboratório os animais inteiros a fim de se realizar os testes de diagnósticos referidos nos pontos II.2 e II.3.

II.2. Métodos de diagnóstico para obter ou manter o estatuto de indemnidade relativamente à infeção por *Bonamia ostreae*

Os métodos de diagnóstico a utilizar para obter ou manter o estatuto de indemnidade relativamente à infeção por *Bonamia ostreae* são a histopatologia, as impressões tecidulares ou a PCR. Ao aplicar estes métodos de diagnóstico, devem seguir-se os correspondentes métodos e procedimentos detalhados estabelecidos no anexo II, parte 5.

II.3. Critérios de diagnóstico para confirmar a presença ou excluir a suspeita de infeção por *Bonamia ostreae*

Sempre que, nos termos do artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE, seja necessário confirmar ou excluir uma suspeita de infeção por *Bonamia ostreae*, devem cumprir-se os seguintes procedimentos de inspeção, amostragem e análise:

A investigação oficial deve incluir pelo menos uma amostragem de 30 moluscos de espécies sensíveis se a suspeita se basear num relatório de mortalidade ou, caso contrário, de 150 moluscos de espécies sensíveis após o início do período de transmissão de *Bonamia ostreae*. Se se desconhecer o período de transmissão, a amostragem deve começar no inverno ou no início da primavera. As amostras devem ser analisadas recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos na subalínea i) de acordo com os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes do anexo II, parte 5, secção I.

- i) a presença de *Bonamia ostreae* deve ser considerada confirmada sempre que um resultado positivo por histopatologia, impressão tecidular ou hibridização *in situ* for combinado com um resultado positivo por PCR completada por sequenciação, em conformidade com os métodos e procedimentos aprovados estabelecidos no anexo II, parte 5;
- ii) a suspeita da presença da infeção por *Bonamia ostreae* deve ser excluída se esses testes não revelarem provas suplementares da presença de *Bonamia ostreae*.

Quadro 5.A

Sistema de vigilância para Estados-Membros, zonas e compartimentos para o período de controlo que precede a obtenção do estatuto de indemnidade no que respeita à *Bonamia ostreae*, como referido no ponto I.2.1

	Número de inspeções sanitárias por ano	Número de exames laboratoriais por ano	Número de moluscos na amostra
Explorações/zonas de produção de moluscos	1	1	150

Quadro 5.B

Sistema de vigilância para Estados-Membros, zonas e compartimentos destinado a manter o estatuto de indemnidade de *Bonamia ostreae*, tal como referido no ponto I.3

Nível de risco	Número de inspeções sanitárias	Número de exames laboratoriais	Número de moluscos na amostra
Elevado	1 vez por ano	1 vez de 2 em 2 anos	150
Médio	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 2 em 2 anos	150
Reduzido	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 4 em 4 anos	150

PARTE 6

VIGILÂNCIA E MÉTODOS DE CONTROLO DA DOENÇA DA MANCHA BRANCA (DMB)**I. Requisitos para os programas de erradicação e vigilância destinados a obter e manter o estatuto de indemnidade relativamente à DMB e a confinar a infeção por VSMB****I.1. Requisitos gerais de inspeção e amostragem**

A amostragem de crustáceos para exame laboratorial deve ser efetuada sempre que seja provável que a temperatura da água esteja no seu máximo anual. Esse requisito relativo à temperatura da água aplica-se também às inspeções sanitárias sempre que tal for viável e adequado.

Se for necessário amostrar crustáceos em explorações em conformidade com os requisitos estabelecidos na presente parte, aplicam-se os seguintes critérios:

- a) se estiverem presentes nas unidades de produção crustáceos fracos ou moribundos, devem selecionar-se esses crustáceos em primeiro lugar. Se esses crustáceos não estiverem presentes, entre os selecionados devem incluir-se crustáceos de diferentes coortes de tamanho, designadamente juvenis e adultos, das espécies sensíveis selecionadas, representados proporcionalmente na amostra;
- b) se for utilizada mais do que uma fonte hídrica na produção de crustáceos, devem estar presentes na amostra crustáceos sensíveis representativos de todas as fontes hídricas.

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada em populações selvagens, de acordo com o anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da Diretiva 2006/88/CE, o número e a distribuição geográfica dos pontos de amostragem devem ser determinados por forma a obter uma cobertura razoável do Estado-Membro, da zona ou do compartimento. Os pontos de amostragem devem também ser representativos dos diferentes ecossistemas onde se situam as populações selvagens de espécies sensíveis, nomeadamente sistemas marinhos, estuarinos, fluviais e lagos.

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada em populações selvagens, de acordo com o anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da Diretiva 2006/88/CE, os crustáceos a amostrar devem ser selecionados como segue:

- i) em sistemas marinhos e estuarinos, deve selecionar-se uma ou várias das seguintes espécies: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* ou espécies de camarões peneídeos, designadamente *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Se essas espécies não estiverem presentes, a amostra deve ser representativa de todas as outras espécies de decápodes sensíveis presentes. Dada a vasta gama de hospedeiros sensíveis, estes devem ser selecionados de géneros ou famílias dos *Decapoda* em que a suscetibilidade tenha sido demonstrada de forma experimental ou natural,
- ii) em sistemas fluviais e lagos, deve selecionar-se uma ou várias das seguintes espécies: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* ou *Orconectes limosus*. Se essas espécies não estiverem presentes, a amostra deve ser representativa de todas as outras espécies de decápodes sensíveis presentes. Dada a vasta gama de hospedeiros sensíveis, estes devem ser selecionados de géneros ou famílias dos *Decapoda* em que a suscetibilidade tenha sido demonstrada de forma experimental ou natural,
- iii) se estiverem presentes crustáceos fracos ou moribundos, devem selecionar-se esses crustáceos em primeiro lugar. Se esses crustáceos não estiverem presentes, entre os selecionados devem incluir-se crustáceos de diferentes coortes de tamanho, designadamente juvenis e adultos, das espécies sensíveis selecionadas, representados proporcionalmente na amostra.

I.2. Requisitos específicos para a obtenção do estatuto sanitário de categoria I no que respeita à DMB

I.2.1. Programas de vigilância

- a) um Estado-Membro, uma zona ou um compartimento com o estatuto sanitário de categoria III no que respeita à DMB, em conformidade com o anexo III, parte B, da Diretiva 2006/88/CE, pode alcançar o estatuto sanitário da categoria I em relação a essa doença se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da referida diretiva, nesse Estado-Membro, zona ou compartimento, cumprirem os requisitos relevantes estabelecidos no anexo V da mesma diretiva e todas essas explorações bem como, quando exigido pelo anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, da mesma diretiva, os pontos de amostragem em populações selvagens, selecionados de acordo com esse ponto, tenham sido sujeitos ao seguinte programa de vigilância bienal incluindo inspeções sanitárias e colheita de amostras para análise.

As explorações ou os pontos de amostragem foram submetidos a inspeções sanitárias e colheita de amostras por um período mínimo de dois anos consecutivos, como estabelecido no quadro 6.A da secção II.

Durante esse período de dois anos, a análise de todas as amostras com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2 deve ter produzido resultados negativos para a infeção por DMB e quaisquer suspeitas de DMB devem ter sido excluídas de acordo com os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3;

- b) se, no decurso da aplicação do programa de vigilância referido na alínea a), se confirmar, numa exploração incluída nesse programa de vigilância, uma infeção por VSMB, tendo portanto sido retirado à exploração o estatuto sanitário de categoria II, a exploração pode recuperar imediatamente esse estatuto e continuar a aplicar o programa de vigilância a fim de obter o estatuto de indemnidade sem aplicar um programa de erradicação, tal como estabelecido no ponto I.2.2, desde que:
 - i) se trate de uma exploração continental cujo estatuto sanitário referente à DMB é independente do estatuto sanitário relativamente a essa doença enumerada das águas naturais circundantes, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 3, da Diretiva 2006/88/CE,
 - ii) tenha sido esvaziada, limpa, desinfetada e sujeita a vazio sanitário com uma duração mínima de seis semanas,
 - iii) tenha sido repovoada com crustáceos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à DMB.

I.2.2. Programas de erradicação

I.2.2.1. Requisitos gerais

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com um estatuto sanitário de categoria V no que respeita à DMB pode alcançar o estatuto sanitário de categoria I relativamente a essa doença se todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE nesse Estado-Membro, zona ou compartimento tiverem sido sujeitas, pelo menos, ao seguinte programa de erradicação:

- a) foram aplicadas com eficácia as medidas mínimas de controlo estabelecidas no capítulo V, secção 4, da Diretiva 2006/88/CE e foi estabelecida, na vizinhança da ou das explorações oficialmente declaradas como infetadas com DMB, uma zona de confinamento, como se refere no artigo 32.º, alínea b), da referida diretiva, incluindo uma zona de proteção e uma zona de vigilância.

A zona de confinamento deve ter sido definida caso a caso atendendo a fatores que influenciam os riscos de propagação de DMB aos crustáceos de criação e selvagens, tais como: o número, a taxa e a distribuição da mortalidade dos crustáceos na exploração infetada com DMB; a distância em relação às explorações vizinhas e a densidade populacional das mesmas; as explorações em contacto; as espécies presentes nas explorações; as práticas de criação aplicadas na exploração afetada e nas explorações vizinhas; as condições hidrodinâmicas e outros fatores identificados com significância a nível epidemiológico.

Para o estabelecimento das zonas de proteção e vigilância, devem aplicar-se os requisitos mínimos seguintes:

- i) deve estabelecer-se uma zona de proteção na vizinhança imediata de uma exploração oficialmente declarada como infetada com DMB, que deve corresponder a:
 - 1) em zonas marinhas e estuarinas: uma área inscrita num círculo de raio mínimo igual a uma excursão de maré ou de, pelo menos, 5 km, consoante a distância que for maior, centrado na exploração oficialmente declarada como infetada com DMB, ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados; ou
 - 2) em águas doces: a totalidade da bacia hidrográfica da exploração oficialmente declarada como infetada com DMB; a autoridade competente pode limitar a extensão da zona de proteção a partes da bacia hidrográfica, desde que a prevenção da propagação da DMB não fique comprometida,
- ii) deve estabelecer-se uma zona de vigilância no exterior da zona de proteção, que deve corresponder a:
 - 1) em zonas marinhas: uma área que circunda a zona de proteção, com sobreposição de zonas de excursão de maré; ou uma área que circunda a zona de proteção, inscrita num círculo com 10 km de raio a partir do centro da zona de proteção; ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados; ou
 - 2) em águas doces: uma área alargada no exterior da zona de proteção estabelecida;
- b) todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE situadas dentro da zona de proteção e não oficialmente declaradas como infetadas com DMB devem ser sujeitas a uma investigação oficial que inclua pelo menos o seguinte:
 - i) a colheita de amostras para análise de 10 crustáceos, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a infeção por DMB, ou de 150 crustáceos quando não forem observados aqueles sinais clínicos ou *post mortem*, e
 - ii) uma inspeção sanitária nas explorações em que as análises referidas na subalínea i) tiverem produzido resultados negativos, as inspeções sanitárias devem prosseguir uma vez por mês durante a estação em que seja mais provável que a temperatura da água atinja o seu máximo anual, até que a zona de proteção seja retirada em conformidade com o ponto I.2.2.1, alínea c);

- c) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com DMB devem ser esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário. A duração mínima do vazio sanitário deve ser de seis semanas. Quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas forem esvaziadas, devem realizar-se pelo menos três semanas de vazio sanitário sincronizado. A presente alínea também se aplica às novas explorações oficialmente declaradas como infetadas durante a aplicação do programa de erradicação.

Após a realização do vazio sanitário das explorações oficialmente declaradas como infetadas, as zonas de proteção são convertidas em zonas de vigilância.

A autoridade competente pode decidir requerer o esvaziamento, limpeza, desinfecção e vazio sanitário de outras explorações dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas. A duração do período de vazio sanitário deve ser determinada pela autoridade competente após uma avaliação de riscos caso a caso;

- d) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas e todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário dentro das zonas de proteção e vigilância estabelecidas devem ser repovoadas:
- i) com crustáceos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à DMB, ou
 - ii) durante um período transitório até 31 de dezembro de 2020, com crustáceos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um programa de vigilância da DMB aprovado.

O repovoamento só deve ocorrer quando todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com DMB tiverem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário de acordo com o ponto I.2.2.1, alínea c);

- e) todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE do Estado-Membro, zona ou compartimento abrangido pelo programa de erradicação e, quando exigida a vigilância nas populações selvagens, os pontos de amostragem selecionados de acordo com o anexo V, parte I, ponto 2, segundo parágrafo, daquela diretiva, devem ser subsequentemente submetidos, pelo menos, ao programa estabelecido no ponto I.2.1.

I.2.2.2. Requisitos para a recuperação do estatuto de indemnidade no que se refere à DMB para os compartimentos continentais que incluam uma única exploração previamente declarada indemne de DMB

Um compartimento continental com uma única exploração com o estatuto sanitário de categoria I no que respeita à DMB, cujo estatuto sanitário em relação a essa doença enumerada seja independente das águas naturais circundantes, em conformidade com o anexo V, parte II, ponto 3, da Diretiva 2006/88/CE, e cujo estatuto sanitário de categoria I tenha sido retirado em conformidade com o artigo 53.º, n.º 3, daquela diretiva, pode recuperar o estatuto sanitário de categoria I imediatamente depois de a autoridade competente ter confirmado que estão satisfeitas as seguintes condições:

- a) a exploração com DMB foi esvaziada, limpa, desinfetada e sujeita a vazio sanitário com a duração mínima de seis semanas;
- b) a exploração com DMB foi repovoada com crustáceos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I no respeitante à DMB.

I.3. Requisitos específicos para a manutenção do estatuto sanitário de indemnidade (categoria I) no que respeita à DMB

Sempre que for exigido efetuar uma vigilância orientada a fim de manter o estatuto sanitário de categoria I, tal como previsto no artigo 52.º da Diretiva 2006/88/CE, todas as explorações com espécies sensíveis enumeradas no anexo IV, parte II, daquela diretiva no Estado-Membro, zona ou compartimento em causa devem ser sujeitas a uma inspeção sanitária e colheita de amostras em conformidade com o quadro 6.B da secção II, tendo em conta o nível de risco da exploração para a contração da DMB.

Nos Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um número limitado de explorações e em que a vigilância orientada dessas explorações não proporciona dados epidemiológicos suficientes, os programas de vigilância para manter o estatuto de indemnidade devem incluir pontos de amostragem selecionados de acordo com os requisitos estabelecidos no ponto I.1.

Esses pontos de amostragem devem ser inspecionados e amostrados por rotação de 50 % dos pontos de amostragem cada ano. A amostragem deve realizar-se de acordo com o quadro 6.B da secção II. As amostras devem ser selecionadas, preparadas e examinadas em conformidade com os métodos de diagnóstico e de amostragem estabelecidos na secção II e os resultados dos exames laboratoriais devem ser negativos no que respeita ao agente da DMB.

O estatuto de indemnidade só deve ser mantido enquanto todas as amostras analisadas com os métodos de diagnóstico e de amostragem estabelecidos no ponto II.2 produzirem resultados negativos para a DMB e qualquer suspeita de DMB for excluída recorrendo à investigação oficial e aos métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.3.

I.4. Requisitos para o levantamento das medidas de confinamento previstas no artigo 39.º da Diretiva 2006/88/CE (mudança de estatuto sanitário da categoria V para a categoria III) no que respeita à DMB

Um Estado-Membro, zona ou compartimento com o estatuto sanitário de categoria V relativamente à DMB pode obter o estatuto sanitário de categoria III em relação a essa doença enumerada, desde que:

- a) estejam cumpridos os requisitos estabelecidos no ponto I.2.2.1, alíneas a), b) e c). Se o vazio sanitário não for tecnicamente possível, as explorações devem ser submetidas a uma medida alternativa que forneça garantias quase semelhantes para a exterminação do VSMB do ambiente da exploração;
- b) todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com DMB e todas as outras explorações sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a) nas zonas de proteção e vigilância estabelecidas tenham sido repovoadas com crustáceos provenientes de Estados-Membros, zonas ou compartimentos com um estatuto sanitário de categoria I, II ou III no respeitante à DMB;
- c) o repovoamento só tenha ocorrido depois de todas as explorações oficialmente declaradas como infetadas com DMB terem sido esvaziadas, limpas, desinfetadas e sujeitas a vazio sanitário ou a medidas alternativas em conformidade com a alínea a);
- d) não se tenha detetado a DMB durante o período de dois anos subsequente à conclusão das medidas referidas nas alíneas a) e b) e quaisquer suspeitas durante esse período tenham sido excluídas de acordo com os procedimentos estabelecidos no ponto II.3.

II. Métodos de diagnóstico e de amostragem

II.1. Amostras

Amostras de epiderme tegumentar, dissecadas ou contidas em pereiópodes, pleópodes, partes bucais ou brânquias do animal testado devem ser fixadas em etanol a 95 % antes da preparação das amostras para a realização da PCR com dois passos.

Pode colher-se outras amostras e fixá-las para histologia e microscopia eletrónica de transmissão a fim de apoiar os dados de diagnóstico decorrentes da PCR.

II.2. Métodos de diagnóstico para obter ou manter o estatuto de indemnidade relativamente à DMB

O método de diagnóstico a utilizar para obter ou manter o estatuto de indemnidade relativamente à DMB, de acordo com os métodos e procedimentos detalhados constantes do anexo II, parte 6, é a PCR com dois passos.

Caso se obtenha um resultado positivo na PCR com dois passos, o resultado deve ser corroborado com a sequenciação do amplicão antes de serem aplicadas as medidas iniciais de controlo previstas no artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE, se possível em condições práticas através da demonstração dos sinais patognomónicos de DMB nos hospedeiros sensíveis selecionados, por histologia e microscopia eletrónica de transmissão.

II.3. Investigação oficial e métodos de diagnóstico para excluir a suspeita ou confirmar a presença de infeção por DMB

Sempre que, nos termos do artigo 28.º da Diretiva 2006/88/CE, seja necessário confirmar a presença da infeção por DMB ou excluir uma suspeita dessa infeção, devem cumprir-se os seguintes procedimentos de inspeção, amostragem e análise:

- a) a investigação oficial deve incluir pelo menos uma inspeção sanitária e uma amostragem de 10 crustáceos, quando se observarem sinais clínicos ou *post mortem* compatíveis com a infeção por DMB, ou de 150 crustáceos quando não forem observados aqueles sinais clínicos ou *post mortem*. As amostras devem ser analisadas segundo os métodos de diagnóstico estabelecidos no ponto II.2. (PCR com dois passos);

- b) considera-se confirmada a presença da DMB sempre que a PCR com dois passos seguida de sequenciação, recorrendo aos métodos e procedimentos detalhados estabelecidos no anexo II, parte 6, apresentar um resultado positivo para o VSMB e sempre que estiverem presentes sinais patognomónicos de DMB nos hospedeiros seleccionados.

A suspeita de DMB pode ser excluída se os referidos testes não revelarem mais provas da presença da DMB.

Quadro 6.A

Sistema de vigilância para Estados-Membros, zonas e compartimentos para o período de controlo de dois anos que precede a obtenção do estatuto de indemnidade no que respeita à DMB, como referido no ponto I.2.1

	Número de inspeções clínicas por ano	Número de exames laboratoriais por ano	Número de crustáceos na amostra
Explorações/locais de amostragem	1	1	150

Quadro 6.B

Sistema de vigilância para Estados-Membros, zonas e compartimentos destinado a manter o estatuto de indemnidade de DMB, tal como referido no ponto I.3

Nível de risco	Número de inspeções sanitárias	Número de exames laboratoriais	Número de crustáceos na amostra
Elevado	1 vez por ano	1 vez de 2 em 2 anos	150
Médio	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 2 em 2 anos	150
Reduzido	1 vez de 2 em 2 anos	1 vez de 4 em 4 anos	150

ANEXO II

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS DETALHADOS

I. Introdução

O presente anexo estabelece os procedimentos detalhados para os métodos de diagnóstico a utilizar nos exames laboratoriais no âmbito dos programas de erradicação e vigilância estabelecidos no anexo I da presente decisão, e para confirmar ou excluir a suspeita da presença das seguintes doenças não exóticas enumeradas no anexo IV, parte II, da Diretiva 2006/88/CE (as «doenças enumeradas»), em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da referida diretiva:

1.	Septicemia hemorrágica viral (SHV)	Parte 1
2.	Necrose hematopoiética infecciosa (NHI)	Parte 1
3.	Herpesvirose da carpa koi (HCK)	Parte 2
4.	Anemia infecciosa do salmão (AIS)	Parte 3
5.	Infeção por <i>Marteilia refringens</i>	Parte 4
6.	Infeção por <i>Bonamia ostreae</i>	Parte 5
7.	Doença da mancha branca (DMB)	Parte 6

II. Definições

Para efeitos do presente anexo, por «meio de transporte» entende-se um meio de cultura celular com 10 % de soro de vitelo e 200 UI de penicilina, 200 µg de estreptomicina e 200 µg de canamicina por mililitro, ou com outros antibióticos de eficácia comprovada.

PARTE 1

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS DETALHADOS PARA A VIGILÂNCIA E A CONFIRMAÇÃO DE NHI E DE SHV

I. Métodos de diagnóstico e procedimentos para a vigilância de NHI e de SHV

Ao efetuar a amostragem e os exames laboratoriais para efeitos de obtenção ou manutenção do estatuto de indemnidade relativamente à NHI e à SHV, tal como se estabelece no anexo I, parte 1, secção I, utilizando os métodos de diagnóstico referidos na parte 1, pontos II.1 e II.2, daquele anexo, aplicam-se os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados estabelecidos nos seguintes pontos I.1 a I.6.

I.1. Preparação e envio das amostras de peixes

I.1.1. Tecidos para exame virológico em cultura celular

Antes do envio ou da transferência para o laboratório, devem extrair-se dos peixes, com o auxílio de instrumentos de dissecação esterilizados, partes dos órgãos a examinar, que devem ser transferidas para tubos de plástico esterilizados contendo meio de transporte.

A quantidade de material de peixe adequado para o exame virológico em cultura celular ou por RT-qPCR depende do tamanho do peixe. Assim, os tecidos a amostrar serão a totalidade do alevim (comprimento do corpo < 4 cm), as vísceras, incluindo o rim (4 cm < comprimento do corpo < 6 cm), ou, para peixes maiores, o rim, o baço, o coração e/ou o encéfalo, assim como o fluido ovariano de reprodutores aquando da desova.

Pode recolher-se fluido ovariano ou seminal ou pedaços de órgãos de, no máximo, 10 peixes para um tubo esterilizado contendo pelo menos 4 ml de meio de transporte, constituindo uma amostra agregada. O tecido de cada amostra deve pesar, no mínimo, 0,5 g.

O exame virológico em cultura celular deve ser iniciado logo que possível e o mais tardar 48 horas após a colheita de amostras. Em casos excecionais, o exame virológico pode ter início, o mais tardar, 72 horas após a colheita, na condição de o material a examinar estar protegido por meio de transporte e de terem sido respeitadas as condições de temperatura exigidas durante o transporte.

I.1.2. Amostras para a análise por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR ou RT-qPCR)

As amostras devem ser colhidas de peixes em conformidade com o procedimento descrito no ponto I.1.1 usando um instrumento esterilizado e transferidas para um tubo de plástico esterilizado contendo meio de transporte. Pode juntar-se no mesmo tubo tecidos provenientes de 10 peixes, constituindo assim uma amostra agregada. No entanto, se a quantidade de inóculo for reduzida, pode usar-se tecidos de um máximo de cinco peixes. Alternativamente, as amostras podem ser agregadas em reagentes estabilizadores de ARN, por exemplo 0,2 g de tecido/ml de reagente, de acordo com as recomendações do fabricante, embora cada peixe deva ser processado individualmente e não deva ser agregado nas amostras em virtude da reduzida quantidade de material a usar para a extração.

Também pode enviar-se ao laboratório peixes inteiros.

I.2. Expedição das amostras de peixes

Os tubos com tecidos de peixes em meio de transporte para cultura celular ou análise por RT-PCR/RT-qPCR devem ser colocados em recipientes isolados, como caixas de poliestireno de paredes espessas, com uma quantidade de gelo suficiente ou um meio alternativo com o mesmo efeito refrigerante, a fim de assegurar a refrigeração das amostras durante o transporte para o laboratório. Deve no entanto evitar-se a congelação das amostras. A temperatura da amostra durante o transporte não deve, em caso algum, exceder 10 °C, devendo a caixa conter ainda gelo à chegada ou um ou mais blocos encontrar-se ainda parcial ou totalmente congelados.

Podem também ser enviados para o laboratório peixes inteiros, se puderem ser respeitadas as condições de temperatura exigidas durante o transporte, tal como se referem no primeiro parágrafo. Os peixes inteiros devem ser embrulhados em papel absorvente, devendo depois ser expedidos em sacos de plástico. Também podem ser enviados peixes vivos.

I.3. Colheita de material de diagnóstico complementar

Sempre que o laboratório de diagnóstico o aprovar, podem também ser colhidos e preparados para exames complementares outros tecidos de peixes.

I.4. Preparação das amostras para exame de cultura celular e RT-qPCR

I.4.1. Congelação em casos excepcionais

Sempre que surjam dificuldades de ordem prática que impossibilitem o processamento das amostras nas 48 horas subsequentes à colheita dos tecidos de peixes, pode congelar-se estes últimos em meio de transporte a uma temperatura igual ou inferior a - 20 °C, efetuando-se o exame virológico no prazo de 14 dias. No entanto, os tecidos de peixes só podem ser congelados e descongelados uma vez antes do exame. Devem manter-se registos com pormenores sobre os motivos para cada congelação de amostras de tecidos de peixes.

I.4.2. Homogeneização dos órgãos

No laboratório, os tecidos de peixes dos tubos devem ser completamente homogeneizados num digestor, misturador ou almofariz e pilão com areia esterilizada, e em seguida suspensos no meio de transporte original.

Caso a amostra seja constituída por um peixe inteiro com menos de 4 cm de comprimento, a amostra deve ser picada com uma tesoura ou um bisturi esterilizados após remoção da parte do corpo posterior à cloaca. Caso a amostra seja constituída por um peixe inteiro de comprimento compreendido entre 4 e 6 cm, devem colher-se as vísceras, incluindo os rins. Se a amostra for constituída por um peixe inteiro com mais de 6 cm de comprimento, as amostras de tecidos são colhidas em conformidade com o ponto I.1. As amostras de tecido devem ser picadas com tesouras ou bisturis esterilizados, homogeneizadas do modo descrito *supra* e suspensas em meio de transporte.

A proporção final entre o material tecidular e o meio de transporte deve ser ajustada a 1:10 no laboratório.

I.4.3. Centrifugação do homogeneizado

O material homogeneizado deve ser centrifugado a $2\,000\text{--}4\,000 \times g$ durante 15 minutos, numa centrífugadora refrigerada a 2-5 °C; o sobrenadante é recolhido e pode ser tratado com antibióticos, durante quatro horas a 15 °C ou até ao dia seguinte entre 4 e 8 °C. Se a expedição da amostra tiver sido efetuada em meio de transporte, pode dispensar-se o tratamento do sobrenadante com antibióticos.

Caso surjam problemas práticos, como, por exemplo, avaria da estufa ou problemas com as culturas celulares, que impossibilitem a inoculação das células nas 48 horas seguintes à colheita das amostras de tecidos de peixes, pode proceder-se à congelação do sobrenadante a - 80 °C, devendo o exame virológico ser realizado nos 14 dias que se seguem.

Se o sobrenadante for armazenado a -80°C no prazo de 48 horas após a colheita da amostra, pode ser descongelado e reutilizado uma única vez para exame virológico.

Antes da inoculação das células, o sobrenadante deve ser misturado em partes iguais com uma mistura devidamente diluída de antissoros dos serótipos indígenas do vírus da necrose pancreática infecciosa (NPI) e incubado assim durante, no mínimo, uma hora a 15°C ou, no máximo, 18 horas a 4°C . O título do antissoro deve ser de, pelo menos, 1: 2 000 num teste de neutralização com placas a 50 %.

O tratamento de todos os inóculos com antissoro do vírus da NPI tem por objetivo a prevenção do desenvolvimento do efeito citopático (ECP) devido ao vírus da NPI nas culturas celulares inoculadas. Tal reduzirá a duração dos exames virológicos e o número de casos em que a ocorrência de ECP poderia ser considerada potencialmente indicativa do VSHV ou do VNHI.

Caso as amostras provenham de unidades de produção consideradas indemnes de NPI, pode omitir-se o tratamento dos inóculos com antissoro do vírus dessa doença.

I.4.4. Preparação das amostras para os programas de vigilância baseados na RT-PCR e na RT-qPCR

Se as amostras tiverem sido colhidas em meio de transporte, deve efetuar-se o procedimento referido nos pontos I.4.2 e I.4.3. Após a centrifugação, recolhe-se o sobrenadante e extrai-se o ARN. Se não se proceder à continuação do exame logo após a centrifugação, as amostras devem ser imediatamente congeladas a uma temperatura igual ou inferior a -20°C .

Para a análise dos tecidos de peixes conservados em reagente estabilizador de ARN, a análise subsequente deverá ser efetuada dentro dos prazos mencionados a seguir, em função da temperatura de armazenagem das amostras:

amostras armazenadas a 37°C : um dia;

amostras armazenadas a 25°C : uma semana;

amostras armazenadas a 4°C : um mês;

amostras armazenadas a -20°C : indefinidamente.

As amostras combinadas em reagente estabilizador de ARN devem ser tratadas como as amostras simples em reagente estabilizador de ARN. Para as amostras combinadas em reagente estabilizador de ARN, a quantidade de amostra não deve exceder a recomendada pelo fabricante para a extração com kits de ARN, como por exemplo *RNeasy Mini kits* (Qiagen) ou semelhantes. Se forem agrupadas amostras de maior dimensão, os kits ou métodos de extração devem refletir este agrupamento.

As amostras colhidas em reagentes estabilizadores de ARN não devem ser usadas para a cultura celular.

I.4.5. Agregação de amostras para RT-qPCR

Uma vez que os protocolos dados para a RT-qPCR têm sensibilidade igual ou superior aos métodos de cultura celular, pode ser aceitável usar o sobrenadante de material homogeneizado de tecidos de peixes de um agregado de órgãos provenientes de até 10 peixes em meio de cultura celular para PCR. Todavia, devido ao inóculo muito mais reduzido usado para a PCR em comparação com a cultura celular, todos os tecidos de peixes devem ser cuidadosamente homogeneizados antes de recolher o material para a extração.

Deve igualmente aplicar-se o mesmo princípio se as amostras tiverem sido colhidas em reagentes estabilizadores de ARN. No entanto, nesse caso é frequentemente difícil recolher material representativo de até 10 peixes num tubo, pelo que o número de peixes por agregado pode ser reduzido para 2 a 5.

I.5. Exame virológico em cultura celular

I.5.1. Culturas celulares e meios

As células de alevim de perca-azul, linhagem celular 2 (BF-2), ou células de gónadas de truta arco-íris, linhagem celular 2 (RTG-2), bem como células de *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) ou de vairão-de-cabeça-grande (FHM), são cultivadas entre 20°C e 30°C em meios adequados, designadamente meio mínimo essencial (MEM) da Eagle, ou variantes deste último, com um suplemento de 10 % de soro fetal de bovino e antibióticos em concentrações padrão.

Se as células forem cultivadas em tubos fechados, recomenda-se que o meio seja tamponado com bicarbonato. O meio utilizado para a cultura celular em unidades abertas pode ser tamponado com tris(hidroximetil) aminometano-HCl (tris-HCl) (23 mM) e bicarbonato de sódio (6 mM). O pH deve ser de $7,6 \pm 0,2$.

As culturas celulares a usar para inoculação com material de tecidos de peixes devem ser células jovens, normalmente com um dia, em monocamada, sempre que possível; pode, no entanto, aceitar-se um intervalo entre 4 e 48 horas. As células devem estar em crescimento ativo quando da inoculação.

I.5.2. Inoculação das culturas celulares

A suspensão de tecidos de órgãos tratados com antibióticos deve ser inoculada em culturas celulares com duas concentrações, isto é, a concentração original e a diluição desta a 1:10, com diluições finais de material tecidular em meio de cultura celular de 1:100 e de 1:1 000, respetivamente, de modo a evitar a interferência de homólogos. Devem ser inoculadas pelo menos duas linhagens celulares, tal como se refere no ponto I.5.1. A relação entre o volume de inóculo e o volume de meio de cultura celular deve ser próxima de 1:10.

Para cada diluição e cada linhagem celular, deve utilizar-se uma área celular mínima de cerca de 2 cm², correspondente a um poço numa placa para cultura celular com 24 poços. Sempre que possível, devem usar-se placas para culturas celulares.

I.5.3. Incubação das culturas celulares

As culturas celulares inoculadas devem ser incubadas a 15 °C durante sete a 10 dias. Se a cor do meio da cultura celular mudar de vermelho para amarelo, indicando uma acidificação do meio, deve proceder-se a um ajustamento do pH com uma solução estéril de bicarbonato ou uma substância equivalente, de modo a assegurar a sensibilidade das células à infeção pelo vírus.

Com uma frequência mínima semestral, ou no caso de se suspeitar de um decréscimo da sensibilidade das células, deve efetuar-se uma titulação das quantidades congeladas de VSHV e de VNHI, de modo a verificar a sensibilidade das culturas celulares à infeção. Deve usar-se, se possível, o procedimento referido na secção III.

I.5.4. Microscopia

As culturas celulares inoculadas devem ser inspecionadas regularmente, pelo menos três vezes por semana, com uma ampliação de 40-150 ×, para a pesquisa de ECP. Caso seja observado um ECP evidente, devem iniciar-se de imediato os procedimentos de identificação do vírus, em conformidade com o ponto I.6.

I.5.5. Subcultura

Caso não tenham ocorrido ECP após a primeira incubação de sete a 10 dias, procede-se à subcultura para culturas celulares recentes, utilizando uma área celular similar à da cultura primária.

Sete a 10 dias após a inoculação devem agrupar-se alíquotas do meio (sobrenadante) de todas as culturas ou poços que constituem a cultura primária, de acordo com a linhagem celular. As alíquotas agrupadas são então inoculadas em culturas de células homólogas, sem diluição e na diluição de 1:10 (diluições finais do sobrenadante de 1:10 e de 1:100, respetivamente), como descrito no ponto I.5.2. Como alternativa, pode inocular-se diretamente num poço com uma cultura celular recente alíquotas de 10 % do meio que constitui a cultura primária (designado subcultura poço a poço). A inoculação pode ser precedida de pré-incubação das diluições com antissoro do vírus da NPI a uma diluição adequada, conforme descrito no ponto I.4.3.

As culturas inoculadas devem ser, em seguida, incubadas durante sete a 10 dias a 15 °C, e inspecionadas como descrito no ponto I.5.4.

Caso se verifique um ECP tóxico nos primeiros três dias de incubação, deve fazer-se a subcultura nesse momento, devendo, para tal, as células ser incubadas durante sete dias e subcultivadas de novo, com uma incubação adicional de sete dias. Caso o ECP tóxico surja depois de decorridos três dias, as células devem ser replicadas uma vez e incubadas até completar o período de 14 dias a contar da inoculação primária. Não deve observar-se qualquer sinal de toxicidade nos sete últimos dias de incubação.

Caso, apesar do tratamento com antibiótico, se observe contaminação bacteriana, a subcultura deve ser precedida de centrifugação a 2 000-4 000 × g, durante 15-30 minutos, a 2-5 °C, ou de filtração do sobrenadante com um filtro de 0,45 µm (com membrana de baixa afinidade proteica) ou ambas. Além disso, a subcultura deve seguir os mesmos procedimentos tal como descritos para o ECP tóxico no quarto parágrafo do presente ponto.

Se não se verificar um ECP, o teste pode ser declarado como negativo.

I.6. Identificação do vírus

Caso se tenha observado um ECP numa cultura celular, o meio (sobrenadante) deve ser colhido e analisado, utilizando uma ou mais das seguintes técnicas: ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunofluorescência (IF), neutralização, RT-PCR ou RT-qPCR. Se as provas não permitirem a identificação definitiva do vírus no prazo de uma semana, o sobrenadante deve ser enviado para o laboratório nacional de referência ou para o laboratório de referência da UE para as doenças dos peixes referido no anexo VI da Diretiva 2006/88/CE para identificação imediata.

I.6.1. ELISA

Deve realizar-se um teste de anticorpos ELISA de tipo «duplo sanduíche» a fim de identificar o isolado do vírus. As placas de micropoços devem ser revestidas com 50 µl/poço (0,9 pg) de imunoglobulinas (Ig) purificadas da proteína A, de qualidade comprovada, de antissoro de coelho contra o VNHI ou o VSHV diluído em tampão carbonato (pH 9,6) com 15 mM de azida de sódio e incubado de 18 horas a duas semanas a 4 °C.

Numa placa de diluição, cada amostra com 1 % de Triton X-100 e os controlos positivos devem ser diluídos com solução tampão (designadamente tampão fosfato salino (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) em quatro diluições: não diluído, 1:4, 1:16, 1:64. As placas ELISA devem ser lavadas com PBS com 0,05 % Tween-20 (PBS-T) e transferem-se 50 µl de cada diluição da placa de diluição para a placa ELISA lavada e revestida.

As placas ELISA devem então ser incubadas por 30 minutos a 37 °C. As placas são a seguir lavadas e incubadas por 30 minutos a 37 °C com anticorpos monoclonais específicos (designadamente, MAb IP5B11 para a identificação do VSHV, e Hyb 136-3 para o VNHI, respetivamente). Transferem-se para a placa ELISA 50 µl de anticorpos anti-ratinho de coelho conjugados com peroxidase de rábano (HRP) diluídos a 1:1 000 em PBS-T-BSA.

Por fim, após nova lavagem, desenvolvem-se as reações com a adição de 50 µl/poço de orto-fenilenodiamina (OPD). As placas ELISA são então incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro, e a reação deve ser interrompida com a adição de 100 µl/poço de H₂SO₄ 0,5 M.

A absorvância deve ser controlada aos comprimentos de onda de 492 e 620 nm num leitor ELISA. As amostras devem ser designadas como positivas ou negativas após a comparação dos resultados do teste com os valores da absorvância dos controlos positivo e negativo. Em geral, as amostras com uma absorvância combinada (A) < 0,5 para o material não diluído devem ser consideradas negativas, as amostras com valor A entre 0,5 e 1,0 devem ser consideradas suspeitas e as amostras com A > 1,0 devem ser consideradas positivas.

Pode usar-se outras versões do teste ELISA com eficácia comprovadamente semelhante em vez da que se refere no presente ponto.

I.6.2. Imunofluorescência (IF)

A identificação dos patógenos enumerados VSHV e VNHI deve realizar-se mediante a infeção de células em placas «Black» de 96 poços, em placas convencionais de 24 poços ou em lamelas para placas de 24 poços. Quando se identifica o VSHV, o VNHI ou ambos mediante a infeção de células em lamelas, deve aplicar-se o seguinte protocolo:

- a) deve proceder-se à sementeira das células nas lamelas a uma densidade que conduza a uma confluência entre 60 e 90 % após 24 horas de cultura. Deve usar-se para este fim, sempre que possível, células de EPC devido à sua forte aderência a superfícies em vidro, mas também se pode utilizar outras linhagens de células, tais como BF-2, RTG-2 ou FHM. Inoculam-se, em duplicado, 150 µl de sobrenadante de cultura celular, em duas diluições diferentes (1:10 e 1:1 000), em monocamadas de um dia, que se incubam a 15 °C durante 24 horas;
- b) subsequentemente, o meio de cultura celular deve ser removido e as monocamadas de células infetadas são fixadas com 0,5 ml de solução aquosa de acetona (80 % vol:vol) gelada. A fixação deve realizar-se numa hote de aspiração durante 15 minutos à temperatura ambiente, a seguir retira-se a solução de acetona e as lamelas devem ser secas ao ar durante pelo menos 30 minutos. Nesta fase, as placas são processadas imediatamente ou armazenadas a – 20 °C para uso posterior;
- c) Os anticorpos monoclonais específicos (designadamente, MAb IP5B11 para a identificação do VSHV, e Hyb 136-3 para o VNHI, respetivamente) devem ser diluídos em PBST 0,01 M, pH 7,2, na diluição recomendada pelo fornecedor dos anticorpos monoclonais; adicionam-se 50 a 100 µl/poço à monocamada fixada e incubam-se as placas durante uma hora a 37 °C numa câmara húmida;

- d) Lavar cuidadosamente as lamelas três vezes com PBS com 0,05 % de Tween-20 (PBS-T), removendo totalmente o tampão após o último enxaguamento. As células devem subsequentemente ser incubadas durante uma hora a 37 °C com anticorpos contra a imunoglobulina do ratinho conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) — ou isotiocianato de 5-(e 6-) tetrametilrodamina — utilizados como anticorpo primário, diluídos de acordo com as instruções do fabricante, novamente lavadas com PBS-T e secas. As culturas coradas devem ser montadas em lamelas com solução salina de glicerol e examinadas sob luz ultravioleta incidente. Utilizar oculares de 10 × ou 12 × e objetivas de 25 × ou 40 × com aberturas numéricas superiores a 0,7 e 1,3, respetivamente.

Podem ser utilizadas técnicas de IF diferentes no respeitante às culturas celulares, à fixação ou aos anticorpos de qualidade de referência, de eficácia comprovadamente semelhante.

I.6.3. Neutralização

As células são removidas do sobrenadante recolhido por centrifugação (2 000-4 000 × g) ou filtração com um filtro de membrana (0,45 µm) de baixa adesão proteica, diluindo em seguida o sobrenadante nas proporções de 1:100 e 1:10 000 em meio de cultura celular.

São misturadas alíquotas de, no mínimo, duas diluições de sobrenadante e incubadas durante 60 minutos a 15 °C com partes iguais dos seguintes reagentes, separadamente:

- a) soro contendo um anticorpo específico do grupo contra o VSHV, numa diluição de 1:50 (vol:vol);
- b) soro contendo um anticorpo específico do grupo contra o VNHI, numa diluição de 1:50 (vol:vol);
- c) mistura de antissoros contra os serótipos indígenas do vírus da NPI, numa diluição de 1:50 (vol:vol);
- d) meio simples (controlo positivo).

A partir de cada mistura de soro e de sobrenadante com vírus são inoculadas pelo menos duas culturas celulares, com 50 µl cada uma, seguidamente incubadas a 15 °C. O desenvolvimento do ECP deve ser verificado tal como descrito no ponto I.5.4.

As estirpes e os isolados de VSHV que não reagem nos testes de neutralização devem ser identificados por IF ou por ELISA.

Pode utilizar-se outros testes de neutralização de eficácia comprovadamente semelhante.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Preparação do ARN viral

Todo o trabalho com o ARN deve realizar-se sobre gelo e usando luvas.

O ARN deve ser extraído pelo método do fenol-clorofórmio ou por coluna de afinidade para ARN, de acordo com as instruções do fabricante. Pode usar-se os kits de extração de ARN disponíveis comercialmente que produzem ARN de elevada qualidade adequado para utilização nos protocolos de RT-PCR especificados nos pontos *infra*.

O ARN deve ser ressuspensão em água isenta de ARNase (ou seja, água tratada com pirocarbonato de dietilo a 0,1 %) ou um tampão de eluição adequado.

I.6.4.2. RT-PCR

Para a deteção do VNHI, devem usar-se os seguintes oligonucleótidos iniciadores:

Oligonucleótido iniciador direto 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3';

Oligonucleótido iniciador reverso 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Devem usar-se os seguintes ciclos (RT-PCR de um só passo): 1 ciclo: 50 °C durante 30 minutos; 1 ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 30 ciclos: 95 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo: 72 °C durante 7 minutos e imersão a 4 °C.

Para a deteção do VSHV, devem usar-se os seguintes oligonucleótidos iniciadores:

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

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

Devem usar-se os seguintes ciclos (RT-PCR com um único passo): 50 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 15 minutos, 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos e a 68°C durante 60 segundos. Subsequentemente, a reação deve ser mantida a 68°C durante 7 minutos.

A quantidade e especificidade das reações de RT-PCR devem ser avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % com brometo de etídio e observada por transiluminação UV. Pode observar-se para o VNHI um amplicão de PCR com 693 pares de bases (pb). Para o VSHV, a dimensão será 505 pb.

Os resultados da PCR podem variar dependendo das condições de realização, designadamente os protocolos térmicos podem carecer de otimização, dependendo do termociclador usado. Além disso, podem ocorrer falsos resultados positivos em virtude de um erro de emparelhamento do iniciador ou de contaminação laboratorial. Assim, para evitar quaisquer dúvidas, devem incluir-se controlos positivos e negativos adequados e amplicões sequenciados. Para os oligonucleótidos iniciadores do VSHV, deve ter-se um especial cuidado ao usar células BF-2, dado que os iniciadores podem reagir com o ADN/ARN da linhagem celular produzindo falsos resultados positivos de tamanho semelhante. Ao testar o sobrenadante de células BF-2, todos os fragmentos amplificados por PCR devem ser sequenciados.

I.6.4.3. RT-qPCR para o VSHV

Para o VSHV, a amplificação deve realizar-se com os seguintes oligonucleótidos iniciadores e a seguinte sonda:

Oligonucleótido iniciador direto: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3';

Oligonucleótido iniciador reverso: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3';

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

RT-qPCR de um só passo:

Em cada placa devem incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Condições dos ciclos: 50 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 15 minutos, 40 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, a 60 °C durante 40 segundos e a 72 °C durante 20 segundos; ajustar caso necessário. Pode utilizar-se outras versões de RT-PCR ou RT-qPCR de eficácia comprovadamente semelhante.

I.6.4.4. RT-qPCR para o VNHI

Para o VNHI, a amplificação deve realizar-se com os seguintes oligonucleótidos iniciadores e a seguinte sonda:

Oligonucleótido iniciador direto: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3';

Oligonucleótido iniciador reverso: 5'-TTCTTTGCGGCTTGTTGA — 3';

Sonda: 5' 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

RT-qPCR de dois passos:

Dado que o ensaio indicado a seguir depende de uma amplificação em dois passos, deve ter-se um especial cuidado ao manipular os tubos de uma reação para a outra, a fim de prevenir a contaminação.

Condições dos ciclos (após o passo de RT): 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e a 60 °C durante 1 minuto; devem fazer-se os ajustamentos que se julguem necessários.

Pode utilizar-se outras versões de RT-PCR ou RT-qPCR de eficácia comprovadamente semelhante.

II. Métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados para a confirmação ou a exclusão da suspeita de SHV, de NHI ou de ambas em caso de suspeita de surto

Sempre que for necessário um exame laboratorial para confirmar ou excluir a presença de NHI, de SHV ou de ambas, em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE, recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no anexo I, parte 1, ponto II.3, deve aplicar-se os seguintes métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados:

- a) isolamento convencional do vírus, seguido de neutralização serológica, identificação imunoquímica ou molecular do vírus;
- b) deteção do vírus por RT-PCR ou RT-qPCR;
- c) outras técnicas de diagnóstico, como IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

- II.1. Isolamento convencional do vírus com posterior identificação do mesmo
 - II.1.1. Seleção das amostras

Devem ser selecionados para exame, pelo menos, 10 peixes que apresentem sinais típicos de NHI ou de SHV.
 - II.1.2. Preparação e envio das amostras de peixes

A preparação e o envio para efeitos do isolamento convencional do vírus deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.2.
 - II.1.3. Colheita de material de diagnóstico complementar

A colheita de material complementar para efeitos do isolamento convencional do vírus deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.3.
 - II.1.4. Preparação das amostras para exame de cultura celular

A preparação das amostras para exame de cultura celular para efeitos do isolamento convencional do vírus deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.4.
 - II.1.5. Exame virológico em cultura celular

O exame virológico para efeitos do isolamento convencional do vírus deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.5.
 - II.1.6. Identificação do vírus

A identificação do vírus para efeitos do isolamento convencional do vírus deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.6.
- II.2. Detecção do vírus por RT-qPCR
 - II.2.1. Seleção das amostras

A seleção das amostras para efeitos da deteção do vírus por RT-qPCR deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.1.2.
 - II.2.2. Preparação e envio das amostras de peixes

A preparação e envio das amostras para efeitos da deteção do vírus por RT-qPCR deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.2.
 - II.2.3. Colheita de material de diagnóstico complementar

A colheita de material de diagnóstico complementar para efeitos da deteção do vírus por RT-qPCR deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.3.
 - II.2.4. Preparação das amostras para RT-qPCR

A preparação das amostras para efeitos da deteção do vírus por RT-qPCR deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos no ponto I.6.4.1.
 - II.2.5. RT-qPCR

A deteção do vírus por RT-qPCR deve seguir os métodos e procedimentos estabelecidos nos pontos I.6.4.1, I.6.4.3 e I.6.4.4.
- II.3. Outras técnicas de diagnóstico

Os sobrenadantes preparados tal como descrito no ponto I.4.3 podem ser submetidos a um ensaio ELISA, ao teste de imunofluorescência indireta (IFAT) ou a RT-PCR de acordo com os pontos I.6.1, I.6.2 ou I.6.4, respetivamente. O material tecidual pode ser submetido a outras técnicas de diagnóstico, como IFAT em secções congeladas ou provas imuno-histoquímicas em tecidos fixados com formalina. Estes métodos rápidos devem ser complementados por um exame virológico de acordo com o ponto II, alínea a) ou alínea b), até 48 horas depois da colheita de amostras, caso:

 - a) deem origem a um resultado negativo; ou
 - b) deem origem a um resultado positivo em amostras que representem o primeiro caso de NHI ou de SHV.

III. Procedimento de titulação para verificar a suscetibilidade das culturas celulares à infeção

Sempre que se recorrer à titulação para verificar a suscetibilidade das culturas celulares à infeção, tal como referido no ponto I.5.3, devem seguir-se os procedimentos estabelecidos nos parágrafos seguintes.

Deve utilizar-se, pelo menos, dois isolados de VSHV e um isolado de VNHI. Os isolados devem representar o principal grupo de vírus de ocorrência na UE, ou seja, no caso do VSHV, um isolado patogénico da truta arco-íris em água doce e um isolado patogénico do pregado; no caso do VNHI, uma estirpe patogénica da truta arco-íris da União Europeia. Deve utilizar-se isolados perfeitamente definidos dos Estados-Membros. Procede-se à propagação em recipientes de cultura de lotes de vírus com um número reduzido de repicagens em células de BF-2 ou RTG-2, no caso do VSHV, e em células de EPC ou FHM, no caso do VNHI. Deve utilizar-se um meio de cultura celular contendo, no mínimo, 10 % de soro. Deve utilizar-se uma MOI reduzida para inoculação (< 1).

Para um ECP total, o vírus é colhido por centrifugação a $2\,000 \times g$, durante 15 minutos, do sobrenadante da cultura celular, sendo de seguida esterilizado por filtração através de um filtro de membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ e distribuído por tubos criogénicos rotulados. O vírus deve ser conservado a $-80\ ^\circ\text{C}$.

Uma semana após a congelação, o conteúdo de três recipientes contendo cada um dos vírus deve ser descongelado com água fria e titulado quanto às respetivas linhagens celulares. Cada isolado de vírus deverá ser descongelado e titulado com uma frequência pelo menos semestral ou no caso de se suspeitar uma redução da suscetibilidade de uma linhagem celular.

Os procedimentos de titulação devem ser descritos em pormenor, devendo seguir-se sempre o mesmo procedimento.

A titulação por diluição final deverá incluir, no mínimo, seis réplicas em cada diluição. Os títulos devem ser comparados com títulos anteriormente obtidos. Caso o título de algum dos três isolados de vírus desça duas unidades ou mais, numa escala logarítmica, abaixo do título inicial, a linhagem celular em causa deverá deixar de ser utilizada para efeitos de vigilância.

Caso coexistam no laboratório diversas linhagens celulares, cada linhagem deve ser examinada separadamente.

Devem manter-se registos por um período mínimo de 10 anos.

PARTE 2

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS DETALHADOS PARA A VIGILÂNCIA E A CONFIRMAÇÃO DE HERPESVIROSE DA CARPA KOI (HCK)

I. Métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados para a confirmação da presença ou a exclusão da suspeita de HCK

Sempre que for necessário um exame laboratorial para confirmar a presença ou excluir a suspeita de HCK, em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE, recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no anexo I, parte 2, secção III, devem aplicar-se os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes dos pontos I.1 e I.2.

I.1. Preparação das amostras de peixes

Para efeitos de diagnóstico, pode usar-se os peixes (enviados vivos ou mortos e embalados separadamente em contentores asséticos selados) ou, alternativamente, os órgãos ou partes de órgãos congelados conservados em etanol a 80 %-100 % ou em meio de transporte viral (a processar no prazo de 48 horas após a colheita) para os ensaios com métodos baseados na PCR convencional ou na qPCR.

Para a deteção do herpesvírus da carpa koi (HVCK), devem colher-se as brânquias e os rins; além disso, pode ainda incluir-se, numa amostra adicional separada, o baço, o encéfalo e o intestino. Em casos agudos, pode agregar-se materiais tecidulares de até cinco peixes.

Pode também usar-se, em certos casos, amostras não letais, como sangue, esfregaços das brânquias, biopsias das brânquias, esfregaço de mucosidade (designadamente, podem usar-se, em caso de suspeita da presença de HVCK, peixes muito valiosos).

I.1.1. Extração de ADN

O ADN deve ser extraído de acordo com procedimentos padrão.

Pode usar-se os kits de extração de ADN disponíveis comercialmente que produzem ADN de elevada qualidade adequado para utilização nos protocolos de PCR referidos no ponto I.2.

I.2. Detecção e identificação do agente através de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

I.2.1. qPCR para detecção do HVCK

Para a detecção do HVCK por qPCR, usa-se o seguinte ensaio de PCR:

Oligonucleótido iniciador direto (HVCK-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3';

Oligonucleótido iniciador reverso (HVCK-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTGTCTTGTT -3';

Sonda (HVCK-109p): 5'-FAM- CTTCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Condições dos ciclos: um ciclo a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C durante 15 segundos e a 60 °C durante 60 segundos. Em cada placa deve incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Pode contudo utilizar-se outras versões da qPCR de eficácia comprovadamente semelhante.

I.2.2. PCR convencional para detecção do HVCK

Deve usar-se o ensaio descrito no presente ponto que tem por alvo o gene da timina quinase (TK). No entanto, pode usar-se outros ensaios de PCR com sensibilidades e especificidades comprovadamente semelhantes ao ensaio descrito.

Oligonucleótido iniciador direto (HVCK-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3';

Oligonucleótido iniciador reverso (HVCK-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Condições dos ciclos: um ciclo a 95 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto e um ciclo a 72 °C durante 10 minutos. A dimensão do produto deveria ser 409 pb.

Os resultados da PCR podem variar dependendo das condições de realização, designadamente os protocolos térmicos podem carecer de otimização, dependendo do termociclador usado. Além disso, podem ocorrer falsos resultados positivos em virtude de um erro de emparelhamento do iniciador ou de contaminação. Em cada placa devem incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Pode contudo utilizar-se outras versões da PCR de eficácia comprovadamente semelhante.

A primeira detecção numa zona deve ser confirmada por sequenciação ou enviada para um laboratório nacional de referência ou para o laboratório de referência da UE para as doenças dos peixes referido no anexo VI da Diretiva 2006/88/CE para identificação imediata.

II. Métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados para a vigilância da HCK

Ao efetuar a amostragem e os exames laboratoriais para efeitos de obtenção ou manutenção de determinados estatutos sanitários relativamente à HCK, tal como se estabelece no anexo I, parte 2, secção I, utilizando os métodos de diagnóstico referidos na parte 2, secções II ou III, daquele anexo, aplicam-se os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados estabelecidos nos seguintes pontos II.1 e II.2.

II.1. Preparação das amostras de peixes

Se possível, devem amostrar-se os peixes mantidos por um período prolongado no intervalo de temperaturas que favorece a presença do vírus, designadamente duas a três semanas entre 15 e 26 °C. Se possível, as amostras devem ser colhidas decorridas 24 horas, mas nunca mais de 72 horas, após práticas de gestão que possam reativar o vírus nos peixes com estatuto de portador, como sejam a captura em rede ou o transporte, a fim de aumentar as hipóteses de detecção do HVCK.

Para efeitos da vigilância da HCK, os peixes podem ser enviados vivos ou mortos e embalados separadamente em contentores assépticos selados ou, alternativamente, podem usar-se nos ensaios com métodos baseados na PCR órgãos ou partes de órgãos congelados conservados em álcool a 80 %-100 % ou em meio de transporte viral (a processar no prazo de 48 horas após a colheita). Para a vigilância da HCK, devem colher-se os tecidos das brânquias e dos rins.

Para efeitos da vigilância da HCK, deve evitar-se, sempre que possível, a agregação de amostras. Se for necessária essa agregação, pode agregar-se tecidos de um máximo de dois peixes. As amostras de maiores dimensões devem ser homogeneizadas com almofariz e pilão ou num digestor, retirando-se subamostras para a extração do ADN antes da clarificação. Em alternativa, pode colher-se subamostras de cada tecido incluído na amostra que se colocam em tubos de lise.

II.1.1. Extração de ADN

O ADN deve ser extraído de acordo com procedimentos padrão. Pode usar-se os kits de extração de ADN disponíveis comercialmente que produzem ADN de elevada qualidade adequado para utilização nos protocolos de PCR referidos no ponto II.2.

A razão aceitável entre o tecido e o meio é de 1:9 p/v. Devem usar-se nos testes entre 20 e 25 mg de material tecidual.

II.2. Vigilância da HCK por métodos baseados na PCR

Para a vigilância do HVCK, deve usar-se a qPCR. Se surgirem amostras positivas numa zona que anteriormente não estava confirmada como positiva, os resultados dos testes devem ser confirmados:

a) por sequenciação de um produto de PCR ou de PCR com iniciadores internos obtido a partir da amostra.

A sequência de consenso limpa obtida deve corresponder (pelo menos em 98 %) a estas sequências de referência.

b) ou, em alternativa, as amostras podem ser enviadas para um laboratório nacional de referência para confirmação.

II.2.1. qPCR para deteção do HVCK

Deve usar-se a qPCR descrita a seguir:

Oligonucleótido iniciador direto (HVCK-86f): 5'-GACGCCGGAGACCTTGTG-3';

Oligonucleótido iniciador reverso (HVCK-163r): 5'-CGGGTTCTTATTTTTCCTTGTT-3';

Sonda (HVCK-109p): 5'-FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-3'.

Condições dos ciclos: um ciclo a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 50 ciclos a 94 °C durante 15 segundos e a 60 °C durante 60 segundos.

Os resultados da qPCR podem variar dependendo das condições de realização, designadamente os protocolos térmicos podem carecer de otimização, dependendo do termociclador usado. Além disso, podem ocorrer falsos resultados positivos em virtude de um erro de emparelhamento do iniciador ou de contaminação laboratorial. Em cada placa devem incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Pode contudo utilizar-se outras versões da qPCR de eficácia comprovadamente semelhante.

II.2.2. PCR convencional para confirmação da deteção do HVCK

Para a confirmação da presença da infeção com o HVCK, deve usar-se a PCR com iniciadores internos genérica descrita no seguinte quadro 2.1, seguida de sequenciação do produto amplificado.

Quadro 2.1

Oligonucleótidos iniciadores e condições para o ensaio de PCR com iniciadores internos que tem por alvo todos os herpesvírus ciprinídeos (CyHV-1, CyHV-2 e CyHV-3)

Nome do oligonucleótido iniciador	Sequência	Condições dos ciclos	Dimensão do produto
CyHVpol-direto	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	Primeira série de PCR	362 pb
CyHVpol-reverso	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'	1 ciclo: 95°C durante 2 minutos	
		40 ciclos: 95°C durante 30 segundos 55°C durante 30 segundos 72°C durante 45 segundos	
		1 ciclo: 72°C durante 10 minutos	

Nome do oligonucleótido iniciador	Sequência	Condições dos ciclos	Dimensão do produto
CyHVpol-interno direto	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	Segunda série de PCR 1 ciclo: 95°C durante 2 minutos 40 ciclos: 95°C durante 30 segundos 55°C durante 30 segundos 72°C durante 45 segundos 1 ciclo: 72°C durante 10 minutos	339 pb
CyHVpol-interno reverso	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3'		

Os resultados da PCR podem variar dependendo das condições de realização, designadamente os protocolos térmicos podem carecer de otimização, dependendo do termociclador usado. Além disso, podem ocorrer falsos resultados positivos em virtude de um erro de emparelhamento do iniciador ou de contaminação laboratorial. Em cada placa devem incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Pode utilizar-se outras versões da PCR de eficácia comprovadamente semelhante.

A sequenciação pode ser realizada pelo laboratório ou por empresas externas especializadas na sequenciação. Os resultados da sequenciação devem ser analisados alinhando as sequências com as sequências de referência conhecidas do HVCK (códigos de registo Gen Bank AP008984, DQ657948 e DQ177346). A sequência de consenso limpa obtida deve corresponder, pelo menos em 98 %, a estas sequências de referência.

PARTE 3

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS DETALHADOS PARA A VIGILÂNCIA E A CONFIRMAÇÃO DA ANEMIA INFECIOSA DO SALMÃO (AIS)

I. Procedimentos de amostragem para a vigilância e o controlo da AIS

Ao efetuar a amostragem e os exames laboratoriais no âmbito dos programas de vigilância ou de erradicação estabelecidos no anexo I, parte 3, ou para confirmar ou excluir a presença de AIS em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE, deve aplicar-se os métodos e procedimentos detalhados constantes dos pontos I.1, I.2 e I.3 da presente secção.

I.1. Preparação das amostras de peixes

Para efeitos dos exames laboratoriais para detetar a presença de AIS, sempre que possível as amostras de peixes não devem ser agregadas. No entanto, para fins de vigilância da AIS, é aceitável a agregação de 2 a 5 peixes.

Deve colher-se amostras de todos os peixes amostrados para a análise por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Com o auxílio de um instrumento estéril, remover um pedaço de rim médio do peixe e transferir para um tubo de microcentrifuga contendo 1 ml de solução de conservação de ARN de eficácia comprovada. Pode juntar-se no mesmo tubo com solução de transporte tecidos provenientes de cinco peixes, constituindo assim uma amostra agregada. A massa de tecido numa amostra deverá ser de 0,5 g. Se os peixes forem demasiado pequenos para obter uma amostra com a massa pretendida, pode recolher-se, por ordem de preferência, pedaços de rim, coração, baço, fígado e cego pilórico, até perfazer 0,5 g.

Os tecidos para o exame histológico devem provir apenas de peixes mortos recentemente, com uma constituição normal, que apresentem sinais clínicos ou necróticos compatíveis com a ocorrência da AIS. Deve colher-se, com o auxílio de um bisturi, amostras de quaisquer lesões externas ou internas, bem como, de forma sistemática, amostras de rim médio, coração, fígado, pâncreas, cloaca, brânquias e baço, transferindo-as para uma solução-tampão isotónica de formol a 8-10 % (vol:vol). A proporção fixador/tecido deve ser de, pelo menos, 20:1, de modo a garantir a conservação satisfatória dos tecidos. Para a análise imuno-histoquímica (IHC) deve colher-se amostras de rim médio e de coração.

Devem colher-se, para o exame virológico em cultura celular, tecidos de todos os peixes das amostras. Com o auxílio de um instrumento estéril, remover pedaços de fígado, rim anterior ou rim médio, coração e baço do peixe e transferir para tubos de plástico com 9 ml de meio de transporte. Pode juntar-se no mesmo tubo com solução de transporte tecidos provenientes de cinco peixes, constituindo assim uma amostra grupada. A massa de tecido de cada amostra deve ser da ordem de $1,0 \pm 0,5$ g.

I.2. Expedição das amostras de peixes

Podem ser transportados peixes inteiros para o laboratório, se, durante o transporte, for possível cumprir os requisitos de temperatura referidos no terceiro parágrafo do presente ponto. Os peixes inteiros deverão ser envoltos em papel absorvente e expedidos num invólucro de plástico, refrigerados do modo descrito no referido parágrafo.

Também podem ser enviados peixes vivos, mas apenas sob a supervisão do laboratório nacional de referência para as doenças dos peixes e tendo em conta os problemas adicionais em termos de desinfeção e biossegurança que se colocam ao transportar peixes vivos.

As amostras de sangue e os tubos que contêm tecidos de peixes para exame virológico ou análise por RT-PCR devem colocar-se em recipientes isolados (por exemplo, caixas de poliestireno de paredes espessas) com uma quantidade de gelo ou de blocos congeladores suficiente para assegurar a refrigeração das amostras durante o transporte para o laboratório. Deve evitar-se a congelação; todavia, aquando da receção, deverá ainda estar presente gelo na caixa ou, caso se tenha utilizado blocos congeladores, um ou mais destes últimos deverão estar ainda total ou parcialmente congelados. Em casos excepcionais, as amostras para RT-PCR e exame virológico podem ser sujeitas a congelação rápida e transportadas para o laboratório a uma temperatura igual ou inferior a -20°C .

Para a análise por RT-PCR de tecidos preservados em reagente de estabilização de ARN (*RNAlater*), a extração do ARN deve ser efetuada dentro dos seguintes prazos dependendo da temperatura de armazenamento:

amostras armazenadas a 37°C : um dia;

amostras armazenadas a 25°C : uma semana;

amostras armazenadas a 4°C : um mês;

amostras armazenadas a -20°C : indefinidamente.

Se os tecidos de peixes forem transportados em fixador para exame histológico, devem ser expedidos em tubos estanques colocados em recipientes resistentes ao impacto. Deve evitar-se a congelação dessas amostras.

O exame virológico em cultura celular deve ser iniciado logo que possível e o mais tardar 48 horas após a colheita de amostras. Em casos excepcionais, o exame virológico pode ter início, o mais tardar, 72 horas após a colheita, na condição de o material a examinar estar protegido por meio de transporte e de terem sido respeitadas as condições de temperatura exigidas durante o transporte.

I.3. Colheita de material de diagnóstico complementar

Sob reserva da aprovação do laboratório de diagnóstico, podem ser colhidos e preparados para exame complementar tecidos de peixes diferentes dos referidos no ponto I.1.

II. Métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados para a vigilância e a confirmação da presença ou a exclusão da suspeita de AIS

Ao efetuar o exame laboratorial para efeitos de obtenção ou manutenção de um determinado estatuto sanitário no que se refere à AIS, tal como referido no anexo I, parte 3, secção I, ou para efeitos de confirmação da presença ou de exclusão da suspeita de AIS em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE, recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no anexo I, parte 3, secção II, devem aplicar-se os métodos e procedimentos detalhados constantes dos seguintes pontos II.1 a II.5.

II.1. Exame das amostras por RT-PCR

O método de diagnóstico a usar para o rastreio do VAIS deve ser a RT-qPCR. Para evitar quaisquer dúvidas, e dado que os resultados da RT-qPCR podem variar em função das condições em que a análise é realizada, deve incluir-se controlos positivos e negativos adequados assim como amplificões.

II.1.1. Extração do ARN total

Todo o trabalho com o ARN deve realizar-se sobre gelo e usando luvas.

O ARN total deve ser extraído pelo método do fenol-clorofórmio ou por coluna de afinidade para ARN, de acordo com as instruções do fabricante.

O ARN purificado deve ser ressuspensão em água isenta de ARNase (ou seja, água tratada com pirocarbonato de dietilo a 0,1 %).

A concentração e a pureza do ARN extraído devem ser estimadas medindo a densidade ótica a 260 nm e a 280 nm. Uma abordagem alternativa pode ser a inclusão de controlos internos dirigidos para o genoma do vírus, tal como se refere no ponto II.1.3.

II.1.2. RT-PCR para a deteção do VAIS

Pode usar-se vários métodos de RT-PCR para a amplificação do genoma do VAIS. Pode efetuar-se uma RT-PCR em dois passos, em que as reações de RT e de PCR se realizam em dois tubos separados. Contudo, é também possível uma reação num único passo, em que as duas reações se processam no mesmo tubo. Sempre que possível, deve optar-se pelo método com um único passo, dado que o ensaio num só tubo minimiza o risco de contaminação cruzada, uma vez que não é necessário transferir o conteúdo, sendo a sensibilidade considerada tão boa como a do método em dois passos.

Deve usar-se os oligonucleótidos iniciadores e o ensaio descritos no presente ponto, designadamente o par de oligonucleótidos iniciadores ILA1 ou ILA2 que visam o segmento 8 e que foram considerados adequados para a deteção do VAIS em surtos e em peixes portadores. O oligonucleótido iniciador reverso ILA2 não é adequado para isolados da América do Norte, pelo que, nesses casos, deve usar-se um iniciador alternativo.

Oligonucleótido iniciador direto (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3';

Oligonucleótido iniciador reverso (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Condições dos ciclos: um ciclo a 50 °C durante 30 minutos, um ciclo a 94 °C durante 15 minutos, 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 60 segundos; um ciclo a 72 °C durante 5 minutos. Dimensão do produto 155 pb.

Os resultados da PCR podem variar dependendo das condições de realização, designadamente os protocolos térmicos podem carecer de otimização, dependendo do termociclador usado. Além disso, podem ocorrer falsos resultados positivos em virtude de um erro de emparelhamento do iniciador ou de contaminação laboratorial. Em cada placa deve incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Pode contudo utilizar-se outras versões da RT-PCR de eficácia comprovadamente semelhante.

II.1.3. RT-qPCR para a deteção do VAIS

A utilização da RT-qPCR pode aumentar a especificidade e provavelmente também a sensibilidade. O método pode executar-se mais rapidamente já que não é necessária a etapa da eletroforese em gel e reduz o risco de contaminação cruzada, dado que é possível estimar a quantidade de ARN genómico viral dentro do tubo da amostra. Um inconveniente do ensaio de RT-qPCR é que, frequentemente, não é possível sequenciar os produtos amplificados. No entanto, se houver dúvidas quanto à especificidade do produto amplificado, pode efetuar-se outro ensaio específico para o VAIS, a fim de verificar o resultado.

Deve usar-se o ensaio especificado no presente ponto, que tem por alvo o segmento 8. Este ensaio abrange os isolados da União Europeia, da Associação Europeia de Comércio Livre e da América do Norte. Sempre que possível, deve optar-se pelo método com um único passo, dado que o ensaio num só tubo minimiza o risco de contaminação cruzada.

Oligonucleótido iniciador direto: 5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3';

Oligonucleótido iniciador reverso: 5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3';

Sonda: 5'-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC — MGBNFQ-3'.

Em cada placa deve incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Condições dos ciclos: um ciclo a 50 °C durante 30 minutos, um ciclo a 95 °C durante 15 minutos, 40 ciclos a 94 °C durante 15 segundos e a 60 °C durante 30 segundos; deve fazer-se os ajustamentos que se julguem necessários. Pode utilizar-se outras versões de RT-PCR ou RT-qPCR de eficácia comprovadamente semelhante.

II.1.4. Sequenciação de produtos amplificados da PCR

Oligonucleótido iniciador direto (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA-3';

Oligonucleótido iniciador reverso (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA-3'.

Em cada placa devem incluir-se padrões de controlo negativo e positivo. Condições dos ciclos (RT-PCR com um único passo): um ciclo a 50 °C durante 30 minutos, um ciclo a 94 °C durante 15 minutos, 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 60 segundos, um ciclo a 72 °C durante 5 minutos; deve fazer-se os ajustamentos que se julguem necessários. Pode utilizar-se outras versões de RT-PCR ou RT-qPCR de eficácia comprovadamente semelhante.

Alternativamente, pode usar-se o seguinte método para a sequenciação da HPR no segmento 6:

Oligonucleótido iniciador direto: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3';

Oligonucleótido iniciador reverso: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'.

Dimensão do produto: 304 nt se HPR0.

Pode igualmente usar-se ensaios de RT-PCR com sensibilidade e especificidade semelhantes às dos ensaios descritos no presente ponto.

Deve verificar-se a pureza do produto amplificado da RT-PCR por eletroforese em gel antes da sequenciação. Se surgir apenas um fragmento puro, deve ser purificado diretamente a partir da reação de PCR. Se estiverem presentes múltiplos fragmentos amplificados, o fragmento de interesse deve ser purificado por eletroforese em gel. A purificação dos fragmentos de PCR a partir de soluções de gel de agarose deve efetuar-se com colunas de afinidade para fragmentos de PCR, de acordo com as instruções do fabricante.

A sequenciação deve realizar-se com oligonucleótidos iniciadores de amplificação, por empresas externas especializadas na sequenciação. Os resultados devem ser analisados com a ferramenta de busca BLAST e as sequências devem ser comparadas com outras sequências conhecidas na base de nucleótidos do US National Centre for Biotechnology Information (NCBI — Centro Nacional para a informação biotecnológica dos Estados Unidos da América).

A sequenciação deve eliminar todas as dúvidas quanto à especificidade de um produto amplificado da RT-PCR.

II.2. Isolamento do VAIS em culturas celulares

II.2.1. Preparação de amostras

O tecido pode ser mantido a – 80 °C. O tecido só pode ser congelado e descongelado uma vez antes do exame. Para fins de vigilância e controlo, o exame deve realizar-se o mais depressa possível.

Cada amostra (agregação de tecidos em solução de transporte) deverá ser perfeitamente homogeneizada num homogeneizador validado e centrifugada a 2 000-4 000 × g durante 15 minutos, a 0-6 °C, devendo o sobrenadante ser filtrado num filtro de 0,45 µm e incubado com igual volume de uma mistura adequadamente diluída de antissoros contra os serótipos indígenas do vírus da NPI. O título do antissoro deverá ser de, pelo menos, 1:2 000, num teste de neutralização em placa a 50 %. Após incubação a 15 °C durante uma hora, esta mistura constitui o inóculo.

O tratamento de todos os inóculos com antissoro do vírus da necrose pancreática infecciosa (um vírus que, nalgumas regiões da Europa, ocorre em 50 % das amostras de peixe) destina-se a evitar o desenvolvimento do efeito citopático (ECP) devido ao vírus da necrose infecciosa nas culturas celulares inoculadas. A fim de reduzir a duração dos exames virológicos e o número de casos em que a ocorrência de ECP poderia ser considerada potencialmente indicativa do VAIS, esse tratamento pode ser efetuado. Caso as amostras provenham de unidades de produção consideradas indemnes de NPI, pode omitir-se o tratamento dos inóculos com antissoro do vírus dessa doença.

II.2.2. Inoculação das culturas celulares

Para o isolamento primário do VAIS, pode usar-se células de rim de salmão-do-atlântico (RSA). Para o isolamento do VAIS pode utilizar-se outras linhagens celulares de eficácia e sensibilidade comprovadas, tendo em conta a variabilidade das estirpes e a capacidade de replicação das diversas estirpes em diversas linhagens celulares. As células de RSA parecem suportar o isolamento e o crescimento dos isolados de vírus conhecidos até agora, desde que se use um número reduzido de repicagens. Pode surgir nas células de RSA um efeito citopático (ECP) mais distinto do que noutras linhagens celulares suscetíveis, como SHK-1 (células de rim anterior do salmão).

As células RSA (com um número de repicagens não superior a 65) devem ser cultivadas em meio L-15 contendo 10 % de soro fetal de bovino, 2 % (vol:vol) de L-glutamina 200 mM e 0,08 % (vol:vol) de 2-mercaptoetanol 50 mM, em placas multipoços. A suspensão de tecidos de órgãos tratados com antissoro deve ser inoculada em culturas celulares jovens em crescimento ativo, a fim de obter uma diluição final de material tecidular em meio de cultura de 1:1 000. Para cada suspensão de tecidos de órgãos, adicionar 40 µl de inóculo a um poço com 2 ml de meio de cultura. Para minimizar o risco de contaminação cruzada, deve usar-se placas de 12 ou 24 poços separadas para amostras provenientes de explorações piscícolas diferentes.

Não inocular uma das placas, que constituirá o controlo negativo. Inocular outra placa com um isolado de referência de VAIS como controlo positivo, da forma que seguidamente se descreve. Inocular 100 µl de preparação-mãe de VAIS (título mínimo: 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹ — dose infecciosa das culturas dos tecidos a 50 % do ponto final) no primeiro poço, misturando bem. Transferir uma porção deste material do primeiro poço para o segundo, de forma a obter uma diluição 1:10 e misturar. Repetir a operação de forma a obter seis diluições 1:10. A preparação-mãe de VAIS pode ser armazenada a - 80 °C durante, pelo menos, dois anos, devendo todavia ser utilizada nos três dias seguintes ao descongelamento. Deve adotar-se os cuidados necessários para evitar a contaminação cruzada das placas em análise com material de controlo positivo. Para tal, as placas utilizadas para os controlos positivos devem ser diferentes das utilizadas para as amostras a analisar e ser manipuladas separadamente. Pode realizar-se semestralmente um teste de sensibilidade das células de RSA em relação a isolados de VAIS, substituindo a inclusão de um controlo positivo em cada inoculação.

Incubar as amostras a 15 ± 2 °C por um período não superior a 15 dias. Efetuar o exame microscópico das culturas celulares para pesquisa de efeito citopático duas vezes, entre 5 a 7 dias e 12 a 14 dias após a inoculação. Se alguma cultura exibir efeito citopático, deve iniciar-se de imediato os procedimentos de identificação do vírus, em conformidade com o ponto II.2.4. Caso não se observe o referido efeito até ao 14.º dia, realizar um teste de imunofluorescência indireta (IFAT), hemadsorção ou RT-PCR.

II.2.3. Subcultura

Efetuar a subcultura entre o 13.º e o 15.º dia. Em placas multipoços, adicionar o sobrenadante de cultura a poços que contenham células novas em crescimento ativo a uma diluição adequada (1/10) e incubar a 14 ± 2 °C por um período não superior a 18 dias. Proceder ao exame microscópico das culturas celulares para a pesquisa de efeito citopático duas vezes, entre o 5.º e o 7.º dia e entre o 14.º e o 18.º dia após a inoculação. Se alguma cultura exibir efeito citopático, deve iniciar-se de imediato os procedimentos de identificação do vírus, em conformidade com o ponto II.2.4. Caso não se observe efeito citopático entre o 14.º e o 18.º dia, deve efetuar-se um teste de hemadsorção ou RT-PCR.

Caso se observe citotoxicidade nos primeiros sete dias de incubação, a subcultura deverá ser efetuada de imediato; incubar as células durante 14-18 dias e proceder a uma nova subcultura, incubando durante um período complementar de 14-18 dias. Se ocorrer citotoxicidade após o sétimo dia, efetuar uma única subcultura e incubar as células de forma a que o período de incubação total seja de 28-36 dias a contar da primeira inoculação.

Se ocorrer contaminação bacteriana na cultura primária, o teste deve ser repetido com o homogeneizado de tecido armazenado a - 80 °C. Antes da inoculação, centrifugar o homogeneizado de tecido a $4\,000 \times g$ durante 15 a 30 minutos, a 0-6 °C, e filtrar o sobrenadante num filtro de 0,22 µm. Se ocorrer contaminação bacteriana na fase de subcultura, filtrar o sobrenadante num filtro de 0,22 µm, inocular em células novas e incubar durante 14-18 dias suplementares.

II.2.4. Testes de identificação viral

Caso se observe efeito citopático em alguma fase ou um teste de hemadsorção se revele positivo, deve proceder-se à identificação viral. Os métodos escolhidos para a identificação do VAIS devem ser a RT-PCR em conformidade com o ponto II.1 e a imunofluorescência (IF) em conformidade com o ponto II.2.6. Caso se considere provável a presença de outros vírus, deve realizar-se testes de identificação viral complementares. Se esses testes não tiverem resultado numa identificação definitiva do vírus no prazo de uma semana, o sobrenadante deve ser enviado para identificação imediata para:

- a) o laboratório de referência para a AIS da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE); ou
- b) um laboratório nacional de referência ou o laboratório de referência da UE para as doenças dos peixes, tal como se refere no anexo VI da Diretiva 2006/88/CE.

II.2.5. Hemadsorção

Dado que a replicação do VAIS em culturas celulares nem sempre produz efeito citopático, cada poço deve ser submetido a um teste RT-PCR ou a um teste de hemadsorção em conformidade com o presente ponto, ou a um teste IF em conformidade com o ponto II.2.6.

Remover o meio de cultura celular de todos os poços, incluindo os poços dos controlos positivos e negativos, e colocar em tubos estéreis rotulados. Adicionar a cada poço 500 µl de uma suspensão a 0,2 % (vol:vol) de eritrócitos lavados de coelho ou cavalo ou de uma suspensão a 0,05 % (vol:vol) de eritrócitos lavados de truta arco-íris ou salmão-do-atlântico e incubar à temperatura ambiente durante 45 minutos. Remover os eritrócitos e lavar cada poço duas vezes com meio L-15. Proceder ao exame microscópico de todos os poços.

A presença de aglomerados de eritrócitos na superfície das células RSA indica uma provável infeção com um ortomixovírus. Caso um teste de hemadsorção se revele positivo, deverá efetuar-se de imediato um teste de identificação viral em conformidade com o ponto II.2.4.

II.2.6. Imunofluorescência (IF)

Cultivar células RSA (com um número de repicagens não superior a 65) em meio L-15 contendo 10 % de soro fetal de bovino, 2 % (vol:vol) de L-glutamina 200 mM e 0,08 % (vol:vol) de 2-mercaptoetanol 50 mM, em placas multipoços, até obter uma confluência superior a 50 %. Pode utilizar-se outras linhagens celulares ou meios de cultura de eficácia comprovada. Adicionar 225 µl de sobrenadante de cada cultura supostamente infetada com vírus a cada um de dois poços, misturar e transferir 225 µl para dois novos poços (diluição 1:5). Deve manter-se, como controlos, dois poços adicionais não inoculados. As amostras provenientes de explorações piscícolas diversas devem ser examinadas em placas separadas, o mesmo sucedendo com o controlo positivo. Este último deve ser preparado a partir do isolado de referência de VAIS.

Incubar as placas a 14 ± 2 °C e efetuar o exame microscópico durante sete dias. Caso se observe efeito citopático num estágio precoce, ou caso não se observe qualquer efeito citopático até ao 7.º dia, o passo seguinte consistirá na fixação. Lavar os poços com tampão fosfato salino (PBS) e fixar por incubação com acetona a 80 % durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Secar as placas ao ar e corá-las de imediato ou armazená-las a 0-6 °C por um período não superior a 24 horas antes da coloração.

Corar os poços em duplicado com uma mistura de anticorpos monoclonais 3H6F8 e 1OC9F5 anti-VAIS ou outros anticorpos monoclonais de eficácia e especificidade comprovadas, diluir em PBS e incubar a 37 ± 4 °C durante 30 minutos. Remover os anticorpos monoclonais e lavar as placas três vezes com solução a 0,05 % de Tween 20 em PBS. Adicionar a cada poço conjugado FITC IgG anti-ratinho diluído em PBS e incubar a 37 ± 4 °C durante 30 minutos. As diluições dos diversos lotes de anticorpos monoclonais e conjugado de FITC deverão ser otimizadas em cada laboratório. Remover o anticorpo e lavar as placas três vezes com solução a 0,05 % de Tween 20 em PBS.

Examinar de imediato os poços num microscópio invertido para microscopia de fluorescência munido de um filtro adequado para excitação de FITC. O teste deverá ser considerado positivo caso se observem células fluorescentes. Para a validação do teste, os controlos positivos devem apresentar resultados positivos e os controlos negativos devem apresentar resultados negativos.

II.3. Exame de outros tecidos

É possível aplicar a técnica descrita no ponto II.2.6 a outros tecidos do peixe, tais como tecidos do fígado, baço e coração, na condição de ser possível depositar nas lâminas uma quantidade razoável de células endoteliais, leucócitos ou linfócitos. O procedimento de coloração é idêntico para cada tecido, embora, em alguns casos, seja preferível omitir a coloração com iodeto de propídio, baseando a identificação dos tipos de células presentes na impressão na iluminação de fase.

II.4. Histologia

Efetuar cortes de 5 µm de secções montadas em parafina e corar com hematoxilina e eosina.

As alterações histológicas em salmão-do-atlântico clinicamente doente são variáveis, mas podem incluir o seguinte:

- numerosos eritrócitos no seio venoso central e nos capilares lamelares das brânquias, onde também se podem formar trombos de eritrócitos;
- petéquia multifocal a confluenta ou necrose dos hepatócitos ou ambas a uma certa distância dos vasos maiores no fígado; acumulação multifocal de eritrócitos nos sinusoides hepáticos dilatados;

- c) acumulação de eritrócitos nos vasos sanguíneos na lâmina própria intestinal e eventualmente hemorragia para a lâmina própria;
- d) estroma do baço distendido por acumulação de eritrócitos;
- e) hemorragia intersticial difusa ligeiramente multifocal a extensa com necrose tubular nas zonas hemorrágicas, acumulação de eritrócitos nos glomérulos no rim;
- f) eritrofagocitose no baço e hemorragias secundárias no fígado e rim.

II.5. Imuno-histoquímica (IHC)

Deve usar-se anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína do VAIS em secções montadas em parafina de tecidos fixados com formalina. Os órgãos a examinar são o rim médio e o coração (área transversal incluindo as três câmaras e as válvulas). Os casos suspeitos devidos a sinais patológicos devem ser confirmados através de um teste IHC positivo. As secções histológicas devem ser preparadas em conformidade com os métodos padrão.

1) Preparação das secções de tecidos

Os tecidos devem ser fixados com formalina a 10 % tamponada com fosfato neutro durante, pelo menos, um dia, desidratados numa série de etanol graduado, clarificados com xileno e montados em parafina, de acordo com protocolos padrão. Aquecer durante 20 minutos secções com cerca de 5 µm de espessura (colocadas para a IHC em lâminas revestidas com poli-L-lisina) entre 56 °C e 58 °C (no máximo 60 °C), desparafinadas em xileno, reidratadas numa série de etanol graduado e coradas com hematoxilina e eosina para a patomorfologia e a IHC em conformidade com o ponto 2.

2) Procedimento de coloração para a IHC

Todas as incubações deve realizar-se à temperatura ambiente numa plataforma oscilante, salvo indicação contrária na presente decisão:

- a) a recuperação do antígeno efetua-se fervendo secções de tecido em tampão citrato 0,1 M, pH 6,0 durante 2 × 6 minutos, seguido de bloqueio com uma solução de extrato seco de leite desnatado a 5 % e de soro de cabra a 2 % em TBS 50 mM (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) durante 20 minutos;
- b) as secções devem em seguida ser incubadas durante a noite com anticorpo primário (anticorpo monoespecífico de coelho contra a nucleoproteína do VAIS) diluído em TBS com extrato seco de leite desnatado a 1 %, seguido de três lavagens em TBS com Tween 20 a 0,1 %;
- c) para a deteção de anticorpos ligados, as secções devem ser incubadas com anticorpos da IgG do coelho conjugados com fosfatase alcalina durante 60 minutos. Após uma lavagem final, adicionam-se Fast Red (1 mg ml⁻¹) e Naftol AS-MX fosfato (0,2 mg ml⁻¹) com levamisole 1 mM em TBS 0,1 M (pH 8,2) para a revelação durante 20 minutos. As secções são em seguida lavadas com água da torneira antes da contra-coloração com hematoxilina da Harris e são montadas em meio de montagem aquoso. Em cada montagem deve incluir-se, como controlos, secções de tecidos positivas e negativas para o VAIS.

3) Interpretação dos resultados da IHC

A interpretação dos resultados da IHC deve ser como a seguir se expõe nas alíneas a) e b):

- a) as secções de controlo devem ser consideradas positivas sempre que se verificar que as mesmas apresentam uma coloração vermelha (avermelhada) claramente visível do citoplasma e do núcleo das células endoteliais dos vasos sanguíneos do endocárdio. Uma amostra de secção de tecido só pode ser considerada positiva se apresentar claramente essa coloração vermelha intranuclear das células endoteliais;
- b) as secções de controlo devem ser consideradas negativas se não apresentarem reação de coloração significativa.

Dado que a localização intranuclear é própria da nucleoproteína do ortomixovírus durante a fase de replicação do vírus mas a coloração citoplasmática concomitante é por vezes dominante, a coloração citoplasmática e outros padrões de coloração sem uma localização intranuclear deve considerar-se como não específicos ou inconclusivos.

As mais fortes reações positivas de coloração obtêm-se frequentemente com células endoteliais do coração e do rim. As reações de coloração endotelial em lesões hemorrágicas muito extensas podem ser leves ou estar ausentes, provavelmente devido à lise das células endoteliais infetadas.

PARTE 4

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS DETALHADOS PARA A VIGILÂNCIA E A CONFIRMAÇÃO DA INFEÇÃO POR *MARTEILIA REFRINGENS*

I. Métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados para o diagnóstico da infeção por *Marteilia refringens*

Ao efetuar a amostragem e os exames laboratoriais para efeitos de obtenção ou manutenção de um estatuto sanitário no que se refere à infeção por *Marteilia refringens*, tal como referido no anexo I, parte 4, secção I, ou para efeitos de confirmação ou de exclusão da presença dessa doença enumerada em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE, recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no anexo I, parte 4, secção II, deve aplicar-se os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes dos pontos I.1, I.2 e I.3 da presente parte.

I.1. Procedimento de amostragem

A fim de aumentar as hipóteses de encontrar animais infetados, deve colher-se em primeiro lugar os moluscos com concha aberta ou mortos recentemente.

Depois de colhidos para amostra, as ostras ou os mexilhões devem ser mantidos a 4 °C ou refrigerados sobre gelo por um máximo de 24 horas se as amostras incluírem moluscos com concha aberta ou por um máximo de 72 horas se tal não acontecer, num saco de plástico rotulado com os pormenores relativos à natureza e origem das ostras ou dos mexilhões. Os moluscos com concha aberta ou recentemente mortos devem ser mantidos separados dos restantes moluscos.

Para o diagnóstico da *Marteilia refringens* por histologia, deve usar-se secções de tecido com 3 a 5 mm de espessura, incluindo as brânquias e o coração. Para alguns testes, nomeadamente impressões e reação em cadeia da polimerase (PCR), deve usar-se um pedaço de glândula digestiva.

I.2. Técnicas de microscopia

I.2.1. Citologia (citologia de impressão)

Após secagem de tecidos da glândula digestiva sobre papel absorvente, deve fazer-se várias impressões sobre uma lâmina. As lâminas devem ser secas ao ar, deve fixar-se com metanol ou com etanol absoluto e corar-se com um kit de coloração de sangue disponível comercialmente, como Diff-Quick®/Hemacolor®, em conformidade com as instruções do fabricante. Após lavagem com água da torneira e secagem, as lâminas devem ser montadas com uma lamela usando uma resina sintética adequada. As lâminas devem primeiro ser observadas com uma ampliação de $\times 200$ e, a seguir, por imersão em óleo, com uma ampliação de $\times 1\,000$.

Um resultado positivo consiste na observação de células com tamanhos entre 30 e 40 μm . O citoplasma apresenta coloração basófila, ao passo que o núcleo tem coloração eosinófila. Observam-se auréolas pálidas em redor de grandes grânulos (refringentes) fortemente corados e, nas células maiores, arranjos de células dentro de células.

A técnica não é específica para espécies de parasitas.

I.2.2. Histologia

Deve fixar-se secções de tecidos incluindo brânquias, glândula digestiva, manto e gónadas em fixador de Davidson por um período mínimo de 24 horas, seguindo-se o processamento normal para a histologia em parafina e a coloração, por exemplo com hematoxilina e eosina. As observações devem efetuar-se a ampliações crescentes até $\times 1\,000$.

Um resultado positivo consiste na observação de células com tamanhos entre 4 e 40 μm . As fases precoces consistem em células multinucleadas, de esféricas a alongadas. Estas células encontram-se sobretudo no epitélio do esófago e do estômago e, por vezes, dos palpos labiais. A esporulação envolve uma divisão celular dentro das células e ocorre nos túbulos e ductos da glândula digestiva. Os grânulos refringentes surgem durante a esporulação, mas não são observados nas fases precoces. Nas fases tardias da infeção, observam-se esporos livres no lúmen do tubo digestivo. O citoplasma apresenta coloração basófila, ao passo que o núcleo tem coloração eosinófila. A coloração dos grânulos pode ir do laranja escuro ao vermelho escuro.

A técnica não é específica para espécies de parasitas.

I.3. Técnicas moleculares

I.3.1. Extração de ADN

O ADN deve ser extraído de acordo com procedimentos padrão.

Pode usar-se os kits de extração de ADN disponíveis comercialmente que produzem habitualmente ADN de elevada qualidade adequado para utilização nos protocolos de PCR descritos no ponto I.3.2.

I.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram desenvolvidos e estão publicado diversos protocolos para a PCR.

Deve usar-se os oligonucleótidos iniciadores que visam a região ITS1 (espaçador interno transcrito) dado que amplificam apenas a *M. refringens*.

A PCR deve ser efetuada num volume de 50 µl. As misturas para PCR devem conter tampão (KCl 500 mM, Tris/HCl 100 mM [pH 9,0 a 25 °C] e Triton® X-100 1 %), MgCl₂ 2,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, oligonucleótidos iniciadores direto e reverso 1 µM, Taq DNA polimerase 0,02 unidades µl⁻¹ e 10 a 100 ng de ADN extraído. Após desnaturação do ADN a 94 °C durante 5 minutos, deve fazer-se 30 ciclos do seguinte modo: desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, emparelhamento a 55 °C durante 1 minuto e elongação a 72 °C durante 1 minuto por quilo de pares de bases. Deve realizar-se uma fase final de elongação de 10 minutos a 72 °C. Para a deteção de *M. refringens*, a PCR deve realizar-se com oligonucleótidos iniciadores que visam a região ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' e 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Os controlos positivos devem consistir em ADN genómico de um hospedeiro altamente infetado ou ADN plasmídico que inclua a região visada.

Os controlos negativos devem consistir em ADN genómico de hospedeiros não infetados e em reagentes de PCR sem o ADN visado.

Um resultado positivo é uma amplificação de PCR com o tamanho esperado (412 pb) com resultado negativo em todos os controlos negativos e resultado positivo em todos os controlos positivos.

I.3.3. Hibridização in situ (HIS)

Foram desenvolvidos e estão publicados diversos protocolos para a HIS.

Deve usar-se uma sonda que vise a SSU do complexo de genes de rARN, uma vez que foi validada em relação à histologia.

Deve fixar-se secções de tecidos incluindo brânquias e glândula digestiva em fixador de Davidson por um período mínimo de 24 horas, seguindo-se o processamento normal para a histologia em parafina. Deve cortar-se secções de 5 µm que se colocam em lâminas revestidas com aminoalquilsilano, que são a seguir cozidas em forno a 40 °C durante uma noite. As secções são desparafinadas por imersão em xileno durante 10 minutos. Esta etapa deve ser repetida uma vez e de seguida elimina-se o solvente por imersão em dois banhos sucessivos em etanol absoluto de 10 minutos cada. As secções são a seguir desidratadas por imersão numa série de banhos de etanol graduado. As secções devem ser tratadas com proteinase K (100 µg ml⁻¹) em tampão TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37 °C durante 30 minutos. As lâminas são desidratadas por imersão numa série de banhos de etanol graduado e em seguida secas ao ar. As secções devem ser incubadas com 100 µl de tampão de hibridização (4 × SSC [citrate de sódio salino], formamida a 50 %, 1 × solução de Denhardt, 250 µg ml⁻¹ de tARN de levedura, sulfato de dextrano a 10 %) contendo 10 ng (1 µl dos reagentes para PCR preparados como descrito no ponto I.3.2 utilizando os oligonucleótidos iniciadores CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG e TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) da sonda marcada com digoxigenina. As secções devem ser cobertas com lamelas de plástico *in situ* e colocadas num bloco de aquecimento a 95 °C durante 5 minutos. As lâminas são de seguida arrefecidas sobre gelo durante 1 minuto antes da hibridização durante toda a noite numa câmara húmida a 42 °C. As secções devem ser lavadas duas vezes durante 5 minutos em 2 × SSC à temperatura ambiente e uma vez durante 10 minutos em 0,4 × SSC a 42 °C. As etapas de deteção devem ser realizadas em conformidade com as instruções do fabricante. As lâminas são em seguida enxaguadas com água destilada estéril (dH₂O). As secções devem sofrer contracoloração com Bismarck Brown Yellow, devem ser enxaguadas com dH₂O e deve aplicar-se lamelas usando um meio de montagem aquoso.

Os controlos positivos e negativos devem ser secções de hospedeiros infetados e não infetados, respetivamente.

Um resultado positivo é demonstrado pela coloração púrpura-preta das células de *M. refringens* em tecidos alvo conhecidos, sendo negativos todos os controlos negativos e positivos todos os controlos positivos.

I.3.4. Sequenciação

A sequenciação deve realizar-se como uma das etapas finais do diagnóstico de confirmação. As regiões alvo são a SSU do rADN e a ITS1.

II. Métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados para a vigilância e a confirmação da infeção por *Marteilia refringens*

Para efeitos dos programas de vigilância e para a confirmação da presença de uma infeção por *Marteilia refringens* ou para excluir uma suspeita dessa doença enumerada, em conformidade com os requisitos estabelecidos no anexo I, parte 4, secção II, os métodos de diagnóstico e os procedimentos correspondentes a utilizar devem estar conformes com as diretrizes estabelecidas no quadro 4.1 como segue:

Quadro 4.1

Diretrizes para a utilização dos métodos de diagnóstico para os programas de vigilância e para confirmar ou excluir a infeção por *Marteilia refringens*

Método	Vigilância orientada	Diagnóstico de presunção	Diagnóstico de confirmação
Impressões da glândula digestiva	X	X	X, ou
Histopatologia	X		X, ou
Hibridização <i>in situ</i>			X, e
PCR	X	X	X, e
Sequenciação			X

PARTE 5

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS DETALHADOS PARA A VIGILÂNCIA E A CONFIRMAÇÃO DA INFEÇÃO POR *BONAMIA OSTREAE*

I. Procedimentos de diagnóstico da infeção por *Bonamia ostreae*

Ao efetuar a amostragem e os exames laboratoriais para efeitos de obtenção ou manutenção de um determinado estatuto sanitário no que se refere à *Bonamia ostreae*, tal como referido no anexo I, parte 5, secção I, ou para efeitos de confirmação ou de exclusão da presença dessa doença enumerada em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE, recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no anexo I, parte 5, secção II, deve aplicar-se os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes dos seguintes pontos I.1, I.2 e I.3.

I.1. Procedimento de amostragem

A fim de aumentar as hipóteses de encontrar animais infetados, deve colher-se em primeiro lugar os moluscos com concha aberta ou mortos recentemente.

Depois de colhidos para amostra, as ostras devem ser mantidas a 4 °C ou refrigeradas sobre gelo por um máximo de 24 horas se as amostras incluírem moluscos com concha aberta ou por 72 horas se tal não acontecer, num saco de plástico rotulado com os pormenores relativos à natureza e origem das ostras. Os moluscos com concha aberta ou recentemente mortos devem ser mantidos separados dos restantes moluscos.

Para o diagnóstico da *Bonamia ostreae* por histologia, deve usar-se secções de tecido com 3 a 5 mm de espessura, incluindo as brânquias e o coração. Para alguns testes, nomeadamente impressões e reação em cadeia da polimerase (PCR), deve usar-se um pedaço de glândula digestiva.

I.2. Técnicas de microscopia

I.2.1. Citologia (citologia de impressão)

Após secagem de tecidos das brânquias ou do coração sobre papel absorvente, deve fazer-se várias impressões sobre uma lâmina. As lâminas devem ser secas ao ar, deve fixar-se com metanol ou com etanol absoluto e corar-se com um kit de coloração de sangue disponível comercialmente (como, por exemplo, Diff-Quick®/Hemacolor®) em conformidade com as instruções do fabricante. Após lavagem com água da torneira e secagem, as lâminas devem ser montadas com uma lamela usando uma resina sintética adequada. As lâminas devem primeiro ser observadas com uma ampliação de $\times 200$ e, a seguir, por imersão em óleo, com uma ampliação de $\times 1\,000$.

Um resultado positivo é constituído pela presença de pequenos organismos esféricos ou ovais (2 a 5 μm de largura) no interior dos hemócitos. No entanto, o parasita também pode ocorrer extracelularmente. Estes organismos apresentam um citoplasma basófilo e um núcleo eosinófilo (as cores podem variar em função do corante usado) e, dado que se espalham na lâmina, podem ter uma aparência maior nas impressões do que no exame histológico. É possível a observação de células polinucleares. A técnica não é específica para espécies de parasitas.

I.2.2. Histologia

Deve fixar-se secções de tecidos incluindo brânquias e glândula digestiva em fixador de Davidson por um período mínimo de 24 horas, seguindo-se o processamento normal para a histologia em parafina e a coloração, por exemplo com hematoxilina e eosina. As observações devem efetuar-se a ampliações crescentes até $\times 1\,000$.

Um resultado positivo é constituído pela presença de parasitas como células muito pequenas com largura compreendida entre 2 e 5 μm , no interior dos hemócitos ou livres no tecido conjuntivo ou nos seios das brânquias, da cloaca e do epitélio do manto, frequentemente associados a uma reação inflamatória intensa. A fim de evitar quaisquer dúvidas, o parasita deve ser observado dentro do hemócito para um diagnóstico positivo. A técnica não é específica para espécies de parasitas.

I.3. Técnicas moleculares

I.3.1. Extração de ADN

O ADN deve ser extraído de acordo com procedimentos padrão.

Pode usar-se os kits de extração de ADN disponíveis comercialmente que produzem habitualmente ADN de elevada qualidade adequado para utilização nos protocolos de PCR descritos abaixo.

I.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram desenvolvidos e estão publicados diversos protocolos para a PCR.

Pode usar-se dois protocolos de PCR que visam a pequena subunidade (SSU) do rADN:

- a) o primeiro é uma PCR convencional que amplifica diversos membros dos *Haplosporidia*, incluindo *Bonamia* spp. Os oligonucleótidos iniciadores designados Bo e Boas são 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' e 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3', respetivamente, e amplificam um produto com 300 pb. As misturas para PCR contêm tampão (KCl 500 mM, Tris/HCl 100 mM [pH 9,0 a 25 °C] e Triton® X-100 1 %), MgCl₂ 2,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, oligonucleótidos iniciadores direto e reverso 1 μM , Taq DNA polimerase 0,02 unidades μl^{-1} e ADN molde 0,2 ng μl^{-1} num volume total de 50 μl . As amostras devem ser desnaturadas num termociclador durante 5 minutos a 94 °C antes de serem submetidas a 30 ciclos (94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto) seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os controlos positivos devem consistir em ADN genómico de um hospedeiro altamente infetado ou ADN plasmídico que inclua a região visada.

Os controlos negativos devem consistir em ADN genómico de hospedeiros não infetados e em reagentes de PCR sem o ADN visado.

Um resultado positivo é uma amplificação de PCR com o tamanho esperado (designadamente 300 pb) com resultado negativo em todos os controlos negativos e resultado positivo em todos os controlos positivos;

- b) o segundo protocolo de PCR é o ensaio de PCR em tempo real SYBR® Green. Permite a detecção específica de *B. ostreae* (descrita *infra*) e pode ser combinado com um ensaio de PCR em tempo real SYBR® Green que permite a detecção específica de *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Os oligonucleótidos iniciadores BOSTRE-F (5'-TTACGTCCTGCCCTTTGTA-3') e BOSTRE-R (5'-TCGCGTTGAATTTTATCGT-3') amplificam um produto de 208 pb. As misturas para PCR contêm SYBR® Green Master Mix (1X), oligonucleótidos iniciadores direto e reverso 0,3 µM, bem como 200 ng de ADN extraído. As amostras devem ser desnaturadas num sistema de detecção em tempo real durante 10 minutos a 95 °C antes de serem submetidas a 35 ciclos (95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 45 segundos e 72 °C durante 1 minuto). A análise da curva de temperaturas de fusão efetua-se com incrementos de 0,5 °C/s começando em 55 °C e terminando em 95 °C e registando a fluorescência em cada mudança de temperatura.

Os controlos positivos devem consistir em ADN genómico de um hospedeiro altamente infetado ou ADN plasmídico que inclua a região visada.

Os controlos negativos devem consistir em ADN genómico de hospedeiros não infetados e em reagentes de PCR sem o ADN visado.

Um resultado positivo consiste numa amplificação de PCR positiva com um único pico na temperatura de fusão ($78,25 \pm 0,25$ °C nas condições publicadas por Ramilo et al. 2013) com resultado negativo em todos os controlos negativos e resultado positivo em todos os controlos positivos.

I.3.3. Hibridização *in situ* (HIS)

Foram desenvolvidos e estão publicados diversos protocolos para a HIS.

Deve usar-se uma sonda que vise a SSU do complexo de genes de rADN, embora se tenha demonstrado que apresenta reação cruzada com alguns outros membros da família *Haplosporidia*.

Deve fixar-se secções de tecidos incluindo brânquias e glândula digestiva em fixador de Davidson por um período mínimo de 24 horas, seguindo-se o processamento normal para a histologia em parafina. Deve cortar-se secções de 5 µm que se colocam em lâminas revestidas com aminoalquilasilano, que são a seguir cozidas em forno a 40 °C durante uma noite. As secções são desparafinadas por imersão em xileno durante 10 minutos. Esta etapa deve ser repetida uma vez e de seguida elimina-se o solvente por imersão em dois banhos sucessivos em etanol absoluto de 10 minutos cada. As secções são a seguir desidratadas por imersão numa série de banhos de etanol graduado. As secções devem ser tratadas com proteinase K ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) em tampão TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37 °C durante 30 minutos. As lâminas são desidratadas por imersão numa série de banhos de etanol graduado e em seguida secas ao ar. As secções devem ser incubadas com 100 µl de tampão de hibridização ($4 \times \text{SSC}$ [citrato de sódio salino], formamida a 50 %, 1 × solução de Denhardt, $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ de tARN de levedura, sulfato de dextrano a 10 %) contendo 20 ng (2 µl dos reagentes para PCR preparados como descrito no ponto I.3.2 utilizando os oligonucleótidos iniciadores Bo e Boas) da sonda marcada com digoxigenina. As secções devem ser cobertas com lamelas de plástico *in situ* e colocadas num bloco de aquecimento a 95 °C durante 5 minutos. As lâminas são de seguida arrefecidas sobre gelo durante 1 minuto antes da hibridização durante toda a noite numa câmara húmida a 42 °C. As secções devem ser lavadas duas vezes durante 5 minutos em $2 \times \text{SSC}$ à temperatura ambiente e uma vez durante 10 minutos em $0,4 \times \text{SSC}$ a 42 °C. As etapas de detecção devem ser realizadas em conformidade com as instruções do fabricante. As lâminas são em seguida enxaguadas com água destilada estéril (dH_2O). As secções devem sofrer contracoloração com Bismarck Brown Yellow, devem ser enxaguadas com dH_2O e deve aplicar-se lamelas usando um meio de montagem aquoso.

Os controlos positivos e negativos devem ser secções de hospedeiros infetados e não infetados, respetivamente.

Um resultado positivo corresponde a parasitas marcados dentro dos hemócitos, com resultado negativo em todos os controlos negativos e resultado positivo em todos os controlos positivos.

I.3.4. Sequenciação

A sequenciação deve realizar-se como uma das etapas finais do diagnóstico de confirmação. As regiões alvo são a SSU do rADN e a ITS1.

II. Procedimentos de vigilância e confirmação da infeção por *Bonamia ostreae*

Para efeitos da vigilância e da confirmação da presença ou para excluir uma suspeita de infeção por *Bonamia ostreae*, em conformidade com os requisitos estabelecidos no anexo I, parte 5, secção II, os métodos de diagnóstico e os procedimentos correspondentes a utilizar devem estar conformes com as diretrizes estabelecidas no seguinte quadro 5.1.

Quadro 5.1

Diretrizes para a utilização dos métodos de diagnóstico para os programas de vigilância e para excluir ou confirmar a infeção por *Bonamia ostreae*

Método	Vigilância orientada	Diagnóstico de presunção	Diagnóstico de confirmação
Impressões do coração ou das brânquias	X	X	X, ou
Histopatologia	X		X, ou
Hibridização <i>in situ</i>			X, e
PCR	X	X	X, e
Sequenciação			X

PARTE 6

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS DETALHADOS PARA A VIGILÂNCIA E A CONFIRMAÇÃO DA DOENÇA DA MANCHA BRANCA (DMB)**1. Procedimentos de diagnóstico para a deteção do VSMB**

Ao efetuar a amostragem e os exames laboratoriais para efeitos dos programas de vigilância e erradicação estabelecidos no anexo I, parte 6, secção I, assim como para a confirmação da presença ou a exclusão da suspeita de infeção com o VSMB em conformidade com o artigo 57.º, alínea b), da Diretiva 2006/88/CE, recorrendo aos métodos de diagnóstico estabelecidos no anexo I, parte 6, secção II, deve aplicar-se os métodos de diagnóstico e procedimentos detalhados constantes dos seguintes pontos 2 a 7.

Os métodos e procedimentos descritos na presente parte foram adaptados do teste acreditado através da norma ISO 17025 aplicado pelo Laboratório de Referência da União Europeia para as doenças dos crustáceos. Pode aplicar-se abordagens alternativas, usando condições equivalentes ou kits produzidos por fabricantes diferentes, mas que proporcionem uma sensibilidade e especificidade equivalentes às dos testes descritos na presente parte. Em qualquer caso, o produto amplificado da PCR deve ser sequenciado para confirmar a sua identidade como vírus da síndrome da mancha branca (VSMB).

2. Procedimento de amostragem

Os tecidos (pleópodes e brânquias) contendo VSMB de crustáceos podem ser armazenados em etanol, reagente de estabilização de ARN (*RNAlater*) ou congelados a – 80 °C. As fases necessárias para a identificação do VSMB de amostras de tecidos são as seguintes: homogeneização do tecido, extração do ADN, amplificação específica do ADN do VSMB por PCR, visualização do produto amplificado em gel, purificação do ADN e sequenciação para confirmar a identidade do patógeno.

3. Homogeneização do tecido

A disrupção dos tecidos e a preparação de um homogenato num tampão adequado deve efetuar-se recorrendo a um disruptor de tecidos Fast Prep e a tubos Lysing Matrix A (MP Biomedicals). O tecido deve ser pesado, colocado em tubos Lysing Matrix A, diluídos 1:10 p/v ou de acordo com as instruções do fabricante num tampão adequado (G2 e 10 µl de proteinase K para utilização com o kit de extração de ADN de tecidos (Qiagen)) e homogeneizado com o homogeneizador Fast Prep 24 durante 2 minutos. As amostras homogeneizadas devem ser incubadas a 56 °C por um período mínimo de quatro horas ou durante a noite. As amostras devem ser agitadas em vórtex, centrifugadas a 9 000 rpm durante 2 minutos e deve retirar-se 50 µl de sobrenadante ou um volume equivalente a 5 mg de tecido (peso ótimo para o kit de extração) que se adicionam a um tubo de amostra para a extração de ADN, perfazendo o volume a 200 µl com tampão G2.

4. Extração de ADN

O ADN total deve ser extraído por recurso a um *kit* de extração de ADN de tecidos e ao Biorobot EZ1 Advanced XL (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Com cada lote de amostras deve analisar-se um controlo de extração (ADN de timo de vitelo) e um controlo negativo (tampão G2). O ADN deve ser eluído num volume de 50 µl. Para garantir que a extração se completou com êxito, deve determinar-se a concentração de todas as amostras e controlos com recurso a um aparelho Nano Drop. Se não for necessário imediatamente, o ADN extraído deve ser congelado a – 20 °C.

5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) do VSMB

O método a usar na deteção do VSMB é o protocolo para a deteção do VSMB por PCR com iniciadores internos estabelecido nos parágrafos seguintes que amplifica amplicões com 1 447 pb e 848 pb do gene 18s do rARN na primeira e segunda ronda de PCR respetivamente.

A primeira ronda da reação de PCR deve ser efetuada com um volume de 50 µl com concentrações finais de 1 × tampão GoTaq (Promega), MgCl₂ 5mM, iniciador VSMB 146 F1 1pmol/µl, iniciador VSMB 146 R1 1pmol/µl (quadro 1), dNTPs 0,25mM, 1,25 U de Taq polimerase e 2,5 µl de ADN. Cada amostra deve ser analisada em duplicado a par com um controlo de extração negativo, um controlo de PCR negativo (adição de 2,5 µl de H₂O em vez do ADN) e um controlo positivo. O controlo positivo deve consistir em plasmídeo de VSMB diluído e validado para uso interno (disponível junto do LRUE).

A segunda ronda de reação de PCR para o VSMB deve ser efetuada da mesma forma que a primeira ronda mas usando o conjunto de oligonucleótidos iniciadores VSMB 146 F2/R2 e um segundo controlo positivo, a fim de verificar que esta fase da PCR funcionou.

Oligonucleótido iniciador	Sequência
VSMB 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
VSMB 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
VSMB 146 F2	GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA
VSMB 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Tanto a primeira como a segunda ronda de PCR devem efetuar-se com as seguintes condições dos ciclos num termociclador Peltier DNA Engine Tetrad 2 (ou equivalente). Uma fase inicial de desnaturação de 94 °C durante 2 minutos, seguida de 94 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos repetido durante 30 ciclos, uma fase de extensão a 72 °C durante 2 minutos e mantido a 4 °C.

6. Eletroforese em gel

Os produtos amplificados da PCR da primeira e segunda rondas de PCR devem ser visualizados em gel de agarose a 2 % preparados com tampão TAE. Analisam-se 15 µl de cada amostra a 120 Volts durante cerca de 20 minutos, observando sob luz UV. As amostras positivas produzem uma banda de 1 447 pb na primeira ronda da PCR e 848 pb na segunda ronda. As amostras dessa dimensão devem ser cortadas e colocadas num tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. O ADN contido nas fatias de gel deve ser purificado com o *kit* Wizard® SV Gel e PCR clean-Up System da Promega, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do ADN deve ser estimada com um aparelho Nano Drop. Se não for usado imediatamente, o ADN purificado deve ser congelado a – 20 °C.

7. Sequenciação de produtos da PCR

Deve proceder-se à sequenciação do ADN com o *kit* Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). O volume total de cada reação é de 20 µl, sendo as concentrações finais de 1 × Big Dye Terminator, 1 × tampão de sequenciação, 10 pmol/µl de oligonucleótido iniciador direto ou reverso e 10 µl de ADN purificado (diluído para aproximadamente 10 ng/µl) e analisa-se com as seguintes condições dos ciclos num termociclador Peltier DNA Engine Tetrad 2 (ou equivalente): 94 °C durante 30 segundos, seguido de 96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 10 segundos e 60 °C durante 4 minutos, repetindo-se estas últimas três etapas por 30 ciclos.

Os produtos da PCR devem ser precipitados recorrendo ao método do acetato de sódio em que se adicionam 20 µl de ADN a 10 µl de NaAc, 70 µl de H₂O e 250 µl de etanol, agita-se em vórtex e centrifuga-se a 13 000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante é removido e o sedimento é lavado com 200 µl de etanol absoluto e centrifugado a 13 000 rpm durante 5 minutos. O sedimento é seco a 37 °C durante 5 minutos. Adicionam-se ao sedimento 25 µl de formamida Hi-Di, aquece-se a 95 °C durante 2 minutos e agita-se vigorosamente em vórtex. As amostras devem ser sequenciadas com o analisador ABI3130xl Avant Genetic de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados da sequenciação devem ser analisados com o software Sequencher e as sequências devem ser comparadas com sequências da base de dados NCBI usando a função BLAST.
