



Vsebina

II *Nezakonodajni akti*

SKLEPI

- ★ **Izvedbeni sklep Komisije (EU) 2015/1554 z dne 11. septembra 2015 o določitvi pravil za uporabo Direktive 2006/88/ES v zvezi z zahtevami za metode nadzora in diagnostične metode (notificirano pod dokumentarno številko C(2015) 6188)⁽¹⁾** 1

⁽¹⁾ Besedilo velja za EGP

II

(Nezakonodajni akti)

SKLEPI

IZVEDBENI SKLEP KOMISIJE (EU) 2015/1554

z dne 11. septembra 2015

o določitvi pravil za uporabo Direktive 2006/88/ES v zvezi z zahtevami za metode nadzora in diagnostične metode

(notificirano pod dokumentarno številko C(2015) 6188)

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Direktive Sveta 2006/88/ES z dne 24. oktobra 2006 o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz ribogojstva ter o preprečevanju in nadzoru nekaterih boleznih pri vodnih živalih⁽¹⁾ ter zlasti člena 49(3), člena 50(4), člena 57(b) in člena 61(3) Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Direktiva 2006/88/ES določa najmanjše preventivne ukrepe za nadzor in zgodnje odkrivanje boleznih s seznama iz Priloge IV k navedeni direktivi pri vodnih živalih (v nadaljnjem besedilu: bolezni s seznama) in ukrepe za nadzor, ki se uporabljajo v primeru suma ali izbruha boleznih s seznama. Prav tako določa zahteve za doseganje statusa brez boleznih v državah članicah ali njihovih območjih ali kompartmentih.
- (2) Izkoreninjenje boleznih s seznama in doseganje statusa brez boleznih v državi članici, na območju ali v kompartmentu bi moralo temeljiti na enakih načelih in slediti enakemu znanstvenemu pristopu po vsej Uniji. Zato je treba na ravni Unije določiti posebne zahteve za programe izkoreninjenja in nadzora ter metode vzorčenja in diagnostične metode, ki jih države članice uporabljajo za pridobitev statusa brez boleznih za celotno državo članico ali njeno območje ali kompartment.
- (3) Laboratorijske preiskave, ki se opravijo v primeru suma ali potrditve prisotnosti boleznih s seznama, bi morale biti enake na ravni Unije ter slediti enakim znanstvenim standardom in protokolom. V skladu z Direktivo 2006/88/ES bi bilo treba vzpostaviti posebne diagnostične metode in postopke, ki se uporabljajo v laboratorijih, ki jih za navedeni namen določi pristojni organ države članice.
- (4) Kodeks zdravstvenega varstva vodnih živali, ki ga je sprejela Svetovna organizacija za zdravje živali (OIE) (v nadaljnjem besedilu: Kodeks za vodne živali) določa standarde za izboljšanje zdravja vodnih živali in dobrobiti gojenih rib po vsem svetu, vključno s standardi za varno mednarodno trgovino z vodnimi živalmi in proizvodi iz njih. Številna poglavja Kodeksa za vodne živali določajo priporočila v zvezi z uporabo nekaterih diagnostičnih testov. Takšni testi, ki jih je določila OIE, so opredeljeni v Priročniku OIE diagnostičnih testov za vodne živali (v nadaljnjem besedilu: Priročnik za vodne živali). Za zagotovitev, da so zahteve Unije v zvezi z diagnostiko boleznih vodnih živali v skladu z mednarodnimi standardi, bi morala pravila iz tega sklepa upoštevati standarde in priporočila Kodeksa za vodne živali.

⁽¹⁾ UL L 328, 24.11.2006, str. 14.

- (5) V zvezi s tem je za številne bolezni s seznama v Priročniku za vodne živali navedenih več testov in postopkov, ki se uporabljajo za namene laboratorijskih preiskav. Za poenotenje znanstvene podlage za diagnosticiranje bolezni s seznama na ravni Unije je treba izbrati med diagnostičnimi testi in postopki, ki jih priporoča OIE, in določiti, kateri testi bi morali biti obvezni za namene laboratorijskih preiskav, ko se izvajajo programi nadzora, ter za izključitev suma na bolezen s seznama ali potrditev prisotnosti bolezni s seznama. Medtem ko bodo v nekaterih primerih morali biti na voljo tudi alternativne metode in postopki, bi bilo treba zagotoviti opise in nekatera znanstvena pojasnila, kdaj in kako bi bilo mogoče uporabiti alternativne metode. To je zlasti potrebno za podrobnejše diagnostične postopke.
- (6) Za natančne in ponovljive diagnostične rezultate je pomembno, da se uporabljeni podrobni postopki in protokoli potrdijo v skladu z zadevnimi standardi kakovosti iz dela I Priloge VI k Direktivi 2006/88/ES. Za številne diagnostične metode iz tega sklepa je uporaba komercialnih kompletov za testiranje nujen del diagnostičnih protokolov, navedene komplete za testiranje pa so z akreditiranimi testi za zadevne bolezni potrdili referenčni laboratoriji Evropske unije (v nadaljnjem besedilu: EURL). Zaradi pravne varnosti bi bilo treba v tem sklepu navesti sklice na komercialna imena navedenih potrjenih komercialnih kompletov za testiranje.
- (7) Nekatero državo članico bodo morda težko dosegle status brez bolezni za celotno državo članico ali njeno območje ali kompartment v zvezi z eno ali več bolezni s seznama. V takih primerih država članica morda ne želi pridobiti ali ponovno pridobiti statusa brez bolezni za navedene bolezni s seznama. Minimalni ukrepi obvladovanja, ki se uporabijo v primerih, v katerih zadevna država članica ne želi pridobiti ali ponovno pridobiti statusa brez bolezni, bi morali biti enaki na ravni Unije in slediti enakim merilom. Zato je treba v skladu z Direktivo 2006/88/ES določiti podrobna pravila za zadrževanje navedenih bolezni s seznama ter minimalne zahteve za odpravo navedenih ukrepov za zadrževanje.
- (8) Odločba Komisije 2001/183/ES ⁽¹⁾ določa zahteve za načrte vzorčenja in diagnostične metode za odkrivanje in potrjevanje bolezni s seznama, in sicer za infekciозno hematopoetsko nekrozo in virusno hemoragično septikemijo. Odločba Komisije 2003/466/ES ⁽²⁾ določa zahteve za načrte vzorčenja in diagnostične metode za odkrivanje infekciозne anemije lososa ter merila za določanje območij in ukrepov uradnega nadzora potem, ko se pojavi sum na prisotnost navedene bolezni ali potrdi prisotnost navedene bolezni. Odločba Komisije 2002/878/ES ⁽³⁾ določa zahteve za načrte vzorčenja in diagnostične metode za odkrivanje in potrjevanje bolezni mehkužcev, in sicer bonamioze in martelioze. Zaradi posodobitve zahtev bi bilo treba navedene odločbe nadomestiti s tem sklepom. Zato bi bilo treba Odločbo 2001/183/ES, Odločbo 2002/878/ES in Odločbo 2003/466/ES razveljaviti.
- (9) Ker nekatere države članice potrebujejo čas za posodobitev nacionalnih referenčnih laboratorijev, tako da bodo izpolnjevali zahteve iz tega sklepa, bi bilo treba ta sklep začeti uporabljati od 1. aprila 2016.
- (10) Ukrepi iz tega sklepa so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za rastline, živali, hrano in krmo –

SPREJELA NASLEDNJI SKLEP:

Člen 1

Predmet urejanja

Ta sklep določa pravila o:

- (a) nadzoru, varovalnih pasovih, vzorčenju in diagnostičnih metodah, ki jih države članice uporabljajo v povezavi s statusom bolezni v državi članici ali njenem območju ali kompartmentu za neeksotične bolezni vodnih živali s seznama v delu II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES (v nadaljnjem besedilu: bolezni s seznama);

⁽¹⁾ Odločba Komisije 2001/183/ES z dne 22. februarja 2001 o določitvi načrtov vzorčenja in diagnostičnih metod za odkrivanje in potrjevanje nekaterih bolezni rib in razveljavitvi Odločbe 92/532/EGS (UL L 67, 9.3.2001, str. 65).

⁽²⁾ Odločba Komisije 2003/466/ES z dne 13. junija 2003 o merilih za določanje območij in ukrepov uradnega nadzora potem, ko se pojavi sum ali potrdi prisotnost infekciозne anemije lososa (ISA) (UL L 156, 25.6.2003, str. 61).

⁽³⁾ Odločba komisije 2002/878/ES z dne 6. novembra 2002 o pripravi načrtov vzorčenja in diagnostičnih metod za odkrivanje in potrjevanje prisotnosti bolezni mehkužcev bonamioze (*Bonamia ostreae*) in martelioze (*Marteilia refrigens*) (UL L 305, 7.11.2002, str. 57).

- (b) diagnostičnih metodah, ki se uporabljajo za laboratorijske preiskave v primeru suma na prisotnost navedene bolezni s seznama ali potrditve prisotnosti bolezni s seznama, ter
- (c) minimalnih ukrepov obvladovanja, ki se uporabljajo v primeru suma ali potrditve bolezni s seznama v državi članici, na območju ali v kompartmentu, ki niso razglašeni za proste navedene bolezni s seznama.

Člen 2

Opredelitev pojmov

V tem sklepu se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:

- (a) „virusna hemoragična septikemija“ (v nadaljnjem besedilu: VHS) pomeni bolezen, ki jo povzroča virus virusne hemoragične septikemije (v nadaljnjem besedilu: VHSV), znan tudi kot virus Egtved, ki spada v rod *Novirhabdovirus* iz družine *Rhabdoviridae*;
- (b) „infekciозна hematopoetska nekroza“ (v nadaljnjem besedilu: IHN) pomeni bolezen, ki jo povzroča virus infekciözne hematopoetske nekroze (v nadaljnjem besedilu: IHNV), ki spada v rod *Novirhabdovirus* iz družine *Rhabdoviridae*;
- (c) „koi herpes viroza“ (v nadaljnjem besedilu: KHVD) pomeni bolezen, ki jo povzroča koi herpes virus (v nadaljnjem besedilu: KHV), ki spada v družino *Alloherpesviridae*. Znanstveno ime je ciprinid herpesvirus 3 (CyHV-3);
- (d) „infekciозна anemija lososov“ (v nadaljnjem besedilu: ISA) pomeni bolezen, ki jo povzroča okužba z virusom anemije lososov (v nadaljnjem besedilu: ISAV) z delecijo zelo polimorfne regije (HPR), ki spada v rod *Isavirus* iz družine *Orthomyxoviridae*;
- (e) „okužba z *Marteilia refringens*“ pomeni bolezen, ki jo povzroča okužba s parazitsko praživaljo *Marteilia refringens*;
- (f) „okužba z *Bonamia ostreae*“ pomeni bolezen, ki jo povzroča okužba s parazitsko praživaljo *Bonamia ostreae*;
- (g) „bolezen belih pik“ (v nadaljnjem besedilu: WSD) pomeni bolezen, ki jo povzroča virus sindroma belih pik (v nadaljnjem besedilu: WSSV), ki je virus z dvoverižno DNK in spada v rod *Whispovirus* iz družine *Nimaviridae*.

Člen 3

Minimalne zahteve za programe izkoreninjenja in nadzora

Države članice zagotovijo, da so izpolnjena pravila glede programov nadzora in izkoreninjenja, varovalnih pasov, metod vzorčenja in diagnostičnih metod iz Priloge I ter posebnih metod in podrobnih postopkov iz Priloge II v primeru potrditve, umika ali ponovne vzpostavitve statusa brez bolezni v državi članici ali na njenem območju ali v kompartmentu za eno ali več bolezni s seznama.

Člen 4

Minimalne zahteve za diagnostične metode in posebne postopke

Države članice zagotovijo, da se laboratorijske preiskave izvajajo v skladu z metodami obvladovanja iz Priloge I ter posebnimi diagnostičnimi metodami in podrobnimi postopki iz Priloge II, da se potrdi ali izključi prisotnost bolezni s seznama.

Člen 5

Minimalni ukrepi obvladovanja za zadrževanje bolezni s seznama in minimalne zahteve za odpravo ukrepov za zadrževanje v državah članicah, na območjih ali v kompartmentih, ki niso razglašeni za proste bolezni s seznama

Države članice zagotovijo, da se ukrepi obvladovanja in odprava ukrepov za zadrževanje za eno ali več bolezni s seznama v državi članici ali na njenem območju ali v kompartmentu, ki niso razglašeni za proste bolezni s seznama, izvajajo v skladu z minimalnimi ukrepi obvladovanja in minimalnimi zahtevami za odpravo ukrepov za zadrževanje iz Priloge I.

Člen 6**Razveljavitve**

Odločbe 2001/183/ES, 2002/878/ES in 2003/466/ES se razveljavijo.

Člen 7**Datum uporabe**

Ta sklep se uporablja od 1. aprila 2016.

Člen 8**Naslovniki**

Ta sklep je naslovljen na države članice.

V Bruslju, 11. septembra 2015

Za Komisijo
Vytenis ANDRIUKAITIS
Član Komisije

PRILOGA I

NADZORNE IN KONTROLNE METODE

I. Uvod

Ta priloga določa:

- (a) zahteve za programe nadzora in izkoreninjenja, kot je določeno v členu 44 Direktive 2006/88/ES, ter metode vzorčenja in diagnostične metode, ki se uporabljajo za razglasitev statusa brez bolezni za države članice ali njena območja ali kompartmente, kot je določeno v poglavju VII navedene direktive;
- (b) metode vzorčenja in diagnostične metode, ki se uporabljajo za laboratorijske preiskave v primeru suma in za potrditev prisotnosti neeksotičnih bolezni s seznama v delu II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES (v nadaljnjem besedilu: bolezni s seznama), kot je določeno v členih 28(a) in 57(b) navedene direktive;
- (c) ukrepe obvladovanja, ki jih je treba sprejeti v primeru potrditve prisotnosti bolezni s seznama, kot je določeno v členu 39 Direktive 2006/88/ES, in ukrepe, ki jih je treba sprejeti za pridobitev zdravstvenega statusa kategorije III v državi članici, na območju ali v kompartmentu z zdravstvenim statusom kategorije V.

Zahteve, določene v tej prilogi, zajemajo naslednje bolezni s seznama:

1.	Virusna hemoragična septikemija (VHS)	del 1
2.	Infekciозна hematopoetska nekroza (IHN)	del 1
3.	Koi herpes virusa (KHVD)	del 2
4.	Infekciозна anemija lososov (ISA)	del 3
5.	Okužba z <i>Marteilia refringens</i>	del 4
6.	Okužba z <i>Bonamia ostreae</i>	del 5
7.	Bolezen belih pik (WSD)	del 6

II. Opredelitev pojmov

Za namene priloge I in II se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:

- (a) „celinski kompartment“ pomeni eno ali več gojilnic na celinskem delu ene ali več držav članic, ki imajo skupni sistem biološke zaščite in zajemajo populacijo vodnih živali s posebnim zdravstvenim statusom glede določene bolezni;
- (b) „celinska gojilnica“ pomeni gojilnico, kjer se gojijo živali iz akvakulture, na celinskem delu ozemlja ene države članice;
- (c) „celinsko območje“ pomeni točno določeno geografsko območje na celinskem delu ene ali več držav članic s homogenim hidrološkim sistemom, ki zajema dele povodja od izvirov do naravne ali umetne pregrade, ki preprečuje selitev vodnih živali iz spodnjih delov povodja navzgor, celotno povodje od izvirov do izliva ali več povodij, vključno z vsemi izlivi, zaradi epidemiološke povezave med povodji prek izliva;

- (d) „gojilnica, uradno razglašena za okuženo“ pomeni gojilnico, kjer se gojijo vodne živali in v kateri je pristojni organ v skladu s členom 28(a), členom 29 in členom 57(b) Direktive 2006/88/ES potrdil eno ali več bolezni s seznama.
- (e) „kontaktna gojilnica“ pomeni gojilnico, kjer se gojijo vodne živali ter za katere je na kakršen koli način dokazano ali obstaja močan sum, da so bile kontaminirane z nalezljivimi organi in tkivi iz gojilnice, uradno razglašene za okuženo.

DEL 1

NADZORNE IN KONTROLNE METODE ZA VIRUSNO HEMORAGIČNO SEPTIKEMIJO (VHS) IN INFEKCIOSNO HEMATOPOETSKO NEKROZO (IHN)

- I. **Zahteve za programe nadzora in izkoreninjenja za pridobitev in ohranitev statusa brez bolezni glede VHS in IHN ter ukrepi obvladovanja za navedeni bolezni s seznama**
- I.1 Splošne zahteve za zdravstvene preglede in vzorčenje za VHS in IHN:
- (a) zdravstveni pregledi in, kadar je ustrezno, vzorčenje se opravijo v obdobju leta, ko je temperatura vode pod 14 °C ali kadar koli je verjetno, da bo voda dosegla najnižjo letno temperaturo;
- (b) ko se v skladu z drugim odstavkom točke 2 dela I Priloge V k Direktivi 2006/88/ES zahteva ciljno usmerjen nadzor pri divjih populacijah, se določita število in geografska porazdelitev mest vzorčenja, tako da so države članice, območja ali kompartmenti ustrezno zajeti. Mesta vzorčenja so reprezentativna za različne ekosisteme z divjimi populacijami dovzetnih vrst;
- (c) ko se zdravstveni pregledi ali vzorčenja v gojilnicah ali pri divjih populacijah opravljajo več kot enkrat na leto, so časovni presledki med zdravstvenimi pregledi ali zbiranjem vzorcev vsaj štiri mesece oz. čim daljši, pri čemer se upoštevajo zahteve glede temperatur iz točke (a);
- (d) v vseh proizvodnih enotah, kot so ribniki, bazeni in mrežaste kletke, se opravijo zdravstveni pregledi, da se odkrijejo poginule ali oslabele ribe ali ribe z neobičajnim vedenjem. Zlasti se pregledajo vodni odtoki, kjer se zaradi vodnega toka zbirajo oslabele ribe;
- (e) ribe dovzetnih vrst, ki se zberejo za vzorce, se izberejo na naslednji način:
- (i) če so med njimi šarenke, se za vzorčenje izberejo samo ribe navedene vrste, razen kadar so med njimi druge dovzetne vrste, ki kažejo tipične znake VHS ali IHN; če med njimi ni šarenk, mora biti vzorec reprezentativen za vse druge prisotne dovzetne vrste;
- (ii) če so med njimi oslabele ribe ali ribe z neobičajnim vedenjem ali pred kratkim poginule, toda še ne razkrojene ribe, se izberejo takšne ribe; če se za gojenje rib uporablja več kot en vodni vir, se v vzorec vključijo ribe iz vseh vodnih virov;
- (iii) izbrane ribe vključujejo ribe, zbrane tako, da so v vzorcu sorazmerno zastopani vsi deli gojilnice in tudi vsi letniki.
- I.2 Posebne zahteve za pridobitev zdravstvenega statusa brez bolezni (kategorija I) glede VHS in IHN
- I.2.1 Programi nadzora:
- (a) država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije III, kot je določeno v delu B Priloge III k Direktivi 2006/88/ES, glede VHS ali IHN ali obeh bolezni lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedenih bolezni s seznama, če vse gojilnice, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k navedeni direktivi, v navedeni državi članici, na območju ali v kompartmentu izpolnjujejo zahteve iz Priloge V k navedeni direktivi ter če je bil v vseh navedenih gojilnicah in, ko to zahteva drugi odstavek točke 2 dela I Priloge V k Direktivi, na mestih vzorčenja pri divjih populacijah, izbranih v skladu z navedenim delom, izveden eden od naslednjih programov nadzora:

(i) model A – dvoletni program nadzora:

v gojilnicah ali na mestih vzorčenja je bilo treba opraviti zdravstvene preglede in vzorčenja za minimalno obdobje dveh zaporednih let, kot je določeno v tabeli 1.A iz oddelka II.

V navedenem dvoletnem obdobju morajo biti rezultati testiranj vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za VHS ali IHN ali obe bolezni, prav tako pa mora biti izključen vsak sum na VHS ali IHN ali obe bolezni v skladu z metodami vzorčenja in diagnostičnimi metodami iz točke II.3;

(ii) model B – štiriletni program nadzora z manjšim vzorcem:

v gojilnicah ali na mestih vzorčenja je bilo treba opraviti zdravstvene preglede in vzorčenja za minimalno obdobje štirih zaporednih let, kot je določeno v tabeli 1.B iz oddelka II.

V navedenem štiriletnem obdobju morajo biti rezultati testiranj vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za VHS ali IHN ali obe bolezni, prav tako pa mora biti izključen vsak sum na VHS ali IHN ali obe bolezni v skladu z metodami vzorčenja in diagnostičnimi metodami iz točke II.3;

(b) če se med izvajanjem programa nadzora iz točke (a) potrdi okužba z VHS ali IHN ali obema boleznima v gojilnici, vključeni v navedeni program nadzora, in je bil zato preklican njen zdravstveni status kategorije II, lahko navedena gojilnica takoj ponovno pridobi zdravstveni status kategorije II in nadaljuje z izvajanjem programa nadzora za pridobitev statusa brez bolezni, ne da bi ji bilo treba izvesti program izkoreninjenja, kot je določen v točki I.2.2, če izpolnjuje naslednje pogoje:

(i) gre za celinsko gojilnico, katere zdravstveni status glede VHS ali IHN ali obeh bolezni je neodvisen od zdravstvenega statusa populacij vodnih živali v okoliških naravnih vodah glede navedenih bolezni s seznama v skladu s točko 3 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES;

(ii) je izpraznjena, očiščena in razkužena, njena proizvodnja pa je prekinjena; prekinitev proizvodnje traja vsaj šest tednov;

(iii) njen stalež je bil obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede VHS ali IHN ali obeh bolezni.

I.2.2 Programi izkoreninjenja

I.2.2.1 Splošne zahteve

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede VHS ali IHN ali obeh bolezni lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedenih bolezni s seznama, če je bil v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden program izkoreninjenja, ki je v skladu s točkami od (a) do (e):

(a) minimalni kontrolni ukrepi iz oddelka 4 poglavja V Direktive 2006/88/ES morajo biti učinkovito izvedeni, v bližini gojilnic, uradno razglašeni za okužene z VHS ali IHN ali obema navedenima boleznima s seznama, pa mora biti vzpostavljeno območje z omejitvami, kot je določeno v členu 32(b) navedene direktive ter ki zajema okuženo in ogroženo območje.

Območje z omejitvami mora biti opredeljeno na podlagi vsakega primera posebej ob upoštevanju dejavnikov, ki vplivajo na tveganja za širjenje bolezni s seznama na gojene in divje ribe, kot so število, stopnja in porazdelitev smrtnosti rib v gojilnici, okuženi z VHS ali IHN ali obema boleznima; oddaljenost od sosednjih gojilnic in gostota sosednjih gojilnic; bližina klavnic; kontaktne gojilnice; vrste rib v gojilnicah; načini gojenja, ki se uporabljajo v prizadetih gojilnicah in sosednjih gojilnicah; hidrodinamične razmere in drugi ugotovljeni dejavniki epidemiološkega pomena.

Pri vzpostavitvi okuženih in ogroženih območij se uporabljajo naslednje minimalne zahteve glede geografske razmejitve navedenih območij:

- (i) okuženo območje se vzpostavi v neposredni bližini gojilnice, uradno razglašene za okuženo z VHS ali IHN ali obema navedenima boleznima s seznama, ter:
 - 1. na obalnih območjih: ustreza območju v krogu s polmerom, ki obsega vsaj območje plimovanja ali vsaj 5 km, katero koli je večje, s središčem v gojilnici, uradno razglašeni za okuženo z VHS ali IHN ali obema boleznima, ali enakovrednemu območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki;
 - 2. na območju celine: ustreza celotnemu povodju gojilnice, uradno razglašene za okuženo z VHS ali IHN ali obema boleznima; pristojni organ lahko obseg območja omeji na dele povodja ali območje gojilnice, če to ne ogroža preprečevanja širjenja VHS ali IHN ali obeh bolezni;
- (ii) ogroženo območje, ki ga vzpostavi pristojni organ zunaj okuženega območja:
 - 1. na obalnih območjih: ustreza območju prekrivajočih se območij plimovanja in obdaja okuženo območje; ali območju, ki obdaja okuženo območje in se nahaja znotraj kroga s polmerom 10 km od središča okuženega območja; ali enakovrednemu območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki;
 - 2. na območju celine: je kot razširjeno območje zunaj vzpostavljenega okuženega območja;
- (b) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES ter ki so na okuženem območju in niso uradno razglašene za okužene z VHS ali IHN ali obema boleznima, se opravi uradna preiskava, ki zajema vsaj naslednje elemente:
 - (i) zbiranje vzorcev za testiranje 10 rib, ko so opaženi klinični znaki ali *post mortem* znaki, ki ustrezajo znakov okužbe z VHS ali IHN ali obema boleznima, ali vsaj 30 rib, ko klinični znaki ali *post mortem* znaki niso opaženi;
 - (ii) zdravstveni pregled: v tistih gojilnicah, kjer so rezultati testov iz točke (i) negativni; v obdobju, ko je temperatura vode pod 14 °C, se zdravstveni pregledi še naprej izvajajo enkrat na mesec, razen ko so ribniki ali mrežaste kletke prekrite z ledom, dokler se okuženo območje ne prekliče v skladu s točko I.2.2.1(c);
- (c) vse gojilnice, uradno razglašene za okužene z VHS ali IHN ali obema boleznima, se izpraznijo, očistijo in razkužijo, njihova proizvodnja pa se prekine. Prekinitev proizvodnje traja vsaj šest tednov. Ko se izpraznijo vse gojilnice, uradno razglašene za okužene znotraj istega okuženega območja, se njihova proizvodnja za vsaj tri tedne sinhronizirano prekine. Ta odstavek se uporablja tudi za nove gojilnice, uradno razglašene za okužene v času izvajanja programa izkoreninjenja.

Med prekinitvijo proizvodnje gojilnic, uradno razglašeni za okužene, se okužena območja spremenijo v ogrožena območja.

Pristojni organ se lahko odloči zahtevati praznjenje, čiščenje, razkuževanje in prekinitev proizvodnje drugih gojilnic znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij. Trajanje prekinitve proizvodnje za navedene gojilnice določi pristojni organ na podlagi ocene tveganja za vsak primer posebej;
- (d) stalež vseh gojilnic, uradno razglašeni za okužene z VHS ali IHN ali obema navedenima boleznima s seznama, in vseh drugih gojilnic s prekinjeno proizvodnjo znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij, kot je navedeno v točki (c), se obnovi z ribami, ki izvirajo iz države članice, območja ali kompartimenta z zdravstvenim statusom brez bolezni (kategorija I) glede VHS ali IHN ali obeh bolezni.

Stalež se obnovi šele, ko so bile vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je bila njihova proizvodnja prekinjena v skladu s točko I.2.2.1(c);

- (e) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu, vključenem oz. vključenem v program izkoreninjenja, in, ko se zahteva nadzor pri divjih populacijah, na mestih vzorčenja, izbranih v skladu s točko I.1, se naknadno izvede sistem nadzora, določeni v točki I.2.1.

I.2.2.2 Zahteve za ponovno pridobitev statusa brez bolezni za celinske kompartmente, ki zajemajo eno samo gojilnico, predhodno razglašeno za prosto IHN ali VHS ali obeh bolezni

Celinski kompartment, ki zajema eno samo gojilnico, predhodno razglašeno za prosto VHS ali IHN ali obeh navedenih bolezni s seznama, katere zdravstveni status glede navedenih bolezni s seznama je neodvisen od okoliških naravnih voda v skladu s točko 3 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES in katere zdravstveni status kategorije I je bil preklican v skladu s členom 53(3) navedene direktive, lahko ponovno pridobi zdravstveni status kategorije I, takoj ko pristojni organ potrdi, da so izpolnjeni naslednji pogoji:

- (a) gojilnica, uradno razglašena za okuženo z VHS ali IHN ali obema boleznima, mora biti izpraznjena, očiščena in razkužena, njena proizvodnja pa mora biti prekinjena; prekinitev proizvodnje mora trajati vsaj šest tednov;
- (b) stalež gojilnice, uradno razglašene za okuženo z VHS ali IHN ali obema boleznima, je bil obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede VHS ali IHN ali obeh bolezni.

I.3 Posebne zahteve za ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezni (kategorija I) glede VHS ali IHN ali obeh bolezni

Ko se zahteva ciljno usmerjen nadzor za ohranitev zdravstvenega statusa kategorije I, kot je določeno v členu 52 Direktive 2006/88/ES, se v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k navedeni direktivi, v zadevni državi članici, na zadevnem območju ali v zadevnem kompartmentu izvedejo zdravstveni pregledi, ribe pa se vzorčijo v skladu s tabelo 1.C iz oddelka II tega dela, ob upoštevanju stopnje tveganja vnosa VHS ali IHN ali obeh navedenih bolezni s seznama v gojilnici.

Pri določanju pogostnosti zdravstvenih pregledov za kompartmente z zdravstvenim statusom kategorije I glede VHS ali IHN ali obeh bolezni, ki se nahajajo na celinskih območjih in katerih zdravstveni status glede VHS ali IHN je odvisen od zdravstvenega statusa populacij vodnih živali v okoliških naravnih vodah v skladu s točko 2 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES, se raven tveganja vnosa VHS ali IHN ali obeh bolezni šteje za visoko.

Status brez bolezni se ohrani le, dokler so rezultati testiranja vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za VHS ali IHN ali obe navedeni bolezni s seznama in je izključen vsak sum na VHS ali IHN ali obe bolezni v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3.

I.4 Zahteve za odpravo ukrepov obvladovanja iz člena 39 Direktive 2006/88/ES, in sicer za spremembo zdravstvenega statusa iz kategorije V v kategorijo III

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede VHS ali IHN ali obeh bolezni lahko doseže zdravstveni status kategorije III glede navedenih bolezni s seznama, če:

- (a) so izpolnjene zahteve iz točk I.2.2.1(a), (b) in (c). Če prekinitev proizvodnje ni tehnično izvedljiva, se v zadevnih gojilnicah izvedejo alternativni ukrepi, ki na enak način zagotavljajo izkoreninjenje IHN ali VHS ali obeh virusov iz okolja gojilnice;
- (b) je bil stalež vseh gojilnic, uradno razglašenih za okužene, in vseh drugih gojilnic, katerih proizvodnja je bila prekinjena/kjer so bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a), na vzpostavljenih okuženih in ogroženih območjih obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I, II ali III glede VHS ali IHN ali obeh bolezni;

- (c) je bil stalež obnovljen šele, ko so bile vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja bila prekinjena/so v njih bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a).

II. Diagnostične metode in metode vzorčenja

II.1 Organi, ki se vzorčijo:

Tkivni material, ki ga je treba pregledati, so vranica, predledvice in bodisi srce bodisi možgani. Pri vzorčenju plemenk se prav tako lahko pregleda ovarialna ali semenska tekočina.

V primeru majhnih ribjih mladice se lahko cele ribe, krajše od 4 cm, po odstranitvi telesa za zadnjično odprtino seseklajo s sterilnimi škarjami ali skalpelom. Če vzorec sestavljajo cele ribe z dolžino telesa med 4 cm in 6 cm, se odvzamejo notranji organi, vključno z ledvicami.

Koščki organov največ 10 rib se lahko združijo.

II.2 Diagnostične metode za pridobitev in ohranitev statusa brez boleznih glede VHS ali IHN ali obeh boleznih

V skladu z odobrenimi diagnostičnimi metodami in postopki iz točke I dela 1 Priloge II za doseg ali ohranitev statusa brez boleznih glede VHS ali IHN ali obeh boleznih je diagnostična metoda bodisi:

- (a) izolacija virusa v celični kulturi, ki ji sledi določanje virusa z encimsko imunskim testom (ELISA), indirektnim fluorescenčnim testom za dokazovanje protiteles (IFAT), virus nevtralizacijskim testom ali verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkripcijo v realnem času (RT-qPCR), bodisi
- (b) RT-qPCR.

II.3 Metode za vzorčenje in diagnostične metode za izključitev ali potrditev prisotnosti VHS ali IHN

Ko je treba sum na VHS ali IHN ali obe boleznih potrditi ali izključiti v skladu s členom 28 Direktive 2006/88/ES, se izvedejo naslednji pregledi, vzorčenja in testiranja:

- (a) v gojilnici, za katero obstaja sum okužbe, se opravita vsaj en zdravstveni pregled in eno vzorčenje 10 rib, ko so opaženi klinični znaki ali *post mortem* znaki, ki ustrezajo znakom okužbe z VHS ali IHN ali obema boleznima, ali vsaj 30 rib, ko klinični znaki ali *post mortem* znaki niso opaženi. Vzorci se testirajo z uporabo ene ali več diagnostičnih metod iz točk (i) in (ii) v skladu z natančnimi diagnostičnimi metodami in postopki, kot so določeni v oddelku II dela 1 Priloge II:
- (i) konvencionalna izolacija virusa v celični kulturi z naknadnim imunokemijskim ali molekularnim določanjem virusa;
- (ii) dokazovanje virusa z RT-qPCR;
- (iii) druge diagnostične tehnike z dokazano podobno učinkovitostjo, kot so indirektni fluorescenčni test za dokazovanje protiteles (IFAT), encimsko imunski test (ELISA), RT-PCR in imunohistokemija (IHC);
- (b) prisotnost VHS se šteje za potrjeno, če so rezultati ene ali več od navedenih diagnostičnih metod pozitivni za VHSV. Prisotnost IHN se šteje za potrjeno, če so rezultati ene ali več od navedenih diagnostičnih metod pozitivni za IHNV. Potrditev prvega primera VHS ali IHN v prej neokuženih državah članicah, na območjih ali v kompartmentih temelji na konvencionalni izolaciji virusa v celični kulturi ali RT-qPCR;
- (c) sum na VHSV ali IHNV ali oba virusa je mogoče izključiti, če gojenje celic ali testi RT-qPCR ne zagotovijo dodatnih dokazov o prisotnosti VHSV ali IHNV ali obeh virusov.

Tabela 1.A

Sistemi nadzora za območja in kompartmente za dvoletno kontrolno obdobje iz točke I.2.1(a)(i) pred dosego statusa brez boleznih glede VHS ali IHN

Vrsta gojilnice	Število zdravstvenih pregledov na leto (dve leti)	Število vzorčenj na leto (dve leti)	Število rib v vzorcu ⁽¹⁾	
			Število nedoraslih rib	Število plemenk ⁽²⁾
(a) Gojilnice s plemenkami	2	2	50 (prvi pregled) 75 (drugi pregled)	30 (prvi ali drugi pregled) 0 (prvi ali drugi pregled)
(b) Gojilnice samo s plemenkami	2	1	0	75 (prvi ali drugi pregled)
(c) Gojilnice brez plemenk	2	2	75 ⁽³⁾ (prvi ali drugi pregled)	0

Največje število rib, ki se lahko združijo: 10

⁽¹⁾ Vzorce je treba odvzeti ne prej kot tri tedne po prenosu rib iz sladke v slano vodo.

⁽²⁾ Ovarialna ali semenska tekočina plemenk se odvzame v času spolnega dozorevanja v povezavi s smukanjem.

⁽³⁾ Vzorce je treba odvzeti takšnemu številu rib, da se zagotovi dokaz VHSV ali IHNV s 95-odstotno gotovostjo, če je načrtovana prevalenca 5 %.

Tabela 1.B

Sistemi nadzora z manjšim vzorcem za štiriletno kontrolno obdobje iz točke I.2.1(a)(ii) pred dosego statusa brez boleznih glede VHS ali IHN

Vrsta gojilnice	Število zdravstvenih pregledov na leto	Število vzorčenj na leto	Število rib v vzorcu ⁽¹⁾	
			Število razvijajočih se rib	Število plemenk ⁽²⁾
Prvi dve leti obdobja nadzora				
(a) Gojilnice s plemenkami	2	1	0 (prvi pregled) 30 (drugi pregled)	0 (prvi pregled) 0 (drugi pregled)
(b) Gojilnice samo s plemenkami	2	1	0	30 (prvi ali drugi pregled)
(c) Gojilnice brez plemenk	2	1	30 ⁽³⁾ (prvi ali drugi pregled)	0
Zadnji dve leti obdobja nadzora				
(a) Gojilnice s plemenkami	2	2	30 (prvi pregled) 0 (drugi pregled)	0 (prvi pregled) 30 (drugi pregled)

Vrsta gojilnice	Število zdravstvenih pregledov na leto	Število vzorčenj na leto	Število rib v vzorcu ⁽¹⁾	
			Število razvijajočih se rib	Število plemenk ⁽²⁾
(b) Gojilnice samo s plemenkami	2	2		30 (prvi ali drugi pregled)
(c) Gojilnice brez plemenk	2	2	30 ⁽³⁾ (prvi ali drugi pregled)	

Največje število rib, ki se lahko združijo: 10

⁽¹⁾ Vzorce je treba odvzeti ne prej kot tri tedne po prenosu rib iz sladke v slano vodo.

⁽²⁾ Ovarialna ali semenska tekočina plemenk se odvzame v času spolnega dozorevanja v povezavi s smukanjem.

⁽³⁾ Vzorce je treba odvzeti takšnemu številu rib, da se zagotovi dokaz VHSV ali IHNV s 95-odstotno gotovostjo, če je načrtovana prevalenca 10 %.

Tabela 1.C

Sistem nadzora za območja ali kompartmente za ohranitev statusa brez bolezni glede VHS ali IHN, kot je navedeno v točki I.3

Stopnja tveganja	Število zdravstvenih pregledov	Število rib v vzorcu ⁽³⁾
Visoka	2 na leto	30 ⁽¹⁾ ⁽²⁾
Srednja	1 na leto	30 ⁽¹⁾
Nizka	1 na 2 leti	30 ⁽¹⁾

Največje število rib, ki se lahko združijo: 10

⁽¹⁾ Vzorce je treba odvzeti ne prej kot tri tedne po prenosu rib iz sladke v slano vodo.

⁽²⁾ Vzorce je treba odvzeti takšnemu številu rib, da se zagotovi dokaz VHSV ali IHNV s 95-odstotno gotovostjo, če je načrtovana prevalenca 10 %.

⁽³⁾ Na voljo je najmanj en vzorec za vsak zdravstveni pregled.

DEL 2

NADZORNE IN KONTROLNE METODE GLEDE KOI HERPES VIROZE (KHVD)

I. **Zahteve za programe nadzora in izkoreninjenja za pridobitev in ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezni glede KHVD ter za obvladovanje okužbe s koi herpes virusom (KHV)**

I.1 Splošne zahteve

Ko se v skladu z drugim odstavkom točke 2 dela I Priloge V k Direktivi 2006/88/ES zahteva ciljno usmerjen nadzor pri divjih populacijah, se določita število in geografska porazdelitev mest vzorčenja, tako da so države članice, območja ali kompartmenti ustrezno zajeti. Mesta vzorčenja so reprezentativna tudi za različne ekosisteme z dovzetnimi divjimi populacijami, in sicer za rečne sisteme in jezera.

Ciljno usmerjen nadzor temelji na rednem spremljanju območij, na katerih se nahajajo dovzetne vrste. Območja se spremljajo, ko voda doseže temperaturo, ki omogoča razvoj bolezni ($> 15\text{ }^{\circ}\text{C}$), in ne prej kot dva tedna od datuma, ko os bile take temperature dosežene. Vse umrle ribe ali ribe z neobičajnim vedenjem, najdene na območju, se vzorčijo in testirajo.

Kadar koli je to mogoče, se vzorčijo ribe, ki so bile dlje časa izpostavljene temperaturam, ki omogočajo razvoj virusa, in sicer dva do tri tedne pri $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lahko pa se sprejme naslednji pristop:

- (a) zbirajo se podpopulacije pri prenosu iz zimskega v poletne ribnike in gojenje rib v istem vodnem telesu kot poletni ribnik, dokler niso izpolnjene minimalne zahteve glede temperature, ali
- (b) zbirajo se vzorci pri lovljenju rib ali drugem ravnanju z ribami, ki je del običajnih praks upravljanja. Če je možno, se vzorci odvzamejo med 24 ur in 72 ur po takšnih praksah, da se izboljšajo možnosti dokaza KHV.

Ko se zdravstveni pregledi ali vzorčenja v gojilnicah ali pri divjih populacijah opravljajo več kot enkrat na leto, so časovni presledki med zdravstvenimi pregledi ali zbiranjem vzorcev čim daljši v sezoni, ko je verjetno, da bo voda dosegla najvišjo letno temperaturo, ne da bi preseгла mejo $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V vseh proizvodnih enotah, kot so ribniki in bazeni, je treba opraviti zdravstvene preglede, da se odkrijejo poginule ali oslabele ribe ali ribe z neobičajnim vedenjem.

Krap *Cyprinus carpio* in njegovi hibridi, kot je *Cyprinus carpio* \times *Carassius auratus*, se vzorčijo, ko so prisotni v gojilnici.

Ribe, ki se zberejo kot vzorci, se izberejo na naslednji način:

- (i) če so med njimi oslabele ribe ali ribe z neobičajnim vedenjem ali pred kratkim poginule, toda še ne razkrojene ribe, je treba izbrati takšne ribe;
- (ii) če se za proizvodnjo rib uporablja več kot en vodni vir, je treba v vzorčenje vključiti ribe iz vseh vodnih virov;
- (iii) izbrane ribe morajo vključevati ribe, zbrane tako, da so v vzorcu sorazmerno zastopani vsi deli gojilnice in tudi vsi letniki.

I.2 Posebne zahteve za doseg zdravstvenega statusa brez bolezni (kategorija I) glede KHVD

I.2.1 Programi nadzora

- (a) država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije III glede KHVD lahko doseže zdravstveni status kategorije I, ko vse gojilnice, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v navedeni državi članici, na območju ali v kompartmentu izpolnjujejo zahteve za status brez bolezni iz Priloge V k navedeni direktivi ter ko je bil v vseh navedenih gojilnicah in, ko to zahteva drugi odstavek točke 2 dela I navedene priloge, na mestih vzorčenja pri divjih populacijah, izbranih v skladu z navedenim delom, izveden eden od naslednjih programov nadzora:

- (i) model A – dvoletni program nadzora:

v gojilnicah ali na mestih vzorčenja je bilo treba opraviti zdravstvene preglede in vzorčenja za minimalno obdobje dveh zaporednih let, kot je določeno v tabeli 2.A iz oddelka III.

V navedenem dvoletnem obdobju so morali biti rezultati testiranj vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za KHV, prav tako pa je moral biti izključen vsak sum na KHVD v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke III.2;

(ii) model B – štiriletni program nadzora z manjšim vzorcem:

v gojilnicah ali na mestih vzorčenja je bilo treba opraviti zdravstvene preglede in vzorčenja za minimalno obdobje štirih zaporednih let, kot je določeno v tabeli 2.B iz oddelka III.

V navedenem štiriletnem obdobju morajo biti rezultati testiranj vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za KHV, prav tako pa mora biti izključen vsak sum na KHVD v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke III.2;

(b) če je med izvajanjem štiriletnega programa nadzora iz točke (a) potrjena okužba s KHV v gojilnici, vključeni v navedeni program nadzora, in je bil zato preklican njen zdravstveni status kategorije II, lahko navedena gojilnica takoj ponovno pridobi zdravstveni status kategorije II in nadaljuje z izvajanjem programa nadzora za pridobitev statusa brez bolezni, ne da bi ji bilo treba izvesti program izkoreninjenja, kot je opisan v točki I.2.2., če izpolnjuje naslednje pogoje:

(i) gre za celinsko gojilnico, katere zdravstveni status glede KHVD je neodvisen od zdravstvenega statusa populacij vodnih živali v okoliških naravnih vodah glede navedene bolezni s seznama v skladu s točko 3 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES;

(ii) je bila izpraznjena, očiščena in razkužena, njena proizvodnja pa je bila prekinjena; prekinitev proizvodnje traja vsaj šest tednov;

(iii) njen stalež je bil obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede KHVD.

I.2.2 Programi izkoreninjenja

I.2.2.1 Splošne zahteve

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede KHVD, lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko je bil v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden vsaj naslednji program izkoreninjenja:

(a) učinkovito so bili izvedeni minimalni kontrolni ukrepi iz oddelka 4 poglavja V Direktive 2006/88/ES, v bližini gojilnic, uradno razglašene za okužene s KHV, pa je bilo vzpostavljeno območje z omejitvami, kot je določeno v členu 32(b) navedene direktive ter ki zajema okuženo in ogroženo območje.

Območje z omejitvami mora biti opredeljeno na podlagi vsakega primera posebej, ob upoštevanju dejavnikov, ki vplivajo na tveganja za širjenje KHVD na gojene in divje ribe, kot so število, stopnja in porazdelitev smrtnosti rib v gojilnici, okuženih z virusom KHV; oddaljenost od sosednjih gojilnic in gostota sosednjih gojilnic; bližina klavnic; kontaktne gojilnice; vrste rib v gojilnicah; načini gojenja, ki se uporabljajo v prizadetih in sosednjih gojilnicah; hidrodinamične razmere in drugi ugotovljeni dejavniki epidemiološkega pomena.

Pri vzpostavitvi okuženih in ogroženih območij se uporabljajo naslednje minimalne zahteve glede geografske razmejitve navedenih območij:

(i) v neposredni bližini gojilnice, uradno razglašene za okuženo s KHV, se vzpostavi okuženo območje, ki ustreza celotnemu povodju gojilnice, uradno razglašene za okuženo s KHV; pristojni organ lahko obseg območja omeji na dele povodja, če to ne ogroža preprečevanja širjenja KHVD;

(ii) zunaj okuženega območja se vzpostavi ogroženo območje, ki ustreza razširjenemu območju, ki obdaja vzpostavljeno okuženo območje;

- (b) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES ter ki so na okuženem območju in niso uradno razglašene za okužene s KHV, se opravi uradna preiskava, ki zajema vsaj naslednje elemente:
- (i) zbiranje vzorcev za testiranje 10 rib, ko so opaženi klinični znaki ali *post mortem* znaki, ki ustrezajo znakom okužbe s KHVD, ali 30 rib, ko klinični znaki ali *post mortem* znaki niso opaženi;
 - (ii) en zdravstveni pregled; v tistih gojilnicah, kjer so rezultati testov iz točke III.2 negativni; v sezoni, ko je verjetno, da bo temperatura vode dosegla > 15 °C, se zdravstveni pregledi še naprej izvajajo enkrat na mesec, dokler se okuženo območje ne prekliče v skladu s točko I.2.2.1(c);
- (c) vse gojilnice, uradno razglašene za okužene s KHV, se izpraznijo, očistijo in razkužijo, njihova proizvodnja pa se prekine. Prekinitev proizvodnje traja vsaj šest tednov. Ko se izpraznijo vse gojilnice, ki so znotraj istega okuženega območja in so uradno razglašene za okužene, se njihova proizvodnja za vsaj tri tedne sinhronizirano prekine. Ta odstavek se uporablja tudi za nove gojilnice, uradno razglašene za okužene v času izvajanja programa izkoreninjenja.

Med prekinitvijo proizvodnje gojilnic, uradno razglašanih za okužene, se okužena območja spremenijo v ogrožena območja.

Pristojni organ se lahko odloči zahtevati praznjenje, čiščenje, razkuževanje in prekinitve proizvodnje drugih gojilnic znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij. Trajanje prekinitve proizvodnje določi pristojni organ na podlagi ocene tveganja za vsak primer posebej;

- (d) stalež vseh gojilnic, uradno razglašanih za okužene s KHV, in vseh drugih gojilnic s prekinjeno proizvodnjo znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij, se obnovi:
- (i) z ribami, ki izvirajo iz držav članic, z območij ali iz kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede KHVD, ali
 - (ii) v prehodnem obdobju do 31. decembra 2020, z ribami iz držav članic, z območij ali iz kompartmentov z odobrenim programom nadzora glede KHVD.

Stalež se obnovi šele, ko so vse gojilnice, uradno razglašene za okužene s KHV, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja prekinjena v skladu s točko I.2.2.1(c);

- (e) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu, vključeni oz. vključenem v program izkoreninjenja, in, ko se zahteva nadzor pri divjih populacijah, na mestih vzorčenja, izbranih v skladu s točko I.1, se naknadno izvede vsaj program nadzora, določen v točki I.2.1.

I.2.2.2 Zahteve za ponovno pridobitev statusa brez bolezni za celinske kompartmente, ki zajemajo eno samo gojilnico, predhodno razglašeno za prosto KHVD

Celinski kompartment, ki zajema eno samo gojilnico z zdravstvenim statusom kategorije I glede KHVD, katere zdravstveni status glede KHVD je neodvisen od okoliških naravnih voda v skladu s točko 3 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES in katere status kategorije I je bil preklican v skladu s členom 53(3) navedene direktive, lahko ponovno pridobi zdravstveni status kategorije I glede KHVD, takoj ko pristojni organ potrdi, da izpolnjuje naslednje pogoje:

- (a) gojilnica je bila izpraznjena, očiščena in razkužena, njena proizvodnja pa je bila prekinjena; prekinitve proizvodnje je morala trajati vsaj šest tednov;
- (b) stalež gojilnice je bil obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I ali iz kompartmentov z odobrenim programom nadzora glede KHVD (zdravstveni status kategorije II).

I.3 Posebne zahteve za ohranitev statusa kategorije I glede KHVD

Ko se zahteva ciljno usmerjen nadzor za ohranitev zdravstvenega statusa kategorije I, kot je določeno v členu 52 Direktive 2006/88/ES, se v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k navedeni direktivi, v zadevni državi članici, na zadevnem območju ali v zadevnem kompartmentu opravijo zdravstveni pregledi in vzorčenja v skladu s tabelo 2.B iz oddelka III tega dela, ob upoštevanju stopnje tveganja vnosa KHV v gojilnici.

Pogostnost zdravstvenih pregledov kompartmentov kategorije I glede KHVD, ki se nahajajo na celinskih območjih in zajemajo eno ali več gojilnic, katerih zdravstveni status glede KHVD je odvisen od zdravstvenega statusa okoliških naravnih voda glede navedene bolezni s seznama v skladu s točko 2 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES, je v skladu s številom, določenim za visoko stopnjo tveganja v navedeni tabeli 2.C.

V državah članicah, na območjih ali v kompartmentih, kjer je število gojilnic omejeno in ciljno usmerjen nadzor v teh gojilnicah ne zagotavlja zadostnih epidemioloških podatkov, sistemi nadzora za ohranitev statusa brez bolezni vključujejo mesta vzorčenja, izbrana v skladu z zahtevami iz točke I.1.

Navedena mesta vzorčenja se pregledajo in vzorčijo po načelu rotacije 50 % mest vzorčenja vsako leto. Vzorčenje se opravi v skladu s tabelo 2.C iz oddelka III. Vzorci se izberejo, pripravijo in pregledajo, kot je opisano v oddelku II, rezultati laboratorijskih preiskav pa morajo biti negativni glede prisotnosti povzročitelja KHVD.

Status brez bolezni se ohrani le, dokler so rezultati testiranja vseh vzorcev, testiranih z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2, negativni za KHVD, prav tako pa mora biti izključen vsak sum na KHVD v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke III.2.

I.4 Posebne zahteve za odpravo ukrepov obvladovanja iz člena 39 Direktive 2006/88/ES za pridobitev zdravstvenega statusa kategorije III glede KHVD v državah članicah, na območjih ali v kompartmentih z zdravstvenim statusom kategorije V

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede KHVD, lahko doseže zdravstveni status kategorije III glede naveden bolezni s seznama, če:

- (a) so izpolnjene zahteve iz točk I.2.2.1(a), (b) in (c). Če prekinitev proizvodnje ni tehnično izvedljiva, se v zadevnih gojilnicah izvedejo alternativni ukrepi, ki na enak način zagotavljajo izkoreninjenje KHV iz okolja gojilnice;
- (b) je bil stalež vseh gojilnic, uradno razglašeni za okužene, in vseh drugih gojilnic, katerih proizvodnja je bila prekinjena/na katerih so bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a) na vzpostavljenih okuženih in ogroženih območjih, obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I, II ali III glede KHVD;
- (c) je bil stalež obnovljen šele, ko so bile vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja bila prekinjena/so v njih bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a).

II. Diagnostične metode in metode vzorčenja za nadzor za pridobitev in ohranitev statusa brez bolezni glede KHVD

II.1 Vzorci

Tkivni material, ki ga je treba pregledati, so deli škrge in ledvic. Koščki organov največ dveh rib se lahko združijo.

II.2 Diagnostične metode za nadzor za pridobitev in ohranitev statusa brez bolezni glede KHVD

Diagnostična metoda za doseg ali ohranitev statusa brez bolezni glede KHVD je verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) v skladu z natančnimi diagnostičnimi metodami in postopki, kot so določeni v točki II dela 2 Priloge II.

III. Diagnostične metode in metode vzorčenja za uradne preiskave za potrditev ali izključitev suma na KHVD

III.1 Vzorci

Tkivni material, ki ga je treba pregledati, so deli škrg in ledvic. Koščki organov največ dveh rib se lahko združijo.

III.2 Uradna preiskava in diagnostične metode za izključitev in potrditev prisotnosti okužbe s KHV

Ko je treba sum na KHVD potrditi ali izključiti v skladu s členom 28 Direktive 2006/88/ES, se izvedejo naslednji pregledi, vzorčenja in testiranja:

- (a) uradna preiskava vključuje vsaj en zdravstveni pregled in eno vzorčenje 10 rib, ko so opaženi klinični znaki ali *post mortem* znaki, ki ustrezajo znakom okužbe s KHV, ali 30 rib, ko klinični znaki ali *post mortem* znaki niso opaženi. Vzorci se testirajo z uporabo diagnostične metode iz točke (b) v skladu z natančnimi diagnostičnimi metodami in postopki, določenimi v točki II dela 2 Priloge II;
- (b) prisotnost okužbe s KHV se šteje za potrjeno v primeru dokaza KHV s PCR;

sum na KHVD je mogoče izključiti, če ta test ne pokaže nadaljnjih dokazov o prisotnosti KHV.

Tabela 2.A

Sistem nadzora za območja in kompartmente za dvoletno kontrolno obdobje nadzora pred dosego statusa brez boleznih glede KHVD iz točke I.2.1.

		Število kliničnih pregledov na leto (dve leti)	Število laboratorijskih preiskav na leto (dve leti)	Število rib v vzorcu
Gojilnice/območja vzorčenja	Prvi dve leti obdobja nadzora	2	2	75 ⁽¹⁾
	Največje število rib, ki se lahko združijo: 2			

⁽¹⁾ Vzorce je treba odvzeti takšnemu številu rib, da se zagotovi dokaz KHV s 95-odstotno gotovostjo, če je načrtovana prevalenca 5 %.

Tabela 2.B

Sistem nadzora za območja in kompartmente za štiriletno kontrolno obdobje pred dosego statusa brez boleznih glede KHVD iz točke I.2.1.

		Število kliničnih pregledov na leto	Število laboratorijskih preiskav na leto	Število rib v vzorcu
Gojilnice/območja vzorčenja	Prvi dve leti obdobja nadzora	1	1	30
Gojilnice/območja vzorčenja	Zadnji dve leti obdobja nadzora	2	2	30
	Največje število rib, ki se lahko združijo: 2			

Tabela 2.C

Sistem nadzora za območja ali kompartmente za ohranitev statusa brez bolezni glede KHVD, kot je navedeno v točki I.3

Stopnja tveganja	Število zdravstvenih pregledov	Število rib v vzorcu
Visoka	2 na leto	30
Srednja	1 na leto	30
Nizka	1 na 2 leti	30

Največje število rib, ki se lahko združijo: 2

Tabela 2.D

Sistem nadzora za ohranitev statusa brez bolezni glede KHVD v državah članicah, na območjih ali v kompartmentih, kjer je število gojilnic omejeno in ciljno usmerjen nadzor v teh gojilnicah ne zagotavlja zadostnih epidemioloških podatkov, kot je določeno v točki I.3.

	Število kliničnih pregledov na leto	Število laboratorijskih preiskav na leto	Število rib v vzorcu
Mesta vzorčenja	1 na 2 leti	1 na 2 leti	30

Največje število rib, ki se lahko združijo: 2

DEL 3

NADZORNE IN KONTROLNE METODE GLEDE INFEKCIOSNE ANEMIJE LOSOSOV (ISA)

I. Zahteve za programe nadzora in izkoreninjenja za pridobitev in ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezni glede ISA ter za obvladovanje okužbe z ISAV z delecijo HPR

I.1 Splošne zahteve

Ko se zdravstveni pregledi in vzorčenje gojilnic v skladu z drugim odstavkom točke 2 dela I Priloge V k Direktivi 2006/88/ES zahtevajo več kot enkrat na leto, so časovni presledki med zdravstvenimi pregledi ali zbiranjem vzorcev čim daljši.

Ko se v skladu z drugim odstavkom točke 2 dela I Priloge V k Direktivi 2006/88/ES zahteva ciljno usmerjen nadzor pri divjih populacijah, se določita število in geografska porazdelitev mest vzorčenja, tako da so države članice, območja ali kompartmenti ustrezno zajeti. Mesta vzorčenja so reprezentativna tudi za različne ekosisteme z dovzetnimi divjimi populacijami.

Zdravstveni pregledi se izvajajo v vseh proizvodnih enotah, kot so ribniki, bazeni in mrežaste kletke, da se ugotovi prisotnost poginulih ali oslabeledih rib ali rib z neobičajnim vedenjem. Zlasti se pregledajo vodni odtoki, kjer se zaradi vodnega toka zbirajo oslabele ribe.

Ribe, ki se zberejo kot vzorci, se izberejo na naslednji način:

- (a) izberejo se samo umirajoče ali pred kratkim poginule, toda še ne razkrojene ribe; prednostno se zbirajo zlasti ribe, ki kažejo znake anemije, krvavitev ali druge klinične znake, ki lahko pomenijo motnje krvnega obtoka;
- (b) če je atlantski losos med dovzetnimi vrstami na zadevnem območju, se prednostno odzamejo vzorci atlantskega lososa. Če v gojilnici ni atlantskega lososa, je treba vzorčiti druge dovzetne vrste;
- (c) če se za gojenje rib uporablja več kot en vodni vir, se v vzorec vključijo ribe iz vseh vodnih virov;
- (d) izbrane ribe vključujejo ribe, zbrane tako, da so v vzorcu sorazmerno zastopani vse proizvodne enote gojilnice, kot so mrežaste kletke, bazeni in ribniki, ter tudi vsi letniki.

I.2 Posebne zahteve za doseg zdravstvenega statusa kategorije I glede ISA

I.2.1 Programi nadzora

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije III v skladu z delom B Priloge III k Direktivi 2006/88/ES glede ISA, lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko vse gojilnice, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izpolnjujejo zadevne zahteve iz Priloge V k navedeni direktivi ter ko je bil v vseh navedenih gojilnicah in, ko to zahteva drugi odstavek točke 2 dela I Priloge V k Direktivi, na mestih vzorčenja pri divjih populacijah, izbranih v skladu z navedeno točko, izveden naslednji program nadzora:

- (a) v gojilnicah ali na mestih vzorčenja so bili opravljeni zdravstveni pregledi in vzorčenja za minimalno obdobje dveh zaporednih let, kot je določeno v tabeli 3.A iz oddelka II;
- (b) v navedenem dvoletnem obdobju so morali biti rezultati testiranja vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za ISAV z delecijo HPR, prav tako pa je moral biti izključen vsak sum na ISA v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3;
- (c) če je bila med izvajanjem programa nadzora potrjena ISA v gojilnici, vključeni v navedeni program nadzora, in je bil zato preklican njen zdravstveni status kategorije II, je bilo treba izvesti program izkoreninjenja v skladu s točko I.2.2.

I.2.2 Programi izkoreninjenja

I.2.2.1 Splošne zahteve

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede ISA lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko je bil v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden program izkoreninjenja, ki izpolnjuje naslednje točke od (a) do (e):

- (a) učinkovito so bili izvedeni minimalni kontrolni ukrepi iz oddelka 3 poglavja V Direktive 2006/88/ES, v bližini gojilnic, uradno razglašeni za okužene z ISAV z delecijo HPR ali s potrjeno boleznijo ISA, pa je zlasti bilo vzpostavljeno območje z omejitvami, kot je določeno v členu 32(b) navedene direktive ter ki zajema okuženo in ogroženo območje;

območje z omejitvami mora biti opredeljeno na podlagi vsakega primera posebej, ob upoštevanju dejavnikov, ki vplivajo na tveganja za širjenje ISA na gojene ali divje ribe, kot so število, stopnja in porazdelitev smrtnosti rib v gojilnici, okuženih z ISAV z delecijo HPR ali s potrjeno boleznijo ISA; oddaljenost od sosednjih gojilnic in gostota sosednjih gojilnic; bližina klavnic; kontaktne gojilnice; vrste rib v gojilnicah; načini gojenja, ki se uporabljajo v prizadetih in sosednjih gojilnicah; hidrodinamične razmere in drugi ugotovljeni dejavniki epidemiološkega pomena.

Pri vzpostavitvi okuženih in ogroženih območij se uporabljajo naslednje minimalne zahteve glede geografske razmejitve navedenih območij:

(i) okuženo območje se vzpostavi v neposredni bližini gojilnice, uradno razglašene za okuženo z ISA, ter:

1. na obalnih območjih: ustreza območju v krogu s polmerom, ki obsega vsaj območje plimovanja ali vsaj 5 km, katero koli je večje, s središčem v gojilnici, uradno razglašeni za okuženo z ISA, ali enakovrednemu območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki;
2. na območju celine: ustreza celotnemu povodju gojilnice, uradno razglašene za okuženo z ISA; pristojni organ lahko obseg območja omeji na dele povodja, če to ne ogroža preprečevanja širjenja ISA;

(ii) ogroženo območje se vzpostavi zunaj okuženega območja in:

1. na obalnih območjih: ustreza območju prekrivajočih se območij plimovanja in obdaja okuženo območje; ali območju, ki obdaja okuženo območje in se nahaja znotraj kroga s polmerom 10 km od središča okuženega območja; ali enakovrednemu območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki, ali
2. na območju celine: ustreza razširjenemu območju zunaj vzpostavljenega okuženega območja;

(b) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES ter ki so na okuženem območju in niso uradno razglašene za okužene z ISA, se opravi uradna preiskava, ki zajema vsaj naslednje elemente:

- (i) zbiranje vzorcev za testiranje najmanj 10 umirajočih rib, ko so opaženi klinični znaki ali *post mortem* znaki, ki ustrezajo znakom okužbe z ISA, ali najmanj 30 rib, ko klinični znaki ali *post mortem* znaki niso opaženi;
- (ii) en zdravstveni pregled; v tistih gojilnicah, kjer so bili rezultati testov iz točke (i) negativni, se zdravstveni pregledi še naprej izvajajo enkrat na mesec, dokler okuženo območje ni preklicano v skladu s točko I.2.2.1(c);

(c) vse gojilnice, uradno razglašene za okužene z ISAV z delecijo HPR ali s potrjeno boleznijo ISA, se izpraznijo, očistijo in razkužijo, njihova proizvodnja pa se prekine za vsaj tri mesece. okužena in ogrožena območja se lahko prekličejo, ko se vse gojilnice znotraj okuženega območja izpraznijo, očistijo in razkužijo, sledi pa jim sinhronizirana prekinitev proizvodnje vsaj šest tednov.

Med prekinitvijo proizvodnje gojilnic, uradno razglašanih za okužene, se okužena območja spremenijo v ogrožena območja.

Pristojni organ se lahko odloči zahtevati praznjenje, čiščenje, razkuževanje in prekinitev proizvodnje drugih gojilnic znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij. Trajanje prekinitve proizvodnje za navedene gojilnice določi pristojni organ na podlagi ocene tveganja za vsak primer posebej;

(d) stalež vseh gojilnic, uradno razglašanih za okužene z ISAV z delecijo HPR ali s potrjeno boleznijo ISA, in vseh drugih gojilnic znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij, katerih proizvodnja je bila prekinjena, se obnovi z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede ISA;

stalež se obnovi šele, ko so vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja prekinjena v skladu s točko I.2.2.1(c);

(e) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu, vključeni oz. vključenem v program izkoreninjenja, in, ko se zahteva nadzor pri divjih populacijah, na mestih vzorčenja, izbranih v skladu s točko I.1, se naknadno izvede sistem nadzora, določen v točki I.2.1.

I.2.2.2 Zahteve za ponovno pridobitev statusa brez bolezni za celinske kompartmente, ki zajemajo eno samo gojilnico, predhodno razglašeno za gojilnico z zdravstvenim statusom kategorije I

Celinski kompartment, ki zajema eno samo gojilnico z zdravstvenim statusom kategorije I glede ISA, katere zdravstveni status je neodvisen od okoliških naravnih voda v skladu s točko 3 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES in katere status kategorije I je bil preklican v skladu s členom 53(3) navedene direktive, lahko ponovno pridobi ta status, takoj ko pristojni organ potrdi, da izpolnjuje naslednje pogoje:

- (a) gojilnica je bila izpraznjena, očiščena in razkužena, njena proizvodnja pa je bila prekinjena; prekinitev proizvodnje traja vsaj šest tednov;
- (b) stalež gojilnice je bil obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede ISA.

I.3 Minimalni kontrolni ukrepi za ohranitev statusa kategorije I glede ISA

Ko se zahteva ciljno usmerjen nadzor za ohranitev zdravstvenega statusa kategorije I, kot je določeno v členu 52 Direktive 2006/88/ES, se v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k navedeni direktivi, v zadevni državi članici, na zadevnem območju ali v zadevnem kompartmentu opravijo zdravstveni pregledi in vzorčenja v skladu s tabelo 3.B ⁽¹⁾ iz oddelka II tega dela, ob upoštevanju stopnje tveganja vnosa ISA v gojilnici.

Pri določanju pogostnosti zdravstvenih pregledov za zdravstveni status kategorije I glede ISA za kompartmente, ki se nahajajo na celinskih območjih in katerih zdravstveni status glede ISA je odvisen od zdravstvenega statusa okoliških naravnih voda, v katerih živijo atlantski lososi (*Salmo salar*), se raven tveganja vnosa ISA šteje za visoko.

Status brez bolezni glede ISA se ohrani le, dokler so rezultati testiranj vseh vzorcev, testiranih z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2, negativni za ISAV z delecijo HPR, prav tako pa je izključen vsak sum na ISA v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3.

I.4 Posebne zahteve za zdravstveni status kategorije III glede ISAV z delecijo HPR v državah članicah, na območjih ali v kompartmentih s predhodnim zdravstvenim statusom kategorije V

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede ISA lahko doseže status kategorije III, če:

- (a) so izpolnjene zahteve iz točk I.2.2.1(a), (b) in (c). Če prekinitev proizvodnje ni tehnično izvedljiva, se v gojilnicah izvedejo alternativni ukrepi, ki na enak način zagotavljajo izkoreninjenje ISAV iz okolja gojilnice;
- (b) je bil stalež vseh gojilnic, uradno razglašeni za okužene, in vseh drugih gojilnic, katerih proizvodnja je bila prekinjena ali v katerih so bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a), na vzpostavljenih okuženih in ogroženih območjih obnovljen z ribami, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I, II ali III glede ISA;
- (c) je bil stalež obnovljen šele, ko so vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja bila prekinjena/so v njih bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a).
- (d) ISAV z delecijo HPR ni bil potrjen v obdobju dveh let po zaključku ukrepov iz točk (a), (b) in (c), poleg tega pa so bili v tem obdobju izključeni sumi v skladu s postopki iz točke II.3.

⁽¹⁾ Se ne uporablja za gojilnice, kjer se gojijo samo šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) ali potočne postrvi (*Salmo trutta*) ali obe vrsti ribe in kjer oskrba z vodo temelji izključno na sladkovodnih virih, kjer ne živijo atlantski lososi (*Salmo salar*).

II. Diagnostične metode in uradne preiskave

II.1 Vzorci

Tkivni material, ki ga je treba pregledati, so:

- (a) histologija: predledvice, jetra, srce, trebušna slinavka, črevesje, vranica in škrge;
- (b) imunohistokemija: praledvice in srce, vključno z zaklopkami in *bulbus arteriosus*;
- (c) analiza RT-qPCR: praledvice in srce;
- (d) kultura virusov: praledvice, srce, jetra in vranica.

Koščki organov največ petih rib se lahko združijo.

II.2 Diagnostične metode za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede ISA

Diagnostična metoda za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede ISA v skladu s točkama I.2 in I.3 je RT-qPCR, ki ji sledi sekvenciranje pozitivnih vzorcev v skladu z natančnimi metodami in postopki, določenimi v delu 3 Priloge II.

V primeru pozitivnega rezultata RT-qPCR se pred izvedbo začetnih kontrolnih ukrepov iz člena 28 Direktive 2006/88/ES testirajo nadaljnji vzorci.

Navedeni vzorci se testirajo na naslednji način v skladu z natančnimi metodami in postopki, določenimi v delu 3 Priloge II:

- (a) presejalni test vzorcev z RT-qPCR, vključno s sekvenciranjem gena HE, da se preveri delecija HPR,
in
- (b) pregled tkivnih pripravkov s posebnimi protitelesi proti ISAV (in sicer fiksirane rezine z IHC ali odtise tkiv z IFAT), ali
- (c) izolacija in določanje ISAV v celični kulturi iz vsaj enega vzorca katere koli vzorčene ribe iz gojilnice.

II.3 Uradna preiskava in diagnostične metode za izključitev ali potrditev prisotnosti ISA

Ko se sum na ISA potrdi ali izključi v skladu s členom 28 Direktive 2006/88/ES, se opravijo naslednji pregledi, vzorčenja in testiranja:

- (a) uradna preiskava, ki vključuje vsaj en zdravstveni pregled in eno vzorčenje 10 umirajočih rib, ko so opaženi klinični znaki ali *post mortem* znaki, ki ustrezajo znakom bolezni ISA. Če klinični znaki ali *post mortem* znaki, ki kažejo na bolezen ISA, niso ugotovljeni, zdravstvenemu pregledu sledi ciljno vzorčenje najmanj 30 umirajočih rib ali pred kratkim umrlih rib z normalnim videzom v skladu s točko I.1. Vzorci se testirajo v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke (b);
- (b) v primeru pozitivnega rezultata RT-qPCR za ISAV z delecijo HPR se pred izvedbo začetnih kontrolnih ukrepov iz člena 28 Direktive 2006/88/ES testirajo nadaljnji vzorci. Sum na okužbo z ISA se potrdi v skladu z naslednjimi merili z uporabo natančnih metod in postopkov, določenih v delu 3 Priloge II:
 - (i) dokazovanje ISAV z RT-qPCR, vključno s sekvenciranjem gena HE, da se preveri delecija HPR, in dokazovanje ISAV v tkivnih pripravkih s posebnimi protitelesi proti ISAV (in sicer fiksirane rezine z IHC ali odtise tkiv z IFAT)

ali

- (ii) dokazovanje ISAV z RT-qPCR, vključno s sekvenciranjem gena HE, da se preveri delecija HPR, ter izolacija in določanje ISAV v celični kulturi iz vsaj enega vzorca katere koli ribe iz gojilnice;
- (c) v primeru ugotovitev kliničnih izsledkov, makroskopskih patoloških sprememb ali histopatoloških izsledkov, ki kažejo na bolezen ISA, je treba izsledke podpreti z dokazovanjem virusa po dveh diagnostičnih metodah z neodvisnimi načeli odkrivanja, kot sta RT-qPCR in IHC, v skladu z delom 3 Priloge II.
- Sum na ISA je mogoče izključiti, če testi in pregledi v obdobju 12 mesecev od datuma suma ne pokažejo nadaljnjih dokazov o prisotnosti ISA.

Tabela 3.A

Sistem nadzora za območja in kompartmente za dvoletno kontrolno obdobje pred dosego statusa brez bolezní glede ISA iz točke I.2.1

Leto nadzora	Število zdravstvenih pregledov na leto (dve leti)	Število laboratorijskih preiskav na leto (dve leti)	Število rib za vzorčenje na leto
Leto 1	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾
Leto 2	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Vzorce je treba zbrati ter shraniti in pregledati v okviru dveh enomesečnih testnih obdobjih na leto (in sicer spomladi in jeseni) ali, ko je primerno, v skladu s praktičnimi vidiki.

⁽²⁾ Največje število rib, ki se lahko združijo: 5.

Tabela 3.B

Sistem nadzora za območja ali kompartmente za ohranitev statusa brez bolezní glede ISA, kot je navedeno v točki I.3 ⁽²⁾

Stopnja tveganja	Število zdravstvenih pregledov na leto	Število laboratorijskih preiskav na leto	Število rib za vzorčenje na leto
Visoka	2	2 ⁽¹⁾	2 * 30
Srednja	1	1 ⁽¹⁾	30
Nizka	1 na 2 leti	1 na 2 leti	30 na 2 leti

⁽¹⁾ Vzorce je treba zbrati in pregledati v okviru dveh enomesečnih testnih obdobjih na leto (in sicer spomladi in jeseni) ali, ko je primerno, v skladu s praktičnimi vidiki.

⁽²⁾ Se ne uporablja za gojilnice, kjer se gojijo samo šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) ali potočne postrvi (*Salmo trutta*) ali obe vrsti ribe in kjer oskrba z vodo temelji izključno na sladkovodnih virih, kjer ne živijo atlantski lososi (*Salmo salar*).

DEL 4

NADZORNE IN KONTROLNE METODE GLEDE OKUŽBE Z MARTEILIA REFRINGENS

I. Zahteve za programe nadzora in izkoreninjenja za pridobitev in ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezní glede okužbe z *Marteilia refringens*

I.1 Splošne zahteve

Zdravstveni pregledi in, kadar je primerno, vzorčenje za laboratorijske preiskave se opravijo v obdobju leta, v katerem je znano, da je prevalenca parazita v državi članici, na območju ali v kompartmentu največja. Ko tak podatek ni na voljo, se vzorčenje opravi takoj, ko temperatura vode preseže 17 °C.

Pri vzorčenju mehkužcev v skladu z zahtevami iz dela 4 se uporabljajo naslednja merila:

- (a) če so v proizvodnih enotah ali na proizvodnem območju školjke rodu *Ostrea* spp. in *Mytilus* spp., se vzorčijo enako veliki vzorci obeh rodov. Če je prisoten le eden od obeh rodov, se vzorči navedeni rod. Če ni prisoten niti rod *Ostrea* niti rod *Mytilus*, mora biti vzorec reprezentativen za vse druge prisotne dovzetne vrste;
- (b) če so v proizvodnih enotah oslabei, odprti ali pred kratkim poginuli, toda ne razkrojeni mehkužci, se primarno izberejo takšni mehkužci. Če takšni mehkužci niso prisotni, izbrani mehkužci vključujejo najstarejše zdrave mehkužce;
- (c) pri vzorčenju v gojilnicah mehkužcev, v katerih se za gojenje mehkužcev uporablja več kot en vodni vir, se mehkužci iz vseh vodnih virov vključijo v vzorčenje tako, da so v vzorcu sorazmerno zastopani vsi deli gojilnice;
- (d) pri vzorčenju na območjih gojenja mehkužcev se mehkužci iz zadostnega števila mest vzorčenj vključijo v vzorčenje tako, da so v vzorcu sorazmerno zastopani vsi deli območja gojenja mehkužcev. Glavni dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri izbiri teh mest vzorčenja, so mesta vzorčenja s predhodnim dokazom *Marteilia refringens*, gostota živali, vodni tokovi, prisotnost dovzetnih vrst, prisotnost vektorskih vrst, batimetrija in prakse upravljanja. V vzorčenje se vključijo naravna nahajališča.

I.2 Posebne zahteve za doseg zdravstvenega statusa kategorije I glede *Marteilia refringens*

I.2.1 Programi nadzora

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije III glede okužbe z *Marteilia refringens* lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko je bil v vseh gojilnicah ali na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden vsaj naslednji program nadzora, ki vključuje zdravstvene preglede in zbiranje vzorcev za testiranje.

Dvoletni program nadzora bolezni:

- (a) v gojilnicah ali na območjih gojenja mehkužcev so bili opravljeni zdravstveni pregledi in vzorčenja za minimalno obdobje dveh zaporednih let, kot je določeno v tabeli 4.A iz oddelka II;
- (b) v navedenem dvoletnem obdobju so bili rezultati testiranj vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za *Marteilia refringens*, prav tako pa je bil izključen vsak sum na *Marteilia refringens* v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3;
- (c) ko se v vzorec vključijo rodovi *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* ali *Mytilus galloprovincialis*, ki izvirajo iz države članice, območja ali kompartmenta z zdravstvenim statusom kategorije I, morajo biti vneseni v gojilnico ali na območje gojenja mehkužcev vsaj spomladi tik pred obdobjem, ko se izvaja program nadzora.

I.2.2 Programi izkoreninjenja

Izkoreninjenje *Marteilia refringens* se v večini primerov šteje za nemogoče, toda kadar država članica presodi, da je to mogoče, se uporablja naslednji model za program izkoreninjenja.

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede okužbe z *Marteilia refringens* lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko je bil v vseh gojilnicah ali na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v navedeni državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden vsaj naslednji program izkoreninjenja:

- (a) učinkovito so bili izvedeni ukrepi, določeni v oddelku 3 poglavja V Direktive 2006/88/ES, v bližini gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, uradno razglašeni za okužene z *Marteilia refringens*, pa je zlasti bilo vzpostavljeno območje z omejitvami, kot je določeno v členu 32(b) Direktive 2006/88/ES ter ki zajema okuženo in ogroženo območje.

Območje z omejitvami se opredeli na podlagi vsakega primera posebej ob upoštevanju dejavnikov, ki vplivajo na tveganja za širjenje *Marteilia refringens*, kot so število, starost, stopnja in porazdelitev smrtnosti mehkužcev v gojilnici ali na območju gojenja mehkužcev, ki je okužena oz. okuženo z *Marteilia refringens*, vključno z divjimi mehkužci; oddaljenost in gostota sosednjih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, vključno z divjimi mehkužci; bližina obratov za predelavo ter kontaktnih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev; vrste, zlasti dovzetne vrste in vektorske vrste, v gojilnici ali na območju gojenja mehkužcev; načini gojenja, ki se uporabljajo v prizadetih in sosednjih gojilnicah ter na območjih gojenja mehkužcev; hidrodinamične razmere in drugi ugotovljeni dejavniki epidemiološkega pomena.

Pri vzpostavitvi okuženih in ogroženih območij se uporabljajo naslednje minimalne zahteve:

- (i) okuženo območje se vzpostavi v neposredni bližini gojilnice ali območja gojenja mehkužcev, ki je bila uradno razglašena oz. je bilo uradno razglašeno za okuženo z *Marteilia refringens*, in ustreza območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki;
 - (ii) ogroženo območje se vzpostavi zunaj okuženega območja in ustreza območju, ki obdaja okuženo območje in je določeno v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki;
- (b) v vseh gojilnicah in na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES ter ki so na okuženem območju in niso uradno razglašeni za okužene z *Marteilia refringens*, se opravi uradna preiskava, ki zajema vsaj zbiranje vzorcev 150 mehkužcev za testiranje po začetku obdobja prenosa *Marteilia refringens*. Ko obdobje prenosa ni znano, se vzorčenje začne v obdobju, ko temperatura vode preseže 17 °C;
- (c) vse gojilnice in območja gojenja mehkužcev, ki so bili razglašeni za okužene z *Marteilia refringens*, se izpraznijo, njihova proizvodnja se prekine ter se, če je mogoče, očistijo in razkužijo.

Prekinitve proizvodnje traja vsaj:

- (i) dva meseca v primeru gojilnic in območij gojenja mehkužcev z omejenimi povezavami z okoliškimi vodami, kot so drstišča in vzgajališča;
- (ii) dva meseca v primeru gojilnic in območij gojenja mehkužcev z neomejenimi povezavami z okoliškimi vodami, če so bili okuženi mehkužci dovzetnih vrst in tisti mehkužci dovzetnih vrst z epidemiološkimi povezavami z okuženo gojilnico ali okuženim območjem gojenja mehkužcev, pobrani ali odstranjeni pred obdobjem leta, ko je prevalenca *Marteilia refringens* znana kot največja, ali, ko to obdobje ni znano, pred obdobjem, ko temperatura vode preseže 17 °C;
- (iii) štirinajst mesecev v primeru gojilnic in območij gojenja mehkužcev z neomejenimi povezavami z okoliškimi vodami, če okuženi mehkužci dovzetnih vrst in tisti mehkužci dovzetnih vrst z epidemiološkimi povezavami z okuženo gojilnico ali okuženim območjem gojenja mehkužcev niso bili pobrani ali odstranjeni pred obdobjem leta, ko je prevalenca *Marteilia refringens* znana kot največja, ali, ko taki podatki niso znani, ko mehkužci dovzetnih vrst niso bili pobrani ali odstranjeni pred obdobjem, ko temperatura vode preseže 17 °C.

Ko se izpraznijo vse gojilnice in območja gojenja mehkužcev, ki so uradno razglašeni za okužene, se njihova proizvodnja za vsaj štiri tedne sinhronizirano prekine.

Pristojni organ se lahko odloči zahtevati praznjenje, čiščenje, razkuževanje in prekinitve proizvodnje drugih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, kot je primerno, znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij. Trajanje prekinitve proizvodnje določi pristojni organ na podlagi ocene tveganja za vsak primer posebej;

- (d) stalež vseh gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, uradno razglašeni za okužene oz. okužena, in vseh drugih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev s prekinjeno proizvodnjo znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij se obnovi z mehkužci, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede okužbe z *Marteilia refringens*.

Stalež se obnovi šele, ko so vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja prekinjena v skladu s točko I.2.2(c);

- (e) v vseh gojilnicah in na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES v državi članici, na območju ali v kompartmentu, vključeni oz. vključenem v program izkoreninjenja, se naknadno izvaja sistem nadzora iz točke I.2.1 tega dela.

I.3 Posebne zahteve za ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezni (kategorija I) glede okužbe z *Marteilia refringens*

Ko se zahteva ciljno usmerjen nadzor za ohranitev zdravstvenega statusa kategorije I, kot je določeno v členu 52 Direktive 2006/88/ES, se v vseh gojilnicah ali na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v zadevni državi članici, na zadevnem območju ali v zadevnem kompartmentu opravijo zdravstveni pregledi in vzorčenja v skladu s tabelo 4.B iz oddelka II, ob upoštevanju stopnje tveganja vnosa *Marteilia refringens* v gojilnici ali na območju gojenja mehkužcev.

Status brez bolezni se lahko ohrani le, dokler so rezultati testiranja vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za *Marteilia refringens*, prav tako pa je izključen vsak sum na *Marteilia refringens* v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3.

I.4 Zahteve za odpravo ukrepov obvladovanja, določenih v členu 39 Direktive 2006/88/ES (sprememba zdravstvenega statusa iz kategorije V v kategorijo III) glede okužbe z *Marteilia refringens*

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede okužbe z *Marteilia refringens* lahko doseže zdravstveni status kategorije III glede navedene bolezni s seznama, če:

- (a) so izpolnjene zahteve iz točk I.2.2(a), (b) in (c). Če prekinitve proizvodnje ni tehnično izvedljiva, se v gojilnicah izvedejo alternativni ukrepi, ki na enak način zagotavljajo izkoreninjenje *Marteilia refringens* iz okolja gojilnice;
- (b) je bil stalež vseh gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, uradno razglašeni za okužene oz. okužena, in vseh drugih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, katerih proizvodnja je bila prekinjena/na katerih so bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a), znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij obnovljen z mehkužci, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I, II ali III glede okužbe z *Marteilia refringens*;
- (c) je bil stalež obnovljen šele, ko so bile vse gojilnice ali vsa območja gojenja mehkužcev, uradno razglašene za okužene oz. razglašena za okužena, izpraznjene, očiščene in razkužene oz. izpraznjena, očiščena in razkužena ter je bila njihova proizvodnja prekinjena ali so na njih bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a);
- (d) okužba z *Marteilia refringens* ni bila potrjena v obdobju dveh let po zaključku ukrepov iz točk (a), (b) in (c), poleg tega pa so bili v tem obdobju izključeni sumi v skladu s postopki iz točke II.3.

II. Diagnostične metode in uradne preiskave

II.1 Vzorci

Celotno žival je treba poslati v laboratorij, da se na njej opravijo diagnostični testi, določeni v točkah II.2 in II.3.

II.2 Diagnostične metode za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede okužbe z *Marteilia refringens*

Diagnostične metode, ki se uporabljajo za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede okužbe z *Marteilia refringens* po natančnih diagnostičnih metodah in postopkih iz dela 4 Priloge II, so histopatologija, odtisi tkiv ali PCR.

II.3 Uradne preiskave in diagnostične metode za potrditev prisotnosti ali izključitev suma okužbe z *Marteilia refringens*

Ko je treba sum na okužbo z *Marteilia refringens* potrditi ali izključiti v skladu s členom 28 Direktive 2006/88/ES, se izvedejo naslednji pregledi, vzorčenja in testiranja:

- (a) uradna preiskava vključuje vsaj eno vzorčenje 30 mehkužcev dovzetnih vrst, če sum temelji na poročilu o umrljivosti ali, v nasprotnem primeru, 150 mehkužcev dovzetnih vrst po začetku obdobja prenosa *Marteilia refringens*. Ko obdobje prenosa ni znano, se vzorčenje začne v obdobju, ko temperatura vode preseže 17 °C;
- (b) vzorci se testirajo z uporabo diagnostičnih metod iz točke (i) po natančnih diagnostičnih metodah in postopkih, določenih v oddelku I dela 4 Priloge II:
 - (i) prisotnost *Marteilia refringens* se šteje za potrjeno, ko je pozitiven rezultat histopatologije, odtisov tkiv ali hibridizacije *in situ* povezan s pozitivnim rezultatom PCR in dopolnjen s sekvenciranjem;
 - (ii) sum na okužbo z *Marteilia refringens* je mogoče izključiti, če testi iz točke (i) pokažejo, da ni nadaljnjih dokazov o prisotnosti *Marteilia refringens*.

Tabela 4.A

Sistem nadzora za države članice, območja in kompartmente za kontrolno obdobje pred dosego statusa brez bolezní glede *Marteilia refringens* iz točke I.2.1

	Število zdravstvenih pregledov na leto	Število laboratorijskih preiskav na leto	Število mehkužcev v vzorcu
Gojilnica/območje gojenja mehkužcev	1	1	150

Tabela 4.B

Sistem nadzora za države članice, območja ali kompartmente za ohranitev statusa brez bolezní glede *Marteilia refringens*, kot je navedeno v točki I.3

Stopnja tveganja	Število zdravstvenih pregledov	Število laboratorijskih preiskav	Število mehkužcev v vzorcu
Visoka	1 na leto	1 na 2 leti	150
Srednja	1 na 2 leti	1 na 2 leti	150
Nizka	1 na 2 leti	1 na 4 leta	150

DEL 5

NADZORNE IN KONTROLNE METODE GLEDE OKUŽBE Z *BONAMIA OSTREAE*

I. Zahteve za programe nadzora ali izkoreninjenja za pridobitev in ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezní glede okužbe z *Bonamia ostreae*

I.1 Splošne zahteve

Zdravstveni pregledi in, kadar je primerno, vzorčenje proizvodnih enot se opravijo v obdobju leta, v katerem je prevalenca *Bonamia ostreae* v državi članici, na območju ali v kompartmentu znana kot največja. Ko tak podatek ni na voljo, se vzorčenje opravi pozimi ali v začetku pomladi.

Pri vzorčenju mehkužcev v skladu z zahtevami iz dela 5 se uporabljajo naslednja merila:

- (a) če so med njimi ostrige vrste *Ostrea edulis*, se za vzorčenje izberejo samo ostrige navedene vrste. Če med njimi ni ostrig vrste *Ostrea edulis*, je vzorec reprezentativen za vse druge prisotne dovzetne vrste;
- (b) če so med njimi oslabei, odprti ali pred kratkim poginuli, toda ne razkrojeni mehkužci, se primarno izberejo takšni mehkužci. Če takšnih mehkužcev ni med njimi, izbrani mehkužci vključujejo najstarejše zdrave mehkužce;
- (c) pri vzorčenju v gojilnicah, kjer se za gojenje mehkužcev uporablja več kot en vodni vir, se mehkužci iz vseh vodnih virov vključijo v vzorčenje tako, da so v vzorcu sorazmerno zastopani vsi deli gojilnice;
- (d) pri vzorčenju na območjih gojenja mehkužcev se v vzorec vključijo mehkužci iz zadostnega števila mest vzorčenja. Glavni dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri izbiri navedenih mest vzorčenja, so mesta vzorčenja s predhodnim dokazom *Bonamia ostreae*, gostota živali, vodni tokovi, prisotnost dovzetnih vrst, prisotnost vektorskih vrst, batimetrija in prakse upravljanja. V vzorčenje se vključijo naravna nahajališča, ki se nahajajo znotraj območja gojenja ali ob njem.

I.2 Posebne zahteve za doseg zdravstvenega statusa kategorije I glede *Bonamia ostreae*

I.2.1 Programi nadzora

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije III glede *Bonamia ostreae* lahko ponovno doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko je bil v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden vsaj naslednji program nadzora, ki zajema zdravstvene preglede in zbiranje vzorcev za testiranje.

Dvoletni program nadzora:

- (a) v gojilnicah in na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, so bili opravljeni zdravstveni pregledi in vzorčenja za minimalno obdobje dveh zaporednih let, kot je določeno v tabeli 5.A iz tega dela;
- (b) v navedenem dvoletnem obdobju so bili rezultati testiranj vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za *Bonamia ostreae*, prav tako pa je bil izključen vsak sum na *Bonamia ostreae* v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3;
- (c) ko se v vzorec vključijo ostrige rodu *Ostrea edulis*, ki izvirajo iz države članice, območja ali kompartmenta z zdravstvenim statusom kategorije I, morajo biti vneseni v gojilnico ali na območje gojenja mehkužcev vsaj jeseni tik pred obdobjem, ko se izvaja program nadzora.

I.2.2 Programi izkoreninjenja

Izkoreninjenje *Bonamia ostreae* se v večini primerov šteje za nemogoče, toda kadar država članica presodi, da je to mogoče, se uporablja naslednji model za program izkoreninjenja.

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede *Bonamia ostreae* lahko ponovno doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko je bil v vseh gojilnicah ali na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden vsaj naslednji program izkoreninjenja:

- (a) učinkovito so bili izvedeni minimalni kontrolni ukrepi iz oddelka 3 poglavja V Direktive 2006/88/ES, v bližini gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, uradno razglašeni za okužene oz. okužena z *Bonamia ostreae*, pa je zlasti bilo vzpostavljeno območje z omejitvami, kot je določeno v členu 32(b) navedene direktive ter ki zajema okuženo in ogroženo območje.

Območje z omejitvami se opredeli na podlagi vsakega primera posebej, ob upoštevanju dejavnikov, ki vplivajo na tveganja za širjenje navedene bolezni s seznama, kot so število, stopnja, starost in porazdelitev smrtnosti mehkužcev v gojilnici ali na območju gojenja mehkužcev, ki je okužena oz. okuženo z *Bonamia ostreae*, vključno z divjimi mehkužci; oddaljenost in gostota sosednjih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, vključno z divjimi mehkužci; bližina obratov za predelavo ter kontaktnih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev; vrste, ki so prisotne v gojilnici ali na območju gojenja mehkužcev, zlasti dovzetne vrste in vektorske vrste; načini gojenja, ki se uporabljajo pri prizadetih in sosednjih gojilnicah ali območjih gojenja mehkužcev; hidrodinamične razmere in drugi ugotovljeni dejavniki epidemiološkega pomena.

Pri vzpostavitvi okuženih in ogroženih območij se uporabljajo naslednje minimalne zahteve:

- (i) okuženo območje se vzpostavi v neposredni bližini gojilnice ali območja gojenja mehkužcev, ki je bila uradno razglašena oz. je bilo uradno razglašeno za okuženo z *Bonamia ostreae*, in ustreza območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki;
 - (ii) ogroženo območje se vzpostavi zunaj okuženega območja in ustreza območju, ki obdaja okuženo območje in je določeno v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki;
- (b) v vseh gojilnicah in na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES ter ki so na okuženem območju in niso uradno razglašene za okužene z *Bonamia ostreae*, se opravi uradna preiskava, ki zajema vsaj zbiranje vzorcev 150 mehkužcev dovzetnih vrst za testiranje po začetku obdobja prenosa *Bonamia ostreae*. Ko obdobje prenosa ni znano, se vzorčenje začne pozimi ali v začetku pomladi;
- (c) vse gojilnice in območja gojenja mehkužcev, ki so bili razglašeni za okužene z *Bonamia ostreae*, se izpraznijo, njihova proizvodnja se prekine ter se, če je mogoče, očistijo in razkužijo. Prekinitev proizvodnje traja vsaj šest mesecev.

Ko se izpraznijo vse gojilnice ali območja gojenja mehkužcev, uradno razglašene oz. razglašena za okužene oz. okužena, se njihova proizvodnja za vsaj štiri tedne sinhronizirano prekine.

Pristojni organ se lahko odloči zahtevati praznjenje, čiščenje, razkuževanje in prekinitev proizvodnje drugih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, kot je primerno, znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij. Trajanje prekinitve proizvodnje določi pristojni organ na podlagi ocene tveganja za vsak primer posebej;

- (d) stalež vseh gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, uradno razglašeni za okužene oz. okužena, in vseh drugih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev s prekinjeno proizvodnjo znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij se obnovi z mehkužci, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede okužbe z *Bonamia ostreae*. Stalež se obnovi šele, ko so vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja prekinjena v skladu s točko I.2.2(c);
- (e) v vseh gojilnicah in na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu, vključeni oz. vključenem v program izkoreninjenja, je treba naknadno izvesti program nadzora, kot je določen v točki I.2.

I.3 Posebne zahteve za ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezni (kategorija I) glede okužbe z *Bonamia ostreae*

Ko se zahteva ciljno usmerjen nadzor za ohranitev zdravstvenega statusa kategorije I, kot je določeno v členu 52 Direktive 2006/88/ES, se v vseh gojilnicah ali na območjih gojenja mehkužcev, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k navedeni direktivi, v zadevni državi članici, na zadevnem območju ali v zadevnem kompartmentu opravijo zdravstveni pregledi in vzorčenja v skladu s tabelo 5.B iz oddelka II tega dela, ob upoštevanju stopnje tveganja vnosa *Bonamia ostreae* v gojilnici ali na območju gojenja mehkužcev.

Status brez bolezni glede okužbe z *Bonamia ostreae* se ohrani le, dokler so rezultati testiranj vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za *Bonamia ostreae*, prav tako pa je izključen vsak sum na *Bonamia ostreae* v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3.

- I.4 Zahteve za odpravo ukrepov obvladovanja, določenih v členu 39 Direktive 2006/88/ES (sprememba zdravstvenega statusa iz kategorije V v kategorijo III) glede okužbe z *Bonamia ostreae*

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede okužbe z *Bonamia ostreae* lahko doseže zdravstveni status kategorije III glede navedene bolezni, če:

- (a) so izpolnjene zahteve iz točk I.2.2(a), (b) in (c). Če prekinitev proizvodnje ni tehnično izvedljiva, se v gojilnicah izvedejo alternativni ukrepi, ki na enak način zagotavljajo izkoreninjenje *Bonamia ostreae* iz okolja gojilnice;
- (b) stalež vseh gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, uradno razglašeni za okužene oz. okužena, in vseh drugih gojilnic ali območij gojenja mehkužcev, katerih proizvodnja je bila prekinjena/na katerih so bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a), znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij je bil obnovljen z mehkužci, ki izvirajo iz držav članic ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I, II ali III glede okužbe z *Bonamia ostreae*;
- (c) stalež je bil obnovljen šele, ko so bile vse gojilnice ali območja gojenja mehkužcev, uradno razglašene za okužene oz. uradno razglašena za okužena, izpraznjene, očiščene in razkužene oz. izpraznjena, očiščena in razkužena ter je bila njihova proizvodnja prekinjena/so na njih bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a);
- (d) okužba z *Bonamia ostreae* ni bila potrjena v obdobju dveh let po zaključku ukrepov iz točk (a), (b) in (c), poleg tega pa so bili v tem obdobju izključeni sumi v skladu s postopki iz točke II.3.

II. Diagnostične metode in diagnostična merila

II.1 Vzorci

Celotno žival je treba poslati v laboratorij, da se na njej opravijo diagnostični testi, določeni v točkah II.2 in II.3.

II.2 Diagnostične metode za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede okužbe z *Bonamia ostreae*

Diagnostične metode, ki se uporabljajo za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede okužbe z *Bonamia ostreae*, so histopatologija, odtisi tkiv ali PCR. Pri uporabi teh diagnostičnih metod se upoštevajo ustrezne natančne metode in postopki iz dela 5 Priloge II.

II.3 Diagnostična merila za potrditev prisotnosti ali izključitev suma okužbe z *Bonamia ostreae*

Ko je treba sum na okužbo z *Bonamia ostreae* potrditi ali izključiti v skladu s členom 28 Direktive 2006/88/ES, se izvedejo naslednji pregledi, vzorčenja in testiranja:

Uradna preiskava vključuje vsaj eno vzorčenje 30 mehkužcev dovzetnih vrst, če sum temelji na poročilu o umrljivosti ali, v nasprotnem primeru, 150 mehkužcev dovzetnih vrst po začetku obdobja prenosa *Bonamia ostreae*. Ko obdobje prenosa ni znano, se vzorčenje začne pozimi ali v začetku pomladi. Vzorci se testirajo z uporabo diagnostičnih metod iz točke (i) po natančnih diagnostičnih metodah in postopkih, določenih v oddelku I dela 5 Priloge II.

- (i) prisotnost *Bonamia ostreae* se šteje za potrjeno, ko je pozitiven rezultat histopatologije, odtisov tkiv ali hibridizacije *in situ* povezan s pozitivnim rezultatom PCR in dopolnjen s sekvenciranjem v skladu z odobrenimi metodami in postopki iz dela 5 Priloge II;
- (ii) sum na prisotnost okužbe z *Bonamia ostreae* se izključi, če navedeni testi pokažejo, da ni nadaljnjih dokazov o prisotnosti *Bonamia ostreae*.

Tabela 5.A

Sistem nadzora za države članice, območja in kompartmente za kontrolno obdobje pred dosegom statusa brez bolezni glede *Bonamia ostreae* iz točke I.2.1

	Število zdravstvenih pregledov na leto	Število laboratorijskih preiskav na leto	Število mehkužcev v vzorcu
Gojilnice/območja gojenja mehkužcev	1	1	150

Tabela 5.B

Sistem nadzora za države članice, območja ali kompartmente za ohranitev statusa brez bolezni glede *Bonamia ostreae*, kot je navedeno v točki I.3

Stopnja tveganja	Število zdravstvenih pregledov	Število laboratorijskih preiskav	Število mehkužcev v vzorcu
Visoka	1 na leto	1 na 2 leti	150
Srednja	1 na 2 leti	1 na 2 leti	150
Nizka	1 na 2 leti	1 na 4 leta	150

DEL 6

NADZORNE IN KONTROLNE METODE GLEDE BOLEZNI BELIH PIK (WSD)

I. Zahteve za programe nadzora in izkoreninjenja za pridobitev in ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezni glede WSD ter za obvladovanje okužbe z WSSV

I.1 Splošne zahteve za preglede in vzorčenje

Raki se za laboratorijske preiskave vzorčijo vedno, kadar koli je verjetno, da bo dosežena najvišja letna temperatura vode. Navedena zahteva glede temperature vode se uporablja tudi za zdravstvene preglede, kadar so ti izvedljivi in ustrezni.

Pri vzorčenju gojenih rakov v skladu z zahtevami iz tega dela se uporabljajo naslednja merila:

- (a) če so v proizvodnih enotah oslabei ali umirajoči raki, se primarno izberejo taki raki. Če med njimi ni takih rakov, izbrani raki vključujejo rake različnih velikosti, torej mlade in odrasle rake, ki spadajo med izbrane dovzetne vrste in so sorazmerno zastopani v vzorcu;
- (b) če se za gojenje rakov uporablja več kot en vodni vir, je treba v vzorčenje vključiti dovzetne rake iz vseh vodnih virov.

Ko se v skladu z drugim odstavkom točke 2 dela I Priloge V k Direktivi 2006/88/ES zahteva ciljno usmerjen nadzor pri divjih populacijah, se določita število in geografska porazdelitev mest vzorčenja, tako da so države članice, območja ali kompartmenti ustrezno zajeti. Mesta vzorčenja so reprezentativna za različne ekosisteme z divjimi populacijami dovzetnih vrst, in sicer za morske ekosisteme, ekosisteme rečnega ustja ter rečne in jezerske ekosisteme.

Ko se v skladu z drugim odstavkom točke 2 dela I Priloge V k Direktivi 2006/88/ES zahteva ciljno usmerjen nadzor pri divjih populacijah, se raki za vzorčenje izberejo na naslednji način:

- (i) na območjih morskih ekosistemov in ekosistemov rečnega ustja se izbere ena ali več od naslednjih vrst: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, vrste kozic *Palaemon adspersus* ali *penaeid*, in sicer *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Če med njimi ni navedenih vrst, mora biti vzorec reprezentativen za druge prisotne dovzetne vrste deseteronožcev. Glede na širok nabor dovzetnih živali gostiteljic se gostiteljice lahko izberejo iz rodov ali družin deseteronožcev, pri katerih je bila dovzetnost dokazana s poskusi ali naravno;
- (ii) na območjih rečnih in jezerskih ekosistemov se izbere ena ali več od naslednjih vrst: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* ali *Orconectes limosus*. Če med njimi ni navedenih vrst, mora biti vzorec reprezentativen za druge prisotne dovzetne vrste deseteronožcev. Glede na širok nabor dovzetnih živali gostiteljic se gostiteljice lahko izberejo iz rodov ali družin deseteronožcev, pri katerih je bila dovzetnost dokazana s poskusi ali naravno;
- (iii) če so med njimi oslabei ali umirajoči raki, se izberejo predvsem taki raki. Če med njimi ni takih rakov, izbrani raki vključujejo rake različnih velikosti, torej mlade in odrasle, ki spadajo med izbrane dovzetne vrste in so sorazmerno zastopani v vzorcu.

I.2 Posebne zahteve za pridobitev zdravstvenega statusa kategorije I glede WSD

I.2.1 Programi nadzora

- (a) Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije III glede WSD v skladu z delom B Priloge III k Direktivi 2006/88/ES lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko vse gojilnice, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k navedeni direktivi, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izpolnjujejo zadevne zahteve iz Priloge V k navedeni direktivi ter ko je bil v vseh navedenih gojilnicah in, ko to zahteva drugi odstavek točke 2 dela I Priloge V k Direktivi 2006/88/ES, na mestih vzorčenja pri divjih populacijah, izbranih v skladu z navedeno točko, izveden eden od naslednjih dvoletnih programov nadzora, ki zajema zdravstvene preglede in zbiranje vzorcev za testiranje.

V gojilnicah ali na mestih vzorčenja so bili opravljeni zdravstveni pregledi in vzorčenja za minimalno obdobje dveh zaporednih let, kot je določeno v tabeli 6.A iz oddelka II.

V navedenem dvoletnem obdobju so bili rezultati testiranja vseh vzorcev z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.2 negativni za okužbo z WSD, prav tako pa je bil izključen vsak sum na WSD v skladu z diagnostičnimi metodami iz točke II.3.

- (b) Ko je med izvajanjem programa nadzora iz točke (a) potrjena okužba z WSSV v gojilnici, vključeni v navedeni program nadzora, in je bil zato preklican njen zdravstveni status kategorije II, lahko navedena gojilnica takoj ponovno pridobi zdravstveni status kategorije II in nadaljuje z izvajanjem programa nadzora za pridobitev statusa brez bolezni, ne da bi ji bilo treba izvesti program izkoreninjenja, kot je določeno v točki I.2.2., če:
 - (i) gre za celinsko gojilnico, katere zdravstveni status glede WSD je neodvisen od zdravstvenega statusa v okoliških naravnih vodah glede navedene bolezni s seznama v skladu s točko 3 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES;
 - (ii) je bila izpraznjena, očiščena in razkužena, njena proizvodnja pa je bila prekinjena; prekinitev proizvodnje mora trajati vsaj šest tednov;
 - (iii) je njen stalež bil obnovljen z raki, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede WSD.

I.2.2 Programi izkoreninjenja

I.2.2.1 Splošne zahteve

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede WSD lahko doseže zdravstveni status kategorije I glede navedene bolezni s seznama, ko je bil v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu izveden vsaj naslednji program izkoreninjenja:

- (a) učinkovito so bili izvedeni minimalni kontrolni ukrepi iz oddelka 4 poglavja V Direktive 2006/88/ES, v bližini gojilnic, uradno razglašene za okužene z WSD, pa je bilo vzpostavljeno območje z omejitvami, ki je določeno v členu 32(b) navedene direktive ter zajema okuženo in ogroženo območje.

Območje z omejitvami mora biti opredeljeno na podlagi vsakega primera posebej, ob upoštevanju dejavnikov, ki vplivajo na tveganja za širjenje WSD na gojene in divje rake, kot so število, stopnja in porazdelitev smrtnosti rakov v gojilnici, okuženih z WSD; oddaljenost od sosednjih gojilnic in gostota sosednjih gojilnic; kontaktne gojilnice; vrste rakov v gojilnicah; načini gojenja, ki se uporabljajo v prizadetih in sosednjih gojilnicah; hidrodinamične razmere in drugi ugotovljeni dejavniki epidemiološkega pomena.

Pri vzpostavitvi okuženih in ogroženih območij se uporabljajo naslednje minimalne zahteve:

- (i) okuženo območje se vzpostavi v neposredni bližini gojilnice, uradno razglašene za okuženo z WSD, ter:

1. na morskih območjih in območjih rečnega ustja: ustreza območju v krogu s polmerom, ki obsega vsaj območje plimovanja ali vsaj 5 km, katero koli je večje, s središčem v gojilnici, uradno razglašeni za okuženo z WSD, ali enakovrednemu območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki, ali
2. v sladkih vodah: ustreza celotnemu povodju gojilnice, uradno razglašene za okuženo z WSD; pristojni organ lahko obseg okuženega območja omeji na dele povodja, če to ne ogroža preprečevanja širjenja WSD;

- (ii) ogroženo območje se vzpostavi zunaj okuženega območja in:

1. na morskih območjih: ustreza območju prekrivajočih se območij plimovanja in obdaja okuženo območje ali območju, ki obdaja okuženo območje in se nahaja znotraj kroga s polmerom 10 km od središča okuženega območja; ali enakovrednemu območju, določenemu v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki, ali
2. v sladkih vodah: je kot razširjeno območje zunaj vzpostavljenega okuženega območja;

- (b) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES ter ki so na okuženem območju in niso uradno razglašene za okužene z WSD, se opravi uradna preiskava, ki zajema vsaj naslednje:

- (i) zbiranje vzorcev za testiranje 10 rakov, ko so opaženi klinični znaki ali *post mortem* znaki okužbe z WSD, ali 150 rakov, ko klinični znaki ali *post mortem* znaki niso opaženi, in
- (ii) en zdravstveni pregled; v tistih gojilnicah, v katerih so bili rezultati testov iz točke (i) negativni, se zdravstveni pregledi še naprej opravljajo enkrat mesečno v sezoni, ko je verjetno, da bo dosežena najvišja letna temperatura vode, dokler okuženo območje ni preklicano v skladu s točko I.2.2.1(c);

- (c) vse gojilnice, uradno razglašene za okužene z WSD, se izpraznijo, očistijo in razkužijo, njihova proizvodnja pa se prekine. Prekinitev proizvodnje traja vsaj šest tednov. Ko se izpraznijo vse gojilnice, uradno razglašene za okužene, se njihova proizvodnja za vsaj tri tedne sinhronizirano prekine. Ta odstavek se uporablja tudi za nove gojilnice, uradno razglašene za okužene v času izvajanja programa izkoreninjenja.

Med prekinitvijo proizvodnje gojilnic, uradno razglašanih za okužene, se okužena območja spremenijo v ogrožena območja.

Pristojni organ se lahko odloči zahtevati praznjenje, čiščenje, razkuževanje in prekinitev proizvodnje drugih gojilnic znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij. Trajanje navedene prekinitve proizvodnje določi pristojni organ na podlagi ocene tveganja za vsak primer posebej;

- (d) stalež vseh gojilnic, uradno razglašanih za okužene, in vseh drugih gojilnic s prekinjeno proizvodnjo znotraj vzpostavljenih okuženih in ogroženih območij se obnovi:
- (i) z raki, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede WSD, ali
 - (ii) v prehodnem obdobju do 31. decembra 2020, z raki iz držav članic, območij ali kompartmentov z odobrenim programom nadzora glede WSD.

Stalež se obnovi šele, ko so vse gojilnice, uradno razglašene za okužene z WSD, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja prekinjena v skladu s točko I.2.2.1(c);

- (e) v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES, v državi članici, na območju ali v kompartmentu, vključenem oz. vključenem v program izkoreninjenja, in, ko se zahteva nadzor pri divjih populacijah, na mestih vzorčenja, izbranih v skladu z drugim odstavkom točke 2 dela I Priloge V k navedeni direktivi, se naknadno izvede vsaj program iz točke I.2.1.

I.2.2.2 Zahteve za ponovno pridobitev statusa brez bolezní glede WSD za celinske kompartmente, ki zajemajo eno samo gojilnico, predhodno razglašeno za prosto WSD

Celinski kompartment, ki zajema eno samo gojilnico z zdravstvenim statusom kategorije I glede WSD, katere zdravstveni status glede navedene bolezní s seznama je neodvisen od okoliških naravnih voda v skladu s točko 3 dela II Priloge V k Direktivi 2006/88/ES in katere status kategorije I je bil preklican v skladu s členom 53(3) navedene direktive, lahko ponovno pridobi zdravstveni status kategorije I, takoj ko pristojni organ potrdi, da so izpolnjeni naslednji pogoji:

- (a) gojilnica z WSD je bila izpraznjena, očiščena in razkužena, njena proizvodnja pa je bila prekinjena; prekinitev proizvodnje je morala trajati vsaj šest tednov;
- (b) stalež gojilnice z WSD je bil obnovljen z raki, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I glede WSD.

I.3. Posebne zahteve za ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezní (kategorija I) glede WSD

Ko se zahteva ciljno usmerjen nadzor za ohranitev zdravstvenega statusa kategorije I, kot je določeno v členu 52 Direktive 2006/88/ES, se v vseh gojilnicah, kjer se gojijo dovzetne vrste s seznama iz dela II Priloge IV k navedeni direktivi, v zadevni državi članici, na zadevnem območju ali v zadevnem kompartmentu opravijo zdravstveni pregledi in vzorčenja v skladu s tabelo 6.B iz oddelka II, ob upoštevanju stopnje tveganja vnosa WSD v gojilnici.

V državah članicah, na območjih ali v kompartmentih, kjer je število gojilnic omejeno in ciljno usmerjen nadzor v navedenih gojilnicah ne zagotavlja zadostnih epidemioloških podatkov, programi nadzora za ohranitev statusa brez bolezní vključujejo mesta vzorčenja, izbrana v skladu z zahtevami iz točke I.1.

Navedena mesta vzorčenja se pregledajo in vzorčijo po načelu rotacije 50 % mest vzorčenja vsako leto. Vzorčenje se opravi v skladu s tabelo 6.B iz oddelka II. Vzorci se izberejo, pripravijo in pregledajo v skladu z diagnostičnimi metodami in metodami vzorčenja iz oddelka II, rezultati laboratorijskih preiskav glede povzročitelja WSD pa morajo biti negativni.

Status brez bolezni se ohrani le, dokler so rezultati testiranja vseh vzorcev, testiranih z uporabo diagnostičnih metod in metod vzorčenja iz točke II.2, negativni za WSD, prav tako pa je bil izključen vsak sum na WSD v skladu z uradno preiskavo in diagnostičnimi metodami iz točke II.3.

I.4 Zahteve za odpravo ukrepov obvladovanja, določenih v členu 39 Direktive 2006/88/ES (sprememba zdravstvenega statusa iz kategorije V v kategorijo III) glede WSD

Država članica, območje ali kompartment z zdravstvenim statusom kategorije V glede WSD lahko doseže zdravstveni status kategorije III glede navedene bolezni s seznama, če:

- (a) so izpolnjene zahteve iz točk I.2.2.1(a), (b) in (c). Če prekinitev proizvodnje ni tehnično izvedljiva, se v gojilnicah izvedejo alternativni ukrepi, ki na enak način zagotavljajo izkoreninjenje WSSV iz okolja gojilnice;
- (b) je bil stalež vseh gojilnic, uradno razglašeni za okužene z WSD, in vseh drugih gojilnic, katerih proizvodnja je bila prekinjena/na katerih so bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a) na vzpostavljenih okuženih in ogroženih območjih, obnovljen z raki, ki izvirajo iz držav članic, območij ali kompartmentov z zdravstvenim statusom kategorije I, II ali III glede WSD;
- (c) je bil stalež obnovljen šele, ko so bile vse gojilnice, uradno razglašene za okužene z WSD, izpraznjene, očiščene in razkužene ter je njihova proizvodnja bila prekinjena/so na njih bili izvedeni alternativni ukrepi v skladu s točko (a);
- (d) WSD ni bila dokazana v obdobju dveh let po zaključku ukrepov iz odstavkov (a) in (b), poleg tega pa so bili v tem obdobju izključeni sumi v skladu s postopki iz točke II.3.

II. **Diagnostične metode in metode vzorčenja**

II.1 Vzorci

Vzorci integumenta, bodisi seciranega bodisi še vedno v hodilkah, pleopodih, ustnem aparatu ali škrgah testne živali, se pred pripravo vzorcev za dvostopenjsko PCR fiksirajo v 95-odstotnem etanolu.

Lahko se zberejo drugi vzorci, fiksirani za histologijo in transmisijsko elektronsko mikroskopijo, v podporo diagnostičnih podatkov iz PCR.

II.2 Diagnostične metode za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede WSD

Diagnostična metoda, ki se uporablja za pridobitev ali ohranitev statusa brez bolezni glede WSD po natančnih metodah in postopkih iz dela 6 Priloge II, je dvostopenjska PCR.

V primeru pozitivnega rezultata pri dvostopenjski PCR se rezultat potrdi s sekvenciranjem amplikona pred izvedbo začetnih kontrolnih ukrepov iz člena 28 Direktive 2006/88/ES, če je to možno pod praktičnimi pogoji s prikazom patognomičnih znakov WSD pri navedenih dovzetnih živalih gostiteljskih s histologijo in transmisijsko elektronsko mikroskopijo.

II.3 Uradna preiskava in diagnostične metode za izključitev suma ali potrditev prisotnosti okužbe z WSD

Ko je treba prisotnost okužbe z WSD potrditi ali sum na takšno okužbo izključiti v skladu s členom 28 Direktive 2006/88/ES, se izvedejo naslednji pregledi, vzorčenja in testiranja:

- (a) uradna preiskava vključuje vsaj en zdravstveni pregled in eno vzorčenje 10 rakov, ko so opaženi klinični ali *post mortem* znaki, ki ustrezajo znakom okužbe z WSD, ali 150 rakov, ko klinični ali *post mortem* znaki niso opaženi. Vzorci se testirajo v skladu z diagnostično metodo iz točke II.2. (dvostopenjska PCR);

- (b) prisotnost WSD se šteje za potrjeno, ko je dvostopenjska PCR, ki ji sledi sekvenciranje, v skladu z natančnimi metodami in postopki iz tega dela 6 Priloge II pozitivna za WSSV in so v izbrani živali gostiteljici prisotni patognomični znaki WSD.

Sum na WSD je mogoče izključiti, če navedeni testi ne pokažejo nadaljnjih dokazov o prisotnosti WSD.

Tabela 6.A

Sistem nadzora za države članice, območja in kompartmente za dvoletno kontrolno obdobje pred doseg statusa brez bolezni glede WSD iz točke I.2.1

	Število kliničnih pregledov na leto	Število laboratorijskih preiskav na leto	Število rakov v vzorcu
Gojilnice/območja vzorčenja	1	1	150

Tabela 6.B

Sistem nadzora za države članice, območja ali kompartmente za ohranitev statusa brez bolezni glede WSD, kot je navedeno v točki I.3

Stopnja tveganja	Število zdravstvenih pregledov	Število laboratorijskih preiskav	Število rakov v vzorcu
Visoka	1 na leto	1 na 2 leti	150
Srednja	1 na 2 leti	1 na 2 leti	150
Nizka	1 na 2 leti	1 na 4 leta	150

PRILOGA II

NATANČNE DIAGNOSTIČNE METODE IN POSTOPKI

I. Uvod

Ta priloga določa natančne postopke za diagnostične metode, ki se uporabljajo za laboratorijske preiskave v okviru programov izkoreninjenja in nadzora iz Priloge I k temu sklepu ter za potrditev ali izključitev suma prisotnosti naslednjih neeksotičnih boleznih s seznama iz dela II Priloge IV k Direktivi 2006/88/ES (v nadaljnjem besedilu: bolezni s seznama) v skladu s členom 57(b) navedene direktive:

1.	Virusna hemoragična septikemija (VHS)	del 1
2.	Infekciозна hematopoetska nekroza (IHN)	del 1
3.	Koi herpes viroza (KHV)	del 2
4.	Infekciозна anemija lososov (ISA)	del 3
5.	Okužba z <i>Marteilia refringens</i>	del 4
6.	Okužba z <i>Bonamia ostreae</i>	del 5
7.	Bolezen belih pik (WSD)	del 6

II. Opredelitev pojmov

V tej prilogi „transportno gojišče“ pomeni gojišče celične kulture z 10-odstotnim telečjim serumom ter 200 IU penicilina, 200 µg streptomicina in 200 µg kanamicina na mililiter ali z drugimi antibiotiki z dokazano učinkovitostjo.

DEL 1

NATANČNE DIAGNOSTIČNE METODE IN POSTOPKI ZA NADZOR IN POTRDI TEV IHN IN VHS

I. Diagnostične metode in postopki za nadzor VHS in IHN

Pri vzorčenju in laboratorijskih preiskavah za pridobitev ali ohranitev zdravstvenega statusa brez bolezni glede IHN ali VHS, kot je določeno v oddelku I dela 1 Priloge I, z uporabo diagnostičnih metod iz točk II.1 in II.2 dela 1 navedene priloge se uporabljajo natančne diagnostične metode in postopki iz naslednjih točk od I.1 do I.6.

I.1 Priprava in pošiljanje vzorcev rib

I.1.1 Tkiva za virološko preiskavo na celični kulturi

Preden se deli organov za preiskavo odpošljejo ali prenesejo v laboratorij, se odstranijo iz ribe s sterilnim secirnim orodjem in prenesejo v sterilne plastične epruvete, ki vsebujejo transportno gojišče.

Količina organov in tkiv rib, ustreznih za virološko preiskavo na celični kulturi in RT-qPCR, je odvisna od velikosti rib. Tako so tkiva za vzorčenje lahko celoten zarod z mešičkom (dolžina telesa < 4 cm), notranji organi, vključno z ledvicami (4 cm < dolžina telesa < 6 cm) ali, pri večjih ribah, ledvice, vranica, srce in/ali možgani ter ovarialna tekočina plemenk v času drstenja.

Ovarialna ali semenska tekočina ali kosi organov največ 10 rib se lahko zberejo v eno sterilno epruveto, ki vsebuje najmanj 4 ml transportnega gojišča, in predstavljajo en združen vzorec. Tkivo v vsakem vzorcu tehta najmanj 0,5 grama (g).

Virološka preiskava na celični kulturi se začne čim prej, najpozneje pa v 48 urah po zbiranju vzorcev. V izjemnih primerih se virološka preiskava lahko začne najpozneje v 72 urah po zbiranju organov in tkiv, če je material za preiskavo zaščiten s transportnim gojiščem in je mogoče med transportom izpolniti zahteve glede temperature.

I.1.2 Vzorci za verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkripcijo (RT-PCR ali RT-qPCR)

Vzorci rib se odvzamejo v skladu s postopkom iz točke I.1.1 z uporabo sterilnega instrumenta in prenesejo v sterilne plastične epruvete, ki vsebujejo transportno gojišče. Tkivo 10 rib se lahko zbere v eno epruveto, predstavlja pa en združen vzorec. Če pa je količina inokuluma majhna, se lahko uporabi tkivo do največ petih rib. Druga možnost je, da se vzorci lahko združujejo v RNK stabilizacijskih reagentih, kot je 0,2 g tkiva/ml reagenta v skladu s priporočilom proizvajalcev, čeprav se vsaka riba posamezno predela in se vzorci ne združujejo zaradi majhne količine organov in tkiv, ki se uporablja za ekstrakcijo.

V laboratorij se lahko pošljejo tudi cele ribe.

I.2 Pošiljanje vzorcev za ribe

Epruvete, ki vsebujejo ribja tkiva v transportnem gojišču za gojenje celic ali analizo RT-PCR/RT-qPCR, se dajo v izolirne posode, na primer polistirenske škatle z debelimi stenami, z dovolj ledu ali z alternativnim hladilnim medijem s podobnim učinkom hlajenja za zagotovitev hlajenja vzorcev med transportom v laboratorij. Vendar je treba preprečiti zamrznitev vzorcev. Temperatura vzorca med transportom nikoli ne sme preseči 10 °C, ob njihovem sprejemu pa mora v transportni škatli še vedno ostati led oz. en ali več zamrzovalnih elementov mora biti še vedno delno ali v celoti zamrznjenih.

V laboratorij se lahko pošljejo cele ribe, če je med transportom mogoče izpolniti zahteve glede temperature iz prvega odstavka. Cele ribe se zavijejo v vpojni papir in se nato pošljejo v plastični vrečki. Lahko se pošljejo tudi žive ribe.

I.3 Zbiranje dodatnega diagnostičnega materiala

Če diagnostični laboratorij to odobri, se za dopolnilne preiskave lahko odvzamejo in pripravijo tudi druga ribja tkiva.

I.4 Priprava vzorcev za preiskavo celične kulture in RT-qPCR

I.4.1 Zamrznitev v izjemnih primerih

V primeru praktičnih težav, ki onemogočajo obdelavo vzorcev v 48 urah po odvzemu ribjih tkiv, je sprejemljivo zamrzniti vzorce tkiv v transportnem gojišču pri – 20 °C ali nižji temperaturi in opraviti virološko preiskavo v 14 dneh. Vendar se ribje tkivo zamrzne in odmrzne samo enkrat pred preiskavo. Vodi se evidenca s podrobnostmi o razlogih za vsako zamrznitev vzorcev ribjih tkiv.

I.4.2 Homogenizacija organov

V laboratoriju se ribje tkivo v epruvetah popolnoma homogenizira s stomaherjem, z mešalcem ali s pestilom v terilnici s sterilnim peskom, nato pa suspendira v prvotnem transportnem gojišču.

Če vzorec sestavljajo cele ribe, krajše od 4 cm, se po odstranitvi telesa za zadnjično odprtino seseklajo s sterilnimi škarjami ali skalpelom. Če vzorec sestavljajo cele ribe z dolžino telesa med 4 in 6 cm, se zberejo notranji organi, vključno z ledvicami. Če vzorec sestavljajo cele ribe, daljše od 6 cm, se zberejo vzorci tkiv, kot je opisano v točki I.1. Vzorci tkiva se seseklajo s sterilnimi škarjami ali skalpelom ter homogenizirajo, kot je opisano v prvem odstavku te točke, in suspendirajo v transportnem gojišču.

Končno razmerje med tkivnim materialom in transportnim gojiščem se v laboratoriju prilagodi na 1: 10.

I.4.3 Centrifugiranje homogenata

Homogenat se 15 minut centrifugira v hlajeni centrifugi pri temperaturi od 2 °C do 5 °C pri 2 000 do 4 000 × g, supernatant pa se zbere in obdela bodisi štiri ure pri 15 °C bodisi čez noč pri 4 °C do 8 °C z antibiotiki. Če je bil vzorec poslan v transportnem gojišču, se obdelava supernatanta z antibiotiki lahko izpusti.

V primeru praktičnih težav, kot je okvara inkubatorja ali težave s celičnimi kulturami, ki onemogočajo inokulacijo celic v 48 urah po zbiranju vzorcev ribjega tkiva, se supernatant lahko zamrzne pri – 80 °C in virološka preiskava opravi v 14 dneh.

Če se zbrani supernatant v 48 urah po vzorčenju shrani pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se lahko ponovno uporabi samo enkrat za virološko preiskavo.

Pred inokulacijo celic se supernatant zmeša z enakimi deli ustrezno razredčenih združenih protiserumov proti avtohtonim serotipom virusa nalezljive nekroze trebušne slinavke (IPN) in s tem inkubira najmanj eno uro pri $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali največ 18 ur pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Titer protiseruma je vsaj $1/2\ 000$ pri nevtralizacijskem testu 50-odstotne redukcije plakov.

Namen obdelave vseh inokulumov s protiserumom proti virusu IPN je preprečiti razvoj citopatskega efekta (CPE) zaradi virusa IPN v inokuliranih celičnih kulturah. To bo skrajšalo virološke preiskave in zmanjšalo število primerov, pri katerih bi bilo treba pojav CPE šteti za morebitno indikacijo VHSV ali IHNIV.

Pri vzorcih iz proizvodnih enot, ki se štejejo za proste IPN, se obdelava inokulumov s protiserumom proti virusu IPN lahko izpusti.

I.4.4 Priprava vzorca za programe nadzora, ki temeljijo na RT-PCR in RT-qPCR

Če so bili vzorci zbrani v transportnem gojišču, se izvede postopek iz točk I.4.2 in I.4.3. Po centrifugiranju se zbere supernatant in ekstrahira RNK. Če se dodatne preiskave ne bodo opravljale takoj po centrifugiranju, se vzorci takoj zamrznejo pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali nižji temperaturi.

Za analizo ribjih tkiv, shranjenih v RNK stabilizacijskem reagentu, se nadaljnji postopki za vzorce, shranjene pri različnih temperaturah, opravijo v naslednjih časovnih okvirih:

vzorci, shranjeni pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: v enem dnevu;

vzorci, shranjeni pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$: v enem tednu;

vzorci, shranjeni pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: v enem mesecu;

vzorci, shranjeni pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: ni omejeno

Združeni vzorci v RNK stabilizacijskem reagentu se obdelajo kot posamezni vzorci v RNK stabilizacijskem reagentu. V primeru vzorcev, združenih v RNK stabilizacijskem reagentu, količina vzorca ne presega količine, ki jo priporoča proizvajalec pripomočkov za ekstrakcijo RNK, kot so pripomočki RNeasy Mini Kits (Qiagen) ali podobno. Če se združijo večji vzorci, morajo pripomočki ali metode za ekstrakcijo to tudi odražati.

Vzorci, zbrani v RNK stabilizacijskem reagentu, se ne uporabijo za gojenje celic.

I.4.5 Združevanje vzorcev za RT-qPCR

Ker je občutljivost danih protokolov RT-qPCR podobna ali večja od občutljivosti metod gojenja celic, je sprejemljivo uporabiti supernatant iz homogeniziranega ribjega tkivnega materiala združenih organov največ 10 rib v gojišču celične kulture za PCR. Vendar se vsa ribja tkiva zaradi precej manjšega inokuluma za PCR v primerjavi s tistim za gojenje celic previdno homogenizirajo pred zbiranjem organov in tkiv za ekstrakcijo.

Enako načelo se uporablja tudi, če se vzorci zbirajo v RNK stabilizacijskih reagentih. Vendar je v navedenem primeru pogosto težko zbrati reprezentativne organe in tkiva za do 10 rib v eni epruveti, zato se število rib, ki se lahko združijo, zmanjša na 2 do 5.

I.5 Virološka preiskava na celični kulturi

I.5.1 Celične kulture in gojišča

Celična linija -2 ribjih mladice sončnega ostriža (BF-2) ali celična linija gonade šarenke -2 (RTG-2) ter bodisi *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) bodisi celice črnohlavega pisanca (FHM) se gojijo pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ na ustreznem gojišču, in sicer na gojišču Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ali njegovih modifikacijah z dodatkom 10-odstotnega fetalnega govejega seruma in antibiotikov v standardnih koncentracijah.

Ko se celice gojijo v zaprtih fiolah, se priporoča puferiranje gojišča z bikarbonatom. Gojišče, ki se uporablja za gojenje celic v odprtih enotah, se lahko puferira s tris(hidroksimetil)aminometan-HCl (Tris-HCl) (23 mM) in natrijevim bikarbonatom (6 mM). Vrednost pH mora biti $7,6 \pm 0,2$.

Celične kulture, ki se uporabijo za inokulacijo z ribjim tkivnim materialom, so mlade, običajno en dan stare monoslojne celične kulture, kadar je to mogoče; vendar se sprejmejo tudi, če so stare od 4 ure do 48 ur. Pri inokulaciji morajo celice rasti aktivno.

I.5.2 Inokulacija celičnih kultur

Z antibiotikom obdelana suspenzija organov se inokulira v celične kulture v dveh razredčitvah, in sicer v primarni razredčitvi in v razredčitvi primarne razredčitve v razmerju 1: 10, tako da sta končni razredčitvi tkivnega materiala v gojišču celične kulture 1: 100 oz. 1: 1 000, da se prepreči homologna interferenca. Vsaj dve celični liniji se inokulirata, kot je navedeno v točki I.5.1. Razmerje med velikostjo inokuluma in količino gojišča celične kulture je približno 1: 10.

Za vsako razredčitev in vsako celično linijo se uporabi najmanj približno 2 cm² celične površine, ki ustreza eni jamici na pladnju s celičnimi kulturami in s 24 jamicami. Pladnji s celičnimi kulturami se uporabljajo, kadar je to mogoče.

I.5.3 Inkubacija celičnih kultur

Inokulirane celične kulture se inkubirajo od sedem do deset dni pri 15 °C. Če se barva gojišča celične kulture spremeni iz rdeče v rumeno, kar kaže na zakisanje gojišča, se pH prilagodi s sterilno raztopino bikarbonata ali enakovrednih snovi, da se zagotovi dovzetnost celic za okužbo z virusom.

Vsaj vsakih šest mesecev ali v primeru suma zmanjšane dovzetnosti celic se titrirajo zamrznjene zaloge VHSV in IHNV, da se preveri dovzetnost celičnih kultur za okužbo. Postopek iz oddelka III se uporabi, če je to mogoče.

I.5.4 Mikroskopija

Inokulirane celične kulture se redno pregledujejo, in sicer vsaj trikrat na teden, na pojav CPE pri 40- do 150-kratni povečavi. Če se opazi očiten CPE, se takoj začnejo postopki za določitev virusa v skladu s točko I.6.

I.5.5 Subkultivacija

Če se po primarni 7- do 10-dnevni inkubaciji CPE ne razvije, se opravi subkultivacija nove celične kulture z uporabo celične površine, podobne površini pri primarni kulturi.

Alikvoti gojišča (supernatant) iz vseh kultur ali jamic, ki sestavljajo primarno kulturo, se združijo glede na celično linijo od 7 do 10 dni po inokulaciji. Združeni vzorci se nato inokulirajo v homologne celične kulture, nerazredčene in razredčene v razmerju 1: 10 (kar pomeni končni razredčitvi supernatanta 1: 10 oz. 1: 100), kot je opisano v točki I.5.2. Druga možnost je, da se alikvoti 10 % gojišča, ki sestavlja primarno kulturo, inokulirajo neposredno v jamico s svežo celično kulturo (tj. subkultivacija iz jamice v jamico). Pred inokulacijo se lahko izvede predinkubacija razredčitev s protiserumom proti virusu IPN pri ustrezni razredčitvi, kot je opisano v točki I.4.3.

Inokulirane kulture se nato inkubirajo od 7 do 10 dni pri 15 °C ter se pregledajo v skladu s točko I.5.4.

Če se toksični CPE pojavi v prvih treh dneh inkubacije, se v tej fazi opravi subkultivacija, vendar se celice potem inkubirajo sedem dni in se opravi ponovna subkultivacija z nadaljnjo sedemdnevno inkubacijo. Ko se toksični CPE razvije po treh dneh, se celice enkrat presadijo in inkubirajo, da se doseže skupaj 14 dni od primarne inokulacije. V zadnjih sedmih dneh inkubacije se ne smejo pojaviti znaki toksičnosti.

Če se kljub tretiranju z antibiotiki pojavi bakterijska okužba, se pred subkultivacijo opravi centrifugiranje pri 2 000 do 4 000 × g za 15 minut do 30 minut pri 2 °C do 5 °C ali filtriranje supernatanta skozi filter 0,45 μm ali oboje (filter, ki veže beljakovine z nizko molekulsko maso). Poleg tega subkultivacija poteka po enakih postopkih, kot so opisani za toksični CPE v četrtem odstavku te točke.

Če se CPE ne pojavi, se rezultati testov lahko razglasijo za negativne.

I.6 Določanje virusa

Če je bil v celični kulturi opažen CPE, se gojišče (supernatant) zbere in pregleda po enem ali več od naslednjih postopkov, in sicer z encimsko-immunskim testom (ELISA), indirektno imunofluorescenco (IF), nevtralizacijo, RT-PCR ali RT-qPCR. Če ti testi niso omogočili dokončne določitve virusa v enem tednu, se supernatant pošlje nacionalnemu referenčnemu laboratoriju ali referenčnemu laboratoriju EU za bolezni rib iz Priloge VI k Direktivi 2006/88/ES za takojšnjo določitev.

I.6.1 ELISA

Za določitev izolata virusa se opravi dvojna sendvič ELISA za dokaz protiteles. Mikrotitrne plošče se premažejo s 50 µl/jamico (0,9 pg) dokazano kakovostnih imunoglobulinov (Ig), očiščenih proteina A, iz kunčjega protiseruma proti IHNV ali VHSV, razredčenega v karbonatnem pufru (pH 9,6), ki vsebuje 15 mM natrijevega azida, in inkubiranega od 18 ur do 2 tedna pri 4 °C.

Na mikrotitrski plošči s pripravljenimi razredčitvami se vsak vzorec, ki vsebuje 1-odstotni Triton X-100 in pozitivne kontrole, razredči s pufrsko raztopino (in sicer s fosfatno pufrano slanico (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) v 4-kratni razredčitvi, in sicer nerazredčen ter v razmerjih 1: 4, 1: 16, 1: 64. Mikrotitrne plošče ELISA se sperejo v PBS, ki vsebuje 0,05-odstotni Tween-20 (PBS-T), 50 µl vsake razredčitve pa se prenese z mikrotitrne plošče s pripravljenimi razredčitvami na sprano in premazano mikroploščo ELISA.

Mikrotitrne plošče ELISA se nato inkubirajo 30 minut pri 37 °C. Potem se mikrotitrne plošče sperejo in inkubirajo 30 minut pri 37 °C s posebnimi monoklonskimi protitelesi (in sicer MAb IP5B11 za določitev VHSV oz. Hyb 136-3 za določitev IHNV). Na mikrotitrsko ploščo ELISA se prenese 50 µl hrenove peroksidaze (HRP), konjugirane s kunčjimi protimišji protitelesi in razredčene v razmerju 1: 1 000 v PBS-T-BSA.

Nazadnje se po ponovnem spiranju razvijejo reakcije z dodajanjem 50 µl/jamico orto-fenilendiamina (OPD). Mikrotitrne plošče ELISA se inkubirajo 20 minut pri sobni temperaturi v temi, reakcija pa se ustavi z dodajanjem 100 µl/jamico 0,5 M H₂SO₄.

Absorbanca se spremlja pri valovnih dolžinah 492 nm in 620 nm na čitalniku testa ELISA. Vzorci se opredelijo kot pozitivni ali negativni po primerjavi rezultatov testa z vrednostmi absorbance za pozitivne in negativne kontrole. Na splošno se vzorci s kombinirano absorbanco (A) < 0,5 za nerazredčen material štejejo za negativne, vzorci z vrednostmi A med 0,5 in 1,0 se štejejo za sumljive, vzorci z vrednostmi A > 1,0 pa se štejejo za pozitivne.

Namesto testov ELISA iz te točke se lahko uporabijo druge različice testa ELISA z dokazano podobno učinkovitostjo.

I.6.2 Imunofluorescenca – IF

Patogeni VHSV in IHNV s seznama se določajo z okužbo celic na 96-jamični mikrotitrski plošči „Black“, konvencionalnih 24-jamičnih mikrotitrskih ploščah ali pokravnih stekelcih na 24-jamičnih mikrotitrskih ploščah. Pri določanju IHNV ali VHSV ali obeh virusov z okužbo celic na pokravnih stekelcih se uporabi naslednji protokol:

- (a) pokrivna stekelca se nasadijo s celicami z gostoto, ki vodi do 60- do 90-odstotne konfluente po 24 urah gojenja. Kadar je mogoče, se v ta namen uporabijo celice EPC, ker se na stekleno površino močno prilepijo, vendar se lahko uporabijo tudi druge celične linije, kot so BF-2, RTG-2 ali FHM. 150 µl supernatanta celične kulture v dveh različnih razredčitvah (1: 10 in 1: 1 000) se inokulira v dveh ponovitvah na en dan starih monoslojih in inkubira 24 ur pri 15 °C;
- (b) nato se gojišče celične kulture odstrani, okuženi celični monosloji pa se fiksirajo z 0,5 ml ledeno mrzle vodne raztopine acetona (80 % vol:vol). Fiksacija poteka 15 minut v komori za odsesavanje dima pri sobni temperaturi, nato se raztopina acetona odstrani, pokrivna stekelca pa se vsaj 30 minut sušijo na zraku. Na tej stopnji se mikrotitrne plošče bodisi takoj obdelajo bodisi shranijo pri – 20 °C za nadaljnjo uporabo;
- (c) specifična monoklonska protitelesa (in sicer MAb IP5B11 za določitev VHSV oz. Hyb 136-3 za določitev IHNV) se razredčijo v 0,01 M PBST, pH 7,2 v razredčitvi, ki jo priporoča proizvajalec monoklonskih protiteles; 50 µl/jamico do 100 µl/jamico se doda fiksiranemu monosloju, mikrotitrne plošče pa se inkubirajo eno uro pri 37 °C v vlažni komori;

- (d) pokrivna stekelca se nežno trikrat sperejo s PBS, ki vsebuje 0,05-odstotni Tween-20 (PBS-T), pufer pa mora biti po zadnjem spiranju v celoti odstranjen. Celice se nato inkubirajo eno uro pri 37 °C s protitelesi proti mišjim imunoglobulinom, konjugiranimi s fluorescein izotiocianatom (FITC) ali tetrametilrodamin-5 (in -6) izotiocianatom (TRITC), ki se uporablja kot primarno protitelo, nato se razredčijo v skladu z navodili dobavitelja, ponovno sperejo v PBS-T in posušijo. Obarvane kulture se namestijo na pokrivna stekelca z uporabo solne raztopine glicerola in se pregledajo pod vpadno ultravijolično (UV) svetlobo. Uporabijo se 10 × oz. 12 × okularji in × 25 oz. × 40 objektna leča s številčnimi aperturami > 0,7 oz. > 1,3.

Namesto tega se glede na celične kulture, fiksacijo in protitelesa referenčne kakovosti lahko uporabijo druge tehnike IF z dokazano podobno učinkovitostjo.

I.6.3 Nevtralizacija

Celice iz zbranega supernatanta se odstranijo s centrifugiranjem (od 2 000 × g do 4 000 × g) ali membransko filtracijo (0,45 μm) s filtrom, ki veže beljakovine z nizko molekulsko maso, supernatant pa se razredči v razmerju 1: 100 in 1: 10 000 v gojišču celične kulture.

Alikvoti najmanj dveh razredčitev supernatanta se zmešajo in ločeno inkubirajo 60 minut pri 15 °C z enakimi deli naslednjih reagentov:

- (a) serum, ki vsebuje protitelo, specifično za zadevno skupino, proti VHSV pri razredčitvi 1: 50 (vol:vol);
- (b) serum, ki vsebuje protitelo, specifično za zadevno skupino, proti IHNV pri razredčitvi 1: 50 (vol:vol);
- (c) združeni vzorci protiserumov proti avtohtonim serotipom IPNV pri razredčitvi 1: 50 (vol:vol);
- (d) samo gojišče (pozitivna kontrola).

Iz vsake virusne mešanice supernatanta in seruma se inokulirata vsaj dve celični kulturi, vsaka s 50 μl, nato pa inkubirata pri 15 °C. Razvoj CPE se preverja, kot je opisano v točki I.5.4.

Sevi in izolati VHSV, ki pri nevtralizacijskih testih ne reagirajo, se določajo z metodo IF ali ELISA.

Namesto tega se lahko uporabijo drugi nevtralizacijski testi z dokazano podobno učinkovitostjo.

I.6.4 RT-PCR/ RT-qPCR

I.6.4.1 Priprava virusne RNK

Vse delo z RNK se opravlja na ledu z uporabo rokavic.

RNK se ekstrahira z metodo s fenol-kloroformom ali centrifugalnimi kolonami za afiniteto do RNK v skladu z navodili proizvajalca. Lahko se uporabijo komercialno dostopni kompleti za ekstrakcijo RNK, ki bodo zagotovili visoko kakovostno RNK, primerno za uporabo s protokoli RT-PCR, ki so podrobno opisani v spodnjih točkah.

RNK se ponovno suspendira v destilirani RNaz prosti vodi (tj. v vodi, tretirani z 0,1-odstotnim dietil pirokarbonatom) ali ustreznem elucijskem pufru.

I.6.4.2 RT-PCR

Za dokazovanje IHNV se uporabljata naslednja začetna oligonukleotida:

smiselni začetni oligonukleotid 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3';

protismiselni začetni oligonukleotid 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Uporabljajo se naslednji cikli (enostopenjska RT-PCR): 1 cikel: 30 minut pri 50 °C; 1 cikel: 2 minuti pri 95 °C; 30 ciklov: 30 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 50 °C, 60 sekund pri 72 °C; 1 cikel: 7 minut pri 72 °C in namakanje pri 4 °C.

Za dokazovanje VHSV se uporabljata naslednja začetna oligonukleotida:

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

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

Uporabljajo se naslednji cikli (enostopenjska RT-PCR): 30 minut pri 50 °C, 15 minut pri 95 °C, 35 ciklov po 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 55 °C in 60 sekund pri 68 °C. Nato se reakcija vzdržuje 7 minut pri 68 °C.

Količina in specifičnost reakcij RT-PCR se ocenjujeta z gelsko elektroforezo v 1,5-odstotnem agaroznem gelu z etidijevim bromidom ter opazujeta z uporabo presvetlitve z UV. Za IHNV je možno opaziti 693 bp PCR amplikon. Za VHSV je velikost 505 bp.

Rezultati PCR se lahko razlikujejo glede na pogoje, pod katerimi se ta test izvaja, in sicer je morda potrebna optimizacija temperaturnih pogojev reakcije pomnoževanja, odvisno od cikličnega termostata v uporabi. Poleg tega lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov zaradi lažnega prileganja začetnega oligonukleotida ali laboratorijske kontaminacije. V izogib morebitnih dvomov se vključijo ustrezne pozitivne in negativne kontrole ter sekvenčni amplikoni. Za začetne oligonukleotide za VHSV je potrebna posebna pozornost pri uporabi celic BF-2, saj začetni oligonukleotidi lahko reagirajo z DNK/RNK celične linije z lažno pozitivnimi rezultati podobne velikosti. Pri testiranju supernatanta iz celic BF-2 se sekvencirajo amplificirani odseki z metodo PCR.

I.6.4.3 RT-qPCR za VHSV

Za VHSV se amplifikacija opravi z uporabo naslednjih začetnih oligonukleotidov in sonde:

Smiselni začetni oligonukleotid: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3';

Protismiselni začetni oligonukleotid: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3',

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

Enostopenjska RT-qPCR:

Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Pogoji pomnoževanja: 30 minut pri 50 °C, 15 minut pri 95 °C, 40 ciklov po 15 sekund pri 94 °C, 40 sekund pri 60 °C in 20 sekund pri 72 °C; po potrebi se prilagodi. Namesto tega se lahko uporabijo druge različice testov RT-PCR ali RT-qPCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

I.6.4.4 RT-qPCR za IHNV

Za IHNV se amplifikacija opravi z uporabo naslednjih začetnih oligonukleotidov in sonde:

Smiselni začetni oligonukleotid: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3';

Protismiselni začetni oligonukleotid: 5'-TTCTTTGCGGCTTGGTTGA-3'

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

Dvostopenjska RT-qPCR:

Naslednji test temelji na dvostopenjski amplifikaciji, zato je od ene do druge reakcije potrebna posebna pozornost pri ravnanju z epruvetami, da se prepreči kontaminacija.

Pogoji pomnoževanja (po stopnji RT): 2 minuti pri 50 °C, 10 minut pri 95 °C, čemur sledi 40 ciklov po 15 sekund pri 95 °C in 1 minuto pri 60 °C; po potrebi se prilagodi.

Namesto tega se lahko uporabijo druge različice testov RT-PCR ali RT-qPCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

II. **Natančne diagnostične metode in postopki za potrditev ali izključitev suma na VHS in IHN ali obe bolezni pri sumih izbruhov**

Ko se zahteva laboratorijska preiskava za potrditev ali izključitev prisotnosti IHN ali VHS ali obeh bolezni v skladu s členom 57(b) Direktive 2006/88/ES z uporabo diagnostičnih metod iz točke II.3 dela 1 Priloge I, se uporabijo naslednje natančne diagnostične metode in postopki:

- (a) konvencionalna izolacija virusa z naknadno seroneutralizacijo, imunokemijskim ali molekularnim določanjem virusa;
- (b) dokazovanje virusa z RT-PCR ali RT-qPCR;
- (c) drugi diagnostični postopki, kot so IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

- II.1 Konvencionalna izolacija virusa z naknadnim določanjem virusa
- II.1.1 Izbira vzorcev
- Za preiskavo se izbere vsaj 10 rib, ki kažejo tipične znake IHN ali VHS.
- II.1.2 Priprava in pošiljanje vzorcev iz rib
- Priprava in pošiljanje za namene konvencionalne izolacije virusa se izvajata v skladu z metodami in postopki iz točke I.2.
- II.1.3 Zbiranje dodatnega diagnostičnega materiala
- Dodatni material za namene konvencionalne izolacije virusa se zbira v skladu z metodami in postopki iz točke I.3.
- II.1.4 Priprava vzorcev za preiskavo celične kulture
- Vzorci za preiskavo celične kulture za namene konvencionalne izolacije virusa se pripravijo v skladu z metodami in postopki iz točke I.4.
- II.1.5 Virološka preiskava na celični kulturi
- Virološka preiskava za namene konvencionalne izolacije virusa se izvaja v skladu z metodami in postopki iz točke I.5.
- II.1.6 Določanje virusa
- Za namene konvencionalne izolacije virusa se virus določa v skladu z metodami in postopki iz točke I.6.
- II.2 Dokazovanje virusa z RT-qPCR
- II.2.1 Izbira vzorcev
- Vzorci za namene dokazovanja virusa z RT-qPCR se izberejo v skladu z metodami in postopki iz točke I.1.2.
- II.2.2 Priprava in pošiljanje vzorcev iz rib
- Priprava in pošiljanje za namene dokazovanja virusa z RT-qPCR se izvajata v skladu z metodami in postopki iz točke I.2.
- II.2.3 Zbiranje dodatnega diagnostičnega materiala
- Dodatni diagnostični material za namene dokazovanja virusa z RT-qPCR se zbira v skladu z metodami in postopki iz točke I.3.
- II.2.4 Priprava vzorcev za RT-qPCR
- Vzorci za namene dokazovanja virusa z RT-qPCR se pripravijo v skladu z metodami in postopki iz točke I.6.4.1.
- II.2.5 RT-qPCR
- Dokazovanje virusa z RT-qPCR poteka v skladu z metodami in postopki iz točk I.6.4.1, I.6.4.3 in I.6.4.4.
- II.3 Drugi diagnostični postopki
- Supernatant, pripravljen v skladu s točko I.4.3, se lahko testira s postopkom ELISA, indirektnim fluorescenčnim testom za dokazovanje protiteles (IFAT) ali postopkom RT-PCR v skladu s točko I.6.1, I.6.2 oz. I.6.4. Tkivni material se lahko pregleda z drugimi diagnostičnimi postopki, kot sta IFAT na zamrznjenih rezinah in imunohistokemija na tkivnem materialu, fiksiranem v formalinu. Navedeni hitri postopki se v 48 urah po vzorčenju dopolnijo z virološko preiskavo v skladu s točko II(a) ali točko II(b), če:
- (a) je rezultat negativen ali
- (b) je pozitiven rezultat pridobljen z materialom, ki predstavlja prvi primer IHN ali VHS.

III. Postopek titracije za preverjanje dovzetnosti celičnih kultur za okužbo

Pri titraciji za preverjanje dovzetnosti celičnih kultur za okužbo, kot je navedeno v točki I.5.3, se uporabijo postopki iz naslednjih odstavkov te točke.

Uporabijo se vsaj dva izolata VHSV in en izolat IHNV. Izolati naj predstavljajo večjo skupino virusov v Evropski uniji, in sicer en izolat patogena šarenke v sladki vodi in en morski izolat patogena romba za VHSV ter en sev patogena šarenke iz Evropske unije za IHNV. Uporabijo se dobro opredeljeni izolati iz držav članic. Šarže virusa, namnoženega na celični liniji z nizkim številom pasaž, se razmnožujejo v stekleničkah s celično kulturo na celicah BF-2 ali RTG-2 za VHSV in na celicah EPC ali FHM za IHNV. Uporabi se gojišče celične kulture z vsaj 10-odstotnim serumom. Pri inokulaciji se uporabi nizka multipliciteta okužbe (MOI) (< 1).

Pri skupnem CPE se virus pridobiva s 15-minutnim centrifugiranjem supernatanta celične kulture pri $2\,000 \times g$, filtersko sterilizira skozi $0,45 \mu\text{m}$ membranski filter in porazdeli v označene krioepruvete. Virus se hrani pri $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

En teden po zamrznitvi se tri fiole z reproducirano vsebino vsakega virusa odmrznejo pod mrzlo vodo in titrirajo na svojih ustreznih celičnih linijah. Vsak izolat virusa se odmrzne in titrira vsaj vsakih šest mesecev ali če obstaja sum, da se je dovzetnost celične linije zmanjšala.

Titracijske postopke je treba podrobno opisati, vsakič pa je treba uporabiti enak postopek.

Titracija s končno razredčitvijo zajema vsaj šest replikacij v vsakem koraku redčenja. Titri se primerjajo s predhodno pridobljenimi titri. Če titer katerega koli od treh izolatov virusa v primerjavi z začetnim titrom pade za faktor $\log 2$ ali več, se celična linija ne uporablja več za namene nadzora.

Če se v laboratoriju hranijo različne celične linije, se vsaka linija pregleda ločeno.

Evidenca se hrani vsaj 10 let.

DEL 2

NATANČNE DIAGNOSTIČNE METODE IN POSTOPKI ZA NADZOR IN POTRDIČEV BOLEZNI KHV (KHVD)

I. Natančne diagnostične metode in postopki za potrditev prisotnosti ali izključitev suma na KHVD

Ko se zahteva laboratorijska preiskava za namene potrditve prisotnosti ali za izključitev suma na KHVD v skladu s členom 57(b) Direktive 2006/88/ES z uporabo diagnostičnih metod iz oddelka III dela 2 Priloge I, se uporabijo natančne diagnostične metode in postopki iz točk I.1–I.2 tega dela.

I.1 Priprava vzorcev iz rib

Za diagnostične namene se ribe (poslane žive ali usmrčene in pakirane ločeno v zaprtih aseptičnih posodah) ali alternativno zamrznjeni organi ali kosi organov, konzervirani v 80-odstotnem do absolutnem etanolu ali transportnem gojišču za viruse (ki jih je treba obdelati v 48 urah po zbiranju), lahko uporabijo za testiranje s konvencionalnimi metodami na podlagi PCR ali qPCR.

Za dokazovanje KHV se zberejo škrge in ledvice, poleg tega pa se v dodatnem ločenem vzorcu lahko vključijo tudi vranica, možgani in črevesje. V resnejših primerih se tkivni material največ petih rib lahko združi.

Poleg tega se v nekaterih primerih lahko uporabijo vzorci, pri katerih ne žrtvujemo ribe, kot so kri, bris škrg, biopsija škrg in bris sluzi (v primeru suma prisotnosti KHV se lahko uporabljajo zelo dragocene ribe).

I.1.1 Ekstrakcija DNK

DNK se ekstrahira v skladu s standardnimi postopki.

Lahko se uporabijo komercialno dostopni kompleti za ekstrakcijo DNK, ki zagotavljajo visoko kakovostno DNK, primerno za uporabo s protokoli PCR iz točke I.2.

I.2 Dokazovanje in določanje povzročitelja z metodo na podlagi verižne reakcije s polimerazo (PCR)

I.2.1 Test qPCR za dokazovanje KHV

Za dokazovanje KHV s qPCR se uporabljajo naslednji testi qPCR:

Smiselni začetni oligonukleotid (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3';

Protismiselni začetni oligonukleotid (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3'

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

Pogoji pomnoževanja: en cikel po 15 minut pri 95 °C, čemur sledi 40 ciklov po 15 sekund pri 94 °C in 60 sekund pri 60 °C. Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Lahko se uporabijo druge različice testov qPCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

I.2.2 Konvencionalni test PCR za dokazovanje KHV

Test, opisan v tej točki, se ciljno uporabi za gen za timidin kinazo virusa KHV. Vendar se namesto tega lahko uporabijo drugi testi PCR z dokazano podobno občutljivostjo in specifičnostjo kot opisani test.

Smiselni začetni oligonukleotid (KHV-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3'

Protismiselni začetni oligonukleotid (KHV-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'

Pogoji pomnoževanja: en cikel po 5 minut pri 95 °C, čemur sledi 35 ciklov po 30 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 52 °C, eno minuto pri 72 °C in en cikel po 10 minut pri 72 °C. Velikost produkta mora biti 409 bp.

Rezultati PCR se lahko razlikujejo glede na pogoje, pod katerimi se ta test izvaja, in sicer je morda potrebna optimizacija temperaturnih pogojev reakcije pomnoževanja, odvisno od cikličnega termostata v uporabi. Poleg tega lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov zaradi lažnega prileganja začetnega oligonukleotida ali kontaminacije. Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Lahko se uporabijo druge različice testa PCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

Prvo dokazovanje na območju se potrdi s sekvenciranjem ali pošlje nacionalnemu referenčnemu laboratoriju ali referenčnemu laboratoriju EU za bolezni rib iz Priloge VI k Direktivi 2006/88/ES za takojšnjo določitev.

II. **Natančne diagnostične metode in postopki za nadzor KHVD**

Pri vzorčenju in laboratorijskih preiskavah za pridobitev ali ohranitev nekaterih zdravstvenih statusov glede KHVD, kot je določeno v oddelku I dela 2 Priloge I, z uporabo diagnostičnih metod iz oddelkov II ali III dela 2 navedene priloge se uporabljajo natančne diagnostične metode in postopki iz naslednjih točk II.1 in II.2. tega dela.

II.1 Priprava vzorcev iz rib

Če je to mogoče, se vzorčijo ribe, ki so bile dlje časa izpostavljene temperaturam, ki omogočajo razvoj virusa, in sicer dva do tri tedne pri 15 °C do 26 °C. Če je to možno, se vzorci zberejo 24 ur, vendar ne več kot 72 ur po ravnanju z njimi, na primer po lovljenju z mrežo ali transportu, ki lahko ponovno aktivirajo virus v ribah s statusom nosilca, tako da se poveča možnost dokaza KHV.

Za namene nadzora KHVD se ribe lahko pošljejo žive ali usmrčene in pakirane ločeno v zaprtih aseptičnih posodah, alternativno pa se za testiranje z metodami na podlagi PCR lahko uporabijo zamrznjeni organi ali kosi organov, konzervirani v 80- do 100-odstotnem alkoholu ali transportnem gojišču virusov (ki jih je treba obdelati v 48 urah po zbiranju). Za nadzor KHVD se lahko zberejo tkiva škrig in ledvic.

Za namene nadzora KHVD se je treba izogibati združevanju vzorcev, kadar je mogoče. Če je združevanje potrebno, se lahko združi tkivni material največ dveh rib. Večji vzorci se homogenizirajo s pestilom v terilnici ali stomaherjem, podvzorca pa se pridobijo za ekstrakcijo DNK pred zbistritvijo. Namesto tega se podvzorca lahko zberejo iz vsakega tkiva, vključenega v vzorec, in dajo v „epruvete za razgradnjo“.

II.1.1 Ekstrakcija DNK

DNK se ekstrahira v skladu s standardnimi postopki. Lahko se uporabijo komercialno dostopni kompleti za ekstrakcijo DNK, ki zagotavljajo visoko kakovostno DNK, primerno za uporabo s protokoli PCR iz točke II.2.

Sprejemljivo razmerje med tkivom in gojiščem je 1:9 w/v. V teste se vključi 20 mg– 25 mg tkivnega materiala.

II.2 Nadzor KHVD z metodami na podlagi PCR

Za nadzor KHV se uporablja qPCR. Če se na območju, ki predhodno ni bilo potrjeno kot pozitivno, pojavijo pozitivni vzorci, se rezultati testa potrdijo bodisi:

(a) s sekvenciranjem produkta PCR ali produkta ugnezdene PCR iz vzorcev.

Pridobljena sekvenca s čistim konsenzusom se ujema s temi referenčnimi sekvencami (vsaj 98 %);

(b) bodisi se vzorci pošljejo v nacionalni referenčni laboratorij za potrditev.

II.2.1 Test qPCR za dokazovanje KHV

Uporablja se test qPCR, opisan v nadaljevanju:

smiselni začetni oligonukleotid (KHV-86f): 5'- GACGCCGAGACCTTGTG -3';

protismiselni začetni oligonukleotid (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTATTTTTGTCCTTGTT -3'

in sonda (KHV-109p): 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCAG -3'.

Pogoji pomnoževanja: en cikel po 15 minut pri 95 °C, čemur sledi 50 ciklov po 15 sekund pri 94 °C in 60 sekund pri 60 °C.

Rezultati qPCR se lahko razlikujejo glede na pogoje, pod katerimi se ta test izvaja, in sicer je morda potrebna optimizacija temperaturnih pogojev reakcije pomnoževanja, odvisno od cikličnega termostata v uporabi. Poleg tega lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov zaradi lažnega prileganja začetnega oligonukleotida ali laboratorijske kontaminacije. Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Lahko se uporabijo druge različice testov qPCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

II.2.2 Konvencionalni test PCR za potrditev dokazovanja KHV

Za potrditev prisotnosti okužbe s KHV se uporabi generična ugnezdena PCR, opisana v spodnji tabeli 2.1, ki ji sledi sekvenciranje amplificiranega pridelka.

Tabela 2.1

Začetni oligonukleotidi in pogoji za ugnezdeno PCR za testiranje vseh herpes virusov ciprinidov (CyHV-1, CyHV-2 in CyHV-3)

Ime začetnega oligonukleotida	Sekvenca	Pogoji pomnoževanja	Velikost produkta
CyHVpol-forward	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	Prvi krog PCR 1 cikel: 2 minuti pri 95 °C 40 ciklov: 30 sekund pri 95 °C 30 sekund pri 55 °C 45 sekund pri 72 °C 1 cikel: 10 minut pri 72 °C	362 bp
CyHVpol-reverse	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'		

Ime začetnega oligonukleotida	Sekvenca	Pogoji pomnoževanja	Velikost produkta
CyHVpol-internal forward	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	Drugi krog PCR 1 cikel: 2 minuti pri 95 °C 40 ciklov: 30 sekund pri 95 °C 30 sekund pri 55 °C 45 sekund pri 72 °C 1 cikel: 10 minut pri 72 °C	339 bp
CyHVpol-internal reverse	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3'		

Rezultati PCR se lahko razlikujejo glede na pogoje, pod katerimi se ta test izvaja, in sicer je morda potrebna optimizacija temperaturnih pogojev reakcije pomnoževanja, odvisno od cikličnega termostata v uporabi. Poleg tega lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov zaradi lažnega prileganja začetnega oligonukleotida ali laboratorijske kontaminacije. Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Namesto tega se lahko uporabijo druge različice testa PCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

Sekvenciranje se lahko izvede v laboratoriju ali zunaj specializiranem podjetju za sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja se analizirajo s primerjavo sekvenc z znanimi referenčnimi sekvencami KHV (identifikacijska koda GenBank AP008984, DQ657948 in DQ177346). Pridobljena sekvenca s čistim konsenzusom se mora ujemati z navedenimi referenčnimi sekvencami (vsaj 98 %).

DEL 3

NATANČNE DIAGNOSTIČNE METODE IN POSTOPKI ZA NADZOR IN POTRDIČEV INFEKCIOSNE ANEMIJE LOSOSOV (ISA)

I. Postopki vzorčenja za nadzor in kontrolo ISA

Pri vzorčenju in laboratorijski preiskavi za namene programov nadzora ali izkoreninjenja iz dela 3 Priloge I ali za potrditev ali izključitev prisotnosti ISA v skladu s členom 57(b) Direktive 2006/88/ES se uporabljajo natančne metode in postopki iz točk I.1, I.2 in I.3 tega oddelka.

I.1 Priprava vzorcev iz rib

Za namene laboratorijskih preiskav na prisotnost ISA se vzorci rib ne združujejo, kadar je to mogoče. Vendar je za namene nadzora za ISA sprejemljiva združitev 2 do 5 rib.

Vzorci za verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkripcijo (RT-PCR) se odvzamejo iz vseh vzorčenih rib. S sterilnim instrumentom se odvzame košček tkiva iz praledvic in prenese v mikrocentrifugirko, ki vsebuje 1 ml raztopine za ohranjanje RNK z dokazano učinkovitostjo. Tkivo največ 5 rib se lahko zbere v eno epruveto, ki vsebuje transportno raztopino, to pa predstavlja en združen vzorec. Teža tkiva v enem vzorcu je 0,5 g. Ko so ribe premajhne za pridobitev vzorca zahtevane teže, se lahko odvzamejo koščki ledvic, srca, vranice, jeter ali piloričnih cekumov (v tem prednostnem vrstnem redu), da dobimo 0,5 g.

Tkivo za histološko preiskavo odvezamo le iz sveže usmrčenih rib z normalnim videzom, ki kažejo klinične znake bolezni ali za katere so ugotovitve *post mortem* pregledov v skladu s prisotnostjo ISA. Vzorčijo se vse zunanje ali notranje lezije, v vsakem primeru pa se iz posameznih rib s skalpelom odstranijo vzorci praledvic, srca, jeter, trebušne slinavke, drobovja, škrj in vranice ter prenesejo v 8- do 10-odstotno (vol:vol) pufrano formalin slanico. Razmerje med fiksirno raztopino in tkivom je vsaj 20: 1 za zagotovitev zadovoljive ohranitve tkiv. Za imunohistokemijo (IHC) se odvzamejo vzorci praledvic in srca.

Tkiva za virološko preiskavo na celični kulturi se odvzamejo iz vseh vzorčenih rib. Koščki jeter, predledvic ali praledvic, srca in vranice se odstranijo s sterilnim instrumentom in prenesejo v plastične epruvete, ki vsebujejo 9 ml transportnega gojišča. Tkivo največ petih rib se lahko zbere v eno epruveto, ki vsebuje transportno raztopino, to pa predstavlja en združen vzorec. Teža tkiva v enem vzorcu je $1,0 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$.

I.2 Pošiljanje vzorcev iz rib

Cele ribe se lahko transportirajo v laboratorij, če so med transportom izpolnjene zahteve glede temperature, kot je opisano v odstavku 3 te točke. Cele ribe se zavijejo v vpojni papir in pošljejo v plastičnih vrečkah, in sicer ohlajene, kot je opisano v navedenem odstavku.

Lahko se pošljejo tudi žive ribe, vendar le pod nadzorom nacionalnega referenčnega laboratorija za bolezni rib in ob upoštevanju dodatnega razkuževanja in vprašanj biološke zaščite pri transportu živih rib.

Vzorci krvi in epruvete, ki vsebujejo ribja tkiva za virološko preiskavo ali analizo RT-PCR, se dajo v izolirne posode, na primer polistirenske škatle z debelimi stenami, z dovolj ledu ali z zamrzovalnimi elementi za zagotovitev hlajenja vzorcev med transportom v laboratorij. Prepreči se zamrzovanje, pri sprejemu pošiljke pa mora v transportnem škatli še vedno ostati led oz. en ali več zamrzovalnih elementov mora biti še vedno delno ali popolnoma zamrznjen. V izjemnih okoliščinah se lahko vzorci za RT-PCR in vzorci za virološke preiskave zamrznejo in transportirajo v laboratorij pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ali manj.

Za analizo tkiv z RT-PCR, ohranjenih v ribonukleinski kislini (RNA)later, se RNK ekstrahira v naslednjih časovnih okvirih, odvisno od temperature shranjevanja vzorcev:

vzorci, shranjeni pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$: en dan;

vzorci, shranjeni pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$: en teden;

vzorci, shranjeni pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$: en mesec;

vzorci, shranjeni pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$: neomejeno.

Če se ribja tkiva transportirajo v fiksirni raztopini za histološko preiskavo, se pošljejo v zatesnjenih eprugetah v posodah, odpornih na udarce. Prepreči se zamrznitev navedenih vzorcev.

Virološka preiskava na celični kulturi se začne čim prej, najpozneje pa v 48 urah po zbiranju vzorcev. V izjemnih primerih se virološka preiskava lahko začne najpozneje v 72 urah po zbiranju materiala, če je material, ki naj bi se pregledal, zaščiten s transportnim gojiščem in je mogoče med transportom izpolniti zahteve glede temperature.

I.3 Zbiranje dodatnega diagnostičnega materiala

Na podlagi odobritve diagnostičnega laboratorija se lahko zberejo druga ribja tkiva kot tkiva iz točke I.1 in pripravijo za dodatno preiskavo.

II. Natančne diagnostične metode in postopki za nadzor in potrditev prisotnosti ali izključitev suma na ISA

Pri laboratorijskih preiskavah za namene pridobitve ali ohranitve določenega zdravstvenega statusa glede ISA, kot je določeno v oddelku I dela 3 Priloge I, ali za namene potrditve prisotnosti ali izključitve suma na ISA v skladu s členom 57(b) Direktive 2006/88/ES z diagnostičnimi metodami iz oddelka II dela 3 Priloge I se uporabljajo natančne metode in postopki iz naslednjih točk od II.1 do II.5.

II.1 Pregled vzorcev z RT-PCR

Diagnostična metoda, ki se uporablja za presejalni test za ISA je RT-qPCR. Rezultati RT-qPCR se lahko razlikujejo glede na pogoje, pod katerimi se test izvaja, zato se v izogib dvomom vključijo ustrezne pozitivne in negativne kontrole ter amplikoni.

II.1.1 Ekstrakcija celotne RNK

Vse delo z RNK se opravlja na ledu z uporabo rokavic.

Celotna RNK se ekstrahira z metodo s fenol-kloroformom ali centrifugalnimi kolonami za afiniteto do RNK v skladu z navodili proizvajalca.

Preciščena RNK se ponovno suspendira v destilirani RNaz prosti vodi (tj. v vodi, tretirani z 0,1-odstotnim dietil pirokarbonatom).

Koncentracija in čistost ekstrahirane RNK se oceni z merjenjem optične gostote pri 260 nm in 280 nm. Alternativni pristop je vključitev notranjih kontrol, ki so ciljno usmerjene v virusni genom iz točke II.1.3.

II.1.2 RT-PCR za dokazovanje ISAV

Za amplifikacijo genoma ISAV se lahko uporablja več metod RT-PCR. Dvostopenjska RT-PCR se lahko izvede z reakcijama RT in PCR v dveh ločenih epruvetah. Lahko pa se izvede tudi enostopenjska reakcija z dvema reakcijama v eni epruveti. Enostopenjska metoda se uporabi, kadar je to mogoče, ker test z eno epruveto zmanjša tveganje navzkrižne kontaminacije, saj ni potreben prenos vsebine, in ker se šteje za enako občutljivo kot dvostopenjska metoda.

Uporabijo se začetna oligonukleotida in test iz te točke, in sicer par začetnih oligonukleotidov ILA1 ali ILA2, ki sta ciljno usmerjena v segment 8 in ki sta se izkazala za primerna za dokazovanje ISAV pri izbruhih in v ribah nosilkah. Protismiselni začetni oligonukleotid ILA2 ne ustreza izolatoma iz Severne Amerike, zato se v teh primerih uporabi alternativni komplet začetnih oligonukleotidov.

Smiselni začetni oligonukleotid (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3';

Protismiselni začetni oligonukleotid (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Pogoji pomnoževanja: en cikel po 30 minut pri 50 °C, 1 cikel po 15 minut pri 94 °C, 40 ciklov po 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 55 °C, 60 sekund pri 72 °C; en cikel po 5 minut pri 72 °C. Velikost produkta je 155 bp.

Rezultati PCR se lahko razlikujejo glede na pogoje, pod katerimi se ta test izvaja, in sicer je morda potrebna optimizacija temperaturnih pogojev reakcije pomnoževanja, odvisno od cikličnega termostata v uporabi. Poleg tega lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov zaradi lažnega prileganja začetnega oligonukleotida ali laboratorijske kontaminacije. Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Namesto tega se lahko uporabijo druge različice testa RT-PCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

II.1.3 RT-qPCR za dokazovanje ISAV

Uporaba RT-qPCR morda lahko poveča specifičnost in verjetno tudi občutljivost. Ta metoda se lahko izvede hitreje, ker ni potrebna gelska elektroforeza, zmanjšuje pa tveganje navzkrižne kontaminacije, saj je možno oceniti količino virusne genomske RNK v epruveti z vzorcem. Pomanjkljivost testa RT-qPCR je, da pogosto ni mogoče sekvencirati amplificiranih pridelkov. Če pa obstaja dvom o specifičnosti amplificiranega pridelka, je treba za potrditev rezultata izvesti drug specifičen test za ISAV.

Uporabi se test, ki je opisan v tej točki in je ciljno usmerjen v segment 8. Ta test zajema izolate iz Evropske unije, Evropskega združenja za prosto trgovino in Severne Amerike. Enostopenjska metoda se uporabi, kadar je to mogoče, ker test z eno epruveto zmanjša tveganje navzkrižne kontaminacije.

Smiselni začetni oligonukleotid: 5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3';

Protismiselni začetni oligonukleotid: 5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3';

in sonda: 5'-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC – MGBNFQ-3'.

Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Pogoji pomnoževanja: en cikel po 30 minut pri 50 °C, en cikel po 15 minut pri 95 °C, 40 ciklov po 15 sekund pri 94 °C, 60 sekund pri 60 °C; po potrebi se prilagodi. Namesto tega se lahko uporabijo druge različice testov RT-PCR ali RT-qPCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

II.1.4 Sekvenciranje amplificiranih pridelkov reakcije PCR

Smiselni začetni oligonukleotid (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3';

Protismiselni začetni oligonukleotid (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3'.

Negativne kontrole reakcijske mešanice in pozitivne kontrole reakcije se vključijo na vsako serijo mikrotitrskih plošč. Pogoji pomnoževanja (enostopenjska RT-PCR): en cikel po 30 minut pri 50 °C, en cikel po 15 minut pri 94 °C, 40 ciklov po 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 55 °C, 60 sekund pri 72 °C, en cikel po 5 minut pri 72 °C; po potrebi se prilagodi. Namesto tega se lahko uporabijo druge različice testov RT-PCR ali RT-qPCR z dokazano podobno učinkovitostjo.

Kot alternativa se lahko uporabi naslednja metoda za sekvenciranje HPR v segmentu 6:

smiselni začetni oligonukleotid: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3';

protismiselni začetni oligonukleotid: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'.

Velikost produkta: 304 nt v primeru HPR0.

Lahko se uporabijo tudi testi RT-PCR s podobno občutljivostjo in specifičnostjo kot testi iz te točke.

Čistost amplificiranega pridelka reakcije RT-PCR se preveri z gelsko elektroforezo pred sekvenciranjem. Če se pojavi samo en čisti odsek, se prečisti neposredno iz reakcije PCR. Če je prisotnih več amplificiranih odsekov, se zadevni odsek prečisti z gelsko elektroforezo. Odseki reakcije PCR iz raztopin ali agaroznih gelov se prečistijo z uporabo centrifugalnih kolon za afiniteto do odsekov reakcije PCR v skladu z navodili proizvajalca.

Sekvenciranje se izvede z uporabo začetnih oligonukleotidov za amplificiranje v zunanjih specializiranih podjetjih za sekvenciranje. Rezultati se analizirajo z iskalnim orodjem BLAST, sekvence pa se primerjajo z drugimi znanimi sekvencami iz podatkovne baze nukleotidov nacionalnega centra ZDA za biotehnične informacije (US National Centre for Biotechnical Information – NCBI).

S sekvenciranjem je treba odpraviti vse dvome o specifičnosti amplificiranega pridelka reakcije RT-PCR.

II.2 Izolacija ISAV na celičnih kulturah

II.2.1 Priprava vzorcev

Tkivo se lahko hrani pri – 80 °C. Tkivo se zamrzne in odmrzne samo enkrat pred preiskavo. Za namene nadzora in kontrole se preiskava opravi čim hitreje.

Vsak vzorec (združeno tkivo v transportni raztopini) se popolnoma homogenizira, pri čemer se uporabi potrjen homogenizator, centrifugiran 15 minut na 2 000 × g do 4 000 × g pri 0 °C do 6 °C, supernatant pa se filtrira (0,45 µm) in inkubira z enako količino primerno razredčenih združenih protiserumov proti avtohtonim serotipom virusa IPNV. Titer protiseruma mora biti vsaj 1: 2 000 pri nevtralizacijskem testu 50-odstotne redukcije plakov. Mešanica se inkubira eno uro pri 15 °C. To predstavlja inokulum.

Namen tretiranja vseh inokulmov s protiserumom proti virusu nalezljive nekroze trebušne slinavke (virus, ki se v nekaterih delih Evrope pojavlja pri 50 % vzorcev rib) je preprečiti razvoj citopatskega efekta (CPE) zaradi virusa IPN na inokuliranih celičnih kulturah. Takšno tretiranje se lahko opravi za skrajšanje viroloških preiskav in zmanjšanje števila primerov, pri katerih bi bilo treba pojav CPE šteti za potencialni znak ISAV. Ko vzorci prihajajo iz proizvodnih enot, ki veljajo za proste IPN, se tretiranje inokulmov s protiserumom proti virusu IPN lahko izpusti.

II.2.2 Inokulacija celičnih kultur

Za izolacijo primarnega ISAV se uporabijo celice ledvic atlantskega lososa (ASK). Uporabijo se lahko druge celične linije z dokazano učinkovitostjo in občutljivostjo pri izolaciji ISAV, ob upoštevanju variabilnosti sevov in sposobnosti različnih sevov, da se replicirajo v različnih celičnih linijah. Videti je, da celice ASK podpirajo izolacijo in rast doslej znanih izolatov virusov, dokler se uporablja nizka raven pasaže. Pri celicah ASK se lahko pojavi bolj izrazit citopatski efekt (CPE) kot pri drugih dovtetnih celičnih linijah, kot je SHK-1 (predledvice lososa (Salmon head kidney-1)).

Celice ASK (pasaža 65 ali manj) se gojijo na gojišču L-15, ki vsebuje 10-odstotni fetalni goveji serum, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamina in 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanol na mikrotitrskih ploščah. S protiserumom obdelana suspenzija organov se inokulira v mlade celične kulture v fazi aktivne rasti za pridobitev končnega razredčenega tkivnega materiala na gojišču s kulturami 1: 1 000. Za vsak organ se v eno jamico, ki vsebuje 2 ml gojišča s kulturami, doda suspenzija 40 µl inokuluma. Za zmanjšanje tveganja navzkrižne kontaminacije se za vzorce iz različnih gojilnic uporabijo ločene 12- ali 24-jamične mikrotitrške plošče.

Ena mikrotitrška plošča se ne inokulira, tako da se lahko uporabi kot negativna kontrola. Posebna mikrotitrška plošča se z referenčnim izolatom ISAV kot pozitivna kontrola inokulira na naslednji način. 100 µl osnovnega pripravka ISAV (minimalni titer 10^7 50-odstotna infektivna doza (TCID₅₀ ml⁻¹)) se inokulira v prvo jamico in premeša. Količina tega materiala se prenese iz prve jamice v drugo za pridobitev razredčitve 1: 10 in premeša. To se ponovi po celotni mikrotitrski plošči za šest desetkratnih razredčitev. Osnovni pripravek ISAV se lahko shrani pri - 80 °C vsaj dve leti, ko pa je odmrznjen, ga je treba uporabiti v treh dneh. Paziti je treba, da se prepreči navzkrižna kontaminacija testnih mikrotitrskih plošč s pozitivnim kontrolnim materialom. V izogib navedenemu tveganju se pripravijo pozitivne kontrole, z njimi pa se ravna ločeno od testnih mikrotitrskih plošč. Test občutljivosti celic ASK na izolate ISAV vsakih šest mesecev lahko nadomesti vključitev pozitivne kontrole pri vsaki inokulaciji.

Vzorce inkubiramo do 15 dni pri 15 °C ± 2 °C. Celične kulture se dvakrat pregledajo pod mikroskopom na pojav CPE med 5. in 7. dnem ter med 12. in 14. dnem po inokulaciji. Če kateri koli združen vzorec pokaže CPE, se takoj začne postopek za določitev virusa v skladu s točko II.2.4. Če se do 14. dneva CPE ne opazi, se opravi indirektni fluorescenčni test za dokazovanje protiteles (IFAT), hemadsorpcija ali RT-PCR.

II.2.3 Subkultivacija

Subkultivacija se opravi med 13. in 15. dnem. Supernatant kulture se doda v jamice, ki vsebujejo sveže celice v fazi aktivne rasti v ustrezni razredčitvi (1/10) na mikrotitrskih ploščah, in inkubira do 18 dni pri 14 °C ± 2 °C. Celične kulture se dvakrat pregledajo pod mikroskopom na pojav CPE med 5. in 7. dnem ter med 14. in 18. dnem po inokulaciji. Če kateri koli združen vzorec pokaže CPE, se takoj začne postopek za določitev virusa v skladu s točko II.2.4. Če se do 14.– 18. dneva CPE ne opazi, se opravi hemadsorpcija ali RT-PCR.

Če se v prvih sedmih dneh inkubacije pojavi citotoksičnost, se v navedeni fazi opravi subkultivacija, celice se inkubirajo 14 do 18 dni in se ponovna subkultivacija z nadaljnjim obdobjem inkubacije 14–18 dni. Če se citotoksičnost pojavi po sedmih dneh, se subkultivacija opravi enkrat, celice pa se inkubirajo, da se doseže skupaj 28 do 36 dni inkubacije od primarne inokulacije.

Če se v primarni kulturi pojavi bakterijska kontaminacija, se test ponovno pripravi z uporabo homogenata, shranjenega pri - 80 °C. Pred inokulacijo se homogenat tkiva centrifugira 15 do 30 minut na 4 000 × g pri 0 °C do 6 °C, supernatant pa se filtrira pri 0,22 µm. Če se med subkultivacijo pojavi bakterijska kontaminacija, se supernatant filtrira pri 0,22 µm, inokulira na sveže celice in inkubira nadaljnjih 14 do 18 dni.

II.2.4 Testi za določitev virusa

Če se v kateri koli fazi opazijo dokazi za CPE ali če je hemadsorpcija pozitivna, se izvede določanje virusa. Za določanje ISAV se izbereta RT-PCR v skladu s točko II.1 in imunofluorescenca (IF) v skladu s točko II.2.6. Če obstaja sum na prisotnost drugih virusov, se izvedejo dodatni testi za določitev virusa. Če z navedenimi testi v enem tednu ni bilo možno dokončno določiti virusa, se supernatant za takojšnjo določitev pošlje:

- (a) referenčnemu laboratoriju za ISA Svetovne organizacije za zdravje živali (OIE) ali
- (b) nacionalnemu referenčnemu laboratoriju ali referenčnemu laboratoriju EU za bolezni rib, kot je določeno v Prilogi VI k Direktivi 2006/88/ES.

II.2.5 Hemadsorpcija

Replikacija ISAV v celičnih kulturah ne privede vedno do CPE, zato se na vsaki jamici opravi RT-PCR ali hemadsorpcija v skladu s točko ali imunofluorescenca v skladu s točko II.2.6.

Gojišče celične kulture se odstrani iz vsake jamice, vključno s tistimi s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, ter prenese v označene sterilne epruvete. V vsako jamico se doda 500 µl 0,2-odstotne (vol:vol) suspenzije spranih eritrocitov kuncev ali konjev ali 0,05-odstotne (vol:vol) suspenzije spranih eritrocitov šarenk ali atlantskega lososa in inkubira 45 minut pri sobni temperaturi. Eritrociti se odstranijo in vsaka jamica se dvakrat spere z gojiščem L-15. Vsaka jamica se pregleda pod mikroskopom.

Prisotnost skupkov eritrocitov, pritrjenih na površino celic ASK, kaže na predvideno okužbo z ortomiksovirusom. Če je hemadsorpcija pozitivna, se takoj opravi test za določitev virusa v skladu s točko II.2.4.

II.2.6 Imunofluorescenca (IF)

Celice ASK (pasaža 65 ali manj) se gojijo na gojišču L-15, ki vsebuje 10-odstotni fetalni goveji serum, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamina in 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptetanola na mikrotitrskih ploščah, in se uporabljajo pri več kot 50-odstotni konfluenci. Lahko se uporabijo tudi druge celične linije ali gojišča z dokazano učinkovitostjo. 225 µl supernatanta kulture, ki je domnevno okužena z virusom, se doda v vsako od obeh jamic in premeša, 225 µl pa se prenese v dve drugi jamici, in sicer v razredčitvi 1: 5. Dve dodatni jamici se ne inokulirata, tako da se lahko uporabita kot kontroli. Vzorci iz vsake gojilnice in kontrola virusa se tretirajo na ločenih mikrotitrskih ploščah. Za kontrolo virusa se uporabi referenčni izolat ISAV.

Mikrotitrške plošče se inkubirajo pri $14\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pregledujejo pod mikroskopom do sedem dni. Ko se opazi zgodnji CPE ali če se v sedmih dneh CPE ne opazi, je naslednji korak fiksacija. Jamice se sperejo s fosfatno pufrano slanico (PBS) in se z inkubacijo z 80-odstotnim acetonom 20 minut fiksirajo pri sobni temperaturi. Mikrotitrške plošče se posušijo na zraku in takoj obarvajo ali shranijo največ 24 ur pred barvanjem pri temperaturi $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Replicirane jamice se obarvajo z mešanico monoklonskih protiteles (MAB) 3H6F8 in 1OC9F5 proti ISAV ali drugim MAB z dokazano učinkovitostjo in specifičnostjo, razredčijo v PBS in inkubirajo 30 minut pri $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. MAB se odstrani, mikrotitrške plošče pa se trikrat sperejo z 0,05-odstotnim Tween 20 v PBS. Vsaki jamici se dodajo protitelesa proti mišjim IgG, konjugirana s fluorescein izotiocianatom (FITC), razredčen v PBS, in inkubira 30 minut pri $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vsak laboratorij optimizira razredčitve različnih šarž MAB in konjugata FITC. Protitelo se odstrani, mikrotitrške plošče pa se trikrat sperejo z 0,05-odstotnim Tween 20 v PBS.

Jamice se takoj pregledajo pod invertnim mikroskopom za fluorescenčno mikroskopijo z ustreznim filtrom za ekscitacijo FITC. Test se šteje za pozitivnega, če se opazijo fluorescenčne celice. Test je veljaven, če je rezultat pozitivnih kontrol pozitiven in rezultat negativnih kontrol negativen.

II.3 Pregled drugih tkiv

Metoda iz točke II.2.6 se lahko uporabi za druga ribja tkiva, kot so jetra, vranica in srce, če se lahko na stekelce prenese ustreznna količina endotelnih celic, levkocitov ali limfocitov. Postopek barvanja ostane enak za vsako tkivo, čeprav je za nekatera tkiva morda bolje opustiti barvanje s propidijevim jodidom in namesto tega s pomočjo fazne osvetljave določiti vrste celic v odtisu.

II.4 Histologija

Rezine, vstavljene v parafin, se razrežejo na 5 µm in obarvajo s hematoksilinom in eozinom.

Histološke spremembe v klinično obolelih atlantskih lososih so različne, vendar lahko vključujejo:

- (a) številne eritrocite v centralnem venoznem sinusu in lamelarnih kapilarah škrg, kjer se lahko tvorijo tudi strdki eritrocitov;
- (b) multifokalne do konfluentne petehije ali hepatocitno nekrozo ali oboje, nekoliko oddaljene od večjih žil v jetrih; multifokalno kopičenje eritrocitov v razširjenih hepaticnih sinusoidih;

- (c) kopičenje eritrocitov v krvnih žilah v *lamina propria* črevesja in sčasoma tudi krvavitve v *lamina propria*;
- (d) stromo vranice, napihnjeno zaradi kopičenja eritrocitov;
- (e) rahlo multifokalno do obsežno razpršeno intersticijsko krvavitev s tubularno nekrozo na območjih krvavitve, kopičenje eritrocitov v ledvičnih glomerulih;
- (f) eritrofagocitozo v vranici in sekundarne krvavitve v jetrih in ledvicah.

II.5 Imunohistokemija (IHC)

Na parafinskih rezinah iz tkiva, fiksiranega v formalinu, se uporabijo poliklonska protitelesa proti nukloproteinu ISAV. Organi, ki se pregledajo, so praledvice in srce (prehodno območje, vključno z vsemi tremi prekatmi in zaklopkami). Sumljivi primeri zaradi patoloških znakov se preverijo s pozitivno IHC. Histološke rezine se pripravijo v skladu s standardnimi metodami.

1. Priprava tkivnih rezin

Tkiva se fiksirajo v nevtralnem fosfatno pufranem 10-odstotnem formalinu vsaj en dan, dehidrirajo v stopenjskih serijah etanola, zbistrijo v ksilenu in vstavijo v parafin v skladu s standardnimi protokoli. Približno 5 μm debele rezine (za IHC prenesene na stekelca, prevlečena s poli-L-lizinom) se 20 minut segrevajo na 56 °C do 58 °C (največ 60 °C), razvoskajo v ksilenu, rehidrirajo v stopenjskih serijah etanola ter obarvajo s hematoksilinom in eozinom za patomorfologijo in IHC v skladu s točko 2.

2. Postopek barvanja za IHC

Vse inkubacije se izvajajo pri sobni temperaturi na stresalniku-zibki, razen če v temu sklepu ni drugače določeno:

- (a) antigen se dokaže tako, da rezine 2 \times 6 minut vrejo v 0,1 M citratnega pufra s pH 6,0 in se nato 20 minut blokirajo s 5-odstotnim nemastnim mlekom v prahu in 2-odstotnim kozjim serumom v 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6);
- (b) rezine se nato čez noč inkubirajo s primarnim protitelesom (monokulturno kunčje protitelo proti nukleoproteinu ISAV), razredčenim v TBS z 1-odstotnim nemastnim mlekom v prahu, nato pa trikrat sperejo v TBS z 0,1-odstotnim Tween 20;
- (c) za dokazovanje vezanih protiteles se rezine 60 minut inkubirajo s protitelesi, konjugirani z alkalno fosfatazo na kunčji IgG. Po zadnjem spiranju se doda Fast Red (1 mg ml⁻¹) in naftol AS-MX fosfat (0,2 mg ml⁻¹) z 1 mM levamizolom v 0,1 M TBS (pH 8,2), da se 20 minut razvija. Rezine se nato sperejo pod tekočo vodo pred nasprotnim barvanjem s Harrisovim hematoksilinom in namestijo na vodeni medij s pokravnimi stekelci. Pri vsaki nastavitvi se kot kontrole vključijo ISAV pozitivni in ISAV negativne tkivne rezine.

3. Razlaga rezultatov IHC

Rezultati testa IHC se razlagajo, kot je navedeno v točkah (a) in (b):

- (a) kontrolne rezine se štejejo za pozitivne, če se v kontrolnih rezinah opazi jasno razvidna rdeča (rdečkasta) citoplazemska in intranuklearna obarvanost endotelnih celic v krvnih žilah endokarda. Testna vzorčna rezina se šteje za pozitivno samo, če se ugotovi takšna jasna, intranuklearna rdeča obarvanost endotelnih celic;
- (b) kontrolne rezine se štejejo za negativne, če nimajo znatne barvne reakcije.

ker je intranuklearna lokalizacija v fazi replikacije virusa značilna za ortomiksovirusni nukleoprotein, sočasna citoplazemska obarvanost pa je pogosto prevladujoča, se citoplazemski in drugi vzorci obarvanosti brez intranuklearne lokalizacije štejejo za nespecifične ali neopredeljive.

Pozitivne barvne reakcije so običajno najmočnejše pri endotelnih celicah srca in ledvic. Endotelne barvne reakcije znotraj zelo obsežnih hemoragičnih lezij so lahko majhne ali jih ni, morda zaradi lize okuženih endotelnih celic.

DEL 4

NATANČNE DIAGNOSTIČNE METODE IN POSTOPKI ZA NADZOR IN POTRDITEV OKUŽBE Z MARTEILIA REFRINGENS

I. Natančne diagnostične metode in postopki za diagnozo okužbe z *Marteilia refringens*

Pri vzorčenju in laboratorijskih preiskavah za namene pridobitve ali ohranitve zdravstvenega statusa glede okužbe z *Marteilia refringens*, kot je določeno v oddelku I dela 4 Priloge I, ali za potrditev ali izključitev prisotnosti navedene bolezni s seznama v skladu s členom 57(b) Direktive 2006/88/ES z diagnostičnimi metodami iz oddelka II dela 4 Priloge I se uporabljajo natančne diagnostične metode in postopki iz točk I.1, I.2 in I.3 tega dela.

I.1 Postopek vzorčenja

Odrpti ali pred kratkim poginuli posamezni mehkužci se vzorčijo po prioriteti, da se povečajo možnosti izsleditve okuženih živali.

Ostrige ali klapavice se, ko se enkrat vzorčijo, hranijo pri 4 °C ali na ledu v hladilniku največ 24 ur, če vzorci vključujejo odrpte mehkužce, in ne več kot 72 ur, če takih mehkužcev ne vključujejo, v plastični vrečki, skupaj z nalepkami s podatki o naravi in poreklu ostrig ali klapavic. Odrpti ali pred kratkim poginuli mehkužci se hranijo ločeno od drugih mehkužcev.

Za diagnostiko *Marteilia refringens* s histologijo se uporabijo 3 mm do 5 mm debele rezine tkiv, vključno s tkivom škrge in srca. Za nekatere teste se uporabi kos prebavne žleze, vključno z odtisi in verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

I.2 Mikroskopske metode

I.2.1 Citologija (citologija odtisa)

Po sušenju tkiv prebavne žleze na vpojnem papirju se na steklenih preparatih naredi več odtisov. Preparati se posušijo na zraku, fiksirajo v metanolu ali absolutnem etanolu in obarvajo s komercialno dostopnim kompletom za barvanje krvi, kot je Diff-Quik®/Hemacolor®, v skladu z navodili proizvajalca. Po spiranju s tekočo vodo in sušenju se na preparate namestijo pokrivna stekelca z uporabo primerne sintetične smole. Preparati se najprej preučujejo s povečavo × 200, nato pa potopljeni v olje s povečavo × 1 000.

Rezultat se šteje za pozitivnega, če se opazijo celice v velikosti do 30 µm–40 µm. Citoplazma se obarva bazofilno, jedro pa eozinofilno. Opazijo se blede siji okrog velikih, močno obarvanih (refrakcijskih) granulah, pri večjih celicah pa celice znotraj celic.

Ta metoda ni specifična za določeno vrsto parazitov.

I.2.2 Histologija

Rezine tkiv, ki vključujejo škrge, prebavno žlezo, plašč in gonado, se vsaj 24 ur fiksirajo v Davidsonovem fiksativu, čemur sledi običajni postopek za parafinsko histologijo in barvanje, na primer s hematoksilinom in eozinom. Opazujejo se na vedno večjih povečavah do × 1 000.

Rezultat se šteje za pozitivnega, če se opazijo celice v velikosti od 4 µm do 40 µm. V zgodnjih fazah so celice večjedrne in sferične do podolgovate oblike. V glavnem se najdejo v epitelu požiralnika in želodcu ter včasih v labialnih palpah. Sporulacija vključuje delitev celic v celicah ter poteka v cevkah in kanalih prebavne žleze. Med sporulacijo se pojavijo refrakcijske granule, ki pa jih v zgodnjih fazah ni možno opaziti. V poznih fazah okužbe se opazijo prosti sporangiji v lumnu prebavnega trakta. Citoplazma se obarva bazofilno, jedro pa eozinofilno. Granule so lahko izrazito oranžne do izrazito rdeče barve.

Ta metoda ni specifična za določeno vrsto parazitov.

I.3 Molekularne metode

I.3.1. Ekstrakcija DNK

DNK se ekstrahira v skladu s standardnimi postopki.

Lahko se uporabijo kompleti za ekstrakcijo DNK, ki so na voljo komercialno in običajno zagotavljajo visokokakovostno DNK, primerno za uporabo s protokoli PCR, kot je opisano v točki I.3.2.

I.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Razvitih in objavljenih je bilo več protokolov PCR.

Uporabita se začetna oligonukleotida PCR, ciljno usmerjena v regijo notranjega prepisanega vmesnika (ITS1), ker lahko amplificirata samo *Marteilia refringens*.

PCR se izvede na količini 50 µl. Mešanice za PCR vsebujejo pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 pri 25 °C] in 1-odstotni Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM mešanice dNTP, 1 µM smiselnega in protismiselnega začetnega oligonukleotida, 0,02 enoti µl⁻¹ Taq DNK polimeraze ter 10 ng–100 ng ekstrahirane DNK. Po petminutni denaturaciji DNK pri 94 °C se 30 ciklov izvede na naslednji način: denaturacija eno minuto pri 94 °C, prileganje eno minuto pri 55 °C ter elongacija eno minuto pri 72 °C na kilobazni par. Izvede se končni postopek elongacije za 10 minut pri 72 °C. Za dokazovanje *Marteilia refringens* se PCR izvede z začetnima oligonukleotidoma, ki sta ciljno usmerjena v regijo ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' in 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Pozitivne kontrole sestojijo iz genske DNK iz močno okužene živali gostiteljice ali plazmidne DNK, vključno s ciljno regijo.

Negativne kontrole sestojijo iz genske DNK iz neokuženih živali gostiteljic in reagentov PCR brez ciljne DNK.

Pozitiven rezultat je pozitivna amplifikacija PCR ob pričakovani velikosti (412 bp), pri čemer so vse negativne kontrole negativne, vse pozitivne kontrole pa pozitivne.

I.3.3 Hibridizacija *in situ* (ISH)

Razvitih in objavljenih je bilo več protokolov ISH.

Uporabi se sonda, ki je ciljno usmerjena v malo podenoto genskega kompleksa rRNK, ker je bil opravljen pregled skladnosti s histologijo.

Rezine tkiv, ki vključujejo škrge in prebavno žlezo, se vsaj 24 ur fiksirajo v Davidsonovem fiksativu, čemur sledi običajni postopek za parafinsko histologijo. Odrežejo se 5 µm velike rezine in prenesejo na preparate, prevlečene z aminoalkilsilanom, ki se nato čez noč pečejo v pečici pri 40 °C. Rezine se razvoskajo tako, da se za 10 minut potopijo v ksilen. Ta korak se ponovi samo enkrat, nato pa se topilo odstrani, tako da se dvakrat zaporedoma po 10 minut potopi v kopeli z absolutnim etanolom. Rezine se potem dehidrirajo, tako da se potopijo v stopenjske serije etanola. Rezine se 30 minut tretirajo s proteinazo K (100 µg ml⁻¹) v pufru TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) pri 37 °C. Preparati se dehidrirajo tako, da se potopijo v stopenjske serije etanola in nato posušijo na zraku. Rezine se inkubirajo s 100 µl hibridizacijskega pufru (4 × SSC [standardna raztopina slane in citrate], 50-odstotni formamid, 1 × Denhardtova raztopina, 250 µg ml⁻¹ tRNK iz kvasovk, 10-odstotni dekstran sulfat), ki vsebuje 10 ng (1 µl reaktantov PCR, pripravljenih v skladu s točko I.3.2 z uporabo začetnih oligonukleotidov CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG in TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) sonde, označene z digoksigeninom. Rezine se prekrijejo s plastičnimi pokravnimi stekelci *in situ* in za pet minut položijo na grelno enoto pri 95 °C. Preparati se nato eno minuto hladijo na ledu, preden se čez noč hibridizirajo v vlažni komori pri 42 °C. Rezine se spirajo dvakrat po pet minut v 2 × SSC pri sobni temperaturi in enkrat po 10 minut v 0,4 × SSC na 42 °C. Postopki dokazovanja se izvajajo v skladu z navodili proizvajalca. Preparati se nato sperejo v sterilni destilirani vodi (dH₂O). Rezine se nasprotno pobarvajo z Bismarck rjavo-rumenim barvilom, sperejo v dH₂O, pokrivna stekelca pa se namestijo z uporabo vodnega medija s pokravnimi stekelci.

Pozitivne in negativne kontrole so rezine iz znanih okuženih oz. neokuženih živali gostiteljic.

Pozitiven rezultat je dokazan z vijoličasto-črno označenimi celicami *Marteilia refringens* v znanih ciljnih tkivih, pri čemer so vse negativne kontrole negativne in vse pozitivne kontrole pozitivne.

I.3.4 Sekvenciranje

Sekvenciranje se izvede kot eden od zadnjih korakov za potrditveno diagnostiko. Ciljni regiji sta mala podenota rDNK in ITS1.

II. Natančne diagnostične metode in postopki za nadzor in potrditev okužbe z *Marteilia refringens*

Za namene programov nadzora in za potrditev prisotnosti okužb z *Marteilia refringens* ali izključitev suma na navedeno bolezen s seznama v skladu z zahtevami iz oddelka II dela 4 Priloge I se uporabijo diagnostične metode in ustrezni postopki v skladu s smernicami iz tabele 4.1:

Tabela 4.1

Smernice za uporabo diagnostičnih metod za programe nadzora in za potrditev ali izključitev okužbe z *Marteilia refringens*

Metoda	Ciljno usmerjen nadzor	Domnevna diagnoza	Potrditvena diagnoza
Odtisi prebavne žleze	X	X	X ali
Histopatologija	X		X ali
Hibridizacija <i>in situ</i>			X in
PCR	X	X	X in
Sekvenciranje			X

DEL 5

NATANČNE DIAGNOSTIČNE METODE IN POSTOPKI ZA NADZOR IN POTRDIČEV OKUŽBE Z *BONAMIA OSTREAE*

I. Postopki za diagnozo okužbe z *Bonamia ostreae*

Pri vzorčenju in laboratorijski preiskavi za namene pridobitve ali ohranitve določenega zdravstvenega statusa glede *Bonamia ostreae*, kot je določeno v oddelku I dela 5 Priloge I, ali za potrditev prisotnosti ali izključitev suma na navedeno bolezen s seznama v skladu s členom 57(b) Direktive 2006/88/ES z diagnostičnimi metodami iz oddelka II dela 5 Priloge I se uporabljajo natančne diagnostične metode in postopki iz naslednjih točk I.1, I.2 in I.3.

I.1 Postopek vzorčenja

Odpri ali pred kratkim poginuli posamezni mehkužci se vzorčijo po prioriteti, da se povečajo možnosti izsleditve okuženih živali.

Ko se opravi vzorčenje ostrig, se te živali hranijo pri 4 °C ali na ledu v hladilniku največ 24 ur, če vzorci vključujejo odprte mehkužce, oz. 72 ur, če ne, v plastični vrečki skupaj z etiketo s podatki o naravi in poreklu ostrig. Odpri ali pred kratkim poginuli mehkužci se hranijo ločeno od drugih mehkužcev.

Za diagnostiko *Bonamia ostreae* s histologijo se uporabijo 3 mm do 5 mm debele rezine tkiv, vključno s tkivom škrge in srca. Za nekatere teste se uporabi kos prebavne žleze, vključno z odtisi in verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

I.2 Mikroskopske metode

I.2.1 Citologija (citologija odtisa)

Po sušenju tkiv škrg ali srca na vpojnem papirju se na steklenih preparatih naredi več odtisov. Preparati se posušijo na zraku, fiksirajo v metanolu ali absolutnem etanolu in obarvajo s komercialno dostopnim kompletom za barvanje krvi, kot je Diff-Quik®/Hemacolor®, v skladu z navodili proizvajalca. Po spiranju s tekočo vodo in sušenju se na preparate namestijo pokrivna stekelca z uporabo primerne sintetične smole. Preparati se najprej preučujejo s povečavo $\times 200$, nato pa potopljeni v olje s povečavo $\times 1\ 000$.

Rezultat je pozitiven, če so v hemocitih prisotni majhni okrogli ali ovalni organizmi (široki $2\ \mu\text{m}$ do $5\ \mu\text{m}$). Vendar pa se parazit lahko pojavi tudi zunaj celice. Ti organizmi imajo bazofilno citoplazmo in eozinofilno jedro (barve se lahko razlikujejo glede na uporabljeno barvilo) in ker se na preparatu razširijo, so pri odtisih lahko videti večji kot pri histološki preiskavi. Opazijo se lahko celice z več jedri. Ta metoda ni specifična za določeno vrsto parazitov.

I.2.2 Histologija

Rezine tkiv, ki vključujejo škrge in prebavno žlezo, se vsaj 24 ur fiksirajo v Davidsonovem fiksativu, čemur sledi običajni postopek za parafinsko histologijo in barvanje, na primer s hematoksilinom in eozinom. Opazujejo se na vedno večjih povečavah do $\times 1\ 000$.

Rezultat je pozitiven, če so paraziti prisotni kot zelo majhne, od $2\ \mu\text{m}$ do $5\ \mu\text{m}$ široke celice v hemocitih ali proste v vezivnem tkivu ali sinusih škrg, drobovju in epitelu plašča, kar je pogosto povezano z intenzivno vnetno reakcijo. V izogib kakršnim koli dvomom je diagnoza pozitivna, če se opazi parazit v hemocitu. Ta metoda ni specifična za določeno vrsto parazitov.

I.3 Molekularne metode

I.3.1 Ekstrakcija DNK

DNK se ekstrahira v skladu s standardnimi postopki.

Lahko se uporabijo kompleti za ekstrakcijo DNK, ki so na voljo komercialno in običajno zagotavljajo visokokakovostno DNK, primerno za uporabo s protokoli PCR, kot je opisano v nadaljnjem besedilu.

I.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Razvitih in objavljenih je bilo več protokolov PCR.

Lahko se uporabita dva protokola PCR, ki sta ciljno usmerjena v male podenote rDNK:

(a) prvi je konvencionalni protokol PCR, s katerim se amplificira več pripadnikov rodu *Haplosporidia*, vključno z *Bonamia* spp. Začetna oligonukleotida Bo in Boas sta 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' oz. 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' in amplificirata produkt 300 bp. Mešanice za PCR vsebujejo pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 pri 25 °C] in 1-odstotni Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM mešanice dNTP, 1 μM smiselnega in protismiselnega začetnega oligonukleotida, 0,02 enoti μl^{-1} Taq DNK polimeraze ter 0,2 ng μl^{-1} templata DNK v skupni količini 50 μl . Vzorci se pet minut denaturirajo v cikličnem termostatu pri 94 °C, nato pa se na njih opravi 30 ciklov (eno minuto pri 94 °C, eno minuto pri 55 °C, eno minuto pri 72 °C), ki jim sledi dokončna ekstenzija 10 minut pri 72 °C.

Pozitivne kontrole sestojijo iz genomske DNK iz močno okužene živali gostiteljice ali plazmidne DNK, vključno s ciljno regijo.

Negativne kontrole sestojijo iz genomske DNK iz neokuženih živali gostiteljic in reagentov PCR brez ciljne DNK.

Pozitiven rezultat je pozitivna amplifikacija PCR ob pričakovani velikosti (in sicer 300 bp), pri čemer so vse negativne kontrole negativne, vse pozitivne kontrole pa pozitivne;

- (b) drugi protokol PCR je PCR v realnem času z nespecifičnim načinom detekcije z barvilom SYBR® Green. Omogoča specifično dokazovanje *Bonamia ostreae* (kot je opisano v nadaljnjem besedilu) in se lahko kombinira s PCR v realnem času z nespecifičnim načinom detekcije z barvilom SYBR® Green, kar omogoča specifično dokazovanje *Bonamia exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Začetna oligonukleotida BOSTRE-F (5'- TTACGTCCTGCCTTTGTA-3') in BOSTRE-R (5'- TCGCGGTTGAATTTATCGT-3') amplificirata produkt 208 bp. Mešanice PCR vsebujejo osnovno zmes SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM smiselne in protismiselne začetne oligonukleotide ter 200 ng ekstrahirane DNK. Vzorci se 10 minut denaturirajo v sistemu za dokazovanje v realnem času pri 95 °C, nato pa se na njih opravi 35 ciklov (30 sekund pri 95 °C, 45 sekund pri 55 °C in eno minuto pri 72 °C). Krivulja tališča se analizira s povečevanjem temperature po 0,5 °C/s od 55 °C do 95 °C, pri vsaki spremembi temperature pa se evidentira fluorescenca.

Pozitivne kontrole sestojijo iz genomske DNK iz močno okužene živali gostiteljice ali plazmidne DNK, vključno s ciljno regijo.

Negativne kontrole sestojijo iz genomske DNK iz neokuženih živali gostiteljic in reagentov PCR brez ciljne DNK.

Pozitiven rezultat je pozitivna amplifikacija PCR z enotnim tališčem (78,25 °C ± 0,25 °C pod pogoji, objavljenimi v Ramilo et al. 2013), pri čemer so vse negativne kontrole negativne, vse pozitivne kontrole pa pozitivne.

I.3.3 Hibridizacija *in situ* (ISH)

Razvitih in objavljenih je bilo več protokolov ISH.

Uporabi se sonda, ki je ciljno usmerjena v malo enoto genskega kompleksa rDNK, čeprav se je izkazalo, da navzkrižno reagirajo z nekaterimi drugimi predstavniki rodu *Haplosporidia*.

Rezine tkiv, ki vključujejo škrge in prebavno žlezo, se vsaj 24 ur fiksirajo v Davidsonovem fiksativu, čemur sledi običajni postopek za parafinsko histologijo. Odrežejo se 5 µm velike rezine in prenesejo na preparate, prevlečene z aminoalkilsilanom, ki se nato čez noč pečejo v pečici pri 40 °C. Rezine se razvoskajo tako, da se za 10 minut potopijo v ksilen. Ta korak se ponovi samo enkrat, nato pa se topilo odstrani, tako da se dvakrat zaporedoma po 10 minut potopi v kopeli z absolutnim etanolom. Rezine se potem dehidrirajo, tako da se potopijo v stopenjske serije etanola. Rezine se 30 minut tretirajo s proteinazo K (100 µg ml⁻¹) v pufru TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) pri 37 °C. Preparati se dehidrirajo tako, da se potopijo v stopenjske serije etanola in nato posušijo na zraku. Rezine se inkubirajo s 100 µl hibridizacijskega pufru (4 × SSC [standardna raztopina slane in citrate], 50-odstotni formamid, 1 × Denhardtova raztopina, 250 µg ml⁻¹ tRNK iz kvasovk, 10-odstotni dekstran sulfat), ki vsebuje 20 ng (2 µl reakcije PCR, pripravljenih v skladu s točko I.3.2 z uporabo začetnih oligonukleotidov Bo in Boas) sonde, označene z digoksigeninom. Rezine se prekrijejo s plastičnimi pokrovnimi stekelci *in situ* in za pet minut položijo na grelno enoto pri 95 °C. Preparati se nato eno minuto hladijo na ledu, preden se čez noč hibridizirajo v vlažni komori pri 42 °C. Rezine se spirajo dvakrat po pet minut v 2 × SSC pri sobni temperaturi in enkrat po 10 minut v 0,4 × SSC na 42 °C. Postopki dokazovanja se izvajajo v skladu z navodili proizvajalca. Preparati se nato sperejo v sterilni destilirani vodi (dH₂O). Rezine se nasprotno pobarvajo z Bismarck rjavo-rumenim barvilom, sperejo v dH₂O, pokrivna stekelca pa se namestijo z uporabo vodenega medija s pokrovnimi stekelci.

Pozitivne in negativne kontrole so rezine iz znanih okuženih oz. neokuženih živali gostiteljic.

Pozitiven rezultat ustreza označenim parazitom v hemocitih, pri čemer so vse negativne kontrole negativne, vse pozitivne kontrole pa pozitivne.

I.3.4 Sekvenciranje

Sekvenciranje se izvede kot eden od zadnjih korakov za potrditveno diagnostiko. Ciljni regiji sta mala podenota rDNK in ITS1.

II. Postopki za nadzor in potrditev okužbe z *Bonamia ostreae*

Za namene nadzora in potrditve prisotnosti ali izključitve suma na okužbo z *Bonamia ostreae* v skladu z zahtevami iz oddelka II dela 5 Priloge I se uporabijo diagnostične metode in ustrezni postopki v skladu s smernicami iz tabele 5.1.

Tabela 5.1

Smernice za uporabo diagnostičnih metod za programe nadzora in za izključitev ali potrditev okužbe z *Bonamia ostreae*

Metoda	Ciljno usmerjen nadzor	Domnevna diagnoza	Potrditvena diagnoza
Odtisi srca ali škrge	X	X	X ali
Histopatologija	X		X ali
Hibridizacija <i>in situ</i>			X in
PCR	X	X	X in
Sekvenciranje			X

DEL 6

NATANČNE DIAGNOSTIČNE METODE IN POSTOPKI ZA NADZOR IN POTRDITEV BOLEZNI BELIH PIK (WSD)

1. Diagnostični postopki za dokazovanje WSSV

Pri vzorčenju in laboratorijski preiskavi za namene programov nadzora in izkoreninjenja iz oddelka I dela 6 Priloge I ter za potrditev prisotnosti ali izključitev suma na okužbo z WSSV v skladu s členom 57(b) Direktive 2006/88/ES z uporabo diagnostičnih metod iz oddelka II dela 6 Priloge I se uporabijo natančne diagnostične metode in postopki iz točk 2 do 7 tega dela.

Metode in postopki, opisani v tem delu Priloge II, so prilagojeni glede na akreditacijski test ISO 17025, ki se uporablja v referenčnem laboratoriju Evropske unije za boleznirakov. Lahko se uporabljajo tudi alternativni pristopi, pri katerih se uporabljajo enaki pogoji ali kompleti, ki jih proizvajajo različni proizvajalci, toda ki zagotavljajo enakovredno občutljivost in specifičnost kot kompleti, opisani v tem delu. V vseh primerih se amplificirani pridelek reakcije PCR sekvencira, da se potrdi določitev virusa kot virusa sindroma belih pik (WSSV).

2. Postopek vzorčenja

Tkivo (pleopodi in škrge) iz rakov, ki vsebuje WSSV, se lahko shrani v etanolu, RNAlater ali hitro zamrznjeno pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Faze, ki se zahtevajo za določitev WSSV iz vzorcev tkiv, so homogenizacija tkiva, ekstrakcija DNK, specifična amplifikacija DNK WSSV z uporabo PCR, vizualizacija amplificiranega pridelka na gelu, prečiščenje DNK in sekvenciranje za potrditev določitve patogena.

3. Homogenizacija tkiva

Tkivna disrupcija in priprava homogenata v ustreznem pufri se izvajata z uporabo tkivnega homogenizatorja Fast Prep in epruvet Lysing Matrix A (MP Biomedicals). Tkivo se stehta, vstavi v epruvete Lysing Matrix A, razredči v razmerju 1 v 10 w/v ali v skladu z navodili proizvajalca v ustreznem pufri (G2 in 10 μl proteinaze K za uporabo s kompletom DNA Tissue (Qiagen)) in dve minuti homogenizira z uporabo tkivnega homogenizatorja Fast Prep 24. Homogenizirani vzorci se najmanj štiri ure ali čez noč inkubirajo pri $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorci se premešajo v vorteks mešalniku, dve minuti centrifugirajo pri 9 000 vrtljajev na minuto, v epruveto z vzorcem se nato doda 50 μl supernatanta ali količina, ki ustreza 5 mg tkiva (teža tkiva, optimalna za komplet za ekstrakcijo), za ekstrakcijo DNK, s pufrom G2 pa se količina nato poveča do 200 μl .

4. Ekstrakcija DNK

Skupna DNK se ekstrahira z uporabo kompleta za ekstrahiranje DNK tkiva in stroja EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Z vsako serijo vzorcev se opravi kontrola ekstrakcije (DNK iz telečjega timusa) in negativna kontrola (G2). DNK se eluira v količino 50 µl. Za zagotovitev, da je bila ekstrakcija uspešna, se koncentracija DNK za vse vzorce in kontrole določi s strojem Nano Drop. Ekstrahirana DNK se zamrzne pri – 20 °C, če se ne uporabi takoj.

5. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za WVVS

Metoda za dokazovanje WSSV je protokol za dokazovanje WSSV z ugnezdjeno PCR, določen v naslednjih odstavkih, ki amplificira amplikona 1 447 bp in 848 bp iz gena 18s rRNK v prvem oz. drugem krogu PCR.

Prvi krog reakcije PCR se vzpostavi v količini 50 µl, ki vsebuje končne koncentracije pufru GoTaq Buffer (Promega), 5 mM MgCl₂, 1 pmol/µl začetnega oligonukleotida WSSV 146 F1, 1 pmol/µl začetnega oligonukleotida WSSV 146 R1 (tabela 1), 0,25 mM dNTPs, 1,25 U Taq polimeraze in 2,5 µl DNK. Vsak vzorec se analizira v dveh izvodih skupaj z negativno kontrolo ekstrakcije, negativno kontrolo PCR (namesto DNK se doda 2,5 µl H₂O) in pozitivno kontrolo. Pozitivna kontrola je razredčen plazmid WSSV, pripravljen in potrjen za interno uporabo (ki ga da na voljo referenčni laboratorij EU).

Drugi krog reakcije PCR za WVVS se vzpostavi na enak način kot prvi krog, vendar z uporabo kompleta začetnih oligonukleotidov WSSV 146 F2/R2 in z drugo pozitivno kontrolo, da se preveri, ali je ta faza PCR delovala.

Začetni oligonukleotid	Sekvenca
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAAGTCCCCCTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Tako prvi kot drugi krog PCR se izvedeta pod naslednjimi pogoji pomnoževanja na cikličnem termostatu DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (ali enakovrednem termostatu). Na začetku se izvede denaturiranje za dve minuti pri 94 °C, ki mu sledi 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 62 °C, 30 sekund pri 72 °C, kar se ponovi za 30 ciklov, nato pa sledita ekstenzija za 2 minuti pri 72 °C in zadržanje pri 4 °C.

6. Gelska elektroforeza

Amplificirani pridelki reakcije PCR iz prvega in drugega kroga PCR se vizualizirajo na 2-odstotnem agaroznem gelu, pripravljenem s pufrom TAE. 15 µl vsakega vzorca se približno 20 minut analizira pri 120 voltih in opazuje pod UV svetlobo. Pri pozitivnih vzorcih se bo v prvem krogu PCR pojavila proga v velikosti 1 447 bp, v drugem krogu pa v velikosti 848 bp. Vzorci navedenih velikosti se izrežejo in vstavijo v 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko. DNK, ki jo vsebujejo rezine gela, se prečisti z uporabo gela Promega Wizard® SV Gel in sistemom PCR Clean-Up System v skladu z navodili proizvajalca. Koncentracija DNK se oceni s strojem Nano Drop. Prečiščena DNK se zamrzne pri – 20 °C, če se ne uporabi takoj.

7. Sekvenciranje produktov PCR

DNK se sekvencira s kompletom Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Skupna količina pri vsaki reakciji je 20 µl, končne koncentracije pa so 1 × Big Dye Terminator, 1 × pufer za sekvenciranje, 10 pmol/µl smiselnega ali protismiselnega začetnega oligonukleotida in 10 µl prečiščene DNK (razredčeno na približno 10 ng/µl), kar se analizira pod naslednjimi pogoji pomnoževanja na cikličnem termostatu DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (ali enakovrednem termostatu): 30 sekund pri 94 °C, nato 10 sekund pri 96 °C, 10 sekund pri 50 °C in štiri minute pri 60 °C, pri čemer se zadnji trije koraki 30-krat ponovijo.

Produkti PCR se oborijo z metodo z natrijevim acetatom, pri kateri se 10 µl NaAc, 70 µl H₂O in 250 µl etanola doda 20 µl DNK, premeša v vorteks mešalniku in 20 minut centrifugira pri 13 000 vrtljajih na minuto, supernatant se odstrani, peleti se sperejo z 200 µL absolutnega etanola, nato pa sledi petminutno centrifugiranje pri 13 000 vrtljajih na minuto. Peleti se pet minut sušijo pri 37 °C. Doda se jim 25 µl Hi-Di formamida, dve minuti se segrevajo na 95 °C in temeljito premešajo v vorteks mešalniku. Vzorci se sekvencirajo z analizatorjem ABI3130xl Avant Genetic Analyser v skladu z navodili proizvajalca. Rezultati sekvenciranja se analizirajo s programsko opremo Sequencher, sekvence pa se primerjajo s sekvencami iz podatkovne baze NCBI s funkcijo BLAST.

ISSN 1977-0804 (elektronska različica)
ISSN 1725-5155 (tiskana različica)



Urad za publikacije Evropske unije
2985 Luxembourg
LUKSEMBURG

SL