II

(Atti mhux leġiżlattivi)

DEĊIŻJONIJIET

DEĊIŻJONI TA' IMPLIMENTAZZJONI TAL-KUMMISSJONI (UE) 2015/1554

tal-11 ta' Settembru 2015

li tistipula regoli għall-applikazzjoni tad-Direttiva 2006/88/KE fir-rigward tar-rekwiżiti għall-metodi dijanjostiċi u ta' sorveljanza

(notifikata bid-dokument C(2015) 6188)

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI EWROPEA,

Wara li kkunsidrat it-Trattat dwar il-Funzjonament tal-Unjoni Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 2006/88/KE tal-24 ta' Ottubru 2006 dwar il-ħtiġiet tas-saħħa tal-annimali għall-annimali tal-akkwakultura u l-prodotti tagħhom, u dwar il-prevenzjoni u l-kontroll ta' ċertu mard f'annimali akkwatiċi ([1]), u b'mod partikolari l-Artikoli 49(3), 50(4), 57(b) u 61(3) tagħha,

Billi:

(1) Id-Direttiva 2006/88/KE tistipula l-miżuri minimi ta' prevenzjoni għas-sorveljanza u għall-identifikazzjoni bikrija tal-mardiet elenkati fl-annimali akkwatiċi, li huwa stabbilit fl-Anness IV ta' dik id-Direttiva ("il-mardiet elenkati") u l-miżuri ta' kontroll li għandhom jiġu applikati f'każ ta' suspett ta' jew ta' tifqigħa tal-mardiet elenkati. Tistipula wkoll ir-rekwiżiti għall-kisba ta' status ta' mingħajr mard għall-Istati Membri, għaż-żoni jew għall-kompartimenti tagħhom.

(2) L-eradikazzjoni tal-mardiet elenkati u l-kisba ta' status ta' mingħajr mard għal Stat Membru, għal żona jew għal kompartiment għandhom ikunu bbażati fuq l-istess prinċipji u għandhom isegwu l-istess approċċ xjentifiku fl-Unjoni kollha. Għal dik ir-raġuni, jeħtieġ li jiġu stipulati rekwiżiti speċifiċi fil-livell tal-Unjoni għall-iskemi ta' eradikazzjoni u ta' sorveljanza, kif ukoll il-metodi ta' teħid ta' kampjuni u ta' dijanjożi li jridu jintużaw mill-Istati Membri sabiex jiksbu status ta' mingħajr mard għall-Istat Membru kollu, għaż-żona jew għall-kompartiment tiegħu.

(3) L-eżaminazzjonijiet fil-laboratorju li jridu jitwettqu f'każ ta' suspett jew ta' konferma tal-preżenza tal-mardiet elenkati, għandhom ikunu l-istess fil-livell tal-Unjoni u għandhom isegwu l-istess standards u protokolli xjentifiċi. Skont id-Direttiva 2006/88/KE, jeħtieġ li jiġu stipulati metodi u proċeduri dijanjostiċi speċifiċi sabiex jintużaw mil-laboratorji magħżula għal dak il-għan mill-awtorità kompetenti tal-Istati Membri.

(4) Il-Kodiċi tas-Saħħa tal-Annimali Akkwatiċi adottat mill-Organizzazzjoni Dinjija għas-Saħħa tal-Annimali (OIE) (il-"Kodiċi Akkwatiku") jistabbilixxi l-istandards għat-titjib tas-saħħa tal-annimali akkwatiċi u għat-trattament xieraq tal-ħut imrobbi fil-livell dinji, li jinkludu l-istandards għal kummerċ internazzjonali sikur tal-annimali akkwatiċi u tal-prodotti tagħhom. Numru ta' kapitoli tal-Kodiċi Akkwatiku jistipulaw rakkomandazzjonijiet dwar l-użu ta' ċerti testijiet dijanjostiċi. Tali testijiet previsti mill-OIE huma stipulati fil-Manwal tal-OIE dwar it-Testijiet Dijanjostiċi għall-Annimali Akkwatiċi (il-"Manwal Akkwatiku"). Sabiex jiġi żgurat li r-rekwiżiti tal-Unjoni fir-rigward tad-dijanjostika tal-mard tal-annimali akkwatiċi jkunu konsistenti mal-istandards internazzjonali, ir-regoli stipulati f'din id-Deċiżjoni għandhom iqisu l-istandards u r-rakkomandazzjonijiet tal-Kodiċi Akkwatiku.

([1]) ĠU L 328, 24.11.2006, p. 14.

(5) F'dan ir-rigward, għal ħafna mill-mardiet elenkati, il-Manwal Akkwatiku jelenka diversi testijiet u proċeduri li jridu jintużaw għall-fini tal-eżaminazzjonijiet fil-laboratorju. Sabiex tinkiseb l-uniformità fil-bażi xjentifika għall-ħidma dijanjostika għall-mardiet elenkati fil-livell tal-Unjoni, jeħtieġ li ssir għażla minn fost it-testijiet u l-proċeduri dijanjostiċi rrakkomandati mill-OIE u li jiġi speċifikat liema huma t-testijiet li għandhom ikunu obbligatorji għall-fini tal-eżaminazzjoni fil-laboratorju meta jitwettqu programmi ta' sorveljanza u li jiġi eliminat is-suspett tal-preżenza tal-mardiet elenkati jew li tiġi kkonfermata. Filwaqt li ser ikun meħtieġ ukoll li jkun hemm metodi u proċeduri alternattivi disponibbli f'ċerti każijiet, għandhom jingħataw deskrizzjonijiet u xi spjegazzjonijiet xjentifiċi dwar meta u dwar kif jistgħu jiġu applikati l-metodi alternattivi. Dan huwa neċessarju b'mod partikolari għall-proċeduri dijanjostiċi iktar iddettaljati.

(6) Sabiex jiġu prodotti riżultati dijanjostiċi preċiżi u riproduċibbli, huwa importanti li l-proċeduri u l-protokolli ddettaljati li jridu jintużaw ikunu vvalidati f'konformità mal-istandards rilevanti tal-kwalità msemmija fil-Parti I tal-Anness VI tad-Direttiva 2006/88/KE. Għal ħafna mill-metodi dijanjostiċi previsti f'din id-Deċiżjoni, l-użu ta' kits kummerċjali tat-testijiet huwa parti neċessarja mill-protokolli dijanjostiċi u dawk il-kits tat-testijiet ikunu ġew ivvalidati f'testijiet akkreditati mil-Laboratorji ta' Referenza tal-UE (EURL) għall-mard rispettiv. Fl-interess taċ-ċertezza ġuridika, l-ismijiet kummerċjali ta' dawk il-kits kummerċjali tat-testijiet li jkunu vvalidati għandhom jissemmew f'din id-Deċiżjoni.

(7) Jista' jkun diffiċli għal ċerti Stati Membri li jiksbu status ta' mingħajr mard għall-Istat Membru kollu, għaż-żona jew għall-kompartiment tiegħu fir-rigward ta' marda waħda jew iktar mill-mardiet elenkati. F'sitwazzjonijiet bħal dawn, l-Istat Membru jista' jkun jixtieq li ma jiksibx jew li ma jerġax jikseb l-istatus ta' mingħajr mard għall-mardiet elenkati. Il-miżuri minimi ta' kontroll li jridu jiġu applikati f'każijiet fejn l-Istat Membru kkonċernat ma jkunx jixtieq jikseb jew jerġa' jikseb l-istatus ta' mingħajr mard, għandhom ikunu l-istess fil-livell tal-Unjoni u għandhom isegwu l-istess kriterji. Għalhekk, f'konformità mad-Direttiva 2006/88/KE, jeħtieġ li jiġu stipulati regoli ddettaljati għall-konteniment ta' dawk il-mardiet elenkati kif ukoll tar-rekwiżiti minimi għat-tneħħija ta' dawk il-miżuri ta' konteniment.

(8) Id-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2001/183/KE ([1]) tistipula r-rekwiżiti li jikkonċernaw il-pjanijiet dwar it-teħid ta' kampjuni u l-metodi dijanjostiċi għas-sejba u għall-konferma tal-mardiet elenkati tan-nekrożi ematopojetika infettiva u tas-settiċemija emorraġika virali. Id-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2003/466/KE ([2]) tistipula r-rekwiżiti li jikkonċernaw il-pjanijiet dwar it-teħid ta' kampjuni u l-metodi dijanjostiċi għas-sejba tal-anemija infettiva tas-salamun, kif ukoll il-kriterji għall-qsim tat-territorju f'żoni u għas-sorveljanza uffiċjali wara suspett u konfermi tal-preżenza ta' dik il-marda. Id-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2002/878/KE ([3]) tistipula r-rekwiżiti li jikkonċernaw il-pjanijiet dwar it-teħid ta' kampjuni u l-metodi dijanjostiċi għas-sejba u għall-konferma taż-żewġ mardiet tal-molluski, jiġifieri l-bonamjożi u l-marteiljożi. Sabiex ir-rekwiżiti jiġu aġġornati, dawk it-tliet Deċiżjonijiet għandhom jiġu sostitwiti minn din id-Deċiżjoni. Skont dan, id-Deċiżjoni 2001/183/KE, id-Deċiżjoni 2002/878/KE u d-Deċiżjoni 2003/466/KE għandhom jitħassru.

(9) Billi ċerti Stati Membri jkunu jeħtieġu ż-żmien biex jaġġornaw il-laboratorji nazzjonali ta' referenza tagħhom sabiex jikkonformaw mar-rekwiżiti stipulati f'din id-Deċiżjoni, għandha tibda tapplika mill-1 ta' April 2016.

(10) Il-miżuri stipulati f'din id-Deċiżjoni huma f'konformità mal-opinjoni tal-Kumitat Permanenti dwar il-Pjanti, l-Annimali, l-Ikel u l-Għalf,

ADOTTAT DIN ID-DEĊIŻJONI:

Artikolu 1

Is-suġġett

Din id-Deċiżjoni tistipula r-regoli għal dan li ġej:

(a) is-sorveljanza, iż-żoni ta' lqugħ, it-teħid ta' kampjuni u l-metodi dijanjostiċi li jridu jintużaw mill-Istati Membri b'rabta mal-istatus tal-mard tal-Istati Membri jew ta' żoni jew ta' kompartimenti tagħhom għall-mard mhux eżotiku tal-annimali akkwatiċi li huma elenkati fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE (il-'mardiet elenkati');

([1]) Id-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2001/183/KE tat-22 ta' Frar 2001 tniżżel il-pjanijiet kampjunarji u l-metodi tad-djanjosi għal-iskoperta u l-konferma ta' ċertu mard tal-ħut u tħassar id-Deċiżjoni 92/532/KEE: (ĠU L 67, 9.3.2001, p. 65).

([2]) Id-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2003/466/KE tat-13 ta' Ġunju 2003 li tistabbilixxi l-kriterji u s-sorveljanza uffiċjali wara suspetti jew konferma tal-preżenza ta' anemija tas-salamun infettiva (ISA) (ĠU L 156, 25.6.2003, p. 61).

([3]) Id-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2002/878/KE tas-6 ta' Novembru 2002 li tistabbilixxi l-pjanijiet dwar it-teħid ta' kampjuni u metodi dijanjostiċi għas-sejba u l-konferma tal-preżenza taż-żewġ tipi ta' mard tal-molluski, il-Bonamiosis (*Bonamia ostrea*) u l-Marteiliosis (*Marteilia refringens*) (ĠU L 305, 7.11.2002, p. 57).

(b) il-metodi dijanjostiċi li jridu jintużaw għall-eżaminazzjonijiet fil-laboratorju fil-każ ta' suspett jew ta' konferma tal-preżenza tal-mardiet elenkati; kif ukoll

(c) il-miżuri minimi ta' kontroll li jridu jiġu applikati fil-każ ta' suspett jew ta' konferma ta' marda elenkata fi Stat Membru, f'żona jew f'kompartiment li ma jkunux iddikjarati ħielsa minn dik il-marda elenkata.

Artikolu 2

Id-definizzjonijiet

Għall-fini ta' din id-Deċiżjoni, għandhom japplikaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

(a) "settiċemija emorraġika virali" ("VHS") tfisser marda kkawżata mill-vajrus tas-settiċemija emorraġika virali (VHSV), magħruf ukoll bħala l-vajrus Egtved, vajrus li jappartjeni għall-ġeneru tan-*Novirhabdovirus,* fi ħdan il-familja tar-*Rhabdoviridae*;

(b) "nekrożi ematopojetika infettiva" ("IHN") tfisser marda kkawżata mill-vajrus tan-nekrożi ematopojetika infettiva (IHNV), vajrus li huwa parti mill-ġeneru tan- *Novirhabdovirus,* fi ħdan il-familja tar- *Rhabdoviridae*;

(ċ) "marda tal-vajrus tal-erpete tal-koi" ("KHVD") tfisser marda kkawżata mill-vajrus tal-erpete tal-koi (KHV), li huwa parti mill-familja tal-*Alloherpesviridae*. L-isem xjentifiku huwa cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3);

(d) "anemija infettiva tas-salamun" ("ISA") tfisser marda kkawżata minn infezzjoni b'vajrus imħassar tal-anemija tas-salamun (ISAV) li huwa ta' reġjun polimorfiku ħafna (HPR), u li huwa vajrus li huwa parti mill-ġeneru tal-*Isavirus*, fi ħdan il-familja tal-*Orthomyxoviridae*;

(e) "infezzjoni bil-*Marteilia refringens*" tfisser marda kkawżata minn infezzjoni bil-protożon protista *Marteilia refringens*;

(f) "infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*" tfisser marda kkawżata minn infezzjoni bil-protożon ħaplosporidju *Bonamia ostreae*;

(g) "marda tal-ponot bojod" ("WSD") tfisser marda kkawżata mill-vajrus tas-sindrome tal-ponot bojod (WSSV), li huwa vajrus fid-DNA b'filament doppju tal-ġeneru tal-*Whispovirus,* fi ħdan il-familja tan-*Nimaviridae*.

Artikolu 3

Ir-rekwiżiti minimi għall-programmi ta' eradikazzjoni u ta' sorveljanza

L-Istati Membri għandhom jiżguraw li r-regoli dwar il-programmi ta' eradikazzjoni u ta' sorveljanza, iż-żoni ta' lqugħ, it-teħid ta' kampjuni u l-metodi dijanjostiċi stabbiliti fl-Anness I, kif ukoll il-metodi speċifiċi u l-proċeduri ddettaljati stabbiliti fl-Anness II jiġu rrispettati, meta jkun irid jingħata, jiġi rtirat jew jinkiseb lura l-istatus ta' mingħajr mard għal Stat Membru, għal żona jew għal kompartiment tiegħu għal marda waħda jew iktar mill-mardiet elenkati.

Artikolu 4

Ir-rekwiżiti minimi għall-metodi dijanjostiċi u għall-proċeduri speċifiċi

L-Istati Membri għandhom jiżguraw li l-metodi ta' kontroll stabbiliti fl-Anness I u l-metodi dijanjostiċi speċifiċi u l-proċeduri ddettaljati stabbiliti fl-Anness II jiġu rrispettati, meta jitwettqu eżaminazzjonijiet fil-laboratorju sabiex tiġi kkonfermata jew tiġi eskluża l-preżenza ta' marda elenkata.

Artikolu 5

Il-miżuri minimi ta' kontroll minimu għall-konteniment tal-mardiet elenkati u r-rekwiżiti minimi għat-tneħħija tal-miżuri ta' konteniment fl-Istati Membri, fiż-żoni jew fil-kompartimenti tagħhom li ma jkunux iddikjarati bħala ħielsa mill-mardiet elenkati

L-Istati Membri għandhom jiżguraw li l-miżuri minimi ta' kontroll u r-rekwiżiti minimi għat-tneħħija tal-miżuri ta' konteniment stipulati fl-Anness I jiġu rrispettati, meta jitwettqu l-miżuri ta' kontroll u t-tneħħija tal-miżuri ta' konteniment għal marda waħda jew iktar mill-mardiet elenkati fi Stat Membru, f'żona jew f'kompartiment tiegħu li ma jkunux iddikjarati bħala ħielsa mill-mardiet elenkati.

Artikolu 6

It-tħassir

Id-Deċiżjonijiet 2001/183/KE, 2002/878/KE u 2003/466/KE huma mħassra.

Artikolu 7

Id-data tal-applikazzjoni

Din id-Deċiżjoni tapplika mill-1 ta' April 2016.

Artikolu 8

L-indirizzi

Din id-Deċiżjoni hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmul fi Brussell, il-11 ta' Settembru 2015.

Għall-Kummissjoni
Vytenis ANDRIUKAITIS
Membru tal-Kummissjoni

ANNESS I

IL-METODI TA' SORVELJANZA U TA' KONTROLL

I. **Introduzzjoni**

Dan l-Anness jistipula:

(a) ir-rekwiżiti għall-programmi ta' eradikazzjoni u ta' sorveljanza, kif previst fl-Artikolu 44 tad-Direttiva 2006/88/KE, u l-metodi dijanjostiċi u tat-teħid ta' kampjuni li jridu jintużaw sabiex l-Istati Membri jew iż-żoni jew il-kompartimenti tagħhom jiġu ddikjarati bi status ta' mingħajr mard kif previst fil-Kapitolu VII ta' dik id-Direttiva;

(b) il-metodi dijanjostiċi u tat-teħid ta' kampjuni li jridu jintużaw għall-eżaminazzjonijiet fil-laboratorji f'każ ta' suspett ta' mard u għall-konferma tal-preżenza ta' mard mhux eżotiku imniżżel fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE ("il-mardiet elenkati") kif previst fl-Artikoli 28(a) u 57(b) ta' dik id-Direttiva;

(c) il-miżuri ta' konteniment li jridu jittieħdu fil-każ ta' konferma tal-preżenza ta' marda elenkata, kif previst fl-Artikolu 39 tad-Direttiva 2006/88/KE, kif ukoll il-miżuri li jridu jittieħdu sabiex jinkiseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija III għal Stat Membru, għal żona jew għal kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V.

Ir-rekwiżiti stipulati f'dan l-Anness ikopru l-mardiet elenkati li ġejjin:

1.	Is-settiċemija emorraġika virali (VHS)	Parti 1
2.	In-nekrożi ematopojetika infettiva (IHN)	Parti 1
3.	Il-marda tal-vajrus tal-erpete tal-koi (KHV)	Parti 2
4.	L-anemija infettiva tas-salamun (ISA)	Parti 3
5.	L-infezzjoni bil-*Marteilia refringens*	Parti 4
6.	L-infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*	Parti 5
7.	Il-marda tal-ponot bojod (WSD)	Parti 6

II. **Id-definizzjonijiet**

Għall-fini tal-Annessi I u II, għandhom japplikaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

(a) "kompartiment kontinentali" tfisser farm wieħed jew iktar li jkun(u) jinsab(u) fil-parti kontinentali ta' Stat Membru wieħed jew iktar li jkun(u) taħt sistema komuni ta' bijosigurtà u li jkun fiha popolazzjoni ta' annimali akkwatiċi bi status distint tas-saħħa fir-rigward ta' marda speċifika;

(b) "farm kontinentali" tfisser farm li fih jinżammu annimali tal-akkwakultura li jkun jinsab fil-parti kontinentali tat-territorju ta' Stat Membru wieħed;

(c) "żona kontinentali" tfisser żona ġeografika preċiża li tinsab fil-parti kontinentali ta' Stat Membru wieħed jew iktar b'sistema idroloġika omoġenja magħmula minn partijiet minn żona ta' magħqad tal-ilma mis-sors(i) għal ostaklu naturali jew artifiċjali li ma jippermettix il-migrazzjoni 'il fuq ta' annimali akkwatiċi minn meded iktar baxxi tal-magħqad tal-ilma, minn magħqad sħiħ tal-ilma mis-sors(i) tiegħu sal-estwarju tiegħu, jew minn iktar minn magħqad wieħed tal-ilma, inklużi l-estwarji tagħhom, minħabba r-rabta epidemjoloġika bejn l-imgħaqed tal-ilma minħabba l-estwarju;

(d) "farm li jkun iddikjarat uffiċjalment li huwa infettat" tfisser farm fejn jinżammu annimali akkwatiċi li fih ġiet ikkonfermata waħda jew iktar mill-mardiet elenkati mill-awtorità kompetenti f'konformità mal-Artikolu 28(a), l-Artikolu 29 u l-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE.

(e) "farm ta' kuntatt" tfisser farm li fih jinżammu annimali akkwatiċi li b'xi mod jew ieħor jintwera jew ikun suspettat ferm li jkun ġie kkontaminat b'materjal infettiv minn farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat.

PARTI 1

IL-METODI TA' SORVELJANZA U TA' KONTROLL GĦAS-SETTIĊEMIJA EMORRAĠIKA VIRALI (VHS) U GĦAN-NEKROŻI EMATOPOJETIKA INFETTIVA (IHN)

I. **Ir-rekwiżiti sabiex il-programmi ta' sorveljanza u ta' eradikazzjoni jiksbu u jżommu l-istatuses tas-saħħa mingħajr mard fir-rigward tal-VHS, tal-IHN u tal-miżuri ta' konteniment għal dawk il-mardiet elenkati**

I.1. Ir-rekwiżiti ġenerali għall-ispezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għall-VHS u għall-IHN:

(a) l-ispezzjonijiet tas-saħħa u, fejn xieraq, it-teħid ta' kampjuni għandhom jitwettqu matul il-perjodu tas-sena meta t-temperatura tal-ilma tkun taħt 14-il°C jew kull meta t-temperatura tal-ilma x'aktarx li tkun ser tilħaq l-iktar temperatura baxxa tas-sena;

(b) meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata fil-popolazzjonijiet selvaġġi f'konformità mat-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, in-numru u d-distribuzzjoni ġeografika tal-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu stabbiliti sabiex tinkiseb kopertura raġonevoli tal-Istat Membru, taż-żona jew tal-kompartiment. Il-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom ikunu jirrappreżentaw l-ekosistemi differenti fejn jinsabu l-popolazzjonijiet selvaġġi tal-ispeċijiet suxxettibbli;

(c) meta l-farms jew il-popolazzjonijiet selvaġġi jridu jkunu soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa jew għat-teħid ta' kampjuni iktar minn darba f'sena, l-intervalli bejn l-ispezzjonijiet tas-saħħa u bejn il-ġbir tal-kampjuni għandhom ikunu mill-inqas ta' erba' xhur u twal kemm jista' jkun, u jitqiesu r-rekwiżiti tat-temperatura previsti fil-punt (a);

(d) l-unitajiet kollha tal-produzzjoni, bħal għadajjar, tankijiet u gaġeġ bix-xibka, għandhom ikunu soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa għall-preżenza ta' ħut mejjet, dgħajjef jew b'imġiba anormali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għaż-żona mnejn joħroġ l-ilma, fejn il-ħut dgħajjef għandu ħabta li jakkumula minħabba l-kurrent tal-ilma;

(e) il-ħut ta' speċijiet suxxettibbli li jridu jinġabru bħala kampjuni għandu jintgħażel kif ġej:

(i) jekk tkun preżenti t-trota qawsalla (Oncorhynchus mykiss), għandu jintgħażel biss il-ħut ta' dik l-speċi għat-teħid ta' kampjuni, għajr fejn ikunu preżenti speċijiet suxxettibbli oħra li juru sinjali tipiċi ta' VHS jew ta' IHN; jekk it-trota qawsalla ma tkunx preżenti, il-kampjun irid ikun jirrappreżenta l-ispeċijiet suxxettibbli l-oħra kollha li jkunu preżenti;

(ii) jekk ikun preżenti ħut dgħajjef, b'imġiba anormali jew li għadu kif miet, iżda mhux fi stadju ta' dekompożizzjoni, dan il-ħut għandu jintgħażel; jekk jintuża iktar minn sors wieħed tal-ilma għall-produzzjoni tal-ħut, għandu jiġi inkluż fil-kampjun ħut li jirrappreżenta s-sorsi kollha tal-ilma;

(iii) il-ħut magħżul għandu jinkludi ħut li jinġabar, b'tali mod li l-partijiet kollha tal-farm kif ukoll il-klassijiet tas-snin kollha, ikunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun.

I.2. Ir-rekwiżiti speċifiċi sabiex jinkiseb status ta' mingħajr mard (il-kategorija I) fir-rigward tal-VHS u tal-IHN

I.2.1. Il-programmi ta' sorveljanza:

(a) Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija III kif imsemmi fil-Parti B tal-Anness III tad-Direttiva 2006/88/KE fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet, jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dawk il-mardiet elenkati, diment li l-farms fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV ta' dik id-Direttiva fi ħdan dak l-Istat Membru jew dik iż-żona jew dak il-kompartiment jikkonformaw mar-rekwiżiti stipulati fl-Anness V ta' dik id-Direttiva u li dawk il-farms kollha u, meta meħtieġ mit-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tagħha, il-punti tat-teħid ta' kampjuni f'popolazzjonijiet selvaġġi magħżula f'konformità ma' dik il-Parti, ikunu ġew soġġetti għal wieħed mill-programmi ta' sorveljanza li ġejjin:

(i) il-mudell A — programm ta' sorveljanza ta' sentejn:

Il-farms jew il-punti tat-teħid ta' kampjuni jridu jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' sentejn wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 1.A stabbilita fit-Taqsima II.

Matul dak il-perjodu ta' sentejn, l-ittestjar tal-kampjuni kollha b'metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2 irid jkun ipproduċa riżultati negattivi għall-VHS, għall-IHN jew għaż-żewġ mardiet, u kwalunkwe suspett ta' VHS, ta' IHN, jew taż-żewġ mardiet, irid ikun ġie eskluż f'konformità mat-teħid ta' kampjuni jew mal-metodi dijanjostiċi stabbiliti fil-punt II.3;

(ii) il-mudell B — programm ta' sorveljanza ta' erba' snin b'kampjun ta' daqs imnaqqas:

Il-farms jew il-punti tat-teħid ta' kampjuni jridu jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' erba' snin wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 1.B stipulata fit-Taqsima II.

Matul dak il-perjodu ta' erba' snin, l-ittestjar tal-kampjuni kollha b'metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2. irid jkun ipproduċa riżultati negattivi għall-VHS, għall-IHN jew għaż-żewġ mardiet, u kwalunkwe suspett ta' VHS, ta' IHN, jew taż-żewġ mardiet, irid ikun ġie eskluż f'konformità mat-teħid ta' kampjuni jew mal-metodi dijanjostiċi stabbiliti fil-punt II.3;

(b) jekk matul l-implimentazzjoni tal-programm ta' sorveljanza msemmi fil-punt (a), tiġi kkonfermata infezzjoni bil-VHS, bl-IHN, jew biż-żewġ mardiet, f'farm inkluż f'dak il-programm ta' sorveljanza u, għalhekk, l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija II tal-farm ikun ġie rtirat, dak il-farm jista' minnufih jerġa' jikseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija II u jkompli l-implimentazzjoni tal-programm ta' sorveljanza sabiex jikseb status ta' mingħajr mard bla ma jimplimenta programm ta' eradikazzjoni kif stipulat fil-punt I.2.2, diment li l-farm jikkonforma mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

(i) ikun farm kontinentali li l-istatus tas-saħħa tiegħu fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet, ma jkunx jiddependi mill-istatus tas-saħħa tal-popolazzjonijiet tal-annimali akkwatiċi fl-ilmijiet naturali tal-madwar fir-rigward tal-mardiet elenkati f'konformità mal-punt 3 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE;

(ii) jitbattal, jitnaddaf, jiġi diżinfettat u jiġi mserraħ; it-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun mill-inqas ta' sitt ġimgħat;

(iii) ikun ġie ripopolat b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet.

I.2.2. Il-programmi ta' eradikazzjoni

I.2.2.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

Stat Membru, żona jew kompartiment bi status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet, jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dawk il-mardiet elenkati, diment li l-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan dak l-Istat Membru jew dik iż-żona jew dak il-kompartiment ikunu ġew soġġetti għal programm ta' eradikazzjoni li jikkonforma mal-punti minn (a) sa (e):

(a) il-miżuri ta' kontroll minimu stipulati fit-Taqsima 4 tal-Kapitolu V tad-Direttiva 2006/88/KE jridu jkunu ġew applikati b'mod effettiv u trid tkun ġiet stabbilita żona ta' konteniment kif imsemmi fl-Artikolu 32(b) ta' dik id-Direttiva, li tkun magħmula minn żona ta' protezzjoni u minn żona ta' sorveljanza, qrib il-farm(s) li jkun (u) uffiċjalment iddikjarat(i) li huwa/huma infettat(i) bil-VHS, bl-IHN jew b'dawk iż-żewġ mardiet elenkati.

Iż-żona ta' konteniment trid tkun ġiet definita abbażi ta' każ b'każ fejn jitqiesu l-fatturi li jinfluwenzaw ir-riskji li l-marda elenkata tinxtered għall-ħut imrobbi u għall-ħut li jgħix fis-selvaġġ, fosthom: in-numru, ir-rata u d-distribuzzjoni tal-mortalità tal-ħut fil-farm infettat bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet; id-distanza u d-densità tal-farms tal-madwar; il-prossimità tal-biċċeriji; il-farms ta' kuntatt; l-ispeċijiet preżenti fil-farms; il-prattiki tat-trobbija applikati fil-farms affettwati u f'dawk tal-madwar għall-farms affettwati il-kundizzjonijiet idrodinamiċi u fatturi identifikati oħra ta' sinifikat epidemjoloġiku.

Sabiex jiġu stabbiliti ż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza, għandhom japplikaw ir-rekwiżiti minimi li ġejjin fir-rigward tad-demarkazzjoni ġeografika ta' dawk iż-żoni:

(i) żona ta' protezzjoni għandha tiġi stabbilita fil-qrib immedjat ta' farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-VHS, bl-IHN, jew b'dawk iż-żewġ mardiet elenkati, u għandha tikkorrispondi għal:

(1) f'żoni kostali: żona inkluża f'ċirku b'raġġ ta' mill-inqas eskursjoni waħda tal-marea jew mill-inqas ħames kilometri, skont liema minnhom tkun l-ikbar, iċċentrata fuq il-farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet, jew żona ekwivalenti li tkun stabbilita skont dejta epidemjoloġika jew idrodinamika xierqa;

(2) f'żoni interni: iż-żona kollha tal-maġħqad tal-ilma tal-farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-VHS jew bl-IHN, jew biż-żewġ mardiet; l-awtorità kompetenti tista' tillimita l-estensjoni taż-żona għal partijiet miż-żona tal-maġħqad tal-ilma, jew iż-żona tal-farm, diment li ma tkunx kompromessal-prevenzjoni tat-tixrid tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet;

(ii) żona ta' sorveljanza għandha tiġi stabbilita 'l barra miż-żona tal-protezzjoni mill-awtorità kompetenti u għandha tikkorrispondi għal:

(1) f'żoni kostali: żona, madwar iż-żona ta' protezzjoni, ta' żoni ta' eskursjoni tal-marea li jikkoinċidu; jew żona, madwar iż-żona ta' protezzjoni, u inkluża f'ċirku b'raġġ ta' għaxar kilometri miċ-ċentru taż-żona ta' protezzjoni; jew żona ekwivalenti stabbilita skont dejta epidemjoloġika jew idrodinamika xierqa;

(2) f'żoni interni: bħala żona estiża 'l barra miż-żona stabbilita ta' protezzjoni;

(b) il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan iż-żona ta' protezzjoni li ma jkunux uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet, għandhom ikunu soġġetti għal investigazzjoni uffiċjali li mill-inqas tinkludi l-elementi li ġejjin:

(i) il-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar ta' għaxar ħutiet, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem* li jkunu konsistenti ma' infezzjoni bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet, jew minimu ta' 30 ħuta, meta ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem*;

(ii) spezzjoni waħda tas-saħħa: f'dawk il-farms fejn it-testijiet imsemmija f'(i) ipproduċew riżultati negattivi; l-ispezzjonijiet tas-saħħa għandhom ikomplu darba fix-xahar matul il-perjodu meta t-temperatura tal-ilma tkun taħt 14-il °C, għajr meta l-għadajjar bil-ħut jew il-gaġeġ bix-xibka jkunu miksija bis-silġ, sa meta ż-żona ta' protezzjoni tiġi rtirata f'konformità mal-punt I.2.2.1(c);

(c) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet, għandhom jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun mill-inqas ta' sitt ġimgħat. Meta jitbattlu l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati fi ħdan l-istess żona ta' protezzjoni, għandu jkun hemm perjodu ta' mistrieħ sinkronizzat ta' mill-inqas tliet ġimgħat. Dan il-paragrafu japplika wkoll għall-farms ġodda li jkunu uffiċjalment iddikjarati li ġew infettati matul l-implimentazzjoni tal-programm ta' eradikazzjoni.

Iż-żoni ta' protezzjoni għandhom jiġu kkonvertiti f'żoni ta' sorveljanza meta l-farms li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jiġu mserrħin.

L-awtorità kompetenti tista' tiddeċiedi li titlob li jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin farms oħra fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għal dawk il-farms għandu jiġi stabbilit mill-awtorità kompetenti wara li jkun hemm evalwazzjoni tar-riskji każ b'każ;

(d) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-VHS, bl-IHN jew b'dawk iż-żewġ mardiet elenkati, u l-farms l-oħra kollha li jkunu ġew imserrħin fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza kif imsemmi fil-punt (c), għandhom jiġu ripopolati b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa mingħajr mard (il-Kategorija I) fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet.

Ir-ripopolazzjoni għandha sseħħ biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin skont il-punt I.2.2.1(c);

(e) il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment koperti mill-programm ta' eradikazzjoni u, meta tkun meħtieġa s-sorveljanza ta' popolazzjonijiet selvaġġi, il-punti tat-teħid tal-kampjuni magħżula skont il-punt I.1, sussegwentement għandhom ikunu soġġetti għall-iskema ta' sorveljanza stipulata fil-punt I.2.1.

I.2.2.2. Ir-rekwiżiti sabiex jerġa' jinkiseb mill-ġdid l-istatus ta' mingħajr mard għal kompartimenti kontinentali li jkunu magħmula minn farm wieħed li kien iddikjarat preċedentement li huwa ħieles mill-IHN, mill-VHS jew miż-żewġ mardiet

Kompartiment kontinentali li huwa magħmul minn farm wieħed li kien iddikjarat preċedentement li huwa ħieles mill-VHS, mill-IHN jew miż-żewġ mardiet elenkati, li l-istatus tiegħu tas-saħħa fir-rigward ta' dawk il-mardiet elenkati ma jiddependix mill-ilmijiet naturali tal-madwar skont il-punt 3 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, u li l-istatus tiegħu tas-saħħa tal-Kategorija I kien ġie rtirat skont l-Artikolu 53(3) ta' dik id-Direttiva, jista' jerġa' jikseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I immedjatament wara li l-awtorità kompetenti tkun ikkonfermat li ġew irrispettati l-kundizzjonijiet li ġejjin:

(a) il-farm li jkun uffiċjalment ikkonfermat li huwa infettat bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet, irid jkun tbattal, tnaddaf, ġie diżinfettat u ġie mserraħ; it-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ irid ikun ta' mill-inqas sitt ġimgħat;

(b) il-farm li jkun uffiċjalment ikkonfermat li huwa infettat bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet, ikun ġie ripopolat b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-kategorija I fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet.

I.3. Ir-rekwiżiti speċifiċi għaż-żamma tal-istatus tas-saħħa mingħajr mard (il-Kategorija I) fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata sabiex jinżamm l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I, kif previst fl-Artikolu 52 tad-Direttiva 2006/88/KE, il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV ta' dik id-Direttiva fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikkonċernati, għandhom ikunu soġġetti għal spezzjoni tas-saħħa u l-ħut għandu jkun soġġett għat-teħid ta' kampjuni f'konformità mat-Tabella 1.C stipulata fit-Taqsima II ta' din il-Parti, fejn jitqies il-livell ta' riskju li l-farm jiġi infettat bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet elenkati.

Meta tiġi stabbilita l-frekwenza tal-ispezzjonijiet tas-saħħa għall-kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet, li jitqiegħdu f'żoni kontinentali u fejn l-istatus tas-saħħa fir-rigward tal-VHS jew tal-IHN jiddependi fuq l-istatus tas-saħħa tal-popolazzjonijiet tal-annimali akkwatiċi fl-ilmijiet naturali tal-madwar f'konformità mal-punt 2 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, ir-riskju ta' infezzjoni bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet għandu jitqies li huwa għoli.

L-istatus ta' mingħajr mard għandu jinżamm biss sakemm il-kampjuni kollha li ġew ittestjati bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2. jipproduċu riżultati negattivi għall-VHS, għall-IHN jew għal dawk iż-żewġ mardiet elenkati, u sakemm ikun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' VHS, ta' IHN jew taż-żewġ mardiet, f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3.

I.4. Ir-rekwiżiti għat-tneħħija tal-miżuri ta' kontenjment previsti fl-Artikolu 39 tad-Direttiva 2006/88/KE (il-bidla minn status tas-saħħa tal-Kategorija V għal dak tal-Kategorija III) fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*.

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward ta' dawk il-mardiet elenkati, diment li:

(a) jkun ġew issodisfati r-rekwiżiti stipulati fil-punti I.2.2.1(a), (b) u (c). F'każ li l-mistrieħ ma jkunx teknikament possibbli, il-farms ikkonċernati għandhom ikunu soġġetti għal miżura alternattiva li tipprovdi garanzija kważi simili għall-isterminazzjoni tal-IHNV, tal-VHSV jew taż-żewġ vajrusijiet mill-ambjent tal-farm;

(b) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms kollha l-oħra li ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi skont (a) fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza jkunu ġew ripopolati b'ħut miġjub minn Stati Membri, żoni jew kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I, II jew III fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet;

(c) ir-ripopolazzjoni tkun seħħet biss wara li l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati, jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a).

II. **Il-metodi dijanjostiċi u tat-teħid ta' kampjuni**

II.1. L-organi li jridu jittieħdu kampjuni tagħhom:

Il-materjal tat-tessut li jrid jiġi eżaminat huwa l-milsa, il-kilwa anterjuri, u l-qalb jew inkella l-enċefalu. Meta jittieħdu kampjuni ta' ħut riproduttur, jista' jiġi eżaminat ukoll il-fluwidu ovariku jew seminali.

F'każ ta' qixx żgħir, ħut sħiħ b'tul ta' inqas minn erba' ċentimetri jista' jiġi kkapuljat b'imqass sterili jew bi skalpell wara li jitneħħa l-ġewwieni ta' wara l-feṫa fl-imsaren. Jekk kampjun ikun jikkonsisti minn ħut sħiħ b'tul ta' bejn erba' u sitt ċentimetri, għandu jinġabar il-ġewwieni, inkluż il-kilwa.

Jistgħu jiġu raggruppati biċċiet ta' organi minn massimu ta' għaxar ħutiet.

II.2. Il-metodi dijanjostiċi sabiex jinkiseb u jinżamm l-istatus ta' mingħajr mard fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet

F'konformità mal-metodi u mal-proċeduri dijanjostiċi approvati u stipulati fil-punt I. tal-Parti 1 tal-Anness II, il-metodu dijanjostiku li jintuża sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard fir-rigward tal-VHS, tal-IHN jew taż-żewġ mardiet għandu jkun:

(a) iżolament tal-vajrus f'kolturi taċ-ċelloli segwit minn identifikazzjoni b'assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiku (ELISA), b'test indirett ta' antikorpi fluworexxenti (IFAT), b'test ta' newtralizzazzjoni tal-vajrus jew b'traskriptaži inversa u reazzjoni katina bil-polimeraži f'ħin reali (RT-qPCR); jew inkella

(b) RT-qPCR.

II.3. Il-metodi dijanjostiċi u tat-teħid ta' kampjuni sabiex tiġi eskluża jew tiġi ikkonfermata l-preżenza ta' VHS jew ta' IHN

Meta jkun meħtieġ li jiġi kkonfermat jew li jiġi eskluż suspett ta' VHS, ta' IHN jew taż-żewġ mardiet f'konformità mal-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE, għandhom jiġu rrispettati l-proċeduri ta' spezzjoni, ta' teħid ta' kampjuni u ta' ttestjar li ġejjin:

(a) il-farm issuspettat għandu jkun soġġett għal mill-inqas spezzjoni waħda tas-saħħa u għal teħid wieħed ta' kampjuni minn għaxar ħutiet, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem* li jkunu konsistenti ma' infezzjoni bil-VHS, bl-IHN jew biż-żewġ mardiet, jew minn minimu ta' 30 ħuta, meta ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem*. Il-kampjuni għandhom jiġu ttestjati b'wieħed jew iktar mill-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punti (i) u (ii) f'konformità mal-metodi u mal-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati kif stipulat fit-Taqsima II tal-Parti 1 tal-Anness II:

(i) l-iżolament tal-vajrus konvenzjonali f'koltura taċ-ċelloli b'identifikazzjoni molekolari jew immunokimika sussegwenti tal-vajrus;

(ii) is-sejba tal-vajrus permezz ta' RT-qPCR;

(iii) Tekniki dijanjostiċi oħra ta' effikaċja simili bil-provi fosthom it-test indirett ta' antikorpi fluworexxenti (IFAT), l-assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiku (ELISA), l-RT-PCR u l-Immunoistokimika (IHC).

(b) Il-preżenza tal-VHS għandha titqies ikkonfermata, jekk waħda jew iktar minn dawk il-metodi dijanjostiċi jkunu pożittivi għall-VHSV. Il-preżenza tal-IHN għandha titqies ikkonfermata, jekk waħda jew iktar minn dawk il-metodi dijanjostiċi jkunu pożittivi għall-IHNV. Il-konferma tal-ewwel każ ta' VHS jew ta' IHN fl-Istati Membri, fiż-żoni jew fil-kompartimenti li ma kinux infettati preċedentement għandha tkun ibbażata fuq l-iżolament tal-vajrus konvenzjonali f'koltura taċ-ċelloli jew fuq ir-RT-qPCR;

(c) Is-suspett ta' VHSV, ta' IHNV jew taż-żewġ vajrusijiet jista' jiġi eskluż, jekk it-testijiet tal-kultivazzjoni taċ-ċelloli jew tar-RT-qPCR ma jiżvelaw l-ebda evidenza ulterjuri tal-preżenza tal-VHSV, tal-IHNV jew taż-żewġ vajrusijiet.

It-Tabella 1.A

L-Iskema ta' sorveljanza għaż-żoni u għall-kompartimenti għall-perjodu ta' kontroll ta' sentejn imsemmi fil-punt I.2.1(a)(i) qabel il-kisba tal-istatus ta' mingħajr mard għall-VHS jew għall-IHN

It-tip ta' farm	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa kull sena (sentejn)	In-numru ta' drabi li kien hemm teħid ta' kampjuni kull sena (sentejn)	In-numru ta' ħut fil-kampjun (1)	
			In-numru ta' ħut li qiegħed jikber	In-numru ta' ħut riproduttur (2)
(a) Il-farms bil-ħut riproduttur	2	2	50 (l-ewwel spezzjoni) 75 (it-tieni spezzjoni)	30 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni) 0 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni)
(b) Il-farms b'ħut riproduttur biss	2	1	0	75 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni)
(c) Il-farms mingħajr ħut riproduttur	2	2	75 (3) (l-ewwel u t-tieni spezzjoni)	0

In-numru massimu ta' ħut f'kull għadira: 10

(1) Il-kampjuni jridu jinġabru mhux qabel tliet ġimgħat wara t-trasferiment tal-ħut mill-ilma ħelu għall-ilma mielaħ.
(2) Il-fluwidu ovariku jew seminali tal-ħut riproduttur għandu jinġabar fil-waqt tal-maturazzjoni, b'rabta mal-istrippaġġ.
(3) Il-kampjuni jridu jinġabru min-numru ta' ħut li jiżgura is-sejba tal-VHSV jew tal-IHNV b'livell ta' fiduċja ta' 95 % jekk il-prevalenza tad-disinn tkun ta' 5 %.

It-Tabella 1.B

L-Iskema ta' sorveljanza b'kampjun ta' daqs imnaqqas għall-perjodu ta' kontroll ta' erba' snin imsemmi fil-punt I.2.1(a)(ii) li jipprečedi l-kisba tal-istatus ta' mingħajr mard għall-VHS jew għall-IHN

It-tip ta' farm	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa kull sena	In-numru ta' drabi li kien hemm teħid ta' kampjuni kull sena (sentejn)	In-numru ta' ħut fil-kampjun (1)	
			In-numru ta' ħut li qiegħed jikber	In-numru ta' ħut riproduttur (2)
L-ewwel sentejn tal-perjodu ta' sorveljanza				
(a) Il-farms bil-ħut riproduttur	2	1	0 (l-ewwel spezzjoni) 30 (it-tieni spezzjoni)	0 (l-ewwel spezzjoni) 0 (it-tieni spezzjoni)
(b) Il-farms b'ħut riproduttur biss	2	1	0	30 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni)
(c) Il-farms mingħajr ħut riproduttur	2	1	30 (3) (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni)	0
L-aħħar sentejn tal-perjodu ta' sorveljanza				
(a) Il-farms bil-ħut riproduttur	2	2	30 (l-ewwel spezzjoni) 0 (it-tieni spezzjoni)	0 (l-ewwel spezzjoni) 30 (it-tieni spezzjoni)

It-tip ta' farm	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa kull sena	In-numru ta' drabi li kien hemm teħid ta' kampjuni kull sena (sentejn)	In-numru ta' ħut fil-kampjun (1)	
			In-numru ta' ħut li qiegħed jikber	In-numru ta' ħut riproduttur (2)
(b) Il-farms b'ħut riproduttur biss	2	2		30 (l-ewwel u t-tieni spezzjoni)
(c) Il-farms mingħajr ħut riproduttur	2	2	30 (3) (l-ewwel u t-tieni spezzjoni)	

In-numru massimu ta' ħut f'kull għadd: 10

(1) Il-kampjuni jridu jinġabru mhux qabel tliet ġimgħat wara t-trasferiment tal-ħut mill-ilma ħelu għall-ilma melaħ.
(2) Il-fluwidu ovariku jew seminali tal-ħut riproduttur għandu jinġabar fil-waqt tal-maturazzjoni, b'rabta mal-istrippaġġ.
(3) Il-kampjuni jridu jinġabru min-numru ta' ħut li jiżgura s-sejba tal-VHSV jew tal-IHNV b'livell ta' fiduċja ta' 95 % jekk il-prevalenza tad-disinn tkun ta' 10 %.

It-Tabella 1.C

L-Iskema ta' sorveljanza għaż-żoni jew għall-kompartimenti sabiex jinżamm l-istatus ta' mingħajr mard għall-VHS jew għall-IHN kif imsemmi fil-punt I.3.

Il-livell ta' riskju	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa	L-għadd ta' ħut fil-kampjun (3)
Għoli	2 kull sena	30 (1) (2)
Medju	1 kull sena	30 (1)
Baxx	1 kull sentejn	30 (1)

In-numru massimu ta' ħut f'kull għadd: 10

(1) Il-kampjuni jridu jinġabru mhux qabel tliet ġimgħat wara t-trasferiment tal-ħut mill-ilma ħelu għall-ilma melaħ.
(2) Il-kampjuni jridu jinġabru minn għadd ta' ħut li jiżgura s-sejba tal-VHSV jew tal-IHNV b'livell ta' fiduċja ta' 95 % jekk il-prevalenza tad-disinn tkun ta' 10 %.
(3) Għandu jkun hemm minimu ta' kampjun wieħed għal kull spezzjoni tas-saħħa.

PARTI 2

IL-METODI TA' SORVELJANZA U TA' KONTROLL GĦALL-MARDA TAL-VAJRUS TAL-ERPETE TAL-KOI (KHVD)

I. **Ir-rekwiżiti għall-programmi ta' sorveljanza u ta' eradikazzjoni sabiex jinkiseb u jinżamm l-istatus ta' mingħajr mard fir-rigward tal-KHVD u għall-konteniment ta' infezzjoni bil-vajrus tal-erpete tal-koi (KHV)**

I.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata fil-popolazzjonijiet selvaġġi f'konformità mat-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, in-numru u d-distribuzzjoni ġeografika tal-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu stabbiliti sabiex tinkiseb kopertura raġonevoli tal-Istat Membru, taż-żona jew tal-kompartiment. Il-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom ikunu jirrappreżentaw l-ekosistemi differenti fejn jinsabu l-popolazzjonijiet selvaġġi tal-ispeċijiet suxxettibbli, jiġifieri, is-sistemi tax-xmajjar u l-lagi.

Is-sorveljanza mmirata għandha sserraħ fuq il-monitoraġġ regolari tas-siti li jilqgħu fihom speċijiet suxxettibbli. Is-siti għandhom jiġu sorveljati meta t-temperatura tal-ilma tkun laħqet livelli li jippermettu l-iżvilupp tal-marda (> 15-il°C) u mhux qabel ġimagħtejn mid-data li fiha jkunu ntlaħqu dawn it-temperaturi. Kwalunkwe ħut marid jew ħut b'imġiba anormali li jinstab fis-sit għandu jiġi soġġett għat-teħid ta' kampjuni u għandu jiġi ttestjat.

Kull meta jkun possibbli, il-ħut li jkun inżamm għal perjodu ta' żmien twil fil-firxa tat-temperatura permessiva għall-vajrus, jiġifieri minn ġimagħtejn sa tliet ġimgħat f'temperatura minn 15-il°C sa 26 °C, għandu jkun soġġett għat-teħid ta' kampjuni. Madankollu, jista' jiġi aċċettat l-approċċ li ġej:

(a) tingħabar sottopopolazzjoni mat-trasferiment mill-vaski tax-xitwa għal dawk tas-sajf u li l-ħut jinżamm fl-istess tip ta' ilma bħal tal-vaska tas-sajf sakemm jintlaħqu r-rekwiżiti minimi tat-temperatura, jew

(b) jingħabru kampjuni waqt il-qbid tal-ħut jew waqt maniġġ ieħor tal-ħut bħala parti mill-prattiki normali ta' ġestjoni. Jekk ikun possibbli, il-kampjuni għandhom jingħabru bejn 24 u 72 siegħa wara dawn il-prattiki ta' ġestjoni sabiex jittejjeb iċ-ċans li jinstab il-KHV.

Meta l-farms jew il-popolazzjonijiet selvaġġi jridu jkunu soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa jew għat-teħid ta' kampjuni iktar minn darba fis-sena, l-intervalli bejn l-ispezzjonijiet tas-saħħa jew il-ġbir tal-kampjuni għandhom ikunu twal kemm jista' jkun fl-istaġun meta t-temperatura tal-ilma x'aktarx tilħaq l-ogħla temperatura annwali mingħajr ma taqbeż il-limitu ta' 28 °C.

L-unitajiet kollha tal-produzzjoni, bħal vaski u tankijiet, iridu jkunu soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa għall-preżenza ta' ħut mejjet, dgħajjef jew b'imġiba anormali.

Cyprinus carpio u l-ibridi tagħha, bħal *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, għandhom jingħabru meta jkunu preżenti fil-farm.

Il-ħut li jrid jingħabar bħala kampjun għandu jintgħażel kif ġej:

(i) jekk ikun preżenti ħut dgħajjef, b'imġiba anormali jew li għadu kif miet, iżda mhux fi stadju ta' dekompożizzjoni, dan il-ħut irid jintgħażel;

(ii) jekk jintuża iktar minn sors wieħed tal-ilma għall-produzzjoni tal-ħut, fil-kampjun irid jiġi inkluż il-ħut li jirrappreżenta s-sorsi kollha tal-ilma;

(iii) il-ħut magħżul irid jinkludi l-ħut li jingħabar, b'tali mod li l-partijiet kollha tal-farm, kif ukoll il-klassijiet tas-snin kollha, ikunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun.

I.2. Ir-rekwiżiti speċifiċi sabiex jinkiseb status ta' mingħajr mard (il-kategorija I) fir-rigward tal-KHVD

I.2.1. Il-programmi ta' sorveljanza

(a) Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward tal-KHVD jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I meta l-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan dak l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikunu jikkonformaw mar-rekwiżiti għal status ta' mingħajr mard kif stipulat fl-Anness V ta' dik id-Direttiva u dawk il-farms kollha, u fejn mitlub mit-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I ta' dak l-Anness, il-punti tat-teħid ta' kampjuni fil-popolazzjonijiet selvaġġi magħżula f'konformità ma' dik il-Parti, jkunu ġew soġġetti għal wieħed mill-programmi ta' sorveljanza li ġejjin:

(i) il-mudell A — programm ta' sorveljanza ta' sentejn:

Il-farms jew il-punti tat-teħid ta' kampjuni jridu jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' sentejn wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 2.A stabbilita fit-Taqsima III.

Matul dak il-perjodu ta' sentejn, l-ittestjar tal-kampjuni kollha bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2 iridu jkunu pproduċew riżultati negattivi għall-KHV u kwalunkwe suspett tal-KHVD irid ikun ġie eskluż f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt III.2;

(ii) il-mudell B — programm ta' sorveljanza ta' erba' snin b'kampjun ta' daqs imnaqqas:

Il-farms jew il-punti tat-teħid ta' kampjuni jridu jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' erba' snin wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 2.B stipulata fit-Taqsima III.

Matul dak il-perjodu ta' erba' snin, l-ittestjar tal-kampjuni kollha bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2 irid ikun ipproduċa riżultati negattivi għall-KHV u kwalunkwe suspett ta' KHVD irid ikun ġie eskluż f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stabbiliti fil-punt III.2;

(b) jekk matul l-implimentazzjoni tal-programm ta' sorveljanza ta' erba' snin imsemmi fil-punt (a), tiġi kkonfermata infezzjoni bil-KHV f'farm inkluż f'dak il-programm ta' sorveljanza, u għalhekk l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija II tal-farm ikun ġie rtirat, dak il-farm jista' minnufih jerġa' jikseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija II u jkompli l-implimentazzjoni tal-programm ta' sorveljanza sabiex jikseb status ta' mingħajr mard mingħajr ma jimplimenta programm ta' eradikazzjoni kif deskritt fil-punt I.2.2, diment li l-farm jikkonforma mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

(i) ikun farm kontinentali li l-istatus tas-saħħa tiegħu fir-rigward tal-KHVD ma jkunx jiddependi mill-istatus tas-saħħa tal-popolazzjonijiet tal-annimali akkwatiċi fl-ilma naturali tal-madwar fir-rigward ta' dik il-marda elenkata f'konformità mal-punt 3 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE;

(ii) ikun tbattal, tnaddaf, ġie diżinfettat u ġie mserraħ; it-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun ta' mill-inqas sitt ġimgħat;

(iii) ikun ġie ripopolat b'ħut miġjub minn Stati Membri, żoni jew kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-KHVD.

I.2.2. Il-programmi ta' eradikazzjoni

I.2.2.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-KHVD, jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha fejn jinżammu l-ispeċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan dak l-Istat Membru, dik iż-żona jew dak il-kompartiment ikunu ġew soġġetti mill-inqas għall-programm ta' eradikazzjoni li ġej:

(a) il-miżuri ta' kontroll minimu stipulati fit-Taqsima 4 tal-Kapitolu V tad-Direttiva 2006/88/KE ikunu ġew applikati b'mod effettiv, u tkun ġiet stabbilita żona ta' konteniment kif imsemmi fl-Artikolu 32(b) ta' dik id-Direttiva li tkun magħmula minn żona ta' protezzjoni u minn żona ta' sorveljanza, qrib il-farm(s) li jkun(u) ġie/ġew iddikjarat(i) uffiċjalment li huma infettat(i) bil-KHV.

Iż-żona ta' konteniment trid tkun ġiet definita abbażi ta' każ b'każ fejn jitqiesu l-fatturi li jinfluwenzaw ir-riskji li l-KHVD tinxtered għall-ħut imrobbi u għall-ħut li jgħix fis-selvaġġ, fosthom: in-numru, ir-rata u d-distribuzzjoni tal-mortalità tal-ħut fil-farm infettat bil-KHV; id-distanza u d-densità tal-farms tal-madwar; il-prossimità tal-biċċeriji; il-farms ta' kuntatt; l-ispeċijiet preżenti fil-farms; il-prattiki tat-trobbija applikati fil-farms affettwati u f'dawk tal-madwar; il-kundizzjonijiet idrodinamiċi u fatturi identifikati oħra ta' sinifikat epidemjoloġiku.

Sabiex jiġu stabbiliti ż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza, għandhom japplikaw ir-rekwiżiti minimi li ġejjin fir-rigward tad-demarkazzjoni ġeografika ta' dawk iż-żoni:

(i) żona ta' protezzjoni għandha tiġi stabbilita fil-qrib immedjat ta' farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-KHV u għandha tikkorrispondi għaż-żona kollha tal-magħqad tal-ilma tal-farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-KHV; l-awtorità kompetenti tista' tillimita l-estensjoni taż-żona għall-partijiet miż-żona tal-magħqad tal-ilma, diment li ma tiġix kompromessal-prevenzjoni tat-tixrid tal-KHVD;

(ii) żona ta' sorveljanza għandha tiġi stabbilita 'l barra miż-żona tal-protezzjoni u għandha tikkorrispondi għal żona estiża madwar iż-żona stabbilita tal-protezzjoni;

(b) il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan iż-żona ta' protezzjoni li ma jkunux uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-KHV għandhom ikunu soġġetti għal investigazzjoni uffiċjali li tkun tinkludi minn tal-inqas l-elementi li ġejjin:

(i) il-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar ta' għaxar ħutiet, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem* li jkunu konsistenti mal-KHVD, jew ta' 30 ħuta, meta ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem*;

(ii) spezzjoni waħda tas-saħħa; f'dawk il-farms li fihom it-testijiet imsemmija fil-punt III.2 ipproduċew riżultati negattivi; l-ispezzjonijiet tas-saħħa għandhom ikomplu jsiru darba fix-xahar matul l-istaġun meta t-temperatura tal-ilma x'aktarx li tilħaq > 15-il °C, sakemm iż-żona ta' protezzjoni tiġi rtirata f'konformità mal-punt I.2.2.1(c);

(c) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-KHV għandhom jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun ta' mill-inqas sitt ġimgħat. Meta jitbattlu l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati, fi ħdan l-istess żona ta' protezzjoni, għandu jkun hemm perjodu ta' mistrieħ sinkronizzat ta' mill-inqas tliet ġimgħat. Dan il-paragrafu japplika wkoll għall-farms ġodda li jkunu uffiċjalment iddikjarati li ġew infettati matul l-implimentazzjoni tal-programm ta' eradikazzjoni.

Meta l-farms li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jiġu mserrħin, iż-żoni ta' protezzjoni għandhom jiġu kkonvertiti f'żoni ta' sorveljanza.

L-awtorità kompetenti tista' tiddeċiedi li titlob li jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin farms oħra fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jiġi stabbilit mill-awtorità kompetenti wara evalwazzjoni tar-riskji każ b'każ;

(d) Il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-KHV u l-farms kollha l-oħra li ġew imserrħin fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza għandhom jiġu ripopolati:

(i) b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-KHVD; jew

(ii) għal perjodu tranżizzjonali sal-31 ta' Diċembru 2020, b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi programm approvat ta' sorveljanza għall-KHVD.

Ir-ripopolazzjoni għandha sseħħ biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-KHV jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin f'konformità mal-punt I.2.2.1(c);

(e) Il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV għad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment koperti mill-programm ta' eradikazzjoni u, meta tkun meħtieġa s-sorveljanza ta' popolazzjonijiet selvaġġi, il-punti tat-teħid tal-kampjuni magħżula skont il-punt I.1., sussegwentement għandhom ikunu ġew soġġetti mill-inqas għall-iskema ta' sorveljanza stipulata fil-punt I.2.1.

I.2.2.2. Ir-rekwiżiti sabiex jinkiseb mill-ġdid l-istatus ta' mingħajr mard għal kompartimenti kontinentali li jkunu magħmula minn farm wieħed li preċedentement kien iddikjarat li huwa ħieles mill-KHVD

Kompartiment kontinentali magħmul minn farm wieħed li għandu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-KHVD, li l-istatus tas-saħħa tiegħu fir-rigward tal-KHVD ma jiddependix mill-ilmijiet naturali tal-madwar f'konformità mal-punt 3 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, u li l-istatus tiegħu tal-Kategorija I kien ġie rtirat skont l-Artikolu 53(3) ta' dik id-Direttiva, jista' jerġa' jikseb status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-KHVD immedjatament wara li l-awtorità kompetenti tkun ikkonfermat li huwa kkonforma mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

(a) ikun tbattal, tnaddaf, ġie diżinfettat u ġie mserraħ; it-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ irid ikun ta' mill-inqas sitt ġimgħat;

(b) ikun ġie ripopolat b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni, minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I jew minn kompartimenti bi programm approvat ta' sorveljanza għall-KHVD (status tas-saħħa tal-Kategorija II).

I.3. Ir-rekwiżiti speċifiċi għaż-żamma tal-istatus tal-Kategorija I fir-rigward tal-KHVD

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata sabiex jinżamm l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I, kif previst fl-Artikolu 52 tad-Direttiva 2006/88/KE, il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV ta' dik id-Direttiva fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikkonċernati, għandhom ikunu soġġetti għal spezzjoni tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni f'konformità mat-Tabella 2.B stipulata fit-Taqsima III ta' din il-Parti, fejn jitqies il-livell ta' riskju li l-farm jiġi infettat bil-KHV.

Il-frekwenza tal-ispezzjonijiet għall-ispezzjonijiet tas-saħħa tal-kompartimenti tal-Kategorija I fir-rigward tal-KHVD li jitqiegħdu f'żoni kontinentali u li jkunu magħmula minn farm wieħed jew iktar li l-istatus tas-saħħa tiegħu/tagħhom fir-rigward tal-KHVD ikun jiddependi fuq l-istatus tas-saħħa għal dik il-marda elenkata tal-ilmijiet naturali tal-madwar f'konformità mal-punt 2 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, għandha tkun konformi man-numru stipulat għal-livell għoli ta' riskju msemmi f'dik it-Tabella 2.C.

Fl-Istati Membri, fiż-żoni jew fil-kompartimenti, li fihom in-numru ta' farms huwa limitat u li fihom is-sorveljanza mmirata fuq dawn il-farms ma tipprovdix biżżejjed dejta epidemjoloġika, l-iskemi ta' sorveljanza għaż-żamma tal-istatus ta' mingħajr mard għandhom jinkludu l-punti tat-teħid ta' kampjuni li jkunu magħżula f'konformità mar-rekwiżiti stipulati fil-punt I.1.

Dawk il-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu spezzjonati u għandhom jiġu soġġetti għat-teħid ta' kampjuni b'rotazzjoni ta' 50 % tal-punti tat-teħid ta' kampjuni kull sena. It-teħid ta' kampjuni għandu jitwettaq f'konformità mat-Tabella 2.C stipulata fit-Taqsima III. Il-kampjuni għandhom jiġu magħżula, jiġu mħejjija u jiġu eżaminati kif deskritt fit-Taqsima II u l-eżaminazzjonijiet fil-laboratorju jridu jkunu negattivi fir-rigward tal-preżenza tal-aġent tal-KHVD.

L-istatus ta' mingħajr mard għandu jinżamm biss sakemm il-kampjuni kollha li ġew ittestjati bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2 jipproduċu riżultati negattivi għall-KHVD, kif ukoll diment li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' KHVD f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt III.2.

I.4. Ir-rekwiżiti speċifiċi għat-tneħħija tal-miżuri ta' konteniment previsti fl-Artikolu 39 tad-Direttiva 2006/88/KE sabiex jinkiseb status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward tal-KHVD fl-Istati Membri, fil-kompartimenti jew fiż-żoni li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-KHVD jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward ta' dik il-marda elenkata, diment li:

(a) jkunu ġew issodisfati r-rekwiżiti stipulati fil-punti I.2.2.1(a), (b) u (c). F'każ li l-mistrieħ ma jkunx teknikament possibbli, il-farms ikkonċernati għandhom ikunu soġġetti għal miżura alternattiva li tipprovdi garanzija kważi simili għall-isterminazzjoni tal-KHV mill-ambjent tal-farm;

(b) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms kollha l-oħra li ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a) fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza jkunu ġew ripopolati b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I, II jew III fir-rigward tal-KHVD;

(c) ir-ripopolazzjoni tkun seħħet biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a).

II. **Il-metodi dijanjostiċi u t-teħid ta' kampjuni għas-sorveljanza sabiex jinkiseb u jinżamm status ta' mingħajr mard fir-rigward tal-KHVD**

II.1. Il-kampjuni

Il-materjal tat-tessut li jrid jiġi eżaminat għandu jkun minn partijiet tal-garġi u tal-kliewi. Jistgħu jiġu raggruppati biċċiet ta' organi minn massimu ta' żewġ ħutiet.

II.2. Il-metodi dijanjostiċi għas-sorveljanza sabiex jinkiseb u jinżamm status ta' mingħajr mard fir-rigward tal-KHVD

Il-metodu dijanjostiku li jintuża sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard għall-KHVD għandu jkun PCR f'ħin reali (qPCR) f'konformità mal-metodi u mal-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati kif stipulati fil-punt II tal-Parti 2 tal-Anness II.

III. **Il-metodi dijanjostiċi u t-tehid ta' kampjuni għal investigazzjonijiet uffiċjali sabiex jiġi kkonfermat jew eskluż suspett ta' KHVD**

III.1. Il-kampjuni

Il-materjal tat-tessut li jrid jiġi eżaminat għandu jkun minn partijiet tal-garġi u tal-kliewi. Jistgħu jiġu raggruppati biċċiet ta' organi minn massimu ta' żewġ ħutiet.

III.2. L-investigazzjoni uffiċjali u l-metodi dijanjostiċi sabiex tiġi eskluża jew tiġi kkonfermata l-preżenza ta' infezzjoni bil-KHV

Meta jkun meħtieġ li jiġi kkonfermat jew li jiġi eskluż suspett ta' KHVD f'konformità mal-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE, għandha tiġi rrispettata l-proċedura ta' spezzjoni, ta' teħid ta' kampjuni u ta' ttestjar li ġejja:

(a) l-investigazzjoni uffiċjali għandha tinkludi mill-inqas spezzjoni waħda tas-saħħa u teħid wieħed ta' kampjuni ta' għaxar ħutiet, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew sinjali post-mortem li jkunu konsistenti ma' infezzjoni bil-KHV, jew ta' 30 ħuta, meta ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew sinjali post-mortem. Il-kampjuni għandhom jiġu ttestjati bil-metodu dijanjostiku stipulat fil-punt (b) f'konformità mal-metodi u mal-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-punt II tal-Parti 2 tal-Anness II;

(b) il-preżenza tal-infezzjoni bil-KHV għandha titqies li hija kkonfermata jekk jinstab KHV permezz ta' PCR;

suspett ta' KHVD jista' jiġi eskluż, jekk dan it-test ma jiżvelax evidenza ulterjuri tal-preżenza tal-KHV.

It-Tabella 2.A

L-Iskema ta' sorveljanza għaż-żoni u għall-kompartimenti għall-perjodu ta' kontroll ta' sentejn, qabel ma jinkiseb l-istatus ta' mingħajr mard għall-KHVD kif imsemmi fil-punt I.2.1

		In-numru ta' spezzjonijiet kliniċi kull sena (sentejn)	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena (sentejn)	In-numru ta' ħut fil-kampjun
Il-farms/is-siti tat-teħid ta' kampjuni	L-ewwel sentejn tal-perjodu ta' sorveljanza	2	2	75 [1]
	In-numru massimu ta' ħut f'kull għadd: 2			

[1] Il-kampjuni jridu jittieħdu min-numru ta' ħut li jiżgura s-sejba tal-KHV b'livell ta' fiduċja ta' 95 % jekk il-prevalenza tad-disinn tkun ta' 5 %.

It-Tabella 2.B

L-iskema ta' sorveljanza għaż-żoni u għall-kompartimenti għall-perjodu ta' kontroll ta' erba' snin qabel il-kisba ta' status ta' mingħajr mard għall-KHVD kif imsemmi fil-punt I.2.1

		In-numru ta' spezzjonijiet kliniċi kull sena	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena	In-numru ta' ħut fil-kampjun
Il-farms/is-siti tat-teħid ta' kampjuni	L-ewwel sentejn tal-perjodu ta' sorveljanza	1	1	30
Il-farms/is-siti tat-teħid ta' kampjuni	L-aħħar sentejn tal-perjodu ta' sorveljanza	2	2	30
	In-numru massimu ta' ħut f'kull għadd: 2			

It-Tabella 2.C

L-Iskemi ta' sorveljanza għaż-żoni jew għall-kompartimenti sabiex jinżamm status ta' mingħajr mard għall-KHVD kif imsemmi fil-punt I.3

Il-livell ta' riskju	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa	In-numru ta' ħut fil-kampjun
Għoli	2 kull sena	30
Medju	1 kull sena	30
Baxx	1 kull sentejn	30

In-numru massimu ta' ħut f'kull għadd: 2

It-Tabella 2.D

L-iskema ta' sorveljanza sabiex jinżamm l-istatus ta' mingħajr il-KHVD fl-Istati Membri, fiż-żoni jew fil-kompartimenti, li fihom in-numru ta' farms huwa limitat u s-sorveljanza mmirata f'dawn l-farms ma tipprovdix biżżejjed dejta epidemjoloġika kif imsemmi fil-punt I.3

	In-numru ta' spezzjonijiet kliniċi kull sena	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena	In-numru ta' ħut fil-kampjun
Il-punti tat-teħid ta' kampjuni	1 kull sentejn	1 kull sentejn	30

In-numru massimu ta' ħut f'kull għadd: 2

PARTI 3

IL-METODI TA' SORVELJANZA U TA' KONTROLL GĦALL-ANEMIJA INFETTIVA TAS-SALAMUN (ISA)

I. **Ir-rekwiżiti għall-programmi ta' sorveljanza u ta' eradikazzjoni sabiex jinkisbu u jinżammu l-istatuses tas-saħħa ta' mingħajr mard fir-rigward tal-ISA u għall-konteniment ta' infezzjoni bl-ISAV bl-HPR imħassar**

I.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

Meta jkun meħtieġ li l-ispezzjonijiet tas-saħħa u t-teħid ta' kampjuni fil-farms jitwettqu iktar minn darba f'sena f'konformità mat-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, l-intervalli bejn l-ispezzjonijiet tas-saħħa jew il-ġbir tal-kampjuni għandhom ikunu twal kemm jista' jkun.

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata fil-popolazzjonijiet selvaġġi f'konformità mat-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, in-numru u d-distribuzzjoni ġeografika tal-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu stabbiliti sabiex tinkiseb kopertura raġonevoli tal-Istat Membru, taż-żona jew tal-kompartiment. Il-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom ikunu jirrappreżentaw ukoll l-ekosistemi differenti fejn jinsabu l-popolazzjonijiet selvaġġi tal-ispeċijiet suxxettibbli.

L-ispezzjonijiet tas-saħħa għandhom jitwettqu fl-unitajiet kollha tal-produzzjoni, bħal vaski, tankijiet u gaġeġ bix-xibka, għall-preżenza ta' ħut mejjet, dgħajjef jew b'imġiba anormali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għaż-żona mnejn joħroġ l-ilma, fejn il-ħut dgħajjef għandu ħabta li jakkumula minħabba l-kurrent tal-ilma.

Il-ħut li jrid jinġabar bħala kampjun għandu jintgħażel kif ġej:

(a) għandu jintgħażel biss ħut moribond jew li għadu kif miet, iżda mhux ħut fi stat ta' dekompożizzjoni; b'mod partikolari, ħut li juri sinjali ta' anemija, ta' fsada jew sinjali kliniċi oħra li jissuġġerixxu tfixkil ċirkolatorju għandhom jingħataw prijorità għall-ġbir;

(b) jekk is-salamun tal-Atlantiku jkun fost l-ispeċijiet suxxettibbli fis-sit, għandha tingħata prijorità lill-kampjuni tas-salamun tal-Atlantiku. Jekk ma jkunx hemm l-ebda salamun tal-Atlantiku fil-farm tal-ħut, iridu jittieħdu kampjuni ta' speċijiet suxxettibbli oħra;

(c) jekk jintuża iktar minn sors wieħed tal-ilma għall-produzzjoni tal-ħut, fil-kampjun għandu jiġi inkluż il-ħut li jirrappreżenta s-sorsi kollha tal-ilma;

(d) il-ħut magħżul għandu jinkludi l-ħut li jinġabar b'tali mod li l-unitajiet kollha tal-produzzjoni fil-farm, bħal gaġeġ bix-xibka, tankijiet u vaski, kif ukoll li l-klassijiet tas-snin kollha jkunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun.

I.2. Ir-rekwiżiti speċifiċi sabiex jinkiseb status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-ISA

I.2.1. Il-programmi ta' sorveljanza

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija III f'konformità mal-Parti B tal-Anness III tad-Direttiva 2006/88/KE fir-rigward tal-ISA jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment jissodisfaw ir-rekwiżiti rilevanti stipulati fl-Anness V ta' dik id-Direttiva u dawk l-farm kollha u, fejn meħtieġ mit-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tagħha, il-punti tat-teħid ta' kampjuni ta' popolazzjonijiet selvaġġi magħżula f'konformità ma' dak il-punt, jkunu ġew soġġetti għall-programm ta' sorveljanza li ġej:

(a) il-farms jew il-punti tat-teħid ta' kampjuni jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' sentejn wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 3.A. stabbilita fit-Taqsima II;

(b) matul dak il-perjodu ta' sentejn, l-ittestjar tal-kampjuni kollha bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2. irid jkun ipproduċa riżultati negattivi għall-ISAV bl-HPR imħassar u kwalunkwe suspett ta' ISA jrid ikun ġie eskluż f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3;

(c) jekk matul l-implimentazzjoni tal-programm ta' sorveljanza, l-ISA tiġi kkonfermata f'farm inkluż f'dak il-programm ta' sorveljanza u, għalhekk l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija II tal-farm ikun ġie rtirat, irid ikun twettaq programm ta' eradikazzjoni f'konformità mal-punt I.2.2.

I.2.2. Il-programmi ta' eradikazzjoni

I.2.2.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-ISA jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment jkunu ġew soġġetti għal programm ta' eradikazzjoni li jikkonforma mal-punti (a) sa (e) li ġejjin:

(a) il-miżuri ta' kontroll minimu stipulati fit-Taqsima 3 tal-Kapitolu V tad-Direttiva 2006/88/KE jkunu ġew applikati b'mod effettiv, u b'mod partikolari, tkun ġiet stabbilita żona ta' konteniment, kif imsemmi fl-Artikolu 32(b) ta' dik id-Direttiva, li tkun magħmula minn żona ta' protezzjoni u minn żona ta' sorveljanza, qrib il-farm(s) li jkun(u) uffiċjalment iddikjarat(i) li huwa/huma infettat(i) bl-ISAV bl-HPR imħassar jew bl-ISA kkonfermata.

Iż-żona ta' konteniment trid tkun ġiet definita abbażi ta' każ b'każ fejn jitqiesu l-fatturi li jinfluwenzaw ir-riskji li l-ISA tinxtered għall-ħut imrobbi jew għall-ħut li jgħix fis-selvaġġ, fosthom: in-numru, ir-rata u d-distribuzzjoni tal-mortalità tal-ħut fil-farm infettat bl-ISAV bl-HPR imħassar jew bl-ISA kkonfermata; id-distanza u d-densità tal-farms tal-madwar; il-prossimità tal-biċċeriji; il-farms ta' kuntatt; l-ispeċijiet preżenti fil-farms; il-prattiki tat-trobbija applikati fil-farms affettwati u f' dawk tal-madwar; il-kundizzjonijiet idrodinamiċi u fatturi identifikati oħra ta' sinifikat epidemjoloġiku.

Sabiex jiġu stabbiliti ż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza, għandhom japplikaw ir-rekwiżiti minimi li ġejjin fir-rigward tad-demarkazzjoni ġeografika ta' dawk iż-żoni:

(i) żona ta' protezzjoni għandha tiġi stabbilita fil-qrib immedjat ta' farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bl-ISA u għandha tikkorrispondi għal:

(1) f'żoni kostali: żona inkluża f'ċirku b'raġġ ta' mill-inqas eskursjoni waħda tal-marea jew mill-inqas ħames kilometri, skont liema tkun l-ikbar, iċċentrata fuq il-farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bl-ISA, jew żona ekwivalenti stabbilita skont dejta epidemjoloġika jew idrodinamika xierqa;

(2) f'żoni interni: iż-żona kollha tal-maġħqad tal-ilma tal-farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bl-ISA; l-awtorità kompetenti tista' tillimita l-estensjoni taż-żona għall-partijiet miż-żona tal-maġħqad tal-ilma, diment li ma tiġix kompromessal-prevenzjoni tat-tixrid tal-ISA;

(ii) żona ta' sorveljanza għandha tiġi stabbilita 'l barra miż-żona ta' protezzjoni u għandha tikkorrispondi għal:

(1) f'żoni kostali: żona, madwar iż-żona ta' protezzjoni, ta' żoni ta' eskursjoni tal-marea li jikkoinċidu; jew żona, madwar iż-żona ta' protezzjoni, u inkluża f'ċirku b'raġġ ta' għaxar kilometri miċ-ċentru taż-żona ta' protezzjoni; jew żona ekwivalenti stabbilita skont dejta idrodinamika jew epidemjoloġika xierqa; jew

(2) f'żoni interni: żona estiża 'l barra miż-żona stabbilita ta' protezzjoni;

(b) il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan iż-żona ta' protezzjoni li ma jkunux uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bl-ISA għandhom ikunu soġġetti għal investigazzjoni uffiċjali li tkun tinkludi minn tal-inqas l-elementi li ġejjin:

(i) il-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar ta' minimu ta' għaxar ħutiet moribondi, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew sinjali post-mortem li jkunu konsistenti ma' infezzjoni bl-ISA, jew minimu ta' 30 ħuta meta ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew sinjali post-mortem;

(ii) spezzjoni waħda tas-saħħa; f'dawk il-farms li fihom it-testijiet imsemmija f'(i) ikunu pproduċew riżultati negattivi, l-ispezzjonijiet tas-saħħa għandhom ikomplu darba fix-xahar sakemm iż-żona ta' protezzjoni tiġi rtirata f'konformità mal-punt I.2.2.1(c);

(c) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bl-ISAV bl-HPR imħassar jew bl-ISA kkonfermata għandhom jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin għal perjodu ta' mill-inqas tliet xhur. Iż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza jistgħu jitneħħew meta l-farms kollha fi ħdan iż-żona ta' protezzjoni jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin permezz ta' perjodu sinkronizzat ta' mistrieħ ta' mill-inqas sitt ġimgħat.

Meta l-farms li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jiġu mserrħin, iż-żoni ta' protezzjoni għandhom jiġu kkonvertiti f'żoni ta' sorveljanza.

L-awtorità kompetenti tista' tiddeċiedi li titlob li farms oħra fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għal dawk il-farms għandu jiġi stabbilit mill-awtorità kompetenti wara evalwazzjoni tar-riskji każ b'każ;

(d) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bl-ISAV bl-HPR imħassar jew bl-ISA kkonfermata u l-farms kollha l-oħra li ġew imserrħin fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza għandhom jiġu ripopolati b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-ISA.

Ir-ripopolazzjoni għandha sseħħ biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin skont il-punt I.2.2.1.(c);

(e) il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment koperti mill-programm ta' eradikazzjoni u, meta tkun meħtieġa s-sorveljanza fil-popolazzjonijiet selvaġġi, il-punti tat-teħid ta' kampjuni magħżula f'konformità mal-punt I.1, għandhom sussegwentement ikunu soġġetti għall-iskema ta' sorveljanza stipulata fil-punt I.2.1.

I.2.2.2. Ir-rekwiżiti sabiex jinkiseb mill-ġdid tal-istatus ta' mingħajr mard għal kompartimenti kontinentali li jkunu magħmula minn farm wieħed li preċedentement kien iddikjarat li kellu status tas-saħħa tal-Kategorija I

Kompartiment kontinentali li jkun magħmul minn farm wieħed li għandu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-ISA, li l-istatus tas-saħħa tiegħu ma jiddependix mill-ilmijiet naturali tal-madwar f'konformità mal-punt 3 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, u li l-istatus tas-saħħa tiegħu tal-Kategorija I kien ġie rtirat f'konformità mal-Artikolu 53(3) ta' dik id-Direttiva, jista' jerġa' jikseb dan l-istatus immedjatament wara li l-awtorità kompetenti tkun ikkonfermat li l-farm jikkonforma mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

(a) ikun tbattal, tnaddaf, ġie diżinfettat u ġie mserraħ; it-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun ta' mill-inqas sitt ġimgħat;

(b) ikun ġie ripopolat b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-ISA.

I.3. Il-miżuri ta' kontroll minimu għaż-żamma tal-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-ISA

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata sabiex jinżamm l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I, kif previst fl-Artikolu 52 tad-Direttiva 2006/88/KE, il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV ta' dik id-Direttiva fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikkonċernati, għandhom ikunu soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni f'konformità mat-Tabella 3.B [1] stipulata fit-Taqsima II ta' din il-Parti, fejn jitqies il-livell ta' riskju li l-farm jiġi infettat bl-ISA.

Meta tiġi stabbilita l-frekwenza tal-ispezzjonijiet tas-saħħa għall-kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-ISA, li jitqiegħdu f'żoni kontinentali u fejn l-istatus tas-saħħa fir-rigward tal-ISA ikun jiddependi fuq l-istatus tas-saħħa tal-ilmijiet naturali tal-madwar li jospitaw is-salamun tal-Atlantiku (*Salmo salar*), ir-riskju ta' infezzjoni bl-ISA għandu jitqies li huwa għoli.

L-istatus ta' mingħajr mard fir-rigward tal-ISA jista' jinżamm biss sakemm il-kampjuni kollha li ġew ittestjati bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2 ikunu pproduċew riżultati negattivi għall-ISAV bl-HPR imħassar, kif ukoll diment li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' ISA f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3.

I.4. Ir-rekwiżiti speċifiċi sabiex jinkiseb status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward tal-ISAV bl-HPR imħassar fl-Istati Membri, fiż-żoni jew fil-kompartimenti li preċedentement kellhom status tas-saħħa tal-Kategorija V

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-ISA jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija III diment li:

(a) ikunu ġew issodisfati r-rekwiżiti stipulati fil-punti I.2.2.1(a), (b) u (c). F'każ li l-mistrieħ ma jkunx teknikament possibbli, il-farms għandhom jiġu soġġetti għal miżura alternattiva li tipprovdi garanzija kważi simili għall-isterminazzjoni tal-ISAV mill-ambjent tal-farm;

(b) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms kollha l-oħra li ġew imserrħin jew li kienu soġġetti għal miżuri alternattivi skont (a) fi ħdan iż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza, ikunu ġew ripopolati b'ħut miġjub minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I, II jew III fir-rigward tal-ISA;

(c) din ir-ripopolazzjoni tkun seħħet biss wara li l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi skont (a).

(d) ma jkun hemm l-ebda konferma tal-ISAV bl-HPR imħassar matul il-perjodu ta' sentejn wara l-ikkompletar tal-miżuri msemmija fil-punti (a), (b) u (c), kif ukoll wara li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett matul dan il-perjodu f'konformità mal-proċeduri stipulati fil-punt II.3.

[1] Ma għandhomx japplikaw għall-farms li fihom titrabba biss it-trota qawsalla (*Oncorhynchus mykiss*) jew it-trota kannella (*Salmo trutta*) jew li fihom jitrabbew iż-żewġ speċijiet, u li fihom il-provvista tal-ilma tkun ibbażata b'mod esklużiv fuq sorsi tal-ilma ħelu li ma jospitawx is-salamun tal-Atlantiku (*Salmo salar*).

II. **Il-metodi dijanjostiċi u l-investigazzjonijiet uffiċjali**

II.1. Il-kampjuni

Il-materjal tat-tessut li jrid jiġi eżaminat għandu jkun:

(a) L-istoloġija: mir-ras sal-kliewi, il-fwied, il-qalb, il-frixa, l-intestini, il-milsa u l-garġi;

(b) L-immunoistokimika: nofs il-kilwa u l-qalb, inklużi l-valvi u l-*bulbus arteriosus;*

(c) l-analiżi RT-qPCR: nofs il-kilwa u l-qalb;

(d) Il-koltura tal-vajrus: nofs il-kilwa, il-qalb, il-fwied u l-milsa.

Jistgħu jiġu raggruppati biċċiet ta' organi minn massimu ta' ħames ħutiet.

II.2. Il-metodi dijanjostiċi sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard fir-rigward tal-ISA

Il-metodu dijanjostiku li jrid jintuża sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard fir-rigward tal-ISA f'konformità mal-punti I.2 u I.3 għandu jkun ir-RT-qPCR, segwit minn sekwenzar ta' kampjuni pożittivi f'konformità mal-metodi u l-proċeduri ddettaljati stipulati fil-Parti 3 tal-Anness II.

Fil-każ ta' riżultat pożittiv għar-RT-qPCR, għandhom jiġu ttestjati kampjuni ulterjuri qabel l-implimentazzjoni tal-miżuri ta' kontroll inizjali previsti fl-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE.

Dawk il-kampjuni għandhom jiġu ttestjati kif ġej f'konformità mal-metodi u l-proċeduri ddettaljati stipulati fil-Parti 3 tal-Anness II:

(a) skrinjar tal-kampjuni permezz tar-RT-qPCR, inkluż is-sekwenzar tal-ġenu HE sabiex jiġi vverifikat it-tħassir minn HPR;

kif ukoll

(b) eżaminazzjoni tal-preparazzjonijiet tat-tessuti permezz ta' antikorpi speċifiċi kontra l-ISAV (jiġifieri IHC fuq sezzjonijiet fissi jew IFAT fuq il-marki tat-tessuti); jew

(c) iżolament u identifikazzjoni tal-ISAV f'koltura taċ-ċelloli minn tal-inqas minn kampjun wieħed minn kwalunkwe kampjun ta' ħut meħud mill-farm.

II.3. L-investigazzjoni uffiċjali u l-metodi dijanjostiċi sabiex tiġi eskluża jew tiġi kkonfermata l-preżenza tal-ISA

Meta jiġi kkonfermat jew jiġi eskluż suspett ta' ISA f'konformità mal-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE, għandha tiġi rrispettata l-proċedura ta' spezzjoni, tat-teħid ta' kampjuni u ta' ttestjar li ġejja:

(a) l-investigazzjoni uffiċjali li għandha tinkludi mill-inqas spezzjoni waħda tas-saħħa u teħid wieħed ta' kampjun ta' għaxar ħutiet moribondi, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem* li jkunu konsistenti mal-ISA. Jekk ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew sinjali *post-mortem* li jkunu konsistenti mal-ISA, l-ispezzjoni tas-saħħa għandha tiġi segwita mit-teħid immirat ta' kampjuni ta' minimu ta' 30 ħuta moribonda jew ta' ħut li jkun għadu kif miet b'kompożizzjoni normali f'konformità mal-punt I.1. Il-kampjuni għandhom jiġu ttestjati f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt (b);

(b) fil-każ ta' riżultat pożittiv tar-RT-qPCR għall-ISAV bl-HPR imħassar, għandhom jiġu ttestjati kampjuni ulterjuri qabel l-implimentazzjoni tal-miżuri ta' kontroll inizjali previsti fl-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE. Każ suspettat ta' infezzjoni bl-ISA għandu jiġi kkonfermat f'konformità mal-kriterji li ġejjin b'metodi u b'proċeduri ddettaljati stipulati fil-Parti 3 tal-Anness II:

(i) Is-sejba tal-ISAV permezz tar-RT-qPCR, inkluż is-sekwenzar tal-ġenu HE sabiex jiġi vverifikat it-tħassir minn HPR, u s-sejba tal-ISAV fi preparazzjonijiet tat-tessuti permezz ta' antikorpi speċifiċi kontra l-ISAV (jiġifieri IHC fuq sezzjonijiet fissi jew IFAT fuq il-marki tat-tessuti)

jew

(ii) is-sejba tal-ISAV permezz tar-RT-qPCR, inkluż is-sekwenzar tal-ġenu HE sabiex jiġi vverifikat it-tħassir minn HPR, u

l-iżolament u l-identifikazzjoni tal-ISAV f'koltura taċ-ċelloli minn tal-inqas minn kampjun wieħed minn kwalunkwe kampjun ta' ħut meħud mill-farm;

(c) fejn tiġi osservata l-preżenza ta' sejbiet kliniċi, ta' bidliet patoloġiċi kbar jew ta' sejbiet istopatoloġiċi li jkunu konsistenti mal-ISA, is-sejbiet iridu jiġu kkorroborati permezz ta' sejba tal-vajrus b'żewġ metodi dijanjostiċi bi prinċipji indipendenti ta' sejba, bħar-RT-qPCR u l-IHC, f'konformità mal-Parti 3 tal-Anness II.

Is-suspett tal-ISA jista' jiġi eskluż, jekk it-testijiet u l-ispezzjonijiet imwettqa matul perjodu ta' 12-il xahar mid-data tas-suspett jinstabu li ma jiżvelaw l-ebda evidenza ulterjuri tal-preżenza tal-ISA.

It-Tabella 3.A

L-Iskema ta' sorveljanza għaż-żoni u għall-kompartimenti għall-perjodu ta' kontroll ta' sentejn, qabel ma jinkiseb l-istatus ta' mingħajr mard għall-ISA kif imsemmi fil-punt I.2.1

Is-sena ta' sorveljanza	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa kull sena (sentejn)	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena (sentejn)	In-numru ta' ħut li jridu jittieħdu kampjuni tagħhom kull sena
Is-sena nru 1	6	2 (1)	2 * 75 (2)
Is-sena nru 2	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Il-kampjuni jridu jinġabru, jinħażnu u jiġu eżaminati matul żewġ perjodi ta' ttestjar ta' xahar kull sena (jiġifieri fir-rebbiegħa u fil-ħarifa) jew meta jkun xieraq f'konformità ma' kunsiderazzjonijiet prattiċi.
(2) In-numru massimu ta' ħut f'kull għadd: 5.

It-Tabella 3.B

L-Iskemi ta' sorveljanza għaż-żoni jew għall-kompartimenti sabiex iżommu l-istatus ta' mingħajr mard għall-ISA kif imsemmi fil-punt I.3 (2)

Il-livell ta' riskju	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa kull sena	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena	In-numru ta' ħut li jridu jittieħdu kampjuni tagħhom kull sena
Għoli	2	2 (1)	2 * 30
Medju	1	1 (1)	30
Baxx	1 kull sentejn	1 kull sentejn	30 kull sentejn

(1) Il-kampjuni jridu jinġabru u jiġu eżaminati matul żewġ perjodi ta' ttestjar ta' xahar kull sena (jiġifieri fir-rebbiegħa u fil-ħarifa) jew meta jkun xieraq f'konformità ma' kunsiderazzjonijiet prattiċi.
(2) Ma għandhomx japplikaw għall-farms li fihom titrabba biss it-trota qawsalla (*Oncorhynchus mykiss*) jew it-trota kannella (*Salmo trutta*) jew li fihom jitrabbew iż-żewġ speċijiet, u li fihom il-provvista tal-ilma tkun ibbażata b'mod esklużiv fuq sorsi tal-ilma ħelu li ma jospitawx is-salamun tal-Atlantiku (*Salmo salar*).

PARTI 4

IL-METODI TA' SORVELJANZA U TA' KONTROLL GĦALL-INFEZZJONI BIL-*MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Ir-rekwiżiti għall-programmi ta' sorveljanza u ta' eradikazzjoni sabiex jinkisbu u jinżammu l-istatuses ta' mingħajr mard fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens***

I.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

L-ispezzjonijiet tas-saħħa u, fejn xieraq, it-teħid ta' kampjuni għall-eżaminazzjonijiet fil-laboratorju, għandhom jitwettqu fil-perjodu tas-sena meta l-prevalenza tal-parassita fl-Istat Membru, fiż-żona jew fil-kompartiment tkun magħrufa li tkun massima. Meta din id-dejta ma tkunx disponibbli, it-teħid ta' kampjuni għandu jsir eżatt wara li t-temperatura tal-ilma tkun qabżet 17-il °C.

Meta jridu jittieħdu kampjuni ta' molluski f'konformità mar-rekwiżiti stipulati fil-Parti 4, għandhom japplikaw il-kriterji li ġejjin:

(a) jekk l-ispeċijiet *Ostrea* u l-ispeċijiet *Mytilus* ikunu preżenti fl-unitajiet tal-produzzjoni jew fiż-żona tal-produzzjoni, għandhom jittieħdu kampjuni ta' daqs ugwali taż-żewġ ġeneri. Jekk ikun preżenti wieħed biss minn dawk il-ġeneri, dak il-ġeneru għandu jittieħed kampjun tiegħu. Jekk la l-ġeneru *Ostrea* u lanqas il-ġeneru *Mytilus* ma jkunu preżenti, il-kampjun irid ikun jirrappreżenta l-ispeċijiet suxxettibbli kollha l-oħra li jkunu preżenti;

(b) jekk ikunu preżenti fl-unitajiet tal-produzzjoni molluski dgħajfa, miftuħin jew li għadhom kif mietu, iżda mhux fi stat ta' dekompożizzjoni, dawn il-molluski għandhom jintgħażlu l-ewwel. Jekk dawn il-molluski ma jkunux preżenti, il-molluski li jintgħażlu għandhom jinkludu l-iktar molluski f'saħħithom u kbar miż-żmien;

(c) meta jittieħdu kampjuni minn farms tal-molluski li jużaw iktar minn sors wieħed tal-ilma għall-produzzjoni tal-molluski, il-molluski li jirrappreżentaw is-sorsi kollha tal-ilma għandhom jiġu inklużi għat-teħid ta' kampjuni b'tali mod li l-partijiet kollha tal-farm ikunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun;

(d) meta jittieħdu kampjuni minn żoni ta' trobbija tal-molluski, il-molluski minn numru biżżejjed ta' punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu inklużi fil-kampjun b'tali mod li l-partijiet kollha taż-żona ta' trobbija tal-molluski jkunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun. Il-fatturi ewlenin li jridu jitqiesu għall-għażla ta' dawn il-punti tat-teħid ta' kampjuni, huma l-punti preċedenti tat-teħid ta' kampjuni fejn instabet il-*Marteilia refringens*, id-densità tal-ħażna, il-flussi tal-ilma, il-preżenza ta' speċijiet suxxettibbli, il-preżenza ta' speċijiet vetturi, il-batimetrija u l-prattiki tal-ġestjoni. Fit-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu inklużi is-saffi naturali.

I.2. Ir-rekwiżiti speċifiċi sabiex jinkiseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-*Marteilia refringens*

I.2.1. Il-programmi ta' sorveljanza

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens* jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikunu ġew soġġetti minn tal-inqas għall-programm ta' sorveljanza li ġej, li jkun jinkludi l-ispezzjonijiet tas-saħħa u l-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar.

Il-programm ta' sorveljanza ta' sentejn:

(a) il-farms jew iż-żoni ta' trobbija tal-molluski jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' sentejn wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 4.A stipulata fit-Taqsima II;

(b) matul dak il-perjodu ta' sentejn, l-ittestjar tal-kampjuni kollha b'metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2 ikun ipproduċa riżultati negattivi għall-*Marteilia refringens* u kwalunkwe suspett ta' *Marteilia refringens* ikun ġie eskluż f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3;

(c) meta l-*Ostrea edulis, Mytilus edulis* jew il-*Mytilus galloprovincialis* miġjuba minn Stat Membru, minn żona jew minn kompartiment bi status tas-saħħa tal-Kategorija I jkunu jridu jiġu inklużi fil-kampjun, dawn iridu jkunu ġew introdotti fil-farm jew fiż-żona ta' trobbija tal-molluski mill-inqas fir-rebbiegħa, eżatt qabel il-perjodu meta jitwettaq il-programm ta' sorveljanza.

I.2.2. Il-programmi ta' eradikazzjoni

L-eradikazzjoni tal-*Marteilia refringens* titqies li hija impossibbli fil-biċċa l-kbira tal-każijiet, iżda meta l-Istat Membru jiġġudika li din hija fattibbli, għandu japplika l-mudell li ġej għal programm ta' eradikazzjoni.

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens*, jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan dak l-Istat Membru jew dik iż-żona jew dak il-kompartiment ikunu ġew soġġetti minn tal-inqas għall-programm ta' eradikazzjoni li ġej:

(a) il-miżuri stipulati fit-Taqsima 3 tal-Kapitolu V tad-Direttiva 2006/88/KE jkunu ġew applikati b'mod effettiv, u b'mod partikolari, tkun ġiet stabbilita żona ta' konteniment kif imsemmi fl-Artikolu 32(b) tad-Direttiva 2006/88/KE, li tkun magħmula minn żona ta' protezzjoni u minn żona ta' sorveljanza, qrib il-farm(s) jew qrib iż-żona(i) ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Marteilia refringens*.

Iż-żona ta' kontenjment għandha tiġi definita abbażi ta' każ b'każ fejn jitqiesu l-fatturi li jinfluwenzaw ir-riskji li l-*Marteilia refringens* tinxtered, fosthom: in-numru, l-età, ir-rata u d-distribuzzjoni tal-mortalità tal-molluski infettati bil-*Marteilia refringens* fil-farm jew fiż-żona ta' trobbija tal-molluski, inklużi il-molluski li jgħixu fis-selvaġġ; id-distanza u d-densità tal-farms tal-madwar jew taż-żoni ta' trobbija tal-molluski tal-madwar, inklużi il-molluski li jgħixu fis-selvaġġ; il-prossimità tal-istabbilimenti tal-ipproċessar, tal-farms ta' kuntatt jew taż-żoni ta' kuntatt tat-trobbija tal-molluski; l-ispeċijiet, speċjalment speċijiet suxxettibbli u speċijiet vetturi, li huma preżenti fil-farms jew fiż-żoni ta' trobbija tal-molluski; il-prattiki tat-trobbija applikati fil-farms affettwati u f'dawk tal-madwar, kif ukoll fiż-żoni affettwati tat-trobbija tal-molluski u f'dawk tal-madwar; il-kundizzjonijiet idrodinamiċi u fatturi identifikati oħra ta' sinifikat epidemjoloġiku.

Sabiex jiġu stabbiliti ż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza, għandhom japplikaw ir-rekwiżiti minimi li ġejjin:

(i) għandha tiġi stabbilita żona ta' protezzjoni fil-qrib immedjat ta' farm jew ta' żona tat-trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Marteilia refringens* u għandha tikkorrispondi għal żona stabbilita skont dejta idrodinamika jew epidemjoloġika xierqa;

(ii) għandha tiġi stabbilita żona ta' sorveljanza 'l barra miż-żona ta' protezzjoni u għandha tikkorrispondi għal żona, madwar iż-żona ta' protezzjoni, stabbilita skont dejta idrodinamika jew epidemjoloġika xierqa;

(b) il-farms u ż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan iż-żona ta' protezzjoni, li ma jkunux uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Marteilia refringens* għandhom ikunu soġġetti għal investigazzjoni uffiċjali li tkun tinkludi minn tal-inqas il-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar ta' 150 mollusk wara l-bidu tal-perjodu ta' trażmissjoni tal-*Marteilia refringens*. Meta l-perjodu tat-trażmissjoni ma jkunx magħruf, it-teħid tal-kampjuni għandu jibda fil-perjodu wara li t-temperatura tal-ilma taqbeż 17-il°C;

(c) il-farms kollha u ż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Marteilia refringens* għandhom jitbattlu, jiġu mserrħin, u jekk ikun possibbli, jitnaddfu u jiġu diżinfettati.

It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun ta' mill-inqas:

(i) xahrejn fil-każ tal-farms u taż-żoni ta' trobbija tal-molluski b'konnessjonijiet limitati mal-ilmijiet tal-madwar, fosthom l-imfaqas u n-nurseries;

(ii) xahrejn fil-każ tal-farms b'konnessjonijiet bla limitu mal-ilmijiet tal-madwar u taż-żoni ta' trobbija tal-molluski, diment li l-molluski infettati tal-ispeċijiet suxxettibbli u dawk il-molluski tal-ispeċijiet suxxettibbli b'rabtiet epidemjoloġiċi mal-farm infettat jew maż-żona infettata ta' trobbija tal-molluski, ikunu ġew maqbuda jew ikunu tneħħew qabel il-perjodu tas-sena meta l-prevalenza tal-*Marteilia refringens* magħrufa li tkun massima, jew meta dak il-perjodu ma jkunx magħruf, qabel il-perjodu meta t-temperatura tal-ilma taqbeż 17-il°C;

(iii) erbatax-il xahar fil-każ tal-farms u taż-żoni ta' trobbija tal-molluski b'konnessjonijiet bla limitu mal-ilmijiet tal-madwar, diment li l-molluski infettati tal-ispeċijiet suxxettibbli u dawk il-molluski tal-ispeċijiet suxxettibbli b'rabtiet epidemjoloġiċi mal-farm infettat jew maż-żona infettata ta' trobbija tal-molluski, ma jkunux ġew maqbuda jew ma jkunux tneħħew qabel il-perjodu tas-sena meta l-prevalenza tal-*Marteilia refringens* magħrufa li tkun massima, jew meta dik id-dejta ma tkunx magħrufa, meta l-molluski tal-ispeċijiet suxxettibbli ma jkunux ġew maqbuda jew ma jkunux tneħħew qabel il-perjodu meta t-temperatura tal-ilma taqbeż 17-il °C.

Meta l-farms kollha u ż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jitbattlu, għandu jkun hemm minn tal-inqas erba' ġimgħat ta' mistrieħ sinkronizzat.

L-awtorità kompetenti tista' tiddeċiedi li titlob li jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin farms oħra jew żoni oħra ta' trobbija tal-molluski, kif xieraq, fiż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jiġi stabbilit mill-awtorità kompetenti wara evalwazzjoni tar-riskji każ b'każ;

(d) il-farms kollha jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms kollha l-oħra jew iż-żoni kollha l-oħra ta' trobbija tal-molluski li jkunu mserrħin fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza għandhom jiġu ripopolati b'molluski miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens*.

Ir-ripopolazzjoni għandha sseħħ biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin f'konformità mal-punt I.2.2(c);

(e) il-farms u ż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment koperti mill-programm ta' eradikazzjoni għandhom sussegwentement ikunu soġġetti għall-iskema ta' sorveljanza stipulata fil-punt I.2.1 ta' din il-Parti.

I.3. Ir-rekwiżiti speċifiċi għaż-żamma tal-istatus tas-saħħa ta' mingħajr mard (il-Kategorija I) fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens*

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata sabiex jinżamm status tas-saħħa tal-Kategorija I, kif previst fl-Artikolu 52 tad-Direttiva 2006/88/KE, il-farms kollha jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment għandhom ikunu soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni skont it-Tabella 4.B stipulata fit-Taqsima II, fejn jitqies il-livell ta' riskju li l-farm jew ż-żona ta' trobbija tal-molluski jiġu infettati bil-*Marteilia refringens*.

L-istatus ta' mingħajr mard jista' jinżamm biss sakemm il-kampjuni kollha li għalihom intużaw il-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2. ikunu pproduċew riżultati negattivi għall-*Marteilia refringens*, kif ukoll diment li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' *Marteilia refringens* f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3.

I.4. Ir-rekwiżiti għat-tneħħija tal-miżuri ta' kontenjment previsti fl-Artikolu 39 tad-Direttiva 2006/88/KE (il-bidla minn status tas-saħħa tal-Kategorija V għal dak tal-Kategorija III) fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens*

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens* jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward ta' dik il-marda elenkata, diment li:

(a) ikunu ġew issodisfati r-rekwiżiti stipulati fil-punti I.2.2(a), (b) u (c). F'każ li l-mistrieħ ma jkunx teknikament possibbli, il-farms għandhom jiġu soġġetti għal miżura alternattiva li tipprovdi garanzija kważi simili għall-isterminazzjoni tal-*Marteilia refringens* mill-ambjent tal-farm;

(b) il-farms jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms u ż-żoni ta' trobbija tal-molluski kollha l-oħra li ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi skont (a) fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza jkunu ġew ripopolati b'molluski miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I, II jew III fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens*;

(c) ir-ripopolazzjoni tkun seħħet biss wara li l-farms kollha jew iż-żoni kollha tat-trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin jew ikunu ġew soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a);

(d) ma jkun hemm l-ebda konferma ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens* matul il-perjodu ta' sentejn wara l-ikkompletar tal-miżuri msemmija fil-punti (a),(b) u (c), kif ukoll wara li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett matul dan il-perjodu skont il-proċeduri stipulati fil-punt II.3.

II. **Il-metodi dijanjostiċi u l-investigazzjonijiet uffiċjali**

II.1. Il-kampjuni

L-annimal kollu għandu jintbagħat għand il-laboratorju għat-twettiq tat-testijiet dijanjostiċi previsti fil-punti II.2 u II.3.

II.2. Il-metodi dijanjostiċi sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard għall-infezzjoni bil-*Marteilia refringens*

Il-metodi dijanjostiċi li jridu jintużaw sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard għall-infezzjoni bil-*Marteilia refringens* wara t-twettiq tal-metodi u tal-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-Parti 4 tal-Anness II, għandhom ikunu l-istopatoloġija, il-marki tat-tessuti jew il-PCR.

II.3. L-investigazzjoni uffiċjali u l-metodi dijanjostiċi sabiex tiġi kkonfermata l-preżenza jew jiġi eskluż s-suspett ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens*

Meta jkun meħtieġ li jiġi kkonfermat jew li jiġi eskluż suspett ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens* f'konformità mal-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE, għandha tiġi rrispettata l-proċedura ta' spezzjoni, tat-teħid ta' kampjuni u ta' ttestjar li ġejja:

(a) l-investigazzjoni uffiċjali għandha tinkludi minn tal-inqas teħid wieħed ta' kampjun ta' 30 mollusk ta' speċijiet suxxettibbli jekk is-suspett ikun ibbażat fuq rapport ta' mortalità, jew jekk le, ta' 150 mollusk ta' speċijiet suxxettibbli wara l-bidu tal-perjodu ta' trażmissjoni tal-*Marteilia refringens*. Meta l-perjodu tat-trażmissjoni ma jkunx magħruf, it-teħid tal-kampjuni għandu jibda fil-perjodu wara li t-temperatura tal-ilma taqbeż 17-il°C;

(b) Il-kampjuni għandhom jiġu ttestjati bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt (i) skont il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fit-Taqsima I tal-Parti 4 tal-Anness II:

(i) il-preżenza tal-*Marteilia refringens* għandha titqies li hija kkonfermata meta jkun hemm riżultat pożittiv permezz tal-istopatoloġija, tal-marki tat-tessuti jew tal-ibridizzazzjoni *in situ* flimkien ma' riżultat pożittiv permezz tal-PCR li jkun komplut bis-sekwenzar;

(ii) is-suspett ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens* jista' jiġi eskluż jekk it-testijiet imsemmija f'(i) ma jiżvelaw l-ebda evidenza ulterjuri tal-preżenza tal-*Marteilia refringens*.

It-Tabella 4.A

L-Iskema ta' sorveljanza għall-Istati Membri, għaż-żoni u għall-kompartimenti għall-perjodu ta' kontroll ta' qabel ma jinkiseb l-istatus ta' mingħajr mard għall-*Marteilia refringens* kif imsemmi fil-punt I.2.1

	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa kull sena	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena	In-numru ta' molluski fil-kampjun
Il-farms/iż-żoni ta' trobbija tal-molluski	1	1	150

It-Tabella 4.B

Skema ta' sorveljanza għall-Istati Membri, għaż-żoni jew għall-kompartimenti sabiex jinżamm status ta' mingħajr mard għall-*Marteilia refringens* kif imsemmi fil-punt I.3

Il-livell ta' riskju	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju	In-numru ta' molluski fil-kampjun
Għoli	1 kull sena	1 kull sentejn	150
Medju	1 kull sentejn	1 kull sentejn	150
Baxx	1 kull sentejn	1 kull 4 snin	150

PARTI 5

IL-METODI TA' SORVELJANZA U TA' KONTROLL GĦALL-INFEZZJONI BIL-*BONAMIA OSTREAE*

I. **Ir-rekwiżiti għall-programmi ta' sorveljanza u ta' eradikazzjoni sabiex jinkisbu u jinżammu l-istatuses ta' mingħajr mard fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae***

I.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

L-ispezzjonijiet tas-saħħa u, fejn xieraq, it-teħid ta' kampjuni tal-unitajiet ta' produzzjoni għandhom isiru fil-perjodu tas-sena meta l-prevalenza tal-*Bonamia ostreae* fl-Istat Membru, fiż-żona jew fil-kompartiment tkun magħrufa li tkun massima. Meta din id-dejta ma tkunx disponibbli, it-teħid ta' kampjuni għandu jsir fix-xitwa jew fil-bidu tar-rebbiegħa.

Meta jridu jittieħdu kampjuni ta' molluski f'konformità mar-rekwiżiti stipulati fil-Parti 5, għandhom japplikaw il-kriterji li ġejjin:

(a) jekk ikunu preżenti molluski tal-ispeċi *Ostrea edulis*, għandhom jintgħażlu għat-teħid ta' kampjuni gajdri ta' dik l-ispeċi biss. Jekk ma jkunux preżenti molluski tal-ispeċi *Ostrea edulis*, il-kampjun għandu jkun jirrappreżenta l-ispeċijiet suxxettibbli kollha l-oħra li jkunu preżenti;

(b) jekk ikunu preżenti molluski dgħajfa, miftuħin jew li għadhom kif mietu, iżda mhux fi stat ta' dekompożizzjoni, dawn il-molluski għandhom jintgħażlu l-ewwel. Jekk dawn il-molluski ma jkunux preżenti, il-molluski li jintgħażlu għandhom jinkludu l-iktar molluski f'saħħithom u kbar miż-żmien;

(c) meta jittieħdu kampjuni minn farms li jużaw iktar minn sors wieħed tal-ilma għall-produzzjoni tal-molluski, il-molluski li jirrappreżentaw is-sorsi kollha tal-ilma għandhom jiġu inklużi għat-teħid ta' kampjuni b'tali mod li l-partijiet kollha tal-farm ikunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun;

(d) meta jittieħdu kampjuni minn żoni ta' trobbija tal-molluski, il-molluski minn numru biżżejjed ta' punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu inklużi fil-kampjun. Il-fatturi ewlenin li jridu jitqiesu għall-għażla ta' dawk il-punti tat-teħid ta' kampjuni huma l-punti preċedenti fejn instabet il-*Bonamia ostreae*, id-densità tal-ħażna, il-flussi tal-ilma, il-preżenza ta' speċijiet suxxettibbli, il-preżenza ta' speċijiet vetturi, il-batimetrija u l-prattiki tal-ġestjoni. Fit-teħid tal-kampjuni għandhom jiġu inklużi s-saffi naturali fi ħdan jew maġenb iż-żoni ta' trobbija.

I.2. Ir-rekwiżiti speċifiċi sabiex jinkiseb status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-*Bonamia ostreae*

I.2.1. Il-programmi ta' sorveljanza

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward tal-*Bonamia ostreae* jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan dak l-Istat Membru, dik iż-żona jew dak il-kompartiment ikunu ġew soġġetti minn tal-inqas għall-programm ta' sorveljanza li ġej, li jkun jinkludi l-ispezzjonijiet tas-saħħa u l-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar.

Il-programm ta' sorveljanza ta' sentejn:

(a) il-farms u ż-żoni ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' sentejn wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 5.A. stabbilita f'din il-Parti;

(b) matul dak il-perjodu ta' sentejn, l-ittestjar tal-kampjuni kollha li għalihom intużaw il-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2. ikun ipproduċa riżultati negattivi għall-*Bonamia ostreae* u jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' *Bonamia ostreae* f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3;

(c) meta jkunu jridu jiġu inklużi molluski tal-ispeċi *Ostrea edulis* fil-kampjun, miġjuba minn Stat Membru, minn żona jew minn kompartiment bi status tas-saħħa tal-Kategorija I, dawn iridu jkunu ġew introdotti fil-farm jew fiż-żona tat-trobbija tal-molluski minn tal-inqas fil-harifa, eżatt qabel il-perjodu meta jitwettaq il-programm ta' sorveljanza.

I.2.2. Il-programmi ta' eradikazzjoni

L-eradikazzjoni tal-*Bonamia ostreae* titqies li hija impossibbli fil-biċċa l-kbira tal-każijiet, iżda meta l-Istat Membru jiġġudika li din hija fattibbli, għandu japplika l-mudell li ġej għal programm ta' eradikazzjoni.

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-*Bonamia ostreae* jistgħu jerġgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan dak l-Istat Membru jew dik iż-żona jew dak il-kompartiment ikunu ġew soġġetti minn tal-inqas għall-programm ta' eradikazzjoni li ġej:

(a) il-miżuri ta' kontroll minimu stipulati fit-Taqsima 3 tal-Kapitolu V tad-Direttiva 2006/88/KE jkunu ġew applikati b'mod effettiv, u b'mod partikolari, tkun ġiet stabbilita żona ta' konteniment kif imsemmi fil-punt (b) tal-Artikolu 32 ta' dik id-Direttiva, li tkun magħmula minn żona ta' protezzjoni u minn żona ta' sorveljanza, qrib il-farm(s) jew qrib iż-żona(i) ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Bonamia ostreae*.

Iż-żona ta' kontenіment għandha tiġi definita abbażi ta' każ b'każ fejn jitqiesu l-fatturi li jinfluwenzaw ir-riskji li dik il-marda elenkata tinxtered, fosthom: in-numru, ir-rata, l-età u d-distribuzzjoni tal-mortalità tal-molluski fil-farm jew fiż-żona ta' trobbija tal-molluski li jkunu infettati bil-*Bonamia ostreae*, inklużi il-molluski li jgħixu fis-selvaġġ; id-distanza u d-densità tal-farms tal-madwar jew taż-żoni ta' trobbija tal-molluski tal-madwar, inklużi il-molluski li jgħixu fis-selvaġġ; il-prossimità tal-istabbilimenti tal-ipproċessar, tal-farms ta' kuntatt jew taż-żoni ta' kuntatt tat-trobbija tal-molluski; l-ispeċijiet, speċjalment speċijiet suxxettibbli u speċijiet vetturi, li huma preżenti fil-farms jew fiż-żoni ta' trobbija tal-molluski; il-prattiki tat-trobbija applikati fil-farms affettwati u f'dawk tal-madwar, kif ukoll fiż-żoni affettwati tat-trobbija tal-molluski u f'dawk tal-madwar; il-kundizzjonijiet idrodinamiċi u fatturi identifikati oħra ta' sinifikat epidemjoloġiku.

Sabiex jiġu stabbiliti ż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza, għandhom japplikaw ir-rekwiżiti minimi li ġejjin:

(i) għandha tiġi stabbilita żona ta' protezzjoni fil-qrib immedjat ta' farm jew ta' żona tat-trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Bonamia ostreae* u għandha tikkorrispondi għal żona stabbilita skont dejta idrodinamika jew epidemjoloġika xierqa;

(ii) għandha tiġi stabbilita żona ta' sorveljanza 'l barra miż-żona ta' protezzjoni u għandha tikkorrispondi għal żona madwar iż-żona ta' protezzjoni, stabbilita skont dejta idrodinamika jew epidemjoloġika xierqa;

(b) il-farms kollha u ż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan iż-żona ta' protezzjoni, li ma jkunux uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Bonamia ostreae* għandhom ikunu soġġetti għal investigazzjoni uffiċjali li tkun tinkludi minn tal-inqas il-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar ta' 150 mollusk tal-ispeċijiet suxxettibbli wara l-bidu tal-perjodu ta' trażmissjoni tal-*Bonamia ostreae*. Meta l-perjodu tat-trażmissjoni ma jkunx magħruf, it-teħid ta' kampjuni għandu jibda fix-xitwa jew fil-bidu tar-rebbiegħa;

(c) il-farms kollha u ż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-*Bonamia ostreae* għandhom jitbattlu, jiġu mserrħin, u jekk ikun possibbli, jitnaddfu u jiġu diżinfettati. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun ta' mill-inqas sitt xhur.

Meta l-farms kollha jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jitbattlu, għandu jkun hemm minn tal-inqas erba' ġimgħat ta' mistrieħ sinkronizzat.

L-awtorità kompetenti tista' tiddeċiedi li titlob li jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin farms oħra jew żoni oħra ta' trobbija tal-molluski, kif xieraq, fiż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jiġi stabbilit mill-awtorità kompetenti wara evalwazzjoni tar-riskji każ b'każ;

(d) il-farms kollha jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms kollha l-oħra jew iż-żoni kollha l-oħra tat-trobbija tal-molluski li jkunu mserrħin fiż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza għandhom jiġu ripopolati b'molluski miġjuba minn Stati Membri, żoni jew kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*. Ir-ripopolazzjoni għandha sseħħ biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin f'konformità mal-punt I.2.2(c);

(e) il-farms u ż-żoni kollha tat-trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment koperti mill-programm ta' eradikazzjoni għandhom sussegwentement ikunu soġġetti għall-programm ta' sorveljanza stipulat fil-punt I.2.

I.3. Ir-rekwiżiti speċifiċi għaż-żamma tal-istatus tas-saħħa ta' mingħajr mard (il-Kategorija I) fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata sabiex jinżamm status tas-saħħa tal-Kategorija I, kif previst fl-Artikolu 52 tad-Direttiva 2006/88/KE, il-farms kollha jew iż-żoni kollha ta' trobbija tal-molluski fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV ta' dik id-Direttiva fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikkonċernati, għandhom ikunu soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni skont it-Tabella 5.B stipulata fit-Taqsima II ta' din il-Parti, fejn jitqies il-livell ta' riskju li l-farm jew ż-żona ta' trobbija tal-molluski jiġu infettati bil-*Bonamia ostreae*.

L-istatus ta' mingħajr mard fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae* jista' jinżamm biss sakemm il-kampjuni kollha li għalihom intużaw il-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2. ikunu pproduċew riżultati negattivi għall-*Bonamia ostreae*, kif ukoll diment li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' *Bonamia ostreae* f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3.

I.4. Ir-rekwiżiti għat-tneħħija tal-miżuri ta' kontenIment previsti fl-Artikolu 39 tad-Direttiva 2006/88/KE (il-bidla minn status tas-saħħa tal-Kategorija V għal dak tal-Kategorija III) fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*.

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae* jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward ta' dik il-marda, diment li:

(a) ikunu ġew issodisfati r-rekwiżiti stipulati fil-punti I.2.2(a), (b) u (c). F'każ li l-mistrieħ ma jkunx teknikament possibbli, il-farms għandhom jiġu soġġetti għal miżura alternattiva li tipprovdi garanzija kważi simili għall-isterminazzjoni tal-*Bonamia ostreae* mill-ambjent tal-farm;

(b) il-farms jew iż-żoni kollha tat-trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms u ż-żoni tat-trobbija tal-molluski kollha l-oħra li ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a) fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza jkunu ġew ripopolati b'molluski miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I, II jew III fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*.

(c) ir-ripopolazzjoni tkun seħħet biss wara li l-farms kollha jew iż-żoni kollha tat-trobbija tal-molluski li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jkunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a);

(d) ma jkun hemm l-ebda konferma ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae* matul il-perjodu ta' sentejn wara l-ikkompletar tal-miżuri msemmija fil-punti (a),(b) u (c), kif ukoll wara li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett matul dan il-perjodu skont il-proċeduri stipulati fil-punt II.3.

II. **Il-metodi dijanjostiċi u l-kriterji dijanjostiċi**

II.1. Il-kampjuni

L-annimal kollu għandu jintbagħat lil-laboratorju għat-twettiq tat-testijiet dijanjostiċi previsti fil-punti II.2 u II.3.

II.2. Il-metodi dijanjostiċi sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard għall-infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*

Il-metodi dijanjostiċi li jridu jintużaw sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard għall-infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*, għandhom ikunu l-istopatoloġija, il-marki tat-tessuti jew il-PCR. Meta jiġu applikati dawn il-metodi dijanjostiċi, għandhom jiġu segwiti l-metodi u l-proċeduri ddettaljati korrispondenti li huma stipulati fil-Parti 5 tal-Anness II.

II.3. Il-kriterji dijanjostiċi sabiex tiġi kkonfermata l-preżenza jew jiġi eskluż is-suspett ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens*

Meta jkun meħtieġ li jiġi kkonfermat jew li jiġi eskluż suspett ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae* f'konformità mal-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE, għandha tiġi rrispettata l-proċedura ta' spezzjoni, tat-teħid ta' kampjuni u ta' ttestjar li ġejja:

L-investigazzjoni uffiċjali għandha tinkludi minn tal-inqas teħid wieħed ta' kampjuni ta' 30 mollusk tal-ispeċijiet suxxettibbli jekk is-suspett ikun ibbażat fuq rapport dwar il-mortalità, jew jekk le, ta' 150 mollusk tal-ispeċijiet suxxettibbli wara l-bidu tal-perjodu ta' trażmissjoni tal-*Bonamia ostreae*. Meta l-perjodu ta' trażmissjoni ma jkunx magħruf, it-teħid ta' kampjuni għandu jibda fix-xitwa jew fil-bidu tar-rebbiegħa. Il-kampjuni għandhom jiġu ttestjati bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt (i) skont il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fit-Taqsima I tal-Parti 5 tal-Anness II.

(i) il-preżenza tal-*Bonamia ostreae* għandha titqies li hija kkonfermata meta jkun hemm riżultat pożittiv tal-istopatoloġija, tal-marki tat-tessuti jew tal-ibridizzazzjoni *in situ* flimkien ma' riżultat pożittiv permezz tal-PCR li jkun komplut bis-sekwenzar f'konformità mal-metodi u mal-proċeduri approvati u stipulati fl-Parti 5 tal-Anness II;

(ii) is-suspett tal-preżenza ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae* għandu jiġi eskluż jekk dawk it-testijiet ma jiżvelawx evidenza ulterjuri tal-preżenza tal-*Bonamia ostreae*.

It-Tabella 5.A

L-Iskema ta' sorveljanza għall-Istati Membri, għaż-żoni jew għall-kompartimenti għall-perjodu ta' kontroll ta' qabel ma jinkiseb l-istatus ta' mingħajr mard għall-*Bonamia ostreae* kif imsemmi fil-punt I.2.1

	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa kull sena	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena	In-numru ta' molluski fil-kampjun.
Il-farms/Iż-żoni ta' trobbija tal-molluski	1	1	150

It-Tabella 5.B

L-Iskemi ta' sorveljanza għall-Istati Membri, għaż-żoni jew għall-kompartimenti sabiex jinżamm l-istatus ta' mingħajr mard għall-*Bonamia ostreae* kif imsemmi fil-punt I.3

Il-livell ta' riskju	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju	In-numru ta' molluski fil-kampjun
Għoli	1 kull sena	1 kull sentejn	150
Medju	1 kull sentejn	1 kull sentejn	150
Baxx	1 kull sentejn	1 kull 4 snin	150

PARTI 6

IL-METODI TA' SORVELJANZA U TA' KONTROLL GĦALL-MARDA TAL-PONOT BOJOD (WSD)

I. **Ir-rekwiżiti għall-programmi ta' sorveljanza u ta' eradikazzjoni sabiex jinkisbu u jinżammu l-istatuses ta' mingħajr mard fir-rigward tal-WSD u għall-konteniment ta' infezzjoni bil-WSSV**

I.1. Ir-rekwiżiti ġenerali għall-ispezzjonijiet u għat-teħid ta' kampjuni

It-teħid ta' kampjuni ta' krustaċji għall-eżaminazzjoni fil-laboratorju għandu jitwettaq kull meta jkun probabbli li t-temperatura tal-ilma tilħaq l-ogħla punt annwali. Dak ir-rekwiżit li jikkonċerna t-temperatura tal-ilma għandu japplika wkoll għall-ispezzjonijiet tas-saħħa, meta dawn ikunu fattibbli u xierqa.

Meta jkunu jridu jittieħdu kampjuni ta' krustaċji mrobbija, f'konformità mar-rekwiżiti stipulati f'din il-Parti, għandhom japplikaw il-kriterji li ġejjin:

(a) jekk ikunu preżenti krustaċji dgħajfa jew moribondi fl-unitajiet tal-produzzjoni, dawn il-krustaċji għandhom jintgħażlu l-ewwel. Jekk dawn il-krustaċji ma jkunux preżenti, dawk magħżula għandhom jinkludu krustaċji ta' koorti ta' daqsijiet differenti, jiġifieri dawk li għadhom qegħdin jikbru u dawk li huma adulti, tal-ispeċijiet suxxettibbli magħżula, li jkunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun.

(b) jekk jintuża iktar minn sors wieħed tal-ilma għall-produzzjoni tal-krustaċji, għat-teħid ta' kampjuni jridu jiġu inklużi krustaċji tal-ispeċijiet suxxettibbli li jirrappreżentaw is-sorsi kollha tal-ilma;

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata fil-popolazzjonijiet selvaġġi f'konformità mat-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, in-numru u d-distribuzzjoni ġeografika tal-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu stabbiliti sabiex tinkiseb kopertura raġonevoli tal-Istat Membru, taż-żona jew tal-kompartiment. Il-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom ikunu jirrappreżentaw ukoll l-ekosistemi differenti fejn jinsabu l-popolazzjonijiet selvaġġi tal-ispeċijiet suxxettibbli, jiġifieri s-sistemi tal-baħar, tal-estwarji, tax-xmajjar u tal-lagi.

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata fil-popolazzjonijiet selvaġġi f'konformità mat-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, il-krustaċji li jridu jittieħdu kampjuni tagħhom għandhom jintgħażlu kif ġej:

(i) f'żoni ta' sistemi tal-baħar u tal-estwarji, għandha tintgħażel speċi waħda jew iktar minn dawn li ġejjin: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* jew l-ispeċijiet ta' gambli *Penaeus*, fosthom *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Jekk dawk l-ispeċijiet ma jkunux preżenti, il-kampjun irid ikun jirrappreżenta speċijiet suxxettibbli oħra ta' dekapodi li jkunu preżenti. Minħabba l-firxa wiesgħa ta' speċijiet ospitanti suxxettibbli, l-ospitanti jistgħu jintgħażlu minn ġeneri jew minn familji tad-Dekapodi fejn is-suxxettibbiltà tkun intweriet b'mod sperimentali jew b'mod naturali;

(ii) f'żoni ta' sistemi tax-xmajjar u tal-lagi, għandha tintgħażel speċi waħda jew iktar minn dawn li ġejjin: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* jew *Orconectes limosus*. Jekk dawk l-ispeċijiet ma jkunux preżenti, il-kampjun irid ikun jirrappreżenta speċijiet suxxettibbli oħra ta' dekapodi li jkunu preżenti. Minħabba l-firxa wiesgħa ta' speċijiet ospitanti suxxettibbli, l-ospitanti jistgħu jintgħażlu minn ġeneri jew minn familji tad-Dekapodi fejn is-suxxettibbiltà tkun intweriet b'mod sperimentali jew b'mod naturali;

(iii) jekk ikunu preżenti krustaċji dgħajfa jew moribondi, dawn il-krustaċji għandhom jintgħażlu l-ewwel. Jekk dawn il-krustaċji ma jkunux preżenti, dawk magħżula għandhom jinkludu krustaċji ta' koorti ta' daqsijiet differenti, jiġifieri dawk żgħar li għadhom qegħdin jikbru u dawk li huma adulti, tal-ispeċijiet suxxettibbli magħżula, li jkunu rrappreżentati b'mod proporzjonali fil-kampjun.

I.2. Ir-rekwiżiti speċifiċi sabiex jinkiseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-WSD

I.2.1. Il-programmi ta' sorveljanza

(a) Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward tal-WSD f'konformità mal-Parti B tal-Anness III tad-Direttiva 2006/88/KE jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV ta' dik id-Direttiva fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikunu jissodisfaw ir-rekwiżiti rilevanti stipulati fl-Anness V ta' dik id-Direttiva, u meta dawk l-farms kollha u, fejn meħtieġ mit-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, il-punti tat-teħid ta' kampjuni fil-popolazzjonijiet selvaġġi li jkunu magħżula f'konformità ma' dak il-punt, ikunu ġew soġġetti għall-programm li ġej ta' sorveljanza ta' sentejn, li jkun jinkludi l-ispezzjonijiet tas-saħħa u l-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar.

Il-farms jew il-punti tat-teħid ta' kampjuni jkunu ġew soġġetti għal spezzjonijiet tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni għal perjodu minimu ta' sentejn wara xulxin kif stipulat fit-Tabella 6.A stabbilita fit-Taqsima II.

Matul dak il-perjodu ta' sentejn, l-ittestjar tal-kampjuni kollha li għalihom intużaw il-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.2. ikun ipproduċa riżultati negattivi għall-infezzjoni bil-WSD u jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' WSD f'konformità mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3.

(b) meta matul l-implimentazzjoni tal-programm ta' sorveljanza msemmi fil-punt (a), tiġi kkonfermata infezzjoni bil-WSSV f'farm li jkun inkluż f'dak il-programm ta' sorveljanza, u għalhekk l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija II tal-farm ikun ġie rtirat, dak il-farm jista' minnufih jerġa' jikseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija II u jkompli l-implimentazzjoni tal-programm ta' sorveljanza sabiex jikseb status ta' mingħajr mard mingħajr ma jimplimenta programm ta' eradikazzjoni kif deskritt fil-punt I.2.2., diment li:

(i) ikun farm kontinentali li l-istatus tas-saħħa tiegħu fir-rigward tal-WSD ma jkunx jiddependi mill-istatus tas-saħħa fir-rigward ta' dik il-marda elenkata fl-ilmijiet naturali tal-madwar f'konformità mal-punt 3 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE;

(ii) ikun tbattal, tnaddaf, ġie diżinfettat u ġie mserraħ; it-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ irid ikun ta' mill-inqas sitt ġimgħat;

(iii) ikun ġie ripopolat bi krustaċji miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-WSD.

I.2.2. Il-programmi ta' eradikazzjoni

I.2.2.1. Ir-rekwiżiti ġenerali

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-WSD jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward ta' dik il-marda elenkata meta l-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikunu ġew soġġetti minn tal-inqas għall-programm ta' eradikazzjoni li ġej:

(a) il-miżuri ta' kontroll minimu stipulati fit-Taqsima 4 tal-Kapitolu V tad-Direttiva 2006/88/KE jkunu ġew applikati b'mod effettiv, u tkun ġiet stabbilita żona ta' konteniment kif imsemmi fl-Artikolu 32(b) ta' dik id-Direttiva, li tkun magħmula minn żona ta' protezzjoni u minn żona ta' sorveljanza, qrib il-farm(s) li jkun(u) uffiċjalment iddikjarat(i) li huwa/huma infettat(i) bil-WSD.

Iż-żona ta' konteniment trid tkun ġiet definita abbażi ta' każ b'każ fejn jitqiesu l-fatturi li jinfluwenzaw ir-riskji li l-WSD tinxtered għall-krustaċji mrobbija u li jgħixu fis-selvaġġ, fosthom: in-numru, ir-rata u d-distribuzzjoni tal-mortalità tal-krustaċji fil-farm li jkun infettat bil-WSD; id-distanza u d-densità tal-farms tal-madwar; il-farms ta' kuntatt; l-ispeċijiet preżenti fil-farms; il-prattiki tat-trobbija applikati fil-farms affettwati u f'dawk tal-madwar; il-kundizzjonijiet idrodinamiċi u fatturi identifikati oħra ta' sinifikat epidemjoloġiku.

Sabiex jiġu stabbiliti ż-żoni ta' protezzjoni u ta' sorveljanza, għandhom japplikaw ir-rekwiżiti minimi li ġejjin:

(i) żona ta' protezzjoni għandha tiġi stabbilita fil-qrib immedjat ta' farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-WSD u għandha tikkorrispondi għal:

(1) f'żoni ta' sistemi tal-baħar u tal-estwarji: iż-żona inkluża f'ċirku b'raġġ ta' mill-inqas eskursjoni waħda tal-marea jew mill-inqas ħames kilometri, skont liema minnhom tkun l-ikbar, iċċentrata fuq il-farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-WSD, jew żona ekwivalenti li tkun stabbilita skont dejta epidemjoloġika jew idrodinamika xierqa; jew inkella

(2) f'żoni tal-ilma ħelu: iż-żona kollha tal-magħqad tal-ilma tal-farm li jkun uffiċjalment iddikjarat li huwa infettat bil-WSD; l-awtorità kompetenti tista' tillimita l-estensjoni taż-żona ta' protezzjoni għall-partijiet miż-żona tal-magħqad tal-ilma, diment li ma tiġix kompromessal-prevenzjoni tat-tixrid tal-WSD;

(ii) żona ta' sorveljanza għandha tiġi stabbilita 'l barra miż-żona ta' protezzjoni u għandha tikkorrispondi għal:

(1) f'żoni tas-sistemi tal-baħar: żona, madwar iż-żona ta' protezzjoni, ta' żoni ta' eskursjoni tal-marea li jikkoinċidu; jew żona, madwar iż-żona ta' protezzjoni, u inkluża f'ċirku b'raġġ ta' għaxar kilometri miċ-ċentru taż-żona ta' protezzjoni; jew żona ekwivalenti li tkun stabbilita skont dejta epidemjoloġika jew idrodinamika xierqa; jew

(2) f'żoni tal-ilma ħelu: bħala żona estiża 'l barra miż-żona stabbilita ta' protezzjoni;

(b) il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan iż-żona ta' protezzjoni, li ma jkunux uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-WSD għandhom ikunu soġġetti għal investigazzjoni uffiċjali li tkun tinkludi minn tal-inqas l-elementi li ġejjin:

(i) il-ġbir ta' kampjuni għall-ittestjar ta' 10 krustaċji, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew sinjali post-mortem li jkunu konsistenti ma' infezzjoni bil-WSD, jew 150 krustaċju, meta ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew sinjali post-mortem; kif ukoll

(ii) spezzjoni waħda tas-saħħa; f'dawk il-farms li fihom it-testijiet imsemmija f'(i) ikunu pproduċew riżultati negattivi, l-ispezzjonijiet tas-saħħa għandhom ikomplu darba fix-xahar matul l-istaġun meta t-temperatura tal-ilma x'aktarx tilħaq l-ogħla temperatura annwali, sakemm iż-żona ta' protezzjoni tiġi rtirata f'konformità mal-punt I.2.2.1(c).

(c) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-WSD għandhom jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jkun ta' mill-inqas sitt ġimgħat. Meta jitbattlu l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati, għandu jkun hemm perjodu ta' mistrieħ sinkronizzat ta' mill-inqas tliet ġimgħat. Dan il-paragrafu għandu japplika wkoll għall-farms ġodda li jkunu uffiċjalment iddikjarati li ġew infettati matul l-implimentazzjoni tal-programm ta' eradikazzjoni.

Meta l-farms li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati jiġu soġġetti għal perjodu ta' mistrieħ, iż-żoni ta' protezzjoni għandhom jiġu kkonvertiti f'żoni ta' sorveljanza.

L-awtorità kompetenti tista' tiddeċiedi li titlob li jitbattlu, jitnaddfu, jiġu diżinfettati u jiġu mserrħin farms oħra fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza. It-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ għandu jiġi stabbilit mill-awtorità kompetenti wara evalwazzjoni tar-riskji każ b'każ.

(d) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati u l-farms kollha l-oħra li ġew imserrħin fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza għandhom jiġu ripopolati:

(i) bi krustaċji miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-WSD; jew

(ii) għal perjodu tranżizzjonali sal-31 ta' Diċembru 2020, bi krustaċji miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi programm approvat ta' sorveljanza għall-WSD.

Ir-ripopolazzjoni għandha sseħħ biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-WSD ikunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin f'konformità mal-punt I.2.2.1(c).

(e) il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment koperti mill-programm ta' eradikazzjoni u, meta tkun meħtieġa s-sorveljanza fil-popolazzjonijiet selvaġġi, il-punti tat-teħid tal-kampjuni magħżula skont it-tieni paragrafu tal-punt 2 tal-Parti I tal-Anness V ta' dik id-Direttiva, iridu sussegwentement ikunu soġġetti minn tal-inqas għall-programm stipulat fil-punt I.2.1.

I.2.2.2. Ir-rekwiżiti sabiex jerġa' jinkiseb mill-ġdid l-istatus ta' mingħajr mard fir-rigward tal-WSD għal kompartimenti kontinentali li jkunu magħmula minn farm wieħed li kien iddikjarat preċedentement li huwa ħieles mill-WSD

Kompartiment kontinentali li huwa magħmul minn farm wieħed li għandu status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-WSD, li l-istatus tiegħu tas-saħħa fir-rigward ta' dik il-marda elenkata ma jiddependix mill-ilmijiet naturali tal-madwar skont il-punt 3 tal-Parti II tal-Anness V tad-Direttiva 2006/88/KE, u li l-istatus tiegħu tal-Kategorija I kien ġie rtirat skont l-Artikolu 53(3) ta' dik id-Direttiva, jista' jerġa' jikseb l-istatus tas-saħħa tal-Kategorija I immedjatament wara li l-awtorità kompetenti tkun ikkonfermat li ġew irrispettati l-kundizzjonijiet li ġejjin:

(a) il-farm li jkun infettat bil-WSD ikun tbattal, tnaddaf, ġie diżinfettat u ġie mserraħ; it-tul ta' żmien tal-perjodu ta' mistrieħ irid ikun ta' mill-inqas sitt ġimgħat;

(b) il-farm infettat bil-WSD ikun ġie ripopolat bi krustaċji miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I fir-rigward tal-WSD.

I.3. Ir-rekwiżiti speċifiċi għaż-żamma tal-istatus tas-saħħa ta' mingħajr mard (il-Kategorija I) fir-rigward tal-WSD

Meta tkun meħtieġa sorveljanza mmirata sabiex jinżamm status tas-saħħa tal-Kategorija I, kif stipulat fl-Artikolu 52 tad-Direttiva 2006/88/KE, il-farms kollha fejn jinżammu speċijiet suxxettibbli mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV ta' dik id-Direttiva fi ħdan l-Istat Membru, iż-żona jew il-kompartiment ikkonċernati, għandhom ikunu soġġetti għal spezzjoni tas-saħħa u għat-teħid ta' kampjuni f'konformità mat-Tabella 6.B stipulata fit-Taqsima II, fejn jitqies il-livell ta' riskju li l-farm jiġi infettat bil-WSD.

Fl-Istati Membri, fiż-żoni jew fil-kompartimenti, li fihom in-numru ta' farms huwa limitat u li fihom is-sorveljanza mmirata fuq dawk il-farms ma tipprovdix biżżejjed dejta epidemjoloġika, il-programmi ta' sorveljanza għaż-żamma tal-istatus ta' mingħajr mard għandhom jinkludu l-punti tat-teħid ta' kampjuni li jkunu magħżula f'konformità mar-rekwiżiti stipulati fil-punt I.1.

Dawk il-punti tat-teħid ta' kampjuni għandhom jiġu spezzjonati u jkunu soġġetti għat-teħid ta' kampjuni b'rotazzjoni ta' 50 % kull sena. It-teħid ta' kampjuni għandu jitwettaq f'konformità mat-Tabella 6.B. stipulata fit-Taqsima II. Il-kampjuni għandhom jintgħażlu, jitħejjew u jiġu eżaminati f'konformità mal-metodi dijanjostiċi u tat-teħid ta' kampjuni stipulati fit-Taqsima II u l-eżaminazzjonijiet fil-laboratorju jridu jkunu pproduċew riżultati negattivi fir-rigward tal-aġent tal-WSD.

L-istatus ta' mingħajr mard għandu jinżamm biss sakemm il-kampjuni kollha li ġew ittestjati bil-metodi dijanjostiċi u tat-teħid ta' kampjuni stipulati fil-punt II.2. jipproduċu riżultati negattivi għall-WSD, kif ukoll diment li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett ta' WSD f'konformità mal-investigazzjoni uffiċjali u mal-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3.

I.4. Ir-rekwiżiti għat-tneħħija tal-miżuri ta' kontenIment previsti fl-Artikolu 39 tad-Direttiva 2006/88/KE (il-bidla minn status tas-saħħa tal-Kategorija V għal dak tal-Kategorija III) fir-rigward tal-WSD

Stat Membru, żona jew kompartiment li għandhom status tas-saħħa tal-Kategorija V fir-rigward tal-WSD jistgħu jiksbu status tas-saħħa tal-Kategorija III fir-rigward ta' dik il-marda elenkata, diment li:

(a) jkunu ġew issodisfati r-rekwiżiti stipulati fil-punti I.2.2.1(a), (b) u (c). F'każ li l-mistrieħ ma jkunx teknikament possibbli, il-farms ikkonċernati għandhom ikunu soġġetti għal miżura alternattiva li tipprovdi garanzija kważi simili għall-isterminazzjoni tal-WSSV mill-ambjent tal-farm;

(b) il-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-WSD u l-farms kollha l-oħra li ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a) fi ħdan iż-żoni stabbiliti ta' protezzjoni u ta' sorveljanza kienu ġew ripopolati bi krustaċji miġjuba minn Stati Membri, minn żoni jew minn kompartimenti bi status tas-saħħa tal-Kategorija I, II jew III fir-rigward tal-WSD.

(c) ir-ripopolazzjoni għandha sseħħ biss meta l-farms kollha li jkunu uffiċjalment iddikjarati li huma infettati bil-WSD ikunu tbattlu, tnaddfu, ġew diżinfettati u ġew imserrħin/kienu soġġetti għal miżuri alternattivi f'konformità ma' (a);

(d) ma kien hemm l-ebda sejba tal-WSD matul il-perjodu ta' sentejn wara l-ikkompletar tal-miżuri stipulati fil-paragrafi (a) u (b), kif ukoll wara li jkun ġie eskluż kwalunkwe suspett matul dan il-perjodu f'konformità mal-proċeduri stipulati fil-punt II.3.

II. **Il-metodi dijanjostiċi u tat-teħid ta' kampjuni**

II.1. Il-kampjuni

Qabel it-tħejjija ta' kampjuni għal PCR b'żewġ passi, kampjuni ta' epidermis tegumentali, dissezzjonati jew inkella li jkunu jinsabu fir-riġlejn, fil-pleopodi, fil-partijiet tal-ħalq jew fil-garġi tal-annimal tal-laboratorju, għandhom jiġu mwaħħla f'95 % etanol.

Jistgħu jinġabru kampjuni oħrajn, imwaħħla għall-istoloġija u għall-mikroskopija tat-trażmissjoni tal-elettroni, sabiex jappoġġaw id-dejta dijanjostika li tirriżulta mill-PCR.

II.2. Il-metodi dijanjostiċi sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard fir-rigward tal-WSD

Il-metodu dijanjostiku li jrid jintuża sabiex jinkiseb jew jinżamm status ta' mingħajr mard fir-rigward tal-WSD wara t-twettiq tal-metodi u tal-proċeduri ddettaljati stipulati fil-Parti 6 tal-Anness II, għandu jkun PCR b'żewġ passi.

Fil-każ ta' riżultat pożittiv tal-PCR b'żewġ passi, ir-riżultat għandu jiġi kkorroborat permezz tas-sekwenzar tal-amplikon qabel ma jiġu implimentati l-miżuri ta' kontroll inizjali previsti fl-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE, u jekk dan ikun possibbli f'kundizzjonijiet prattiċi, permezz tat-turija ta' sinjali patonjomoniċi tal-WSD f'dawk l-ispeċijiet ospitanti suxxettibbli li jkunu magħżula permezz tal-istoloġija u tal-mikroskopija tat-trażmissjoni tal-elettroni.

II.3. L-investigazzjoni uffiċjali u l-metodi dijanjostiċi sabiex jiġi eskluż is-suspett jew tiġi kkonfermata l-preżenza ta' infezzjoni bil-WSD

Meta jkun meħtieġ li tiġi kkonfermata l-preżenza jew li jiġi eskluż is-suspett ta' infezzjoni bil-WSD f'konformità mal-Artikolu 28 tad-Direttiva 2006/88/KE, għandha tiġi rrispettata l-proċedura ta' spezzjoni, tat-teħid ta' kampjuni u ta' ttestjar li ġejja:

(a) l-investigazzjoni uffiċjali għandha tinkludi minn tal-inqas spezzjoni waħda tas-saħħa u teħid wieħed ta' kampjuni ta' għaxar krustaċji, meta jiġu osservati sinjali kliniċi jew post-mortem li jkunu konsistenti ma' infezzjoni bil-WSD, jew ta' 150 krustaċju meta ma jiġux osservati sinjali kliniċi jew post-mortem. Il-kampjuni għandhom jiġu ttestjati bil-metodu dijanjostiku stipulat fil-punt II.2. (PCR b'żewġ passi);

(b) il-preżenza tal-WSD għandha titqies li hija kkonfermata meta l-PCR b'żewġ passi segwit minn sekwenzar, skont il-metodi u l-proċeduri ddettaljati stipulati f'din il-Parti 6 tal-Anness II, ikun pożittiv għall-WSSV, u meta fl-ispeċijiet ospitanti li jkunu magħżula jkun hemm il-preżenza ta' sinjali patonjomoniċi tal-WSD.

Is-suspett ta' WSD jista' jiġi eskluż jekk dawk it-testijiet ma jiżvelaw l-ebda evidenza ulterjuri tal-preżenza tal-WSD.

It-Tabella 6.A

L-iskema ta' sorveljanza għall-Istati Membri, għaż-żoni u għall-kompartimenti għall-perjodu ta' kontroll ta' sentejn ta' qabel ma jinkiseb l-istatus ta' mingħajr mard għall-WSD kif imsemmi fil-punt I.2.1

	In-numru ta' spezzjonijiet kliniċi kull sena	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju kull sena	In-numru ta' krustaċji fil-kampjun
Il-farms/is-siti tat-teħid ta' kampjuni	1	1	150

It-Tabella 6.B

L-Iskemi ta' sorveljanza għall-Istati Membri, għaż-żoni u għall-kompartimenti sabiex jinżamm l-istatus ta' mingħajr mard fir-rigward tal-WSD, kif imsemmi fil-punt I.3

Il-livell ta' riskju	In-numru ta' spezzjonijiet tas-saħħa	In-numru ta' eżaminazzjonijiet fil-laboratorju	In-numru ta' krustaċji fil-kampjun
Għoli	1 kull sena	1 kull sentejn	150
Medju	1 kull sentejn	1 kull sentejn	150
Baxx	1 kull sentejn	1 kull 4 snin	150

ANNESS II

IL-METODI U L-PROĊEDURI DIJANJOSTIĊI DDETTALJATI

I. **Introduzzjoni**

Dan l-Anness jistabbilixxi l-proċeduri ddettaljati għall-metodi dijanjostiċi li jridu jintużaw għall-eżaminazzjoni fil-laboratorju fil-programmi ta' eradikazzjoni u ta' sorveljanza stipulati fl-Anness I ta' din id-Deċiżjoni, u sabiex tiġi kkonfermata jew tiġi eskluża l-preżenza suspettata tal-mardiet mhux eżotiċi li ġejjin li huma mniżżla fil-Parti II tal-Anness IV tad-Direttiva 2006/88/KE ("il-mardiet elenkati") f'konformità mal-Artikolu 57(b) ta' dik id-Direttiva:

1.	Is-settiċemija emorraġika virali (VHS)	Parti 1
2.	In-nekrożi ematopojetika infettiva (IHN)	Parti 1
3.	Il-marda tal-vajrus tal-erpete tal-koi (KHV)	Parti 2
4.	L-anemija infettiva tas-salamun (ISA)	Parti 3
5.	L-infezzjoni bil-*Marteilia refringens*	Parti 4
6.	L-infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*	Parti 5
7.	Il-marda tal-ponot bojod (WSD)	Parti 6

II. **Id-definizzjonijiet**

Għall-fini ta' dan l-Anness, "medium ta' trasport" tfisser medium għall-koltura taċ-ċelloli b'10 % serum tal-għoġġiela u b'200 iu peniċillina, 200 µg streptomiċina u 200 µg kanamiċina għal kull millilitru jew b'antibijotiċi oħra ta' effikaċja bil-provi.

PARTI 1

IL-METODI U L-PROĊEDURI DIJANJOSTIĊI DDETTALJATI GĦAS-SORVELJANZA U GĦALL-KONFERMA TAL-IHN U TAL-VHS

I. **Il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi għas-sorveljanza tal-VHS u tal-IHN**

Meta jitwettaq it-teħid ta' kampjuni u meta titwettaq l-eżaminazzjoni fil-laboratorju għall-fini li jinkiseb jew jinżamm status tas-saħħa ta' mingħajr mard fir-rigward tal-IHN jew tal-VHS kif stipulat fit-Taqsima I tal-Parti 1 tal-Anness I, bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punti II.1 u II.2 tal-Parti 1 ta' dak l-Anness, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-punti minn I.1 sa I.6.

I.1. It-tħejjija u l-vjeġġ ta' kampjuni mill-ħut

I.1.1. It-tessuti għal eżaminazzjoni viroloġika fuq koltura taċ-ċelloli

Qabel il-vjeġġ jew it-trasferiment lejn il-laboratorju, il-biċċiet tal-organi li jrid jiġu eżaminati għandhom jitneħħew mill-ħut b'għodod sterili tad-dissezzjoni u għandhom jiġu ttrasferiti f'tubi sterili tal-plastik li jkun fihom medium ta' trasport.

Il-kwantità ta' materjal tal-ħut adattat għal eżaminazzjoni viroloġika fuq koltura taċ-ċelloli u permezz tar-RT-qPCR jiddependi fuq id-daqs tal-ħut. B'hekk, it-tessuti li għandhom jittieħdu kampjuni minnhom huma: minn alevin sħaħ (b'tul tal-ġisem ta' < 4 ċm), mill-vixxri inkluż il-kilwa (b'tul tal-ġisem ta' bejn < 4 ċm u < 6 ċm) jew, mill-ħut ta' daqs ikbar, mill-kilwa, mill-milsa, mill-qalb u/jew mill-enċefalu, kif ukoll mill-fluwidu ovariku tal-ħut riproduttur fil-waqt tar-riproduzzjoni.

Il-fluwidu ovariku jew seminali, jew il-biċċiet ta' organi minn massimu ta' għaxar ħutiet, jistgħu jingħabru f'tubu sterili wieħed li jkun fih minn tal-inqas 4 ml ta' medium ta' trasport u li jkun jirrappreżenta kampjun raggruppat wieħed. It-tessut f'kull kampjun għandu jiżen minimu ta' 0,5 grammi (g).

L-eżaminazzjoni viroloġika fuq il-koltura taċ-ċelloli għandha tinbeda mill-iktar fis possibbli u mhux iktar tard minn 48 siegħa wara l-ġbir tal-kampjuni. F'każijiet eċċezzjonali, l-eżaminazzjoni viroloġika tista' tinbeda sa mhux iktar tard minn 72 siegħa wara l-ġbir tal-materjal, diment li l-materjal li jrid jiġi eżaminat ikun protett minn medium ta' trasport u li r-rekwiżiti tat-temperatura matul it-trasport ikunu jistgħu jiġu ssodisfati.

I.1.2. Il-kampjuni għall-analiżi tat-traskriptaži inversa u reazzjoni katina bil-polimeraži (RT-PCR jew RT-qPCR)

Il-kampjuni għandhom jittieħdu mill-ħut f'konformità mal-proċedura deskritta fil-punt I.1.1 billi jintuża strument sterili u billi jiġu ttrasferiti f'tubu sterili tal-plastik li jkun fih medium ta' trasport. It-tessut minn għaxar ħutiet jista' jinġabar f'tubu wieħed u għandu jirrappreżenta kampjun raggruppat wieħed. Madankollu, f'każ li l-ammont ta' inokulu ikun żgħir, jista' jintuża tessut minn mhux iktar minn ħames ħutiet. B'mod alternattiv, il-kampjuni jistgħu jiġu raggruppati f'reaġenti ta' stabbilizzazzjoni tal-RNA, bħal reaġent ta' 0,2 g ta' tessut/ml skont ir-rakkomandazzjoni mill-manifatturi, għalkemm kull ħuta għandha tiġi pproċessata individwalment u ma għandhiex tiġi raggruppata fil-kampjuni minħabba l-ammont żgħir ta' materjal li jrid jintuża għall-estrazzjoni.

Jista' jintbagħat ukoll ħut sħiħ lejn il-laboratorju.

I.2. Il-vjeġġ ta' kampjuni għall-ħut

It-tubi li jkun fihom tessuti tal-ħut f'medium ta' trasport għall-koltivazzjoni taċ-ċelloli jew għall-analiżi tar-RT-PCR/tar-RT-qPCR għandhom jitpoġġew f'kontenituri insulati, bħal kaxxi tal-polistiren bil-ġnub ħoxnin, flimkien ma' biżżejjed silġ jew medium alternattiv ta' tkessiħ b'effett simili ta' tkessiħ sabiex ikun żgurat li l-kampjuni jinżammu refriġerati matul it-trasport lejn il-laboratorju. Madankollu, għandu jiġi evitat li l-kampjuni jiffriżaw. It-temperatura ta' kampjun matul it-tranżitu qatt ma għandha taqbeż l-10 °C u s-silġ irid ikun għadu preżenti fil-kaxxa tat-trasport mal-wasla jew inkella blokka waħda jew iktar tal-iffriżar iridu jkunu għadhom iffriżati parzjalment jew kompletament.

Jista' jintbagħat ħut sħiħ lejn il-laboratorju jekk ir-rekwiżiti tat-temperatura msemmija fl-ewwel paragrafu jkunu jistgħu jiġu ssodisfati matul it-trasport. Il-ħut sħiħ għandu jiġi mqartas fil-karti li jkollhom kapaċità ta' assorbiment u fl-aħħar għandu jiġi ttrasportat f'basket tal-plastik. Jista' jiġi ttrasportat ukoll ħut ħaj.

I.3. Il-ġbir ta' materjal dijanjostiku supplimentari

Meta jkun approvat mil-laboratorju dijanjostiku, jistgħu jinġabru wkoll tessuti oħra tal-ħut u jitħejjew għal eżaminazzjonijiet supplimentari.

I.4. It-tħejjija ta' kampjuni għall-eżaminazzjoni ta' koltura taċ-ċelloli u għar-RT-qPCR

I.4.1. L-iffriżar f'każijiet eċċezzjonali

Meta jinqalgħu diffikultajiet prattiċi, li jagħmluha impossibbli li l-kampjuni jiġu pproċessati fi żmien 48 siegħa wara l-ġbir tat-tessuti tal-ħut, jista' jkun aċċettabbli li l-kampjuni tat-tessuti jiġu ffriżati f'medium ta' trasport f'temperatura ta' – 20 °C jew inqas u li titwettaq eżaminazzjoni viroloġika fi żmien 14-il jum. Madankollu, it-tessut tal-ħut għandu jiġi ffriżat u jitħalla jinħall darba biss qabel l-eżaminazzjoni. Għandhom jinżammu reġistri bid-dettalji dwar ir-raġuni għal kull iffriżar ta' kampjuni tat-tessuti tal-ħut.

I.4.2. L-omoġenizzazzjoni tal-organi

Fil-laboratorju, it-tessut tal-ħut fit-tubi għandu jkun kompletament omoġenizzat, bi stomacher, bi blender jew b'mehrież u bil-lida flimkien ma' ramel sterili, u sussegwentement jitħallew fil-medium oriġinali ta' trasport.

Jekk kampjun ikun jikkonsisti minn ħuta sħiħa b'tul ta' inqas minn 4 ċm, din għandha tiġi kkapuljata b'imqass jew bi skalpell sterili wara li jitneħħa l-ġewwieni ta' wara l-feħa fl-imsaren. Jekk kampjun ikun jikkonsisti minn ħuta sħiħa b'tul tal-ġisem ta' bejn 4 ċm u 6 ċm, għandhom jinġabru l-vixxri, inklużi l-kliewi. Jekk kampjun ikun jikkonsisti minn ħuta sħiħa b'tul ta' iktar minn 6 ċm, il-kampjuni tat-tessuti għandhom jinġabru kif deskritt fil-punt I.1. Il-kampjuni tat-tessuti għandhom jiġu kkapuljati b'imqass jew bi skalpell sterili u għandhom jiġu omoġenizzati kif deskritt fl-ewwel paragrafu ta' dan il-punt u għandhom jitħallew fil-medium ta' trasport.

Il-proporzjon finali bejn il-materjal tat-tessut u l-medium ta' trasport għandu jiġi aġġustat fil-laboratorju għal 1:10.

I.4.3. Iċ-ċentrifugazzjoni tal-omoġenat

L-omoġenat għandu jiġi ċċentrifugat f'ċentrifuga refriġerata f'temperatura ta' bejn 2 °C u 5 °C f'2 000 sa 4 000 × *g* għal 15-il minuta u s-supernatant li jinġabar jista' jiġi ttrattat bl-antibijotiċi għal erba' sigħat f'temperatura ta' 15-il°C jew inkella għal lejla f'temperatura ta' bejn 4 °C u 8 °C. Jekk il-kampjun ikun ġie ttrasportat f'medium ta' trasport, it-trattament tas-supernatant bl-antibijotiċi jista' ma jsirx.

Meta jinqalgħu diffikultajiet prattiċi, bħal ħsara fl-inkubatur jew problemi bil-kolturi taċ-ċelloli, li jagħmluha impossibbli li ssir l-inokulazzjoni taċ-ċelloli fi żmien 48 siegħa wara l-ġbir tal-kampjuni tat-tessuti tal-ħut, is-supernatant jista' jiġi ffriżat f'temperatura ta' – 80 °C u tkun tista' titwettaq eżaminazzjoni viroloġika fi żmien 14-il jum.

Jekk is-supernatant li jingabar jinħażen f'temperatura ta' – 80 °C fi żmien 48 siegħa wara t-teħid ta' kampjuni, dan jista' jerġa' jintuża darba biss għal eżaminazzjoni viroloġika.

Qabel l-inokulazzjoni taċ-ċelloli, is-supernatant għandu jiġi mħallat ma' partijiet ugwali ta' għadd dilwit b'mod adegwat ta' antisera mas-serotipi indiġeni tal-vajrus tan-nekrożi pankreatika infettiva (IPN) u għandu jiġi inkubat flimkien ma' din it-taħlita għal minimu ta' siegħa f'temperatura ta' 15-il°C jew għal massimu ta' 18-il siegħa f'temperatura ta' 4 °C. It-titru tal-antiserum għandu jkun ta' proporzjon ta' minn tal-inqas 1:2 000 f'test ta' newtralizzazzjoni tal-plakka ta' 50 %.

It-trattament tal-inokuli kollha b'antiserum għall-vajrus tal-IPN jimmira li ma jippermettix li l-effett ċitopatiku (CPE) ikkawżat mill-vajrus tal-IPN jiżviluppa fil-kolturi inokulati taċ-ċelloli. Dan inaqqas it-tul ta' żmien tal-eżaminazzjonijiet viroloġiċi kif ukoll in-numru ta' każijiet li fihom l-okkorrenza ta' CPE ikollha titqies li hija potenzjalment indikattiva għall-VHSV jew għall-IHNV.

Meta l-kampjuni jiġu minn unitajiet tal-produzzjoni, li jitqiesu li huma ħielsa mill-IPN, it-trattament tal-inokuli b'antiserum għall-vajrus tal-IPN jista' ma jsirx.

I.4.4. It-tħejjija tal-kampjuni għall-programmi ta' sorveljanza bbażati fuq ir-RT-PCR u r-RT-qPCR

Jekk il-kampjuni jkunu nġabru f'medium ta' trasport, għandha titwettaq il-proċedura stipulata fil-punti I.4.2 u I.4.3. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, is-supernatant għandu jingħabar u l-RNA għandu jiġi estratt. Jekk ma tkunx trid titwettaq eżaminazzjoni ulterjuri direttament wara ċ-ċentrifugazzjoni, il-kampjuni għandhom jiġu ffriżati immedjatament f'temperatura ta' – 20 °C jew inqas.

Għall-analiżi tat-tessuti tal-ħut li jkunu kkonservati f'reaġent ta' stabbilizzazzjoni tal-RNA, għandha titwettaq ħidma sussegwenti għall-kampjuni maħżuna f'temperaturi differenti skont it-termini ta' żmien li ġejjin:

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' 37 °C: jum;

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' 25 °C: ġimgħa;

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' 4 °C: xahar;

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' – 20 °C: b'mod indefinit

Il-kampjuni raggruppati f'reaġent ta' stabbilizzazzjoni tal-RNA għandhom jiġu ttrattati bħala kampjuni individwali f'reaġent ta' stabbilizzazzjoni tal-RNA. Għall-kampjuni raggruppati f'reaġent ta' stabbilizzazzjoni tal-RNA, l-ammont tal-kampjun ma għandux jaqbeż dak irrakkomandat mill-manifattur għall-estrazzjoni b'kits tal-RNA, bħal RNeasy Mini kits (Qiagen) jew simili. Jekk ikun hemm l-għadd ta' kampjuni ikbar, il-kits jew il-metodi tal-estrazzjoni jridu jirriflettu dan l-għadd.

Il-kampjuni miġbura fir-reaġenti ta' stabbilizzazzjoni tal-RNA ma għandhomx jintużaw għall-koltivazzjoni taċ-ċelloli.

I.4.5. L-għadd ta' kampjuni għar-RT-qPCR

Billi l-protokolli mogħtija tar-RT-qPCR huma ta' sensittività simili jew ogħla mill-metodi ta' koltivazzjoni taċ-ċelloli, jista' jkun aċċettabbli li jintuża supernatant minn materjal omoġenizzat tat-tessut tal-ħut ta' għadd ta' organi minn massimu ta' għaxar ħutiet f'medium għall-koltura taċ-ċelloli għall-PCR. Madankollu, minħabba l-inokulu ferm iżgħar li jintuża għall-PCR meta mqabbel mal-koltivazzjoni taċ-ċelloli, it-tessuti kollha tal-ħut għandhom jiġu omoġenizzati bir-reqqa qabel l-iggruppar tal-materjal għall-estrazzjoni.

L-istess prinċipju għandu jiġi applikat ukoll jekk il-kampjuni jingħabru f'reaġenti ta' stabbilizzazzjoni tal-RNA. Madankollu, f'dak il-każ, spiss ikun diffiċli li jingħabar materjal rappreżentattiv minn massimu ta' għaxar ħutiet f'tubu wieħed, u għalhekk in-numru ta' ħut f'kull għadd għandu jitnaqqas għal massimu ta' 2 sa 5.

I.5. L-eżaminazzjoni viroloġika fuq il-koltura taċ-ċelloli

I.5.1. Il-kolturi u l-media taċ-ċelloli

Il-linja ta' ċelloli –2 tal-qixx tad-dott tal-misluta blu (BF–2) jew il-linja ta' ċelloli –2 tal-gonad tat-trota qawsalla (RTG–2) u ċ-ċelloli tal-*Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) jew tal-karpjun buras (FHM) għandhom jitkabbru f'temperatura ta' 20 °C sa 30 °C f'medium adattat, jiġifieri medium essenzjali minimu (MEM) ta' Eagle jew modifiki tiegħu, b'suppliment ta' 10 % ta' serum tal-fetu tal-bovini u ta' antibijotiċi f'konċentrazzjonijiet standard.

Meta ċ-ċelloli jiġu kkoltivati f'kunjetti magħluqin, il-medium għandu jiġi newtralizzat bil-bikarbonat. Il-medium li jintuża għall-koltivazzjoni taċ-ċelloli f'unitajiet miftuħin jista' jiġi newtralizzat bit-tris(idrossimetil) aminometan–HCl (Tris–HCl) (23 mM) u bil-bikarbonat tas-sodju (6 mM). Il-pH irid ikun 7,6 ± 0,2.

Il-kolturi taċ-ċelloli li jridu jintużaw għall-inokulazzjoni bil-materjal tat-tessut tal-ħut għandhom ikunu żgħar fl-età, normalment ikunu monosaffi ta' koltura taċ-ċelloli ta' jum, meta dan ikun possibbli; madankollu, tista' tiġi aċċettata koltura ta' firxa ta' età bejn 4 sigħat u 48 siegħa. Fl-inokulazzjoni, iċ-ċelloli jridu jkunu qegħdin jikbru b'mod attiv.

I.5.2. L-inokulazzjoni tal-kolturi taċ-ċelloli

Is-sospensjoni tal-organi ttrattati bl-antibijotiċi għandha tiġi inokulata f'kolturi taċ-ċelloli f'żewġ dilwizzjonijiet, jiġifieri d-dilwizzjoni primarja u, barra minn hekk, dilwizzjoni tagħha ta' 1:10, li tirriżulta f'proporzjon ta' dilwizzjonijiet finali ta' materjal tat-tessut u medium għall-koltura taċ-ċelloli ta' 1:100 u ta' 1:1 000 rispettivament, sabiex tiġi evitata l-interferenza omologa. Għandhom jiġu inokulati minn tal-inqas żewġ linji ta' ċelloli kif imsemmi fil-punt I.5.1. Il-proporzjon bejn id-daqs tal-inokulu u l-volum tal-medium għall-koltura taċ-ċelloli għandu jkun ta' madwar 1:10.

Għal kull dilwizzjoni u għal kull linja ta' ċelloli, għandha tintuża erja minima ta' 2 ċm^2 ta' ċelloli, li tikkorrispondi għal bwejra waħda fi pjastra tal-koltura taċ-ċelloli ta' 24 bwejra. Il-pjastri tal-kolturi taċ-ċelloli għandhom jintużaw kull meta dan ikun possibbli.

I.5.3. L-inkubazzjoni tal-kolturi taċ-ċelloli

Il-kolturi inokulati taċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati f'temperatura ta' 15-il°C għal bejn seba' u għaxart ijiem. Jekk il-kulur tal-medium għall-koltura taċ-ċelloli jinbidel minn aħmar għal isfar, bidla li tindika l-aċidifikazzjoni tal-medium, għandu jitwettaq aġġustament tal-pH b'soluzzjoni tal-bikarbonat sterili jew ta' sustanzi ekwivalenti sabiex tiġi żgurata s-suxxettibbiltà taċ-ċelloli għal infezzjoni b'vajrus.

Minn tal-inqas kull sitt xhur jew jekk ikun hemm suspett ta' tnaqqis fis-suxxettibbiltà taċ-ċelloli, għandha titwettaq titrazzjoni tal-istokkijiet iffriżati tal-VHSV u tal-IHNV sabiex tiġi vverifikata s-suxxettibbiltà tal-kolturi taċ-ċelloli għal infezzjoni. Jekk ikun possibbli, għandha tintuża l-proċedura stipulata fit-Taqsima III.

I.5.4. Il-mikroskopija

Il-kolturi inokulati taċ-ċelloli għandhom jiġu spezzjonati regolarment, minn tal-inqas tliet darbiet fil-ġimgħa, għall-okkorrenza ta' CPE bi tkabbir ta' 40 sa 150 ×. Jekk jiġi osservat CPE ovvju, il-proċeduri tal-identifikazzjoni tal-vajrus għandhom jinbdew minnufih f'konformità mal-punt I.6.

I.5.5. Is-sottokoltivazzjoni

Jekk ma jkun żviluppa l-ebda CPE wara l-inkubazzjoni primarja għal bejn seba' u għaxart ijiem, għandha titwettaq sottokoltivazzjoni għall-kolturi friski taċ-ċelloli billi tintuża erja ta' ċelloli simili għal dik tal-koltura primarja.

L-alikwoti ta' medium (supernatant) mill-kolturi jew mill-bwejriet kollha li jikkostitwixxu l-koltura primarja għandhom jiġu raggruppati skont il-linja ta' ċelloli bejn seba' u għaxart ijiem wara l-inokulazzjoni. Imbagħad, l-għadd għandu jiġi inokulat f'kolturi ta' ċelloli omologi mhux dilwiti u dawk dilwiti fi proporzjon ta' 1:10 (li jirriżultaw f'dilwizzjonijiet finali ta' 1:10 u ta' 1:100, rispettivament, tas-supernatant) kif deskritt fil-punt I.5.2. B'mod alternattiv, l-alikwoti ta' 10 % tal-medium li jikkostitwixxu l-koltura primarja, għandhom jiġu inokulati direttament f'bwejra b'koltura friska ta' ċelloli (jiġifieri, sottokoltivazzjoni minn bwejra għal bwejra). L-inokulazzjoni tista' tiġi ppreċeduta minn preinkubazzjoni tad-dilwizzjonijiet bl-antiserum għall-vajrus tal-IPN f'dilwizzjoni xierqa kif deskritt fil-punt I.4.3.

Imbagħad, il-kolturi inokulati għandhom jiġu inkubati għal bejn seba' u għaxart ijiem f'temperatura ta' 15-il°C u għandhom jiġu spezzjonati f'konformità mal-punt I.5.4.

Jekk ifeġġ CPE tossiku fl-ewwel tlett ijiem tal-inkubazzjoni, is-sottokoltivazzjoni għandha titwettaq f'dak l-istadju, iżda mbagħad iċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati għal sebat ijiem u għandhom jerġgħu jiġu sottokoltivati mill-ġdid b'inkubazzjoni ulterjuri ta' sebat ijiem. Meta jiżviluppa CPE tossiku wara tlett ijiem, iċ-ċelloli għandhom jiġu mgħoddija darba u għandhom jiġu inkubati sabiex jinkiseb it-total ta' 14-il jum mill-inokulazzjoni primarja. Ma jrid ikun hemm l-ebda evidenza ta' tossiċità fl-aħħar sebat ijiem tal-inkubazzjoni.

Jekk tfeġġ kontaminazzjoni batterika minkejja t-trattament bl-antibijotiċi, is-sottokoltivazzjoni għandha tiġi ppreċeduta minn ċentrifugazzjoni f'2 000 sa 4 000 × g għal bejn 15 u 30 minuta f'temperatura ta' bejn 2 °C u 5 °C, jew minn filtrazzjoni tas-supernatant permezz ta' filtru ta' 0,45 μm, jew mit-tnejn li huma (membrana li ma tantx tgħaqqad proteini). Minbarra dan, is-sottokoltivazzjoni għandha ssegwi l-istess proċeduri kif deskritti għal CPE tossiku fir-raba' paragrafu ta' dan il-punt.

Jekk ma jfeġġ l-ebda CPE, it-test jista' jiġi ddikjarat li huwa negattiv.

I.6. L-identifikazzjoni tal-vajrus

Jekk tkun ġiet osservata evidenza ta' CPE f'koltura taċ-ċelloli, il-medium (supernatant) għandu jinġabar u jiġi eżaminat permezz ta' waħda jew iktar mit-tekniki li ġejjin: L-assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiku (ELISA), l-immunofluworexxenza (IF), in-newtralizzazzjoni, ir-RT-PCR jew ir-RT-qPCR. Jekk dawn it-testijiet ma jkunux ippermettew li ssir identifikazzjoni definittiva tal-vajrus fi żmien ġimgħa, is-supernatant għandu jintbagħat fil-laboratorju nazzjonali ta' referenza jew fil-laboratorju ta' referenza tal-UE għall-identifikazzjoni immedjata tal-mardiet tal-ħut imsemmija fl-Anness VI tad-Direttiva 2006/88/KE.

I.6.1. ELISA

Għandu jitwettaq double antibody sandwich ELISA sabiex jiġi identifikat il-vajrus iżolat. Il-pjastri bi bwejriet multipli għandhom jiġu miksija b'50 µl/bwejra (0,9 pg) tal-immunoglobulini (Ig) ppurifikati tal-proteina–A ta' kwalità bil-provi minn antisera tal-fniek kontra l-IHNV jew il-VSHV li jkunu dilwiti f'soluzzjoni mewwieta tal-karbonat (pH 9,6) li jkun fiha 15-il mM ta'ażid tas-sodju u li jiġu inkubati għal bejn 18-il siegħa u ġimagħtejn f'temperatura ta' 4 °C.

Fuq pjastra tad-dilwizzjoni, kull kampjun li fih 1 % Triton X-100 u l-kontrolli pożittivi għandhom jiġu dilwiti b'soluzzjoni mewwieta (jiġifieri, soluzzjoni ta' melħ immewta bil-fosfat (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) f'dilwizzjoni b'erba' darbiet: mhux dilwiti, 1:4, 1:16, 1:64. Il-pjastri ELISA għandhom jinħaslu f'PBS li jkun fiha 0,05 % Tween-20 (PBS-T) u 50 µl ta' kull dilwizzjoni għandhom jiġu ttrasferiti mill-pjastra tad-dilwizzjoni għall-pjastra ELISA li tkun maħsula u miksija.

Imbagħad, il-pjastri ELISA għandhom jiġu inkubati għal 30 minuta f'temperatura ta' 37 °C. Sussegwentement, il-pjastri għandhom jinħaslu u għandhom jiġu inkubati għal 30 minuta f'temperatura ta' 37 °C b'antikorpi monoklonali speċifiċi (jiġifieri, MAb IP5B11 għall-identifikazzjoni tal-VHSV u Hyb 136-3 għall-identifikazzjoni tal-IHNV, rispettivament). 50µl ta' perossidaži tar-rafan (HRP) ikkonjugati b'antikorpi tal-fniek kontra l-ġrieden li jkunu dilwiti fi proporzjon ta' 1:1 000 f'PBS-T-BSA għandhom jiġu ttrasferiti fil-pjastra ELISA.

Fl-aħħarnett, wara l-ħasil mill-ġdid, ir-reazzjonijiet għandhom jiġu żviluppati billi jiġu miżjuda 50 µl/bwejra ta' orto-fenilenedijamina (OPD). Il-pjastri Elisa għandhom jiġu inkubati għal 20 minuta f'temperatura ambjentali fid-dlam u r-reazzjoni għandha titwaqqaf billi jiġu miżjuda 100 µl/bwejra ta' 0,5 M ta' H_2SO_4.

L-assorbenza għandha tiġi mmonitorata f'tul ta' mewġa ta' 492 nm u ta' 620 nm f'apparat għall-qari tal-ELISA. Il-kampjuni għandhom jiġu indikati pożittivi jew negattivi wara li r-riżultati tat-testijiet jitqabblu mal-valuri tal-assorbenza għall-kontrolli pożittivi u negattivi. B'mod ġenerali, il-kampjuni b'assorbenza kkombinata (A) < 0,5 għal materjal mhux dilwit għandhom jitqiesu negattivi, il-kampjuni b'valuri A ta' bejn 0,5 u 1,0 għandhom jitqiesu suspettużi u l-kampjuni b'valuri A > 1,0 għandhom jitqiesu pożittivi.

Jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' ELISA b'effikaċja simili bil-provi minflok dawk li huma msemmija f'dan il-punt.

I.6.2. L-immunofluworexxenza — IF

L-identifikazzjoni tal-patoġeni elenkati, il-VHSV u l-IHNV, għandha titwettaq billi jiġu infettati ċelloli fi pjastri "Suwed" b'96 bwejra, fi pjastri konvenzjonali b'24 bwejra jew f'għotjien (coverslips) fi pjastri b'24 bwejra. Meta jiġi identifikat l-IHNV jew il-VHSV jew jiġu identifikati ż-żewġ mardiet, permezz ta' infezzjoni taċ-ċelloli fuq l-għotjien, għandu japplika l-protokoll li ġej:

(a) l-għotjien għandhom jitpoġġewlhom ċelloli f'densità li twassal għal konfluwenza ta' bejn 60 % u 90 % wara 24 siegħa ta' koltivazzjoni. Fejn possibbli, għandhom jintużaw ċelloli tal-EPC għal dan il-għan minħabba l-aderenza qawwija tagħhom mal-uċuh tal-ħġieġ, iżda jistgħu jintużaw ukoll linji ta' ċelloli oħra bħal BF-2, RTG-2 jew FHM. 150 µl ta' supernatant tal-koltura taċ-ċelloli f'żewġ dilwizzjonijiet differenti (1:10 u 1:1 000) għandu jiġi inokulat f'żewġ kopji fuq monosaffi ta' jum u għandu jiġi inkubat f'temperatura ta' 15-il°C għal 24 siegħa;

(b) sussegwentement, il-medium għall-koltura taċ-ċelloli għandu jitneħħa, u l-monosaffi taċ-ċelloli infettati għandhom jitwaħħlu b'0,5 ml ta' soluzzjoni milwiema kiesħa silġ ta' aċeton (80 % vol:vol). It-twaħħil għandu jseħħ f'kabina tal-estrattur għal 15-il minuta f'temperatura ambjentali, imbagħad is-soluzzjoni tal-aċetun għandha titneħħa u l-għotjien tal-ħġieġ għandhom jitnixxfu bl-arja għal minn tal-inqas 30 minuta. F'dan l-istadju, il-pjastri għandhom jiġu pproċessati minnufih jew inkella għandhom jinħażnu f'temperatura ta' – 20 °C sabiex ikunu jistgħu jintużaw 'il quddiem;

(c) antikorpi monoklonali speċifiċi (jiġifieri l-MAb IP5B11 għall-identifikazzjoni tal-VHSV u l-Hyb 136-3 għall-identifikazzjoni ta' IHNV, rispettivament) għandhom jiġu dilwiti f'0,01 M ta' PBST, b'pH ta' 7,2 fid-dilwizzjoni kif rakkomandat mill-fornitur tal-MAbs; għandhom jiżdiedu minn 50 sa 100 µl/bwejra mal-monosaff fiss u l-pjastri għandhom jiġu inkubati għal siegħa f'temperatura ta' 37 °C f'kompartiment umduż;

(d) l-għotjien għandhom jinħaslu bil-galbu għal tliet darbiet b'PBS li jkun fih 0,05 % ta' Tween-20 (PBS-T) u s-soluzzjoni mewwieta għandha titneħħa kompletament wara l-aħħar tlaħliħa. Sussegwentement, iċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati għal siegħa f'temperatura ta' 37 °C b'antikorpi kkonjugati bl-isotijoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) jew bl-isotijoċjanat tetrametillrodamina-5-(u-6-) (TRITC) kontra l-immunoglobulina tal-ġrieden li jintużaw bħala l-antikorp primarju, u li jiġu dilwiti skont l-istruzzjonijiet tal-fornitur, jerġgħu jinħaslu fil-PBS-T, u jitnixxfu. Il-kolturi mtebbgħin għandhom jiġu mmuntati fuq slajds tal-ħġieġ billi tintuża salina tal-gliċerol u għandhom jiġu eżaminati f'dawl ultravjola (UV) inċidentali. Uża lentijiet ta' 10 × jew ta' 12-il × u lenti tal-objettiv ta' × 25 jew ta' × 40 b'aperturi numeriċi ta' > 0,7 u > 1,3 rispettivament.

Minflok, jistgħu jintużaw tekniki oħra ta' IF ta' effikaċja simili bil-provi, fir-rigward tal-kolturi taċ-ċelloli, tat-twaħħil u tal-antikorpi ta' kwalità ta' referenza.

I.6.3. In-newtralizzazzjoni

Iċ-ċelloli mis-supernatant miġbur għandhom jitneħħew permezz taċ-ċentrifugazzjoni (minn 2 000 sa 4 000 × *g*) jew tal-filtrazzjoni tal-membrana (0,45 μm) b'membrana li ma tantx tgħaqqad proteini u s-supernatant għandu jiġi dilwit fi proporzjonijiet ta' 1:100 u ta' 1:10 000 f'medium għall-koltura taċ-ċelloli.

L-alikwoti ta' minimu ta' żewġ dilwizzjonijiet ta' supernatant għandhom jitħalltu u jiġu inkubati għal 60 minuta f'temperatura ta' 15-il°C b'partijiet ugwali tar-reaġenti li ġejjin separatament:

(a) serum li jkun fih antikorpi ta' grupp speċifiku kontra l-VHSV f'dilwizzjoni ta' 1:50 (vol:vol);

(b) serum li jkun fih antikorpi ta' grupp speċifiku kontra l-IHNV f'dilwizzjoni ta' 1:50 (vol:vol);

(c) għadd ta' antisera kontra s-serotipi indiġeni tal-IPNV f'dilwizzjoni ta' 1:50 (vol:vol);

(d) medium waħdu (kontroll pożittiv).

Minn kull taħlita ta' supernatant-serum tal-vajrus, minn tal-inqas kull waħda miż-żewġ kolturi taċ-ċelloli għandhom jiġu inokulati b'50 μl u mbagħad għandhom jiġu inkubati f'temperatura ta' 15-il °C. L-iżvilupp ta' CPE għandu jiġi vverifikat kif ġie deskritt fil-punt I.5.4.

Il-varjetajiet u l-iżolati tal-VHSV li ma jirreaġixxux fit-testijiet tan-newtralizzazzjoni għandhom jiġu identifikati permezz tal-IF jew tal-ELISA.

Minflok, jistgħu jintużaw testijiet tan-newtralizzazzjoni oħra ta' effikaċja simili bil-provi.

I.6.4. Ir-RT-PCR/ir-RT-qPCR

I.6.4.1. It-tħejjija ta' RNA virali

Il-ħidma kollha bl-RNA għandha titwettaq fuq is-silġ, billi jintużaw l-ingwanti.

L-RNA għandu jiġi estratt billi jintuża l-metodu fenol-kloroform jew permezz ta' kolonni dawwara tal-affinità tal-RNA, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Jistgħu jintużaw kits tal-estrazzjoni tal-RNA li jkunu kummerċjalment disponibbli u li jipproduċu RNA ta' kwalità għolja li jkun adattat biex jintuża mal-protokolli tar-RT-PCR kif spjegati fid-dettall fil-punti ta' hawn taħt.

L-RNA għandu jitħalla mill-ġdid f'ilma distillat mingħajr RNaži (jiġifieri f'ilma ttrattat b'0,1 % ta' pirokarbonat dietiliku) jew f'soluzzjoni mewwieta xierqa ta' elużjoni.

I.6.4.2. Ir-RT-PCR

Għandhom jintużaw il-primers li ġejjin għas-sejba tal-IHNV:

Primer 'il quddiem (VN For) b'elongazzjoni ta' 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

Primer lura (VN Rev) b'elongazzjoni ta' 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

Għandhom jintużaw iċ-ċikli li ġejjin (RT-PCR b'pass wieħed): Ċiklu wieħed: 50 °C għal 30 minuta; Ċiklu wieħed: 95 °C għal żewġ minuti; 30 ċiklu: 95 °C għal 30 sekonda, 50 °C għal 30 sekonda, 72 °C għal 60 sekonda; Ċiklu wieħed: 72 °C għal seba' minuti u għaddas f'temperatura ta' 4 °C.

Għandhom jintużaw il-primers li ġejjin għas-sejba tal-VHSV:

VN For b'elongazzjoni ta' 5′-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3′;

VN Rev b'elongazzjoni ta' 5′-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3′.

Għandhom jintużaw iċ-ċikli li ġejjin (RT-PCR b'pass wieħed): 50 °C għal 30 minuta, 95 °C għal 15-il minuta, 35 ċiklu f'temperatura ta' 94 °C għal 30 sekonda, 55 °C għal 30 sekonda u 68 °C għal 60 sekonda. Sussegwentement, ir-reazzjoni għandha tinżamm f'temperatura ta' 68 °C għal seba' minuti.

Il-kwantità u l-ispeċifiċità tar-reazzjonijiet tar-RT-PCR għandhom jiġu evalwati permezz ta' elettroforeżi b'ġell f'1,5 % ta' ġell tal-agarożju ma' bromur tal-etidju u għandhom jiġu osservati billi tintuża it-transilluminazzjoni tal-UV. Jista' jiġi osservat amplikon ta' PCR ta' 693 bp għall-IHNV. Id-daqs għandu jkun ta' 505 bp għall-VHSV.

Ir-riżultati tal-PCR jistgħu jvarjaw skont il-kundizzjonijiet li fihom titwettaq, jiġifieri l-protokolli termali jista' jkollhom bżonn ottimizzazzjoni, skont it-termoċiklatur li jintuża. Barra minn hekk, jistgħu jidhru riżultati pożittivi li jkunu foloz minħabba r-rikottura falza tal-primers foloz jew minħabba l-kontaminazzjoni fil-laboratorju. Għalhekk, għandhom jiġu inklużi kontrolli pożittivi u negattivi kif ukoll amplikons ta' sekwenza sabiex jiġi evitat kwalunkwe dubju. Għall-primers tal-VHSV, għandha tingħata attenzjoni speċjali meta jintużaw ċelloli BF-2, minħabba li l-primers jistgħu jirreaġixxu mal-linja ta' ċelloli tad-DNA/tar-RNA u jipproduċu riżultati pożittivi ta' daqs simili li jkunu foloz. Meta jiġi ttestjat is-supernatant miċ-ċelloli BF-2, kwalunkwe frammenti amplifikati ta' PCR għandhom jitpoġġew f'sekwenza.

I.6.4.3. Ir-RT-qPCR għall-VHSV

Għall-VHSV, l-amplifikazzjoni għandha titwettaq billi jintużaw il-primers u s-sonda li ġejjin:

Il-primer 'il quddiem: b'elongazzjoni ta' 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′;

Il-primer lura: b'elongazzjoni ta' 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′;

u s-sonda: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Ir-RT-qPCR b'pass wieħed:

Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ: 50 °C għal 30 minuta, 95 °C għal 15-il minuta, 40 ċiklu ta' 94 °C għal 15-il sekonda, 60 °C għal 40 sekonda, 72 °C għal 20 sekonda; aġġusta jekk ikun neċessarju. Minflok, jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' RT-PCR jew ta' RT-qPCR ta' effikaċja simili bil-provi.

I.6.4.4. Ir-RT-qPCR għall-IHNV

Għall-IHNV, l-amplifikazzjoni għandha titwettaq billi jintużaw il-primers u s-sonda li ġejjin:

Il-primer 'il quddiem: b'elongazzjoni ta' 5′- AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′;

Il-primer lura: b'elongazzjoni ta' 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA — 3′;

u s-sonda: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Ir-RT-qPCR b'żewġ passi:

Peress li l-assaġġ li ġej jiddependi fuq amplifikazzjoni b'żewġ passi, għandha tingħata attenzjoni addizzjonali meta jintużaw it-tubi minn reazzjoni għall-oħra sabiex tiġi evitata kontaminazzjoni.

Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ (wara l-pass ta' RT): 50 °C għal żewġ minuti, 95 °C għal għaxar minuti, segwiti minn 40 ċiklu ta' 95 °C għal 15-il sekonda u 60 °C għal minuta; jekk ikunu neċessarji xi aġġustamenti, dawn għandhom isiru.

Minflok, jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' RT-PCR jew ta' RT-qPCR ta' effikaċja simili bil-provi.

II. **Il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati għall-konferma jew għall-esklużjoni tas-suspett ta' VHS, ta' IHN jew taż-żewġ mardiet f'tifqigħat suspettati**

Meta tkun meħtieġa eżaminazzjoni fil-laboratorju sabiex tiġi kkonfermata jew tiġi eskluża l-preżenza ta' IHN, ta' VHS jew taż-żewġ mardiet f'konformità mal-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE bil-metodi dijanjostiċi stipulati fil-punt II.3 tal-Parti 1 tal-Anness I, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati li ġejjin:

(a) l-iżolament konvenzjonali tal-vajrus bis-seronewtralizzazzjoni, bl-identifikazzjoni immunokimika jew bl-identifikazzjoni ta' vajrus molekulari sussegwenti;

(b) is-sejba ta' vajrus permezz tar-RT-PCR jew tar-RT-qPCR;

(c) tekniki dijanjostiċi oħra bħal IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

II.1. L-iżolament konvenzjonali ta' vajrus bl-identifikazzjoni sussegwenti ta' vajrus

II.1.1. L-għażla tal-kampjuni

Għall-eżaminazzjoni għandhom jintgħażlu minn tal-inqas għaxar ħutiet li juru sinjali tipiċi ta' IHN jew ta' VHS.

II.1.2. It-tħejjija u l-vjeġġ ta' kampjuni mill-ħut

It-tħejjija u l-vjeġġ għall-fini ta' iżolament konvenzjonali ta' vajrus għandhom isegwu l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.2.

II.1.3. Il-ġbir ta' materjal dijanjostiku supplimentari

Il-ġbir ta' materjal supplimentari għall-fini ta' iżolament konvenzjonali ta' vajrus għandu jsegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.3.

II.1.4. It-tħejjija ta' kampjuni għall-eżaminazzjoni tal-koltura taċ-ċelloli

It-tħejjija ta' kampjuni għall-eżaminazzjoni tal-koltura taċ-ċelloli għall-fini ta' iżolament konvenzjonali ta' vajrus għandha ssegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.4.

II.1.5. L-eżaminazzjoni viroloġika fuq il-koltura taċ-ċelloli

L-eżaminazzjoni viroloġika għall-fini ta' iżolament konvenzjonali ta' vajrus għandha ssegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.5.

II.1.6. L-identifikazzjoni tal-vajrus

L-identifikazzjoni tal-vajrus għall-fini ta' iżolament konvenzjonali ta' vajrus għandha ssegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.6.

II.2. Is-sejba ta' vajrus permezz tar-RT-qPCR

II.2.1. L-għażla tal-kampjuni

L-għażla tal-kampjuni għall-fini tas-sejba ta' vajrus permezz tar-RT-qPCR għandha ssegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.1.2.

II.2.2. It-tħejjija u l-vjeġġ ta' kampjuni mill-ħut

It-tħejjija u l-vjeġġ għall-fini tas-sejba ta' vajrus permezz tar-RT-qPCR għandhom isegwu l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.2.

II.2.3. Il-ġbir ta' materjal dijanjostiku supplimentari

Il-ġbir ta' materjal dijanjostiku supplimentari għall-fini tas-sejba ta' vajrus permezz ta' RT-qPCR għandu jsegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.3.

II.2.4. It-tħejjija ta' kampjuni għar-RT-qPCR

It-tħejjija ta' kampjuni għall-fini tas-sejba ta' vajrus permezz tar-RT-qPCR għandha ssegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punt I.6.4.1.

II.2.5. Ir-RT-qPCR

Is-sejba ta' vajrus permezz tar-RT-qPCR għandha ssegwi l-metodi u l-proċeduri stipulati fil-punti I.6.4.1, I.6.4.3 u I.6.4.4.

II.3. Tekniki dijanjostiċi oħra

Is-supernatant imħejji kif deskritt fil-punt I.4.3 jista' jintbagħat għal ELISA, għal test indirett ta' antikorpi fluworexxenti (IFAT) jew għal RT-PCR f'konformità mal-punt I.6.1, I.6.2 jew I.6.4 rispettivament. Il-materjal tat-tessut jista' jiġi soġġett għal tekniki dijanjostiċi oħra, bħal IFAT fuq sezzjonijiet iffriżati jew immunoistokimika fuq materjal ta' tessut fiss bil-formalin. Dawk it-tekniki rapidi għandhom jiġu ssupplimentati b'eżaminazzjoni viroloġika f'konformità mal-punt II(a) jew inkella mal-punt II(b) fi żmien 48 siegħa wara t-teħid ta' kampjuni, jekk:

(a) jinkiseb riżultat negattiv; jew

(b) jinkiseb riżultat pożittiv b'materjal li jirrappreżenta l-ewwel każ ta' IHN jew ta' VHS.

III. **Il-proċedura għat-titrazzjoni sabiex tiġi vverifikata s-suxxettibbiltà tal-kolturi taċ-ċelloli għal infezzjoni**

Meta titwettaq titrazzjoni sabiex tiġi vverifikata s-suxxettibbiltà tal-kolturi taċ-ċelloli għal infezzjoni kif imsemmi fil-punt I.5.3, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri stipulati fil-paragrafi li ġejjin ta' dan il-punt.

Għandhom jintużaw minn tal-inqas żewġ iżolati tal-VHSV u iżolat wieħed tal-IHNV. L-iżolati għandhom jirrappreżentaw il-grupp ewlieni ta' vajrusijiet fl-Unjoni Ewropea, jiġifieri iżolat patoġeniku wieħed minn trota qawsalla fl-ilma ħelu u iżolat patoġeniku wieħed tal-baħar minn barbun imperjali għall-VHSV, u varjetà patoġenika waħda minn trota qawsalla mill-Unjoni Ewropea għall-IHNV. Għandhom jintużaw iżolati ddefiniti sewwa mill-Istati Membri. Lottijiet ta' vajrusijiet li ma tantx inxterdu minn koltura taċ-ċelloli għall-oħra għandhom jiġu ppropagati f'kontenituri tal-koltura taċ-ċelloli fuq ċelloli BF-2 jew RTG-2 għall-VHSV u fuq ċelloli EPC jew FHM għall-IHNV. Għandu jintuża medium għall-koltura taċ-ċelloli b'minn tal-inqas 10 % ta' serum. Għandu jintuża MOI baxx għall-inokulazzjoni (< 1).

F'CPE totali, il-vajrus għandu jinħażen permezz ta' ċentrifugazzjoni tas-supernatant ta' koltura taċ-ċelloli bi tkabbir ta' 2 000 × g għal 15-il minuta, b'filtru sterilizzat permezz ta' filtru tal-membrana ta' 0,45 μm u għandu jiġi mqassam fi krijotubi ttikkettati. Il-vajrus għandu jinżamm f'temperatura ta' – 80 °C.

Ġimgħa wara l-iffriżar, għandhom tliet kunjetti rreplikati b'kull vajrus għandhom jitħallew jinħallu fl-ilma kiesaħ u għandhom jiġu ttitrati fuq il-linji ta' ċelloli rispettivi tagħhom. Minn tal-inqas kull sitt xhur, jew jekk ikun suspettat li s-suxxettibbiltà ta' linja ta' ċellola naqset, kull iżolat tal-vajrus għandu jitħalla jinħall u għandu jiġi ttitrat.

Il-proċeduri ta' titrazzjoni jridu jiġu deskritti fid-dettall u jridu jiġu segwiti l-istess proċeduri kull darba.

It-titrazzjoni b'dilwizzjoni fil-punt tat-tmiem għandha tinkludi minn tal-inqas sitt repliki f'kull pass tad-dilwizzjoni. It-titri għandhom jitqabblu mat-titri li jkunu miksuba preċedentement. Jekk it-titru ta' kwalunkwe wieħed mit-tliet iżolati tal-vajrusijiet jonqos b'żewġ livelli rreġistrati jew iktar, meta mqabbel mat-titru inizjali, il-linja ta' ċelloli ma għandhiex tibqa' tintuża iktar għal finijiet ta' sorveljanza.

Jekk jinżammu linji differenti ta' ċelloli fil-laboratorju, kull linja għandha tiġi eżaminata separatament.

Ir-reġistri għandhom jinżammu għal perjodu ta' mill-inqas għaxar snin.

PARTI 2

IL-METODI U L-PROĊEDURI DIJANJOSTIĊI DDETTALJATI GĦAS-SORVELJANZA U GĦALL-KONFERMA TAL-MARDA TAL-KHV (KHVD)

I. **Il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati għall-konferma tal-preżenza jew tal-esklużjoni tas-suspett tal-KHVD**

Meta tkun meħtieġa eżaminazzjoni fil-laboratorju għall-fini li tiġi kkonfermata l-preżenza jew li jiġi eskluż is-suspett tal-KHVD f'konformità mal-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE, bil-metodi dijanjostiċi stipulati fit-Taqsima III tal-Parti 2 tal-Anness I, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-punti I.1 u I.2 ta' din il-Parti.

I.1. It-tħejjija ta' kampjuni minn ħut

Għall-finijiet dijanjostiċi, il-ħut (li jintbagħat ħaj jew maqtul u ppakkjat separatament f'kontenituri asettiċi ssiġillati) jew inkella l-organi jew biċċiet ta' organi ffriżati li jkunu kkonservati f'medium ta' trasport virali jew bi 80 % etanol sa etanol assolut (li jridu jiġu pproċessati fi żmien 48 siegħa wara li jinġabru) għall-ittestjar b'metodi konvenzjonali bbażati fuq PCR jew fuq qPCR.

Għas-sejba tal-KHV, għandhom jinġabru l-garġi u l-kliewi; barra minn hekk, jistgħu jiġu inklużi wkoll il-milsa, l-enċefalu u l-intestini f'kampjun addizzjonali separat. F'każijiet akuti, jista' jinġabar għadd ta' materjal tat-tessut minn massimu ta' ħames ħutiet.

Barra minn hekk, f'ċerti każijiet jistgħu jintużaw kampjuni mhux letali bħal demm, tajjara tal-garġi, bijopsija tal-garġi jew fluwidu tal-mukus (jiġifieri jista' jintuża ħut ta' valur kbir fil-każ ta' suspett tal-preżenza tal-KHV).

I.1.1. L-estrazzjoni tad-DNA

Id-DNA għandu jiġi estratt skont il-proċeduri standard.

Jistgħu jintużaw il-kits tal-estrazzjoni tad-DNA li huma kummerċjalment disponibbli u li jipproduċu DNA ta' kwalità għolja li jkun adattat biex jintuża mal-protokolli ta' PCR, kif imsemmi fil-punt I.2.

I.2. Is-sejba u l-identifikazzjoni tal-aġenti permezz ta' metodi bbażati fuq reazzjoni katina bil-polimeraži (PCR)

I.2.1. Il-qPCR għas-sejba tal-KHV

Għas-sejba tal-KHV permezz tal-qPCR, għandu jintuża l-assaġġ qPCR li ġej:

Il-primer 'il quddiem (KHV-86f): b'elongazzjoni ta' 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

Il-primer lura (KHV-163r): b'elongazzjoni ta' 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

u s-sonda (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ: ċiklu wieħed ta' 95 °C għal 15-il minuta, segwit minn 40 ċiklu f'temperatura ta' 94 °C għal 15-il sekonda u ta' 60 °C għal 60 sekonda. Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Madankollu, minflok jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' qPCR ta' effikaċja simili bil-provi.

I.2.2. Il-PCR konvenzjonali għas-sejba tal-KHV

Għandu jintuża l-assaġġ deskritt f'dan il-punt li jimmira għall-ġene Timina kinaži (TK) tal-KHV. Madankollu, minlfok jistgħu jintużaw assaġġi oħra ta' PCR b'sensittivitajiet u bi speċifiċitajiet simili għall-assaġġ deskritt.

Il-primer 'il quddiem (KHV-TKf): b'elongazzjoni ta' 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′;

Il-primer lura (KHV-TKr): b'elongazzjoni ta' 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ: ċiklu wieħed ta' 95 °C għal ħames minuti segwit minn 35 ċiklu f'temperatura ta' 95 °C għal 30 sekonda, 52 °C għal 30 sekonda, 72 °C għal minuta u ċiklu wieħed ta' 72 °C għal għaxar minuti. Id-daqs tal-prodott għandu jkun ta' 409 bp.

Ir-riżultati tal-PCR jistgħu jvarjaw skont il-kundizzjonijiet li fihom titwettaq, jiġifieri l-protokolli termali jista' jkollhom bżonn ottimizzazzjoni, skont it-termoċiklatur li jintuża. Barra minn hekk, jistgħu jidhru riżultati pożittivi li jkunu foloz minħabba r-rikottura falza tal-primers foloz jew minħabba l-kontaminazzjoni. Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Madankollu, minflok jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' PCR ta' effikaċja simili bil-provi.

L-ewwel sejba f'żona għandha tiġi kkonfermata permezz ta' sekwenzar jew inkella għandha tintbagħat f'laboratorju nazzjonali ta' referenza jew fil-laboratorju ta' referenza tal-UE għall-identifikazzjoni immedjata tal-mardiet tal-ħut imsemmija fl-Anness VI tad-Direttiva 2006/88/KE.

II. **Il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati għas-sorveljanza tal-KHVD**

Meta teħid ta' kampjuni u eżaminazzjoni fil-laboratorju jitwettqu għall-fini tal-kisba jew taż-żamma ta' ċertu statuses tas-saħħa fir-rigward tal-KHVD kif stabbilit fit-Taqsima I tal-Parti 2 tal-Anness I, bil-metodi dijanjostiċi stipulati fit-Taqsimiet II jew III tal-Parti 2 ta' dak l-Anness, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-punti II.1 u II.2 li ġejjin ta' din il-Parti.

II.1. It-tħejjija ta' kampjuni mill-ħut

Jekk ikun possibbli, għandhom jittieħdu kampjuni mill-ħut li jkun inżamm għal perjodu imtawwal ta' żmien fit-temperaturi permessivi għall-vajrus (jiġifieri, għal bejn ġimagħtejn u tliet ġimgħat f'temperatura ta' bejn 15-il°C u 26 °C). Jekk ikun possibbli, il-kampjuni għandhom jinġabru minn 24 siegħa, iżda mhux iktar tard minn 72 siegħa, wara l-prattiki ta' ġestjoni li jistgħu jattivaw il-vajrus mill-ġdid fil-ħut bi status ta' trasportatur, bħal pereżempju x-xbieki jew it-trasport, sabiex jiżdied iċ-ċans ta' sejba tal-KHV.

Għall-fini tas-sorveljanza tal-KHVD, il-ħut jista' jintbagħat ħaj jew maqtul kif ukoll ippakkjat separatament f'kontenituri asettiċi ssiġillati jew inkella jistgħu jintużaw organi jew biċċiet ta' organi ffriżati li jkunu kkonservati f'medium ta' trasport virali jew bi 80 % sa 100 % alkoħol (li jridu jiġu pproċessati fi żmien 48 siegħa wara li jinġabru) għall-ittestjar b'metodi bbażati fuq PCR. Għas-sorveljanza tal-KHVD, għandhom jinġabru l-garġi u l-kliewi.

Għall-fini tas-sorveljanza tal-KHVD, l-għadd ta' kampjuni għandu jiġi evitat fejn dan ikun possibbli. Jekk l-għadd ikun neċessarju, jista' jinġabar għadd ta' materjal tat-tessut minn massimu ta' żewġ ħutiet. Il-kampjuni ta' daqs ikbar għandhom jiġu omoġenizzati f'mehrież u f'lida jew fi stomacher, u għandhom jinkisbu sottokampjuni għall-estrazzjoni tad-DNA qabel kjarifika. B'mod alternattiv, jistgħu jinġabru sottokampjuni minn kull tessut inkluż fil-kampjun u jitpoġġew f'"tubi tal-liżi".

II.1.1. L-estrazzjoni tad-DNA

Id-DNA għandu jiġi estratt skont il-proċeduri standard. Jistgħu jintużaw kits tal-estrazzjoni tad-DNA li jkunu kummerċjalment disponibbli u li jipproduċu DNA ta' kwalità għolja li jkun adattat biex jintuża mal-protokolli ta' PCR stipulati fil-punt II.2.

Il-proporzjon aċċettabbli tal-medium tat-tessut għandu jkun ta' 1:9 w/v. Fit-testijiet għandu jiġi inkluż materjal tat-tessut ta' bejn 20 u 25 mg.

II.2. Is-sorveljanza tal-KHVD b'metodi bbażati fuq PCR

Għas-sorveljanza tal-KHV, għandha tintuża l-qPCR. Jekk jirriżultaw kampjuni pożittivi f'żona li preċedentement ma kinitx ikkonfermata bħala waħda pożittiva, ir-riżultati tat-test għandhom jiġu kkonfermati:

(a) permezz ta' sekwenzar ta' PCR jew prodott imbejjet ta' PCR mill-kampjuni.

Is-sekwenza mhux minsusa ta' kunsens li tinkiseb għandha taqbel (b'minn tal-inqas 98 %) ma' dawn is-sekwenzi ta' referenza.

(b) jew inkella, jistgħu jintbagħtu għall-konferma f'laboratorju nazzjonali ta' referenza.

II.2.1. Il-qPCR għas-sejba tal-KHV

Il-qPCR deskritta għandha tintuża kif ġej:

Il-primer 'il quddiem (KHV-86f): b'elongazzjoni ta' 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

Il-primer lura (KHV-163r): b'elongazzjoni ta' 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

u s-sonda (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ: ċiklu wieħed f'temperatura ta' 95 °C għal 15-il minuta, segwit minn 50 ċiklu f'temperatura ta' 94 °C għal 15-il sekonda u 60 °C għal 60 sekonda.

Ir-riżultati tal-qPCR jistgħu jvarjaw skont il-kundizzjonijiet li fihom titwettaq, jiġifieri l-protokolli termali jista' jkollhom bżonn ottimizzazzjoni, skont it-termoċiklatur li jintuża. Barra minn hekk, jistgħu jidhru riżultati pożittivi li jkunu foloz minħabba r-rikottura falza tal-primers foloz jew minħabba l-kontaminazzjoni fil-laboratorju. Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Madankollu, minflok jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' qPCR ta' effikaċja simili bil-provi.

II.2.2. Il-PCR konvenzjonali għall-konferma tas-sejba tal-KHV

Għall-konferma tal-preżenza ta' infezzjoni bil-KHV, għandha tintuża l-PCR ġenerika mbejta deskritta fit-Tabella 2.1 li ġejja, segwita minn sekwenzar tal-prodott amplifikat.

It-Tabella 2.1

Il-primers u l-kundizzjonijiet għall-assaġġ ta' PCR imbejjet li jimmira għall-vajrusijiet ċiprinidi kollha tal-erpete (CyHV-1, CyHV-2 u CyHV-3)

L-isem tal-primer	Is-sekwenza	Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ	Id-daqs tal-prodott
CyHVpol-'il quddiem	b'elongazzjoni ta' 5′ -CCAGCAA-CATGTGCGACGG-3′	L-ewwel rawnd ta' PCR *Ċiklu wieħed:* 95 °C għal żewġ minuti *40 ċiklu:* 95 °C għal 30 sekonda 55 °C għal 30 sekonda 72 °C għal 45 sekonda *Ċiklu wieħed:* 72 °C għal għaxar minuti	362 bp
CyHVpol-lura	b'elongazzjoni ta' 5′ -CCGTARTGA-GAGTTGGCGCA-3′		

L-isem tal-primer	Is-sekwenza	Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ	Id-daqs tal-prodott
CyHVpol-intern 'il quddiem	b'elongazzjoni ta' 5′ -CGACGGVG-GYATCAGCCC-3′	It-tieni rawnd ta' PCR *Ċiklu wieħed:* 95 °C għal żewġ minuti, *40 ċiklu:* 95 °C għal 30 sekonda 55 °C għal 30 sekonda 72 °C għal 45 sekonda *Ċiklu wieħed:* 72 °C għal għaxar minuti	339 bp
CyHVpol-intern lura	b'elongazzjoni ta' 5′ -GAGTTGGCG-CAYACYTTCATC-3′		

Ir-riżultati tal-PCR jistgħu jvarjaw skont il-kundizzjonijiet li fihom titwettaq, jiġifieri l-protokolli termali jista' jkollhom bżonn ottimizzazzjoni, skont it-termoċiklatur li jintuża. Barra minn hekk, jistgħu jidhru riżultati pożittivi li jkunu foloz minħabba r-rikottura falza tal-primers foloz jew minħabba l-kontaminazzjoni fil-laboratorju. Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Minflok, jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' PCR ta' effikaċja simili bil-provi.

Is-sekwenzar jista' jitwettaq mil-laboratorju jew f'kumpaniji esterni speċjalizzati fis-sekwenzar. Ir-riżultati tas-sekwenzar għandhom jiġu analizzati billi s-sekwenzi jiġu allinjati mas-sekwenzi magħrufa ta' referenza tal-KHV (in-numri ta' adeżjoni tal-Gen Bank AP008984, DQ657948 u DQ177346). Is-sekwenza mhux minsusa ta' kunsens li tinkiseb trid taqbel, b'minn tal-inqas 98 %, ma' dawk is-sekwenzi ta' referenza.

PARTI 3

IL-METODI U L-PROĊEDURI DIJANJOSTIĊI DDETTALJATI GĦAS-SORVELJANZA U GĦALL-KONFERMA TAL-ANEMIJA INFETTIVA TAS-SALAMUN (ISA)

I. **Il-proċeduri tat-teħid ta' kampjuni għas-sorveljanza u għall-kontroll tal-ISA**

Meta jitwettaq teħid ta' kampjuni u titwettaq eżaminazzjoni fil-laboratorju, għall-fini tal-programmi ta' sorveljanza jew ta' eradikazzjoni stipulati fil-Parti 3 tal-Anness I, jew sabiex tiġi kkonfermata jew tiġi eskluża l-preżenza tal-ISA f'konformità mal-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri ddettaljati stipulati fil-punti I.1, I.2 u I.3 ta' din it-Taqsima.

I.1. It-tħejjija ta' kampjuni mill-ħut

Għall-fini tal-eżaminazzjoni fil-laboratorju għall-preżenza tal-ISA, ma għandux ikun hemm l-għadd ta' kampjuni tal-ħut meta dan ikun possibbli. Madankollu, għall-fini tas-sorveljanza għall-ISA, l-għadd ta' kampjuni ta' bejn żewġ ħutiet sa ħames ħutiet jiġi aċċettat.

Il-kampjuni għall-analiżi tat-traskriptaži inversa u reazzjoni katina bil-polimeraži għandhom jittieħdu mill-ħut kollu li ttieħed għall-kampjuni. Biċċa minn nofs il-kilwa għandha titneħħa mill-ħut billi jintuża strument sterili u għandha tiġi ttrasferita f'tubu mikrofugu li jkun fih millilitru ta' soluzzjoni ta' konservazzjoni tal-RNA li tkun effikaċi bil-provi. It-tessuti minn mhux iktar minn ħames ħutiet jistgħu jingabru f'tubu wieħed li jkun fih soluzzjoni ta' trasport u għandhom jirrappreżentaw l-għadd ta' kampjun wieħed. Il-piż tat-tessut f'kampjun wieħed għandu jkun ta' 0,5 g. Meta l-ħut ikun żgħir wisq sabiex jinkiseb kampjun tal-piż meħtieġ, jistgħu jittieħdu biċċiet mill-kliewi, mill-qalb, mill-milsa, mill-fwied jew mill-musrana l-għamja, f'dik l-ordni ta' preferenza, sabiex jingabar kampjun b'piż ta' 0,5 g.

It-tessut għall-eżaminazzjoni istoloġika għandu jittieħed biss minn ħut li jkun għadu kif inqatel b'kompożizzjoni normali, li jkun juri sinjali kliniċi jew sejbiet post-mortem li jkunu konsistenti mal-preżenza tal-ISA. Għandhom jittieħdu kampjuni ta' kwalunkwe leżjoni interna jew esterna u, fi kwalunkwe każ, il-kampjuni ta' nofs il-kilwa, tal-qalb, tal-fwied, tal-frixa, tal-imsaren, tal-garġi u tal-milsa għandhom jitneħħew minn ħut individwali billi jintuża skalpell u għandhom jiġu ttrasferiti fi 8 % sa 10 % (vol:vol) ta' soluzzjoni ta' melħ immewta bil-formol. Il-proporzjon ta' sustanza li twaħħal imqabbel mat-tessut għandu jkun minn tal-inqas ta' 20:1 sabiex tiġi żgurata konservazzjoni sodisfaċenti tat-tessuti. Għall-immunoistokimika (IHC), għandhom jittieħdu kampjuni minn nofs il-kilwa u mill-qalb.

It-tessuti għall-eżaminazzjoni viroloġika fuq il-koltura taċ-ċelloli għandhom jittieħdu mill-ħut kollu li ttieħed għall-kampjuni. Il-biċċiet tal-fwied, tal-kilwa anterjuri jew ta' nofs il-kilwa, tal-qalb u tal-milsa għandhom jitneħħew mill-ħut billi jintuża strument sterili u għandhom jiġu ttrasferiti f'tubi tal-plastik li jkun fihom medium ta' trasport li jesa' 9 ml. It-tessuti minn mhux iktar minn ħames ħutiet jistgħu jingħabru f'tubu wieħed li jkun fih soluzzjoni ta' transport u jirrappreżentaw għadd ta' kampjun wieħed. Il-piż tat-tessut f'kampjun wieħed għandu jkun ta' 1,0 ± 0,5 g.

I.2. Il-vjeġġ ta' kampjuni mill-ħut

Jista' jiġi ttrasportat ħut sħiħ lejn il-laboratorju jekk ikunu jistgħu jiġu ssodisfati r-rekwiżiti tat-temperatura matul it-trasport, kif deskritt fil-paragrafu 3 ta' dan il-punt. Il-ħut sħiħ għandu jiġi mqartas fil-karti li jkollhom kapaċità ta' assorbiment u għandu jiġi ttrasportat f'basket tal-plastik, imkessaħ kif deskritt f'dak il-paragrafu.

Jista' jiġi ttrasportat ukoll ħut ħaj, iżda dan jista' jsir biss taħt is-superviżjoni tal-laboratorju nazzjonali ta' referenza għall-mardiet tal-ħut u fejn jitqiesu l-kwistjonijiet addizzjonali ta' diżinfezzjoni u ta' bijosigurtà meta jiġi ttrasportat ħut ħaj.

Il-kampjuni tad-demm u t-tubi li jkun fihom tessuti tal-ħut għall-eżaminazzjoni viroloġika jew għall-analiżi tar-RT-PCR għandhom jitpoġġew f'kontenituri insulati, bħal kaxxi tal-polistiren bil-ġnub ħoxnin, flimkien ma' biżżejjed silġ jew blokok tal-friża sabiex jiġi żgurat li t-tkessiħ tal-kampjuni matul it-trasport lejn il-laboratorju. L-iffriżar għandu jiġi evitat u s-silġ irid ikun għadu preżenti fil-kaxxa tat-trasport mal-wasla tal-vjeġġ jew inkella blokka waħda jew iktar tal-friża jridu jkunu parzjalment jew kompletament iffriżati. F'ċirkostanzi eċċezzjonali, il-kampjuni tar-RT-PCR u l-kampjuni għall-eżaminazzjoni viroloġika jistgħu jiġu ffriżati b'mod rapidu (snap-frozen) u jistgħu jiġu ttrasportati sal-laboratorju f'temperatura ta' – 20 °C jew inqas.

Għall-analiżi tar-RT-PCR ta' tessuti kkonservati fl-aċidu ribonuklejku(RNA)later, l-estrazzjoni tal-RNA għandha titwettaq fit-termini ta' żmien li ġejjin skont it-temperatura li fiha jinħażnu l-kampjuni:

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' 37 °C: jum;

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' 25 °C: ġimgħa;

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' 4 °C: xahar;

il-kampjuni li jinħażnu f'temperatura ta' – 20 °C: b'mod indefinit.

Jekk it-tessuti tal-ħut jiġu ttrasportati f'sustanza li twaħħal għall-eżaminazzjoni istoloġika, dawn għandhom jiġu ttrasportati f'tubi li ma jnixxi xejn minnhom u f'kontenituri reżistenti għall-impatt. L-iffriżar ta' dawk il-kampjuni għandu jiġi evitat.

L-eżaminazzjoni viroloġika fuq il-koltura taċ-ċelloli għandha tinbeda mill-iktar fis possibbli u mhux iktar tard minn 48 siegħa wara l-ġbir tal-kampjuni. F'każijiet eċċezzjonali, l-eżaminazzjoni viroloġika tista' tinbeda sa mhux iktar tard minn 72 siegħa wara l-ġbir tal-materjal, diment li l-materjal li jrid jiġi eżaminat ikun protett minn medium ta' trasport u li r-rekwiżiti tat-temperatura matul it-trasport ikunu jistgħu jiġu ssodisfati.

I.3. Il-ġbir ta' materjal dijanjostiku supplimentari

Soġġett għall-approvazzjoni tal-laboratorju dijanjostiku, jistgħu jingħabru u jitħejjew għall-eżaminazzjoni supplimentari tessuti tal-ħut għajr dawk imsemmija fil-punt I.1.

II. **Il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati għas-sorveljanza u għall-konferma tal-preżenza jew għall-esklużjoni tas-suspett ta' ISA**

Meta titwettaq eżaminazzjoni fil-laboratorju għall-fini li jinkiseb jew li jinżamm ċertu status tas-saħħa fir-rigward tal-ISA kif stipulat fit-Taqsima I tal-Parti 3 tal-Anness I tad-Direttiva, jew għall-fini tal-konferma tal-preżenza jew tal-esklużjoni tas-suspett ta' ISA f'konformità mal-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE, bil-metodi dijanjostiċi stipulati fit-Taqsima II tal-Parti 3 tal-Anness I, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri ddettaljati stipulati fil-punti li ġejjin minn II.1 sa II.5.

II.1. L-eżaminazzjoni ta' kampjuni permezz tar-RT-PCR

Il-metodu dijanjostiku li jrid jintuża għall-iskrinjar għall-ISAV għandu jkun ir-RT-qPCR. Peress li r-riżultati tar-RT-qPCR jistgħu jvarjaw skont il-kundizzjonijiet li fihom titwettaq, għandhom jiġu inklużi kontrolli u amplikons pożittivi u negattivi li jkunu adattati sabiex jiġi evitat kwalunkwe dubju.

II.1.1. L-estrazzjoni tal-RNA totali

Il-ħidma kollha bl-RNA għandha titwettaq fuq is-silġ, billi jintużaw l-ingwanti.

L-RNA totali għandu jiġi estratt billi jintuża l-metodu fenol-kloroform jew permezz ta' kolonni dawwara tal-affinità tal-RNA, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur.

L-RNA ppurifikat għandu jitħalla mill-ġdid f'silma distillat mingħajr RNaži (jiġifieri f'silma ttrattat b'0,1 % ta' pirokarbonat dietiliku)

Il-konċentrazzjoni u l-purità tal-RNA li jiġi estratt għandu jiġi stmat billi titkejjel id-densità ottika bi tkabbir ta' 260 nm u ta' 280 nm. Approċċ alternattiv jista' jkun li jiġu inklużi kontrolli interni mmirati kontra l-ġenoma tal-vajrus kif imsemmi fil-punt II.1.3.

II.1.2. Ir-RT-PCR għas-sejba tal-ISAV

Jistgħu jintużaw diversi metodi tar-RT-PCR għall-amplifikazzjoni tal-ġenoma tal-ISAV. Jista' jitwettaq RT-PCR b'żewġ passi, fejn il-passi tar-reazzjonijiet ta' RT u ta' PCR iseħħu f'żewġ tubi separati. Madankollu, tista' titwettaq ukoll reazzjoni b'pass wieħed, fejn iż-żewġ reazzjonijiet iseħħu f'tubu wieħed. Il-metodu b'pass wieħed għandu jintuża kull fejn ikun possibbli, billi l-assaġġ b'tubu wieħed inaqqas ir-riskju ta' kontaminazzjoni kroċjata peress li ma hemm bżonn li jsir l-ebda trasferiment ta' kontenut, u dan il-metodu jitqies li huwa sensittiv daqs il-metodu b'żewġ passi.

Għandhom jintużaw il-primers u l-assaġġ deskritti f'dan il-punt, jiġifieri l-par ta' primers ILA1 u ILA2 li jimmiraw għas-segment 8 u li nstabu li huma adattati għas-sejba tal-ISAV fit-tifqigħat kif ukoll fil-ħut trasportatur. Il-primer lura ILA2 ma jaqbilx mal-iżolati mill-Amerka ta' Fuq u f'dawk il-każijiet għandu jintuża sett alternattiv ta' primer.

Il-primer 'il quddiem (ILA1): b'elongazzjoni ta' 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′;

Il-primer lura (ILA2): b'elongazzjoni ta' 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ: ċiklu wieħed ta' 50 °C għal 30 minuta, ċiklu wieħed ta' 94 °C għal 15-il minuta, 40 ċiklu ta' 94 °C għal 30 sekonda, 55 °C għal 30 sekonda, 72 °C għal 60 sekonda; ċiklu wieħed ta' 72 °C għal ħames minuti. Id-daqs tal-prodott huwa ta' 155 bp.

Ir-riżultati tal-PCR jistgħu jvarjaw skont il-kundizzjonijiet li fihom titwettaq, jiġifieri l-protokolli termali jista' jkollhom bżonn ottimizzazzjoni, skont it-termoċiklatur li jintuża. Barra minn hekk, jistgħu jidhru riżultati pożittivi li jkunu foloz minħabba r-rikottura falza tal-primers foloz jew minħabba l-kontaminazzjoni fil-laboratorju. Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Madankollu, minflok jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' RT-PCR ta' effikaċja simili bil-provi.

II.1.3. Ir-RT-qPCR għas-sejba tal-ISAV

L-użu tar-RT-qPCR jista' jżid l-ispeċifiċità u x'aktarx anki s-sensittività. Il-metodu jista' jitwettaq iktar malajr peress li mhux meħtieġ li jsir l-ebda pass ta' elettroforeżi b'ġell u dan il-metodu jnaqqas ir-riskju ta' kontaminazzjoni kroċjata minħabba li huwa possibbli li jiġi stmat l-ammont ta' RNA ġenomiku virali fit-tubu tal-kampjun. Żvantaġġ tal-assaġġ tar-RT-qPCR huwa li sikwit ma jkunx possibbli li jsir sekwenzar tal-prodotti amplifikati. Madankollu, jekk ikun hemm dubju dwar l-ispeċifiċità tal-prodott amplifikat, irid jitwettaq assaġġ ieħor li jkun speċifiku għall-ISAV sabiex jiġi vverifikat ir-riżultat.

Għandu jintuża l-assaġġ deskritt f'dan il-punt, li huwa assaġġ li jimmira għas-segment 8. Dan l-assaġġ għandu jkopri iżolati mill-Unjoni Ewropea, mill-Assoċjazzjoni Ewropea tal-Kummerċ Ħieles u mill-Amerika ta' Fuq. Il-metodu b'pass wieħed għandu jintuża kull fejn ikun possibbli, minħabba li l-assaġġ b'tubu wieħed inaqqas ir-riskju ta' kontaminazzjoni kroċjata.

Il-primer 'il quddiem: b'elongazzjoni ta' 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;

Il-primer lura: b'elongazzjoni ta' 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;

u s-sonda: 5′-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC — *MGBNFQ*-3′.

Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ: ċiklu wieħed ta' 50 °C għal 30 minuta, ċiklu wieħed ta' 95 °C għal 15-il minuta, 40 ċiklu ta' 94 °C għal 15-il sekonda, 60 °C għal 60 sekonda; jekk ikunu neċessarji xi aġġustamenti, dawn għandhom isiru. Minflok, jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' RT-PCR jew ta' RT-qPCR ta' effikaċja simili bil-provi.

II.1.4. Is-sekwenzar ta' prodotti amplifikati bil-PCR

Il-primer 'il quddiem (ILAs6-3F): b'elongazzjoni ta' 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;

Il-primer lura (ILAs6-2R): b'elongazzjoni ta' 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.

Għandhom jiġu inklużi kontrolli mudell li jkunu negattivi kif ukoll kontrolli pożittivi fuq kull pjastra li tintuża. Il-kundizzjonijiet taċ-ċiklaġġ (RT-PCR b'pass wieħed): ċiklu wieħed ta' 50 °C għal 30 minuta, ċiklu wieħed ta' 94 °C għal 15-il minuta, 40 ċiklu ta' 94 °C għal 30 sekonda, 55 °C għal 30 sekonda; 72 °C għal 60 sekonda, ċiklu wieħed ta' 72 °C għal ħames minuti; jekk ikunu neċessarji xi aġġustamenti, dawn għandhom isiru. Minflok, jistgħu jintużaw verżjonijiet oħra ta' RT-PCR jew ta' RT-qPCR ta' effikaċja simili bil-provi.

B'mod alternattiv, jista' jintuża l-metodu li ġej għas-sekwenzar tal-HPR fis-segment 6:

Il-primer 'il quddiem: b'elongazzjoni ta' 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′;

Il-primer lura: b'elongazzjoni ta' 5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′;.

Id-daqs tal-prodott: 304 nt jekk HPR0.

Jistgħu jintużaw ukoll assaġġi tar-RT-PCR b'sensittivitajiet u bi speċifiċitajiet simili għall-assaġġi deskritti f'dan il-punt.

Il-purità tal-prodott amplifikat bir-RT-PCR għandha tiġi vverifikata bl-elettroforeżi qabel is-sekwenzar. Jekk jirriżulta framment wieħed biss li jkun pur, dan għandu jiġi ppurifikat direttament mir-reazzjoni ta' PCR. Jekk ikunu preżenti bosta frammenti amplifikati, il-framment ta' interess għandu jiġi ppurifikat bl-elettroforeżi b'ġell. Il-purifikazzjoni tal-frammenti ta' PCR minn soluzzjonijiet jew minn ġellijiet tal-agarożju għandha ssir permezz ta' kolonni dawwara tal-affinità tal-frammenti ta' PCR, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur.

Is-sekwenzar għandu jitwettaq billi jintużaw il-primers ta' amplifikazzjoni f'kumpaniji esterni speċjalizzati fis-sekwenzar. Ir-riżultati għandhom jiġu analizzati bl-għodda tat-tfittxija BLAST u s-sekwenzi għandhom jitqabblu ma' sekwenzi magħrufa oħra fil-bażi ta' dejta tan-nukleotidi taċ-Ċentru Nazzjonali tal-Istati Uniti għall-Informazzjoni Bijoteknika (NCBI).

Is-sekwenzar irid jelimina kwalunkwe dubju dwar l-ispeċifiċità ta' prodott amplifikat bir-RT-PCR.

II.2. L-iżolament tal-ISAV fil-koltura taċ-ċelloli

II.2.1. It-tħejjija ta' kampjuni

It-tessut jista' jinżamm f'temperatura ta' – 80 °C. It-tessut tal-ħut għandu jiġi ffriżat u jitħalla jinħall darba biss qabel l-eżaminazzjoni. Għall-finijiet ta' sorveljanza u ta' kontroll, l-eżaminazzjoni għandha titwettaq mill-iktar fis possibbli.

Kull kampjun (għadd ta' tessut f'soluzzjoni ta' trasport) għandu jiġi omoġenizzat kompletament b'omoġenizzatur ivvalidat, għandu jiġi ċċentrifugat f'2 000 sa 4 000 × *g* għal 15-il minuta f'temperatura ta' 0 °C sa 6 °C, u s-supernatant għandu jiġi ffiltrat (0,45 µm) u għandu jiġi inkubat b'volum ugwali ta' għadd dilwit b'mod adegwat ta' antisera mas-serotipi indiġeni tal-IPNV. It-titru tal-antiserum irid jkun ta' proporzjon ta' minn tal-inqas 1:2 000 f'test ta' newtralizzazzjoni tal-plakka ta' 50 %. It-taħlita għandha tiġi inkubata għal siegħa f'temperatura ta' 15-il°C. Din għandha tirrappreżenta l-inokulu.

It-trattament tal-inokuli kollha b'antiserum għall-vajrus tan-nekrożi pankreatika infettiva (vajrus li f'xi partijiet tal-Ewropa jfeġġ f'50 % tal-kampjuni tal-ħut) jimmira li ma jippermettix li l-effett ċitopatiku (CPE) ikkawżat mill-vajrus tal-IPN jiżviluppa fil-kolturi inokulati taċ-ċelloli. Dan it-trattament jista' jitwettaq sabiex jitnaqqas it-tul ta' żmien tal-eżaminazzjonijiet viroloġiċi kif ukoll tan-numru ta' każijiet li fihom l-okkorrenza ta' CPE jkollha titqies li hija potenzjalment indikattiva għall-ISAV. Meta l-kampjuni jiġu minn unitajiet tal-produzzjoni, li jitqiesu li huma ħielsa mill-IPN, it-trattament tal-inokuli b'antiserum għall-vajrus tal-IPN jista' ma jsirx.

II.2.2. L-inokulazzjoni fuq il-koltura taċ-ċelloli

Iċ-ċelloli tal-kliewi tas-salamun tal-Atlantiku (ASK) għandhom jintużaw għall-iżolament primarju tal-ISAV. Jistgħu jintużaw linji ta' ċelloli oħra ta' effikaċja u ta' sensittività bil-provi għall-iżolament tal-ISAV, fejn titqies l-varjabbiltà tal-varjetà tal-vajrus u fejn titqies il-kapaċità ta' varjetajiet differenti li jirreplikaw f'linji differenti ta' ċelloli. Iċ-ċelloli tal-ASK jidhru li jappoġġaw l-iżolament u t-tkabbir tal-iżolati tal-vajrus li huma magħrufa, diment li jintuża livell ta' vajrus li ma tantx jinxtered. Jista' jirriżulta effett ċitopatiku (CPE) iktar distint fiċ-ċelloli tal-ASK milli f'linji ta' ċelloli suxxettibbli oħra bħal SHK-1 (il-pronefru-1 tas-salamun).

Iċ-ċelloli tal-ASK (livell ta' tixrid ta' 65 jew iktar baxx) għandhom jiġu mkabbra f'medium L-15 li jkun fih 10 % ta' serum tal-fetu tal-bovini, 2 % (vol:vol) ta' 200 nM ta' L-glutamina u 0,08 % (vol/vol) ta' 50 mM ta' 2-merkaptoetanol fi pjastri bi bwejriet multipli. Is-sospensjoni tal-organi ttrattati bl-antibijotiċi għandha tiġi inokulata f'kolturi taċ-ċelloli li jkunu żgħar fl-età u li jkunu qegħdin jikbru b'mod attiv sabiex tirriżulta f'proporzjon ta' dilwizzjoni finali ta' materjal tat-tessut u medium għall-koltura taċ-ċelloli ta' 1:1 000. Għal kull organu, għandha tiżdied sospensjoni ta' 40 µl ta' inokulu fi bwejra waħda li jkun fiha 2 ml ta' medium għall-koltura taċ-ċelloli. Sabiex jitnaqqas ir-riskju ta' kontaminazzjoni kroċjata, għandhom jintużaw pjastri separati bi 12-il bwejra jew b'24 bwejra għall-kampjuni minn siti differenti ta' farms tal-ħut.

Pjastra waħda għandha titħalla mhux inokulata biex isservi ta' kontroll negattiv. Pjastra separata għandha tiġi inokulata b'iżolat ta' referenza tal-ISAV biex isservi ta' kontroll pożittiv, kif ġej. Mitt µl ta' tħejjija ta' stokk tal-ISAV (titru minimu ta' 10^7 ta' doża infettiva ta' koltura tat-tessut fil-punt tat-tmiem ta' 50 % (TCID50 ml^{-1})) għandhom jiġu inokulati fl-ewwel bwejra u għandhom jiġu mħallta. Volum ta' dan il-materjal għandu jiġi ttrasferit mill-ewwel bwejra għat-tieni bwejra sabiex tinkiseb dilwizzjoni ta' 1:10 u għandu jiġi mħallat. Dan għandu jkun ripetut fil-pjastra kollha sabiex jinkisbu għaxar dilwizzjonijiet ta' 1:10. L-istokk tal-ISAV jista' jinħażen f'temperatura ta' – 80 °C għal minn tal-inqas sentejn iżda ladarba jitħalla jinħall irid jintuża fi żmien tlett ijiem. Għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata tal-pjastri tat-testijiet b'materjal tal-kontroll pożittiv. Sabiex jiġi evitat dak ir-riskju, il-kontrolli pożittivi għandhom jitħejjew u jintużaw b'mod separat mill-pjastri tat-testijiet. Test tas-sensittività taċ-ċelloli tal-ASK fil-konfront tal-iżolati tal-ISAV, li jitwettaq kull sitt xhur, jista' jissostitwixxi l-użu tal-inklużjoni ta' kontroll pożittiv f'kull inokulazzjoni.

Il-kampjuni għandhom jiġu inkubati f'temperatura ta' 15 ± 2 °C għal mhux iktar minn 15-il jum. Billi jintuża mikroskopju, il-kolturi taċ-ċelloli għandhom jiġu eżaminati darbtejn għal CPE, għal bejn ħamest ijiem u sebat ijiem u bejn 12-il jum u 14-il jum wara l-inokulazzjoni. Jekk kwalunkwe għadd juri li hemm CPE, il-proċeduri ta' identifikazzjoni tal-vajrus għandhom jinbdew minnufih f'konformità mal-punt II.2.4. Jekk ma jiġi osservat l-ebda CPE sal-14-il jum, għandu jitwettaq test indirett ta' antikorpi fluworexxenti (IFAT), test ta' emadsorbiment jew test ta' RT-PCR.

II.2.3. Is-sottokoltivazzjoni

Is-sottokoltivazzjoni għandha titwettaq bejn it-13-il jum u l-15-il jum. Is-supernatant ta' koltura għandu jiġi miżjud fil-bwejriet li jkun fihom ċelloli friski li qegħdin jikbru b'mod attiv f'dilwizzjoni xierqa (1/10) fi pjastri bi bwejriet multipli u għandu jiġi inkubat f'temperatura ta' 14 ± 2 °C għal mhux iktar minn 18-il jum. Billi jintuża mikroskopju, il-kolturi taċ-ċelloli għandhom jiġu eżaminati darbtejn għal CPE, għal bejn ħamest ijiem u sebat ijiem u bejn 14-il jum u 18-il jum wara l-inokulazzjoni. Jekk kwalunkwe għadd juri li hemm CPE, il-proċeduri ta' identifikazzjoni tal-vajrus għandhom jinbdew minnufih f'konformità mal-punt II.2.4. Jekk ma jiġi osservat l-ebda CPE sa bejn l-14-il jum u t-18-il jum, għandu jitwettaq test ta' emadsorbiment jew test ta' RT-PCR.

Jekk iċ-ċitotossiċità tfeġġ fl-ewwel sebat ijiem tal-inkubazzjoni, is-sottokoltivazzjoni għandha titwettaq f'dak l-istadju, u ċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati għal bejn 14-il jum u 18-il jum u mbagħad għandhom jerġgħu jiġu sottokoltivati b'perjodu ulterjuri ta' inkubazzjoni ta' bejn 14-il jum u 18-il jum. Jekk iċ-ċitotossiċità tfeġġ wara sebat ijiem, is-sottokoltivazzjoni għandha titwettaq darba u ċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati sabiex jinkiseb il-perjodu totali ta' inkubazzjoni ta' bejn 28 jum u 36 jum mill-inokulazzjoni primarja.

Jekk il-kontaminazzjoni batterika tfeġġ fil-koltura primarja, it-test għandu jerġa' jsir billi jintuża l-omoġenat tat-tessut li jinħażen f'temperatura ta' – 80 °C. Qabel l-inokulazzjoni, l-omoġenat tat-tessut għandu jiġi ċċentrifugat f'4 000 × *g* għal bejn 15-il minuta u 30 minuta f'temperatura ta' bejn 0 °C u 6 °C u s-supernatant għandu jiġi ffiltrat f'0,22 µm. Jekk il-kontaminazzjoni batterika tfeġġ matul il-pass tas-sottokoltivazzjoni, is-supernatant għandu jiġi ffiltrat f'0,22 µm, għandu jiġi inokulat f'ċelloli friski u għandu jiġi inkubat għal perjodu ulterjuri ta' bejn 14-il jum u 18-il jum.

II.2.4. It-testijiet għall-identifikazzjoni tal-vajrus

Jekk tiġi osservata evidenza ta' CPE fi kwalunkwe stadju, jew jekk test tal-emadsorbiment ikun pożittiv, għandha titwettaq l-identifikazzjoni tal-vajrus. Il-metodi tal-għażla għall-identifikazzjoni tal-ISAV għandhom ikunu r-RT-PCR f'konformità mal-punt II.1 u l-Immunofluworexxenza (IF) f'konformità mal-punt II.2.6. Jekk jitqies li vajrusijiet oħra jistgħu jkunu preżenti, għandhom jitwettqu testijiet supplimentari għall-identifikazzjoni tal-vajrus. Jekk dawk it-testijiet ma jkunux irriżultaw f'identifikazzjoni definittiva tal-vajrus fi żmien ġimgħa, is-supernatant għandu jintbagħat minnufih għall-identifikazzjoni għand:

(a) il-laboratorju ta' referenza tal-Organizzazzjoni Dinjija għas-Saħħa tal-Annimali (OIE) għall-ISA, jew;

(b) laboratorju nazzjonali ta' referenza jew il-laboratorju ta' referenza tal-UE għall-mardiet tal-ħut kif imsemmi fl-Anness VI tad-Direttiva 2006/88/KE.

II.2.5. L-emadsorbiment

Peress li r-replikazzjoni tal-ISAV fil-kolturi taċ-ċelloli mhux dejjem tirriżulta f'CPE, kull bwejra għandha tkun soġġetta għal test tar-RT-PCR jew għal test ta' emadsorbiment f'konformità ma' dan il-punt, jew għal test ta' IF f'konformità mal-punt II.2.6.

Il-medium għall-kolturi taċ-ċelloli għandu jitneħħa minn kull bwejra, inklużi dawk ta' kontrolli pożittivi u negattivi, u għandu jitpoġġa f'tubi sterili ttikkettati. 500 µl ta' 0,2 % (vol:vol) ta' sospensjoni taċ-ċelloli ħomor maħsula tad-demm tal-fniek jew taż-żwiemel, jew 0,05 % (vol:vol) ta' sospensjoni taċ-ċelloli ħomor maħsula tad-demm tat-trota qawsalla jew tas-salamun tal-Atlantiku, għandhom jiġu miżjuda f'kull bwejra u għandhom jiġu inkubati f'temperatura ambjentali għal 45 minuta. Iċ-ċelloli ħomor tad-demm għandhom jitneħħew u kull bwejra għandha tiġi maħsula darbtejn b'medium L-15. Kull bwejra għandha tiġi eżaminata billi jintuża mikroskopju.

Il-preżenza ta' raggruppamenti ta' ċelloli ħomor tad-demm li jkun qegħdin jithemżu mal-wiċċ taċ-ċelloli tal-ASK għandha tkun indikattiva ta' infezzjoni preżuntiva b'ortomiksovajrus. Jekk test ta' emadsorbiment ikun pożittiv, għandu jitwettaq test għall-identifikazzjoni tal-vajrus minnufih f'konformità mal-punt II.2.4.

II.2.6. L-immunofluworexxenza (IF)

Iċ-ċelloli tal-ASK (livell ta' tixrid ta' 65 jew iktar baxx) għandhom jiġu mkabbra f'medium L-15 li jkun fih 10 % ta' serum tal-fetu tal-bovini, 2 % (vol:vol) ta' 200 nM ta' L-glutamina u 0,08 % (vol:vol) ta' 50 mM ta' 2-merkaptoetanol fi pjastri bi bwejriet multipli u għandhom jintużaw f'konfluwenza li tkun ikbar minn 50 %. Jistgħu jintużaw ukoll linji ta' ċelloli oħra jew medium ieħor ta' tkabbir ta' effikaċja bil-provi. 225 µl ta' supernatant ta' koltura taċ-ċelloli infettat b'vajrus putattiv għandhom jiġu miżjuda u jiġu mħallta ma' kull waħda miż-żewġ bwejriet, u 225 µl għandhom jiġu ttrasferiti f'żewġ bwejriet oħra, jiġifieri dilwizzjoni ta' 1:5. Żewġ bwejriet addizzjonali għandhom jitħallew mhux inokulati sabiex jaġixxu ta' kontrolli. Il-kampjuni minn kull sit fejn hemm farm tal-ħut għandhom jintużaw fuq pjastri separati, u l-istess għandu jsir għall-kontroll tal-vajrus. Kontroll tal-vajrus għandu jiġi stabbilit billi jintuża iżolant ta' referenza tal-ISAV.

Il-pjastri għandhom jiġu inkubati f'temperatura ta' 14 ± 2 °C u għandhom jiġu eżaminati mikroskopikament għal mhux iktar minn sebat ijiem. Meta jiġi osservat CPE bikri, jew jekk l-ebda CPE ma jiġi osservat fi żmien sebat ijiem, il-pass li jmiss għandu jkun it-twaħħil. Il-bwejriet għandhom jinħaslu b'soluzzjoni ta' melħ immewta bil-fosfat (PBS) u għandhom jitwaħħlu permezz tal-inkubazzjoni bi 80 % aċetun għal 20 minuta f'temperatura ambjentali. Il-pjastri għandhom jitnixxfu bl-arja u għandhom jiġu mtebbgħin minnufih jew jinħażnu f'temperatura ta' bejn 0 °C u 6 °C għal mhux iktar minn 24 siegħa qabel ma jiġu mtebbgħin.

Il-bwejriet irreplikati għandhom jiġu mtebbgħin b'taħlita ta' antikorpi monoklonali (MAb) 3H6F8 u 1OC9F5 kontra l-ISAV, jew MAb oħra ta' effikaċja u speċifiċità bil-provi, dilwiti f'PBS u inkubati f'temperatura ta' 37 ± 4 °C għal 30 minuta. L-MAb għandhom jitneħħew u l-pjastri għandhom jinħaslu tliet darbiet b'0,05 % Tween 20 f'PBS. Il-konjugat tal-isotijoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) kontra l-immunoglobulina tal-ġrieden dilwit f'PBS għandu jiġi miżjud f'kull bwejra u għandu jiġi inkubat f'temperatura ta' 37 ± 4 °C għal 30 minuta. Id-dilwizzjonijiet ta' lottijiet differenti ta' MAb u tal-konjugat tal-FITC għandhom jiġu ottimizzati f'kull laboratorju. L-antikorp għandu jitneħħa u l-pjastri għandhom jinħaslu tliet darbiet b'0,05 % Tween 20 f'PBS.

Il-bwejriet għandhom jiġu eżaminati minnufih billi jintuża mikroskopju invertit imħejji għall-mikroskopija fluworexxenti b'filtru adattat għall-istimulazzjoni tal-FITC. Test għandu jitqies li huwa pożittiv jekk jiġu osservati ċelloli fluworexxenti. Sabiex test ikun validu, il-kontrolli pożittivi għandhom jirriżultaw pożittivi u l-kontrolli negattivi għandhom jirriżultaw negattivi.

II.3. L-eżaminazzjoni ta' tessuti oħra

It-teknika msemmija fil-punt II.2.6 tista' tiġi applikata għal tessuti oħra tal-ħut bħal fwied, il-milsa u l-qalb diment li kwantità raġonevoli ta' ċelloli endoteljali, lewkoċiti jew linfoċiti jkunu jistgħu jiġu ddepożitati fuq is-slajd. Il-proċedura tat-titbigħ għandha tibqa' l-istess għal kull tessut, għalkemm għal xi tessuti jista' jkun preferibbli li jiġi eskluż it-titbigħ bil-jodur tal-propidju, u tintuża l-illuminazzjoni f'fażijiet sabiex jiġu identifikati t-tipi taċ-ċelloli li jkunu preżenti fil-marka.

II.4. L-istoloġija

Is-sezzjonijiet integrati fil-paraffina għandhom jinqatgħu f'5 µm u għandhom jiġu mtebbgħin bl-ematossilina u bl-eosina.

Il-bidliet istoloġiċi fis-salamun tal-Atlantiku li jkun klinikament marid huma varjabbli, iżda jistgħu jinkludu dawn li ġejjin:

(a) bosta eritroċiti fis-sinus venuż ċentrali u fil-kapillari lamellari tal-garġi, li fihom jistgħu jifformaw it-trombusijiet tal-eritroċiti;

(b) tbenġil jew nekrożi tal-epatoċiti multifokali għal konfluwenti jew it-tnejn li huma f'ċerta distanza minn oħra ikbar fil-fwied; akkumulazzjoni multifokali tal-eritroċiti f'sinusojdi epatiċi dilatati;

(c) akkumulazzjoni ta' eritroċiti f'važi tad-demm tal-lamina propria intestinali u eventwalment emorraġija fil-lamina propria;

(d) stroma minfuħa tal-milsa bl-akkumulazzjoni tal-eritroċiti;

(e) emorraġija interstizzjali diffuża kemxejn multifokali għal estensiva b'nekrożi tubulari fejn hemm l-emorraġija, u akkumulazzjoni tal-eritroċiti fil-glomeruli tal-kliewi;

(f) eritrofagoċitożi fil-milsa u emorraġiji sekondarji fil-fwied u fil-kliewi.

II.5. L-immunoistokimika (IHC)

L-antikorp poliklonali kontra n-nukleoproteina tal-ISAV għandu jintuża fuq sezzjonijiet integrati fil-paraffina minn tessut fiss fil-formalin. L-organi li jridu jiġu eżaminati għandhom ikunu nofs il-kilwa u l-qalb (l-parti tranżizzjonali li tinkludi t-tliet kompartimenti kollha u l-valvoli kollha). Il-każijiet suspettati minħabba sinjali patoloġiċi għandhom jiġu vverifikati b'IHC pożittiva. Is-sezzjonijiet istoloġiċi għandhom jitħejjew f'konformità mal-metodi standard.

(1) It-tħejjija tas-sezzjonijiet tat-tessut

It-tessuti għandhom jitwaħħlu f'10 % formalin immewwet b'fosfat newtrali għal minn tal-inqas jum, għandhom jiġu diżidratati f'serje ta' etanol iggradat, għandhom jiġu ċċarati fil-ksilen u għandhom jiġu integrati fil-paraffina, skont il-protokolli standard. Is-sezzjonijiet bi ħxuna ta' madwar ħames μm (għall-IHC imqiegħda fuq slajds miksija b'poli-L-liżina) għandhom jissaħħnu f'temperatura ta' bejn 56 °C u 58 °C (massimu ta' 60 °C) għal 20 minuta, ix-xama' għandha titneħħielhom bil-ksilen, għandhom jiġu idratati mill-ġdid b'serje ta' etanol iggradat u għandhom jiġu mtebbgħin bl-ematossilina u bl-eosina għall-patomorfoloġija u għall-IHC f'konformità mal-punt (2).

(2) Il-proċedura tat-titbigħ għall-IHC

L-inkubazzjonijiet kollha għandhom jitwettqu f'temperatura ambjentali fuq pjattaforma li titbandal, sakemm ma jiġix previst mod ieħor f'din id-deċiżjoni:

(a) l-irkupru tal-antiġen għandu jsir billi s-sezzjonijiet jitgħallew f'0,1 M ta' soluzzjoni mewwieta taċ-ċitrat b'pH ta' 6,0 għal 2 × 6 minuti segwit minn imblukkar b'5 % ħalib niexef mhux xaħmi u 2 % serum tal-mogħoż f'50 mM ta' TBS (TBS; Tris/HCI 50 mM, NaCl 150 mM, pH ta' 7,6) għal 20 minuta;

(b) imbagħad, is-sezzjonijiet għandhom jiġu inkubati għal lejla b'antikorp primarju (antikorp monospeċifiku tal-fniek kontra n-nukleoproteina tal-ISAV) dilwit fit-TBS b'1 % ħalib niexef mhux xaħmi, segwit minn tliet ħasliet fit-TBS b'0,1 % Tween 20;

(c) għas-sejba ta' antikorpi mgħaqda, is-sezzjonijiet għandhom jiġu inkubati b'antikorpi kkonjugati bil-fosfataži alkalina ma' immunoglobulina tal-fniek għal 60 minuta. Wara ħasla finali, għandhom jiġu miżjuda Fast Red (1 mg ml^{-1}) u fosfat tan-Naphthol AS-MX (0,2 mg ml^{-1}) ma' 1 mM ta' Levamisole f'0,1 M ta' TBS (pH ta' 8,2) sabiex jiżviluppaw għal 20 minuta. Imbagħad, is-sezzjonijiet għandhom jinħaslu fl-ilma tal-vit qabel il-kontrotitbigħ bl-ematossilina Harris u għandhom jiġu mmuntati f'medium milwiemi ta' mmuntar. Is-sezzjonijiet tat-tessut pożittivi għall-ISAV u dawk negattivi għall-ISAV għandhom jiġu inklużi f'kull muntaġġ sabiex jaġixxu ta' kontrolli.

(3) L-interpretazzjoni tar-riżultat tal-IHC

L-interpretazzjoni tar-riżultat tat-test tal-IHC għandha tkun kif stipulat fil-punti (a) u (b):

(a) meta jiġi osservat li s-sezzjonijiet ta' kontroll ikollhom titbigħ taċ-ċelloli endoteljali fil-važi tad-demm tal-endokardju, li jkun ċitoplażmiku u intranukleari, li jkun viżibbli b'mod ċar u li jkun ta' lewn aħmar (ħamrani), is-sezzjonijiet ta' kontroll għandhom jitqiesu pożittivi. Sezzjoni ta' kampjun tat-test għandha titqies pożittiva biss jekk jinstab dan it-tip ta' titbigħ aħmar intranukleari u ċar taċ-ċelluli endoteljali;

(b) is-sezzjonijiet ta' kontroll għandhom jitqiesu negattivi jekk ma jkollhom l-ebda reazzjoni ta' kulur.

Ladarba l-lokalizzazzjoni intranukleari tkun partikolari għan-nukleoproteina tal-ortomiksovajrus matul stadju tar-replikazzjoni virali iżda t-titbigħ ċitoplażmiku parallel sikwit ikun dominanti, il-mudelli ċitoplażmiċi u oħra ta' titbigħ mingħajr lokalizzazzjoni intranukleari għandhom jitqiesu mhux speċifiċi jew mhux konklużivi.

L-iktar reazzjonijiet pożittivi u b'saħħithom ta' titbigħ, is-soltu jinkisbu fiċ-ċelloli endoteljali tal-qalb u tal-kliewi. Ir-reazzjonijiet tat-titbigħ endoteljali f'leżjonijiet emorraġiċi estensivi ħafna jistgħu jkunu kemxejn preżenti jew assenti, possibbilment minħabba liżi taċ-ċelloli endoteljali infettati.

PARTI 4

IL-METODI U L-PROĊEDURI DIJANJOSTIĊI DDETTALJATI GĦAS-SORVELJANZA U GĦALL-KONFERMA TA' INFEZZJONI BIL-*MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati għad-dijanjożi ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens***

Meta teħid ta' kampjuni u eżaminazzjoni fil-laboratorju jitwettqu għall-fini li jinkiseb jew li jinżamm status tas-saħħa fir-rigward ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens* kif stipulat fit-Taqsima I tal-Parti 4 tal-Anness I, jew għall-konferma jew għall-esklużjoni tal-preżenza ta' dik il-marda elenkata f'konformità mal-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE, bil-metodi dijanjostiċi stipulati fit-Taqsima II tal-Parti 4 tal-Anness I, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-punti I.1, I.2 u I.3 ta' din il-Parti.

I.1. Il-proċedura tat-teħid ta' kampjuni

It-teħid ta' kampjuni ta' molluski individwali miftuħin jew li għadhom kif mietu għandu jsir skont il-prijorità, sabiex jiżdied iċ-ċans li jinstabu annimali infettati.

Ladarba jittieħdu kampjuni tagħhom, il-gajdri jew il-maskli għandhom jinżammu f'temperatura ta' 4 °C jew fuq silġ refriġerat għal mhux iktar minn 24 siegħa jekk il-kampjuni jkunu jinkludu molluski miftuħin u għal mhux iżjed minn 72 siegħa jekk le, f'basket tal-plastik li jinkludi tikketta bid-dettalji relatati man-natura u mal-oriġini tal-gajdri jew tal-maskli. Il-molluski miftuħin jew li għadhom kif mietu għandhom jinżammu b'mod separat mill-molluski l-oħra.

Għandha tintuża sezzjoni ta' tessuti bi ħxuna ta' bejn tliet millimetri u ħames millimetri, inklużi tessut tal-garġi u tal-qalb, għad-dijanjożi tal-*Marteilia refringens* permezz tal-istoloġija. Għandha tintuża biċċa glandola diġestiva għal xi testijiet, inklużi l-marki u r-reazzjoni katina bil-polimeraży (PCR).

I.2. It-tekniki mikroskopiċi

I.2.1. Iċ-ċitoloġija (ċitoloġija tal-marki)

Wara li jitnixxfu t-tessuti tal-glandola diġestiva fuq il-karti li jkollhom kapaċità ta' assorbiment, għandhom isiru diversi marki fuq slajd tal-ħġieġ. Is-slajds għandhom jitnixxfu bl-arja, għandhom jitwaħħlu fil-metanol jew fl-etanol assolut u għandhom jiġu mtebbgħin billi jintuża kit kummerċjalment disponibbli għat-titbigħ tad-demm bħal Diff-Quik®/Hemacolor®, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Wara li jitlaħalħu fl-ilma tal-vit u jitnixxfu, is-slajds għandhom jiġu mmuntati b'għotjien billi tintuża reżina sintetika xierqa. Is-slajds għandhom l-ewwel jiġu osservati bi tkabbir ta' ×200 u mbagħad għandhom jiġu osservati mgħaddsin fiż-żejt bi tkabbir ta' × 1 000.

Riżultat pożittiv għandu jkun l-osservazzjoni ta' ċelloli ta' daqs li jvarja bejn 30 μm u sa massimu ta' 40 μm. Iċ-ċitoplażma ttebba' b'mod bażofiliku, filwaqt li n-nukleu jtebba' b'mod eosinofiliku. Ġew osservati tbajja' pallidi madwar xifer il-korpi (refrattarji) kbar u mtebbgħin ħafna u, f'ċelloli akbar, ġew osservati arranġamenti ta' ċellola f'ċellola.

It-teknika mhijiex speċifika għal speċi parassita.

I.2.2. L-istoloġija

Is-sezzjonijiet ta' tessut li jinkludu l-garġi, il-glandola diġestiva, il-mantell u l-gonad għandhom jitwaħħlu għal minn tal-inqas 24 siegħa fis-sustanza li twaħħal ta' Davidson, segwiti minn ipproċessar normali għall-istoloġija u t-titbigħ tal-paraffina, pereżempju bl-ematossilina u bl-eosina. L-osservazzjonijiet għandhom isiru bi tkabbir li jibqa' jiżdied sa × 1 000.

Riżultat pożittiv għandu jkun l-osservazzjoni ta' ċelloli ta' daqs li jvarja bejn 4 μm sa massimu ta' 40 μm. L-istadji bikrin jikkonsistu f'ċelloli multinukleati, minn sferiċi sa mtawla. Dawn jinstabu primarjament fl-epitelju tal-esofagu u fl-istonku u xi kultant fil-palpi labjali. L-isporulazzjoni tinvolvi d-diviżjonijiet ta' ċelloli fi ħdan iċ-ċelloli u sseħħ fit-tubuli u fil-kanali tal-glandola diġestiva. Il-korpi refrattarji jfeġġu matul l-isporulazzjoni, iżda ma jiġux osservati fl-istadji bikrin. Fil-fażijiet aħħarija ta' infezzjoni, l-isporanġji jiġu osservati li jkunu ħielsa fil-lumen tal-kanal diġestiv. Iċ-ċitoplażma ttebba' b'mod basofiliku, filwaqt li n-nukleu jtebba' b'mod eosinofiliku. Il-korpi jistgħu jvarjaw minn oranġjo skur għal aħmar skur.

It-teknika mhijiex speċifika għall-ispeċijiet parassita.

I.3. It-tekniki molekolari

I.3.1. L-estrazzjoni tad-DNA

Id-DNA għandu jiġi estratt skont il-proċeduri standard.

Jistgħu jintużaw kits għall-estrazzjoni tad-DNA li huma kummerċjalment disponibbli u li s-soltu jipproduċu DNA ta' kwalità għolja li jkun adattat biex jintuża mal-protokolli ta' PCR, kif deskritt fil-punt I.3.2.

I.3.2. *Ir-reazzjoni katina bil-polimeraży* (*PCR*)

Ġew żviluppati u ġew ippubblikati diversi protokolli ta' PCR.

Għandhom jintużaw primers ta' PCR li jimmiraw għar-reġjun tal-ispazjatur intern traskritt (ITS1) peress li kapaċi jamplifikaw biss il-*M. refringens*.

Il-PCR għandha titwettaq f'volum ta' 50 µl. It-taħlitiet PCR għandhom jinkludu soluzzjoni mewwieta (500 mM ta' KCl, 100 mM ta' Tris/HCl [pH ta' 9,0 f'25 °C] u 1 % Triton® X-100), 2,5 mM ta' MgCl2, taħlita ta' 0,2 mM ta' dNTP, 1 µM ta' primers 'il quddiem u ta' primers lura, 0,02 unitajiet ta' μl^{-1} ta' polimeraży tad-DNA Taq, u bejn 10 ng u 100 ng ta' DNA estratt. Wara d-denaturazzjoni tad-DNA f'temperatura ta' 94 °C għal ħames minuti, għandhom jitwettqu 30 ċiklu kif ġej: denaturazzjoni f'temperatura ta' 94 °C għal minuta, rikottura f'temperatura ta' 55 °C għal minuta u elongazzjoni f'temperatura ta' 72 °C għal minuta, għal kull kilo ta' koppja tal-bażi. Għandu jitwettaq pass finali ta' elongazzjoni ta' għaxar minuti f'temperatura ta' 72 °C. Għas-sejba ta' *M. refringens*, il-PCR għandha titwettaq bi primers li jimmiraw għar-reġjun tal-ITS1 (b'elongazzjoni ta' 5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ u b'elongazzjoni ta' 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Il-kontrolli pożittivi għandhom jikkonsistu f'DNA ġenomiku minn ospitant infettat ħafna jew minn DNA plażmidiku li jinkludi r-reġjun fil-mira.

Il-kontrolli negattivi għandhom jikkonsistu f'DNA ġenomiku minn ospitanti mhux infettati u minn reattivi ta' PCR mingħajr DNA fil-mira.

Riżultat pożittiv għandu jkun l-amplifikazzjoni pożittiva tal-PCR fid-daqs mistenni (412bp), bil-kontrolli negattivi kollha jkunu negattivi u bil-kontrolli pożittivi kollha jkunu pożittivi.

I.3.3. L-ibridizzazzjoni in situ (ISH)

Ġew żviluppati u ġew ippubblikati diversi protokolli ta' ISH.

Għandha tintuża sonda li timmira għall-SSU tal-kumpless tal-ġeni tar-rRNA, minħabba li tkun ġiet ivvalidata skont l-istoloġija.

Is-sezzjonijiet ta' tessut li jinkludu l-garġi u l-glandola diġestiva, għandhom jitwaħħlu għal minn tal-inqas 24 siegħa fis-sustanza li twaħħal ta' Davidson, segwit minn ipproċessar normali għall-istoloġija tal-paraffina. Għandhom jinqatgħu sezzjonijiet ta' 5 µm u għandhom jitpoġġew fuq slajds miksija bl-aminoalkilsilan, li mbagħad għandhom jinħmew għal lejla f'forn f'temperatura ta' 40 °C. Ix-xama' għandha titneħħa mis-sezzjonijiet billi jiġu mgħaddsa fil-ksilen għal għaxar minuti. Dan il-pass għandu jiġi ripetut darba u mbagħad is-solvent għandu jiġi eliminat billi jiġi mgħaddas f'żewġ banjijiet suċċessivi ta' etanol assolut għal għaxar minuti kull banju. Imbagħad, is-sezzjonijiet għandhom jiġu diżidratati billi jiġu mgħaddsa f'serje ta' etanol iggradat. Is-sezzjonijiet għandhom jiġu ttrattati bi proteinaży K (100 µg ml–1) f'soluzzjoni mewwieta TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) f'temperatura ta' 37 °C għal 30 minuta. Is-slajds għandhom jiġu diżidratati billi jiġu mgħaddsa f'serje ta' etanol iggradat u mbagħad jitnixxfu bl-arja. Is-sezzjonijiet għandhom jiġu inkubati b'100 µl ta' soluzzjoni mewwieta tal-ibridizzazzjoni (4 × ta' SSC [soluzzjoni standard taċ-ċitrat tal-melħ], 50 % formamid, 1 × ta' soluzzjoni ta' Denhardt, 250 µg ml–1 ta' ħmira tat-tRNA, 10 % sulfat tad-dextran) li jkun fih 10 ng (1 µl tar-reattivi ta' PCR imħejjija kif deskritt fil-punt I.3.2 billi jintużaw il-primers CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG u TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) tas-sonda ttikkettata bid-digossiġenina. Is-sezzjonijiet għandhom jitgħattew b'għotjien tal-plastik *in situ* u għandhom jitpoġġew fuq blokka tat-tiskin f'temperatura ta' 95 °C għal ħames minuti. Imbagħad, is-slajds għandhom jitkessħu fuq is-silġ għal minuta qabel l-ibridizzazzjoni għal lejla f'temperatura ta' 42 °C f'kompartiment umduż. Is-sezzjonijiet għandhom jinħaslu darbtejn għal ħames minuti f'2 × SSC f'temperatura ambjentali, u darba għal għaxar minuti f'0,4 × SSC f'temperatura ta' 42 °C. Il-passi tas-sejba għandhom jitwettqu skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Imbagħad, is-slajds għandhom jitlaħalħu f'ilma distillat u sterili (dH2O). Is-sezzjonijiet għandhom jiġu kontromtebbgħin bil-Bismarck Brown Yellow, għandhom jiġu mlaħalħa f'dH2O, u għandhom jiġu applikati fuqhom għotjien billi jintuża medium milwiemi ta' mmuntar.

Il-kontrolli pożittivi u negattivi għandhom ikunu sezzjonijiet minn ospitanti infettati u mhux infettati li jkunu magħrufa, rispettivament.

Riżultat pożittiv għandu jintwera permezz ta' tikkettar iswed fil-vjola taċ-ċelloli tal-*M. refringens* fit-tessuti fil-mira li jkunu magħrufa, bil-kontrolli negattivi kollha jkunu negattivi u l-kontrolli pożittivi kollha jkunu pożittivi.

I.3.4. Is-sekwenzar

Is-sekwenzar għandu jitwettaq bħala wieħed mill-passi finali għall-proċedura dijanjostika konfermatorja. Ir-reġjuni fil-mira huma l-SSU rDNA u l-ITS1.

II. **Il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati għas-sorveljanza u għall-konferma ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens***

Għall-fini tal-programmi ta' sorveljanza u sabiex tiġi kkonfermata l-preżenza ta' infezzjoni bil-*Marteilia refringens* jew jiġi eskluż suspett ta' dik il-marda elenkata, f'konformità mar-rekwiżiti stipulati fit-Taqsima II tal-Parti 4 tal-Anness I, il-metodi dijanjostiċi u l-proċeduri korrispondenti li jridu jintużaw għandhom ikunu konformi mal-linji gwida stipulati fit-Tabella 4.1 kif ġej:

It-Tabella 4.1

Il-linji gwida għall-użu tal-metodi dijanjostiċi għall-programmi ta' sorveljanza u sabiex jiġu kkonfermati jew jiġu eskluži infezzjoni bil-*Marteilia refringens*

Il-metodu	Is-sorveljanza attiva	Id-dijanjożi preżuntiva	Id-dijanjożi konfermatorja
Il-marki tal-glandola diġestiva	X	X	X, jew
L-istopatoloġija	X		X, jew
L-ibridizzazzjoni *in situ*			X, u
Il-PCR	X	X	X, u
Is-sekwenzar			X

PARTI 5

IL-METODI U L-PROĊEDURI DIJANJOSTIĊI DDETTALJATI GĦAS-SORVELJANZA U GĦALL-KONFERMA TA' INFEZZJONI BIL-*BONAMIA OSTREAE*

I. **Il-proċeduri għad-dijanjożi ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae***

Meta teħid ta' kampjuni u eżaminazzjoni fil-laboratorju jitwettqu għall-fini li jinkiseb jew li jinżamm ċertu status tas-saħħa fir-rigward tal-*Bonamia ostreae* kif stipulat fit-Taqsima I tal-Parti 5 tal-Anness I jew għall-konferma jew għall-esklużjoni tal-preżenza ta' dik il-marda elenkata f'konformità mal-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE, bil-metodi dijanjostiċi stipulati fit-Taqsima II tal-Parti 5 tal-Anness I, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-punti I.1, I.2 u I.3 li ġejjin.

I.1. Il-proċess tal-kampjun

It-teħid ta' kampjuni ta' molluski individwali miftuħin jew li għadhom kif mietu għandu jsir skont il-prijorità, sabiex jiżdied iċ-ċans li jinstabu annimali infettati.

Ladarba jittieħdu kampjuni tagħhom, il-gajdri għandhom jinżammu f'temperatura ta' 4 °C jew fuq silġ refriġerat għal mhux iktar minn 24 siegħa jekk il-kampjuni jkunu jinkludu molluski miftuħin u għal 72 siegħa jekk le, f'basket tal-plastik li jinkludi tikketta bid-dettalji relatati man-natura u mal-oriġini tal-gajdri. Il-molluski miftuħin jew li għadhom kif mietu għandhom jinżammu b'mod separat mill-molluski l-oħra.

Għandha tintuża sezzjoni ta' tessuti bi ħxuna ta' bejn tliet millimetri u ħames millimetri, inklużi tessut tal-garġi u tal-qalb, għad-dijanjożi tal-*Bonamia ostreae* permezz tal-istoloġija. Għandha tintuża biċċa glandola diġestiva għal xi testijiet, inklużi l-marki u r-reazzjoni katina bil-polimeraży (PCR).

I.2. It-tekniki mikroskopiċi

I.2.1. Iċ-ċitoloġija (ċitoloġija tal-marki)

Wara li jitnixxfu t-tessuti tal-garġi jew tal-qalb fuq il-karti li jkollhom kapaċità ta' assorbiment, għandhom isiru diversi marki fuq slajd tal-ħġieġ. Is-slajds għandhom jitnixxfu bl-arja, għandhom jitwaħħlu fil-metanol jew fl-etanol assolut u għandhom jiġu mtebbgħin billi jintuża kit kummerċjalment disponibbli għat-titbigħ tad-demm bħal Diff-Quik®/Hemacolor®.), skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Wara li jitlaħalħu fl-ilma tal-vit u jitnixxfu, is-slajds għandhom jiġu mmuntati b'għotjien billi tintuża reżina sintetika xierqa. Is-slajds għandhom l-ewwel jiġu osservati bi tkabbir ta' × 200 u mbagħad għandhom jiġu osservati mgħaddsin fiż-żejt bi tkabbir ta' ×1 000.

Riżultat pożittiv għandu jkun il-preżenza ta' organiżmi sferiċi jew ovojdi żgħar (b'wisa' ta' bejn żewġ u ħames μm) fl-emoċiti. Madankollu, il-parassita tista' tfeġġ ukoll b'mod extraċellolari. Dawn l-organiżmi juru ċitoplażma basofilika u nukleu eosinofiliku (il-kuluri jistgħu jvarjaw skont it-tebgħa li ntużat) u minħabba li jinfirxu fuq is-slajd, l-organiżmi jistgħu jidhru usa' fuq il-marki milli fuq l-eżaminazzjoni istoloġika. Jistgħu jiġu osservati ċelloli multinukleati. It-teknika mhijiex speċifika għall-ispeċijiet parassita.

I.2.2. L-istoloġija

Is-sezzjonijiet tat-tessut li jinkludu l-garġi u l-glandola diġestiva, għandhom jitwaħħlu għal perjodu ta' mill-inqas 24 siegħa fis-sustanza li twaħħal ta' Davidson, segwiti minn ipproċessar normali għall-istoloġija u għat-titbigħ tal-paraffina, pereżempju bl-ematossilina u bl-eosina. L-osservazzjonijiet għandhom isiru bi tkabbir li jibqa' jiżdied sa × 1 000.

Riżultat pożittiv għandu jkun il-preżenza ta' parassiti bħala ċelluli żgħar ħafna b'wisa' ta' bejn 2 u 5 μm fl-emoċiti jew ħielsa fit-tessut konnettiv jew fis-sajnus tal-garġi, l-imsaren u l-epitelju tal-mantell, ta' spiss assoċjati ma' reazzjoni infjammatorja intensa. Sabiex jiġi evitat kwalunkwe dubju, il-parassita għandha tiġi osservata fl-emoċita għal dijanjożi pożittiva. It-teknika mhijiex speċifika għall-ispeċijiet parassita.

I.3. It-tekniki molekolari

I.3.1. L-estrazzjoni tad-DNA

Id-DNA għandu jiġi estratt f'konformità mal-proċeduri standard.

Jistgħu jintużaw kits għall-estrazzjoni tad-DNA li huma kummerċjalment disponibbli u li s-soltu jipproduċu DNA ta' kwalità għolja li jkun adattat biex jintuża mal-protokolli ta' PCR, kif deskritt hawn taħt.

I.3.2. Ir-reazzjoni katina bil-polimeraż (PCR)

Ġew żviluppati u ġew ippubblikati diversi protokolli ta' PCR.

Jistgħu jintużaw żewġ protokolli ta' PCR li jimmiraw għas-sottounità żgħira (SSU) tar-rDNA:

(a) l-ewwel wieħed huwa PCR konvenzjonali li jamplifika diversi membri tal-Ħaplosporidji inklużi l-ispeċijiet tal-*Bonamia*. Il-primers speċifikati Bo u Boas huma b'elongazzjoni ta' 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ u b'elongazzjoni ta' 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′ rispettivament, u jamplifikaw prodott ta' 300 bp. It-taħlitiet ta' PCR għandhom jinkludu soluzzjoni mewwieta (500 mM ta' KCl, 100 mM ta' Tris/HCl [pH ta' 9,0 f'25 °C] u 1 % Triton® X-100), 2,5 mM ta' MgCl2, taħlita ta' 0,2 mM ta' dNTP, 1 μM ta' primers 'il quddiem u ta' primers lura, 0,02 unitajiet ta' μl–1 ta' polimeraż tad-DNA Taq, u 0,2 ng ta' μl–1 tal-mudell tad-DNA f'volum totali ta' 50 μl. Il-kampjuni għandhom jiġu denaturati f'termoċiklatur għal ħames minuti f'temperatura ta' 94 °C qabel ma jintbagħtu għal 30 ċiklu (f'temperatura ta' 94 °C għal minuta, ta' 55 °C għal minuta u ta' 72 °C għal minuta) segwiti minn estensjoni finali ta' għaxar minuti f'temperatura ta' 72 °C.

Il-kontrolli pożittivi għandhom jikkonsistu f'DNA ġenomiku minn ospitant infettat ħafna jew minn DNA plażmidiku li jinkludi r-reġjun fil-mira.

Il-kontrolli negattivi għandhom jikkonsistu f'DNA ġenomiku minn ospitanti mhux infettati u minn reattivi ta' PCR mingħajr DNA fil-mira.

Riżultat pożittiv għandu jkun l-amplifikazzjoni pożittiva tal-PCR fid-daqs mistenni (jiġifieri, 300 bp), bil-kontrolli negattivi kollha jkunu negattivi u bil-kontrolli pożittivi kollha jkunu pożittivi;

(b) it-tieni protokoll ta' PCR huwa assaġġ ta' SYBR®Green Real time PCR. Dan jippermetti s-sejba speċifika ta' *B. ostreae* (deskritta hawn taħt) u jista' jintuża flimkien ma' assaġġ ta' SYBR®Green Real time PCR, li jippermetti s-sejba speċifika ta' *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Il-primers BOSTRE-F (b'elongazzjoni ta' 5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) u BOSTRE-R (b'elongazzjoni ta' 5′- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) jamplifikaw prodott ta' 208 bp. It-taħlitiet ta' PCR fihom SYBR®Green Master Mix (1X), 0,3 μM ta' primer 'il quddiem u ta' primer lura, kif ukoll 200 ng ta' DNA estratt. Il-kampjuni għandhom jiġu denaturati f'Sistema ta' Sejba f'Ħin Reali għal għaxar minuti f'temperatura ta' 95 °C qabel ma jintbagħtu għal 35 ċiklu (f'temperatura ta' 95 °C għal 30 sekonda, ta' 55 °C għal 45 sekonda u ta' 72 °C għal minuta). L-analiżi tal-kurvatura tat-temperatura tat-tidwib għandha titwettaq b'żidiet fit-temperatura ta' 0,5 °C/s, li jibdew minn temperatura ta' 55 °C u jispiċċaw b'temperatura ta' 95 °C u billi tiġi rreġistrata l-fluworexxenza ma' kull bidla fit-temperatura.

Il-kontrolli pożittivi għandhom jikkonsistu f'DNA ġenomiku minn ospitant infettat ħafna jew minn DNA plażmidiku li jinkludi r-reġjun fil-mira.

Il-kontrolli negattivi għandhom jikkonsistu f'DNA ġenomiku minn ospitanti mhux infettati u minn reattivi ta' PCR mingħajr DNA fil-mira.

Riżultat pożittiv għandu jkun l-amplifikazzjoni tal-PCR pożittiva bl-eqqel temperatura unika tat-tidwib (78,25 ± 0,25 °C fil-kundizzjonijiet ippubblikati minn Ramilo et al. 2013), bil-kontrolli negattivi kollha jkunu negattivi u l-kontrolli pożittivi kollha jkunu pożittivi.

I.3.3. L-ibridizzazzjoni *in situ* (ISH)

Ġew żviluppati u ġew ippubblikati diversi protokolli ta' ISH.

Għandha tintuża sonda li timmira għall-SSU tal-kumpless tal-ġeni tar-rDNA, għalkemm intwera li din tirreaġixxi b'mod trasversali ma' xi membri oħra tal-familja tal-Ħaplosporidji.

Is-sezzjonijiet tat-tessut li jinkludu l-garġi u l-glandola diġestiva, għandhom jitwaħħlu għal perjodu ta' mill-inqas 24 siegħa fis-sustanza li twaħħal ta' Davidson, segwiti minn ipproċessar normali għall-istoloġija tal-paraffina. Għandhom jinqatgħu sezzjonijiet ta' 5 μm u għandhom jitpoġġew fuq slajds miksija bl-aminoalkilsilan, li mbagħad għandhom jinħmew għal lejla f'forn f'temperatura ta' 40 °C. Ix-xama' għandha titneħħa mis-sezzjonijiet billi jiġu mgħaddsa fil-ksilen għal għaxar minuti. Dan il-pass għandu jiġi ripetut darba u mbagħad is-solvent għandu jiġi eliminat billi jiġi mgħaddas f'żewġ banjijiet suċċessivi ta' etanol assolut għal għaxar minuti kull banju. Imbagħad, is-sezzjonijiet għandhom jiġu diżidratati billi jiġu mgħaddsa f'serje ta' etanol iggradat. Is-sezzjonijiet għandhom jiġu ttrattati bi proteinaži K (100 μg ml–1) f'soluzzjoni mewwieta TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) f'temperatura ta' 37 °C għal 30 minuta. Is-slajds għandhom jiġu diżidratati billi jiġu mgħaddsa f'serje ta' etanol iggradat u mbagħad jitnixxfu bl-arja. Is-sezzjonijiet għandhom jiġu inkubati b'100 μl ta' soluzzjoni mewwieta tal-ibridizzazzjoni (4 × ta' SSC [soluzzjoni standard taċ-ċitrat tal-melħ], 50 % formamid, 1 × ta' soluzzjoni ta' Denhardt, 250 μg ml–1 ta' ħmira tat-tRNA, 10 % sulfat tad-dextran) li jkun fih 20 ng (2 μl tar-reazzjoni ta' PCR imħejjija kif deskritt fil-punt I.3.2 billi jintużaw il-primers Bo u Boas) tas-sonda ttikkettata bid-digossiġenina. Is-sezzjonijiet għandhom jitgħattew b'għotjien tal-plastik *in situ* u għandhom jitpoġġew fuq blokka tat-tisħin f'temperatura ta' 95 °C għal ħames minuti. Imbagħad, is-slajds għandhom jitkessħu fuq is-silġ għal minuta qabel l-ibridizzazzjoni għal lejla f'temperatura ta' 42 °C f'kompartiment umduż. Is-sezzjonijiet għandhom jinħaslu darbtejn għal ħames minuti f'2 × SSC fit-temperatura ambjentali, u darba għal għaxar minuti f'0,4 × SSC f'temperatura ta' 42 °C. Il-passi tas-sejba għandhom jitwettqu skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Imbagħad, is-slajds għandhom jitlaħalħu f'ilma distillat u sterili (dH2O). Is-sezzjonijiet għandhom jiġu kontromtebbgħin bil-Bismarck Brown Yellow, għandhom jiġu mlaħalħa f'dH2O, u għandhom jiġu applikati fuqhom għotjien billi jintuża medium milwiemi ta' mmuntar.

Il-kontrolli pożittivi u negattivi għandhom ikunu sezzjonijiet minn ospitanti infettati u mhux infettati li jkunu magħrufa, rispettivament.

Riżultat pożittiv għandu jikkorrispondi għall-parassiti ttikkettati fl-emoċiti, bil-kontrolli negattivi kollha jkunu negattivi u l-kontrolli pożittivi kollha jkunu pożittivi.

I.3.4. Is-sekwenzar

Is-sekwenzar għandu jitwettaq bħala wieħed mill-passi finali għall-proċedura dijanjostika konfermatorja. Ir-reġjuni fil-mira huma l-SSU tar-rDNA u l-ITS1.

II. **Il-proċeduri għas-sorveljanza u għall-konferma ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae***

Għall-fini tas-sorveljanza u tal-konferma tal-preżenza jew tal-esklużjoni ta' suspett ta' infezzjoni bil-*Bonamia ostreae* f'konformità mar-rekwiżiti stipulati fit-Taqsima II tal-Parti 5 tal-Anness I, il-metodi dijanjostiċi u l-proċeduri korrispondenti li jridu jintużaw għandhom ikunu jikkonformaw mal-linji gwida stipulati fit-Tabella 5.1. li ġejja:

It-Tabella 5.1

Il-linji gwida għall-użu tal-metodi dijanjostiċi għall-programmi ta' sorveljanza u sabiex jiġu eskluži jew jiġu kkonfermati infezzjoni bil-*Bonamia ostreae*

Il-metodu	Is-sorveljanza attiva	Id-dijanjożi preżuntiva	Id-dijanjożi konfermatorja
Il-marki tal-qalb jew tal-garġi	X	X	X, jew
L-istopatoloġija	X		X, jew
L-ibridizzazzjoni *in situ*			X, u
Il-PCR	X	X	X, u
Is-sekwenzar			X

PARTI 6

IL-METODI U L-PROĊEDURI DIJANJOSTIĊI DDETTALJATI GĦAS-SORVELJANZA U GĦALL-KONFERMA TAL-MARDA TAL-PONOT BOJOD (WSD)

1. **Il-proċeduri dijanjostiċi għas-sejba tal-WSSV**

Meta teħid ta' kampjuni u eżaminazzjoni fil-laboratorju jitwettqu għall-fini tal-programmi ta' sorveljanza u ta' eradikazzjoni stipulati fit-Taqsima I tal-Parti 6 tal-Anness I u għall-konferma tal-preżenza ta' jew għall-esklużjoni ta' suspett ta' infezzjoni bil-WSSV, imwettqa f'konformità mal-Artikolu 57(b) tad-Direttiva 2006/88/KE, bil-metodi dijanjostiċi stipulati fit-Taqsima II tal-Parti 6 tal-Anness I, għandhom japplikaw il-metodi u l-proċeduri dijanjostiċi ddettaljati stipulati fil-punti minn 2 sa 7 ta' din il-Parti.

Il-metodi u l-proċeduri deskritti f'din il-Parti tal-Anness II huma adattati mit-test akkreditat tal-ISO 17025 applikat fil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għall-Mardiet tal-Krustaċji. Jistgħu jiġu applikati approċċi alternattivi, billi jintużaw kundizzjonijiet ekwivalenti jew kits prodotti minn manifatturi differenti, iżda li joffru sensittività u speċifiċità ekwivalenti għal dawk deskritti f'din il-Parti. Fil-każijiet kollha, il-prodott amplifikat bil-PCR għandu jiġi soġġett għal sekwenzar sabiex tiġi kkonfermata l-identità tiegħu bħala vajrus tas-sindrome tal-ponot bojod (WSSV).

2. **Il-proċess tal-kampjun**

It-tessut (pleopodi u garġi) li jkun fihom WSSV mill-krustaċji jistgħu jinħażnu fl-etanol, fir-RNAlater jew jiġu ffriżati b'mod rapidu f'temperatura ta' – 80 °C. L-istadji meħtieġa għall-identifikazzjoni tal-WSSV minn kampjuni tat-tessuti għandhom ikunu kif ġej: L-omoġenizzazzjoni tat-tessut, l-estrazzjoni tad-DNA, l-amplifikazzjoni speċifika tad-DNA tal-WSSV bil-PCR, il-viżwalizzazzjoni tal-prodott amplifikat fuq ġell, il-purifikazzjoni tad-DNA u s-sekwenzar sabiex tiġi kkonfermata l-identità tal-patoġenu.

3. **L-omoġenizzazzjoni tat-tessut**

It-tkissir tat-tessuti u t-tħejjija ta' omoġenat f'soluzzjoni mewwieta xierqa għandhom jitwettqu billi jintuża apparat tal-Fast Prep għat-tkissir tat-tessut u billi jintużaw tubi ta' Lysing Matrix A (MP Biomedicals). It-tessut għandu jintiżen, għandu jitpoġġa f'tubi ta' Lysing Matrix A, għandu jiġi dilwit f'proporzjon ta' 1:10 w/v jew skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur, f'soluzzjoni mewwieta xierqa (G2 u 10 µl ta' Proteinaži K biex jintużaw mal-kit ta' Tessuti tad-DNA (Qiagen)) u għandu jiġi omoġenizzat billi jintuża l-omoġenizzatur Fast Prep 24 għal żewġ minuti. Il-kampjuni omoġenizzati għandhom jiġu inkubati f'temperatura ta' 56 °C għal perjodu minimu ta' erba' sigħat jew għal lejla. Il-kampjuni għandhom jiġu mħawda b'mod rapidu, għandhom jiġu ċċentrifugati f'9 000 rpm għal żewġ minuti u 50 µl ta' supernatant jew volum ekwivalenti għal 5 mg ta' tessut (il-piż tat-tessut li huwa ottimali għal kit għall-estrazzjoni) għandu jiġi miżjud ma' tubu b'kampjun għall-estrazzjoni tad-DNA u b'volum sa mhux iktar minn 200 µl b'soluzzjoni mewwieta ta' G2.

4. **L-estrazzjoni tad-DNA**

Id-DNA totali għandu jiġi estratt billi jintuża kit għall-estrazzjoni tat-tessuti tad-DNA u l-EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) skont l-istruzzjonijiet tal-manifatturi. Għandu jitwettaq kontroll tal-estrazzjoni (DNA tat-timus tal-għoġġiela) u kontroll negattiv (soluzzjoni mewwieta ta' G2) ma' kull lott ta' kampjuni. Id-DNA għandu jiġi elwit f'volum ta' 50 µl. Sabiex jiġi żgurat li l-estrazzjoni tlestiet b'suċċess, il-konċentrazzjoni tad-DNA għall-kampjuni u għall-kontrolli kollha għandha tiġi stabbilita billi jintuża apparat Nano Drop. Id-DNA estratt għandu jiġi ffriżat f'temperatura ta' – 20 °C jekk ma jkunx meħtieġ minnufih.

5. **Ir-Reazzjoni Katina bil-Polimerażi (PCR) għall-WSSV**

Il-metodu li jrid jintuża għas-sejba tal-WSSV għandu jkun il-protokoll għas-sejba tal-WSSV permezz ta' PCR imbejta, kif stipulat fil-paragrafi li ġejjin, li jamplifika amplikon ta' 1 447 bp u amplikon ta' 848 bp tal-ġenu ta' 18s rRNA fl-ewwel u fit-tieni rawnd ta' PCR rispettivament.

L-ewwel rawnd tar-reazzjoni ta' PCR għandu jsir f'volum ta' 50 µl, li jkun fih konċentrazzjonijiet finali ta' 1 × ta' Soluzzjoni mewwieta ta' GoTaq (Promega), 5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/µl ta' primer 146 F1 għall-WSSV, 1 pmol/µl ta' primer 146 R1 għall-WSSV (Tabella 1), 0,25 mM ta' dNTPs, 1,25 U ta' polimeraži Taq u 2,5 µl ta' DNA. Kull kampjun għandu jintuża b'mod duplikat flimkien ma' kontroll negattiv bl-estrazzjoni, kontroll negattiv bil-PCR (2,5 µl H_20 miżjud minflok DNA) u kontroll pożittiv. Il-kontroll pożittiv għandu jkun plażmid dilwit tal-WSSV magħmul u vvalidat sabiex jintuża internament (disponibbi mill-EURL).

It-tieni rawnd tar-reazzjoni ta' PCR tal-WSSV għandu jsir bl-istess mod bħall-ewwel rawnd, iżda billi jintuża is-sett ta' primer 146 F2/R2 għall-WSSV u billi jintuża t-tieni kontroll pożittiv sabiex jiġi vverifikat li dan l-istadju tal-PCR ħadem.

Il-primer	Is-sekwenza
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Kemm l-ewwel rawnd kif ukoll it-tieni rawnd tal-PCR għandhom jitwettqu bil-kundizzjonijiet li ġejjin ta' ċiklaġġ f'Termoċiklatur tad-DNA tat-tip Engine Tetrad 2 Peltier (jew ekwivalenti). Pass inizjali ta' denaturazzjoni f'temperatura ta' 94 °C għal żewġ minuti segwit minn 94 °C għal 30 sekonda, 62 °C għal 30 sekonda, 72 °C għal 30 sekonda, ripetuti għal 30 ċiklu, u pass ta' estensjoni f'temperatura ta' 72 °C għal żewġ minuti u miżmum f'temperatura ta' 4 °C.

6. **L-elettroforeżi b'ġell**

Il-prodotti amplifikati bil-PCR kemm mill-ewwel kif ukoll mit-tieni rawnd tal-PCR għandhom jiġu viżwalizzati fuq 2 % ta' ġellijiet tal-agarożju magħmula billi tintuża soluzzjoni mewwieta TAE. 15-il mikrolitru ta' kull kampjun għandhom jintużaw f'120 Volt għal madwar 20 minuta u għandhom jiġu osservati f'dawl UV. Il-kampjuni pożittivi jipproduċu firxa ta' 1 447 bp fl-ewwel rawnd tal-PCR u ta' 848 bp fit-tieni rawnd tal-PCR. Il-kampjuni ta' dak id-daqs għandhom jinqatgħu u għandhom jitpoġġew f'tubu mikrofugu ta' 1,5 ml. Id-DNA li jkun hemm fil-flieli tal-ġell għandu jiġi ppurifikat billi jintużaw il-prodotti, Promega Wizard® SV Gel u PCR Clean-Up System, skont l-istruzzjonijiet tal-manifatturi. Il-konċentrazzjoni tad-DNA għandha tiġi stmata billi jintuża l-apparat Nano Drop. Id-DNA ppurifikat għandu jiġi ffriżat f'temperatura ta' – 20 °C jekk ma jkunx se jintuża minnufih.

7. **Is-sekwenzar tal-prodotti tal-PCR**

Id-DNA għandu jiġi soġġett għal sekwenzar billi jintuża l-Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Il-volum totali f'kull reazzjoni huwa ta' 20 µl, bil-konċentrazzjonijiet finali ta' 1 × Big Dye Terminator, 1 × soluzzjoni mewwieta tas-sekwenzar, 10 pmol/µl ta' primer 'il quddiem jew ta' primer lura u 10 µl ta' DNA ppurifikat (dilwit għal madwar 10 ng/µl) jintużaw bil-kundizzjonijiet ta' ċiklaġġ li ġejjin f'Termoċiklatur tad-DNA tat-tip Engine Tetrad 2 Peltier (jew ekwivalenti): ċiklaġġ f'temperatura ta' 94 °C għal 30 sekonda segwit minn ċiklaġġ f'temperatura ta' 96 °C għal għaxar sekondi, minn ċiklaġġ f'temperatura ta' 50 °C għal għaxar sekondi u minn ċiklaġġ f'temperatura ta' 60 °C għal erba' minuti, b'ċiklaġġ tal-aħħar tliet passi għal 30 darba.

Il-prodotti tal-PCR għandhom jiġu preċipitati billi jintuża metodu ta' aċetat tas-sodju fejn jiġu miżjuda 20 μl ta' DNA ma' 10 μl ta' NaAc, 70 μl ta' H_20 u 250 μl ta' etanol, għandhom jiġu mħawda b'mod rapidu u ċċentrifugati f'13 000 rpm għal 20 minuta, is-supernatant għandu jitneħħa u t-tubu għandu jiġi maħsul b'200 μl ta' etanol assolut, b'ċentrifugazzjoni f'13 000 rpm għal ħames minuti. It-tubu għandu jitnixxef għal ħames minuti f'temperatura ta' 37 °C. 25 μl ta' formamid Hi-Di għandhom jiġu miżjuda fit-tubi, għandhom jiġu msaħħna sa 95 °C għal żewġ minuti u għandhom jiġu mħawda sew b'mod rapidu. Il-kampjuni għandhom jiġu soġġetti għal sekwenzar billi jintuża analizzatur tat-tip ABI3130xl Avant Genetic skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Ir-riżultati tas-sekwenzar għandhom jiġu analizzati billi jintuża software msejjaħ Sequencher u billi jintużaw sekwenzi li jiġu mqabbla ma' sekwenzi fuq il-bażi ta' dejta tal-NCBI permezz tal-funzjoni BLAST.