II

(Niet-wetgevingshandelingen)

BESLUITEN

UITVOERINGSBESLUIT (EU) 2015/1554 VAN DE COMMISSIE

van 11 september 2015

tot vaststelling van bepalingen ter uitvoering van Richtlijn 2006/88/EG wat betreft voorschriften voor bewaking en diagnosemethoden

(Kennisgeving geschied onder nummer C(2015) 6188)

(Voor de EER relevante tekst)

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gezien het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gezien Richtlijn 2006/88/EG van de Raad van 24 oktober 2006 betreffende veterinairrechtelijke voorschriften voor aquacultuurdieren en de producten daarvan en betreffende de preventie en bestrijding van bepaalde ziekten bij waterdieren ([1]), en met name artikel 49, lid 3, artikel 50, lid 4, artikel 57, onder b), en artikel 61, lid 3,

Overwegende hetgeen volgt:

(1) Bij Richtlijn 2006/88/EG zijn minimale preventieve maatregelen vastgesteld voor de bewaking en de vroegtijdige opsporing bij waterdieren van de in de lijst van bijlage IV bij die richtlijn opgenomen ziekten (hierna „in de lijst opgenomen ziekten" genoemd), alsmede de bestrijdingsmaatregelen die bij een verdenking of het uitbreken van een in de lijst opgenomen ziekte moeten worden toegepast. Bij die richtlijn zijn tevens de voorschriften vastgesteld voor het verkrijgen van de ziektevrije status voor lidstaten of voor gebieden of compartimenten daarvan.

(2) De uitroeiing van de in de lijst opgenomen ziekten en het verkrijgen van de ziektevrije status voor een lidstaat, gebied of compartiment moeten in de hele Unie op dezelfde beginselen worden gebaseerd en dezelfde wetenschappelijke aanpak volgen. Om die reden is het nodig op het niveau van de Unie specifieke voorschriften voor uitroeiings- en bewakingsprogramma's vast te stellen, alsmede de voor het verkrijgen van de ziektevrije status voor het gehele grondgebied van een lidstaat of voor een gebied of compartiment daarvan door de lidstaten te gebruiken bemonsterings- en diagnosemethoden.

(3) De te verrichten laboratoriumonderzoeken in het geval van de verdenking of bevestiging van de aanwezigheid van in de lijst opgenomen ziekten moeten op het niveau van de Unie gelijk zijn en volgens dezelfde wetenschappelijke normen en protocollen worden verricht. Overeenkomstig Richtlijn 2006/88/EG is het nodig de door de daarvoor door de bevoegde autoriteit van de lidstaat aangewezen laboratoria te gebruiken specifieke diagnosemethoden en -procedures vast te stellen.

(4) In de door de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE) aangenomen Gezondheidscode voor waterdieren van de OIE (hierna „Gezondheidscode voor waterdieren" genoemd) worden normen vastgesteld voor verbetering van de gezondheid van waterdieren en van het welzijn van kweekvis overal ter wereld, waaronder ook normen voor een veilige internationale handel in waterdieren en producten daarvan. In een aantal hoofdstukken van de Gezondheidscode voor waterdieren zijn aanbevelingen opgenomen betreffende het gebruik van bepaalde diagnostische tests. Dergelijke door de OIE vastgestelde tests zijn in het Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (Handboek inzake normen voor diagnostische tests voor waterdieren, hierna „Handboek voor waterdieren" genoemd) opgenomen. Om ervoor te zorgen dat de voorschriften van de Unie met betrekking tot de diagnose van ziekten bij waterdieren in overeenstemming zijn met internationale normen, moet bij de vaststelling van de in dit besluit vervatte regels rekening worden gehouden met de normen en aanbevelingen van de Gezondheidscode voor waterdieren.

([1]) PB L 328 van 24.11.2006, blz. 14.

(5) In dit verband bevat het Handboek voor waterdieren een opsomming van meerdere ten behoeve van laboratoriumonderzoeken te gebruiken tests en procedures. Met het oog op een op het niveau van de Unie geüniformeerde wetenschappelijke basis voor de diagnose van de in de lijst opgenomen ziekten is het nodig een keuze te maken tussen de door de OIE aanbevolen diagnostische tests en diagnoseprocedures en aan te geven welke tests verplicht moeten zijn voor laboratoriumonderzoek in het kader van de uitvoering van bewakingsprogramma's en om de verdenking van de aanwezigheid van de in de lijst opgenomen ziekten te weerleggen dan wel de aanwezigheid ervan te bevestigen. Aangezien er in bepaalde gevallen ook behoefte zal zijn aan de beschikbaarheid van alternatieve methoden en procedures, moeten dergelijke alternatieve methoden worden beschreven en moet enige wetenschappelijke toelichting worden gegeven over wanneer en hoe zij zouden kunnen worden toegepast. Dit is met name nodig voor de meer gedetailleerde diagnoseprocedures.

(6) Teneinde nauwkeurige en reproduceerbare diagnostische resultaten te verkrijgen, is het van belang dat de te gebruiken gedetailleerde procedures en protocollen worden gevalideerd overeenkomstig de in bijlage VI, deel I, bij Richtlijn 2006/88/EG bedoelde relevante kwaliteitsnormen. Voor veel van de in dit besluit opgenomen diagnosemethoden vormt het gebruik van commerciële testkits een noodzakelijk onderdeel van de diagnoseprotocollen en die testkits zijn door de referentielaboratoria van de Europese Unie met behulp van erkende tests voor de desbetreffende ziekten gevalideerd. In het belang van de rechtszekerheid moet in dit besluit naar de handelsbenamingen van die gevalideerde commerciële testkits worden verwezen.

(7) Het kan voor bepaalde lidstaten moeilijk zijn met betrekking tot een of meer van de in de lijst opgenomen ziekten de ziektevrije status te verkrijgen voor het gehele grondgebied van die lidstaat of voor een gebied of compartiment daarvan. In dergelijke situaties kan de lidstaat wellicht afzien van het (opnieuw) verkrijgen van de ziektevrije status voor die in de lijst opgenomen ziekten. De minimale bestrijdingsmaatregelen die moeten worden toegepast in gevallen waarin de betrokken lidstaat afziet van het (opnieuw) verkrijgen van de ziektevrije status, moeten op het niveau van de Unie gelijk zijn en aan dezelfde criteria voldoen. Overeenkomstig Richtlijn 2006/88/EG is het derhalve nodig gedetailleerde regels voor de inperking van die in de lijst opgenomen ziekten alsmede minimale voorschriften voor de opheffing van die inperkingsmaatregelen vast te stellen.

(8) Bij Beschikking 2001/183/EG van de Commissie [1] zijn de voorschriften vastgesteld met betrekking tot bemonsteringsschema's en diagnosemethoden voor de opsporing en bevestiging van de in de lijst opgenomen ziekten infectieuze hematopoëtische necrose en virale hemorragische septikemie. Bij Beschikking 2003/466/EG van de Commissie [2] zijn de voorschriften vastgesteld met betrekking tot bemonsteringsschema's en diagnosemethoden voor de opsporing van infectieuze zalmanemie, evenals criteria voor de indeling in gebieden en het officiële toezicht naar aanleiding van verdenking of bevestiging van de aanwezigheid van die ziekte. Bij Beschikking 2002/878/EG van de Commissie [3] zijn de voorschriften vastgesteld met betrekking tot bemonsteringsschema's en diagnosemethoden voor de opsporing en bevestiging van de in de lijst opgenomen ziekten bonamiose en marteiliose bij weekdieren. Met het oog op de bijwerking van de voorschriften, moeten die drie beschikkingen worden vervangen door dit besluit. De Beschikkingen 2001/183/EG, 2002/878/EG en 2003/466/EG moeten derhalve worden ingetrokken.

(9) Aangezien bepaalde lidstaten tijd nodig hebben om hun nationale referentielaboratoria te moderniseren teneinde te voldoen aan de voorschriften van dit besluit, moet het van toepassing zijn met ingang van 1 april 2016.

(10) De in dit besluit vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Comité voor planten, dieren, levensmiddelen en diervoeders,

HEEFT HET VOLGENDE BESLUIT VASTGESTELD:

Artikel 1

Onderwerp

Bij dit besluit worden regels vastgesteld voor:

a) de door de lidstaten toe te passen bewaking, bufferzones, bemonsterings- en diagnosemethoden in verband met de ziektestatus van die lidstaten of gebieden of compartimenten daarvan ten aanzien van de in de lijst van deel II van bijlage IV bij Besluit 2006/88/EG opgenomen niet-exotische ziekten bij waterdieren (hierna de „in de lijst opgenomen ziekten" genoemd);

---

[1] Beschikking 2001/183/EG van de Commissie van 22 februari 2001 tot vaststelling van de bemonsteringsschema's en de diagnostische methoden voor de opsporing en bevestiging van bepaalde visziekten en tot intrekking van Beschikking 92/532/EEG (PB L 67 van 9.3.2001, blz. 65).

[2] Beschikking 2003/466/EG van de Commissie van 13 juni 2003 tot vaststelling van de criteria voor de indeling in gebieden en het officiële toezicht naar aanleiding van de vermoedelijke of de bevestigde aanwezigheid van infectieuze zalmanemie (ISA) (PB L 156 van 25.6.2003, blz. 61).

[3] Beschikking 2002/878/EG van de Commissie van 6 november 2002 tot vaststelling van de bemonsteringsschema's en de diagnostische methoden voor de opsporing en de bevestiging van bonamiose (*Bonamia ostreae*) en marteiliose (*Marteilia refringens*) bij weekdieren (PB L 305 van 7.11.2002, blz. 57).

b) de te gebruiken diagnosemethoden voor laboratoriumonderzoeken in het geval van verdenking of bevestiging van de aanwezigheid van in de lijst opgenomen ziekten; alsmede

c) de minimale bestrijdingsmaatregelen die moeten worden genomen in geval van verdenking of bevestiging van een in de lijst opgenomen ziekte in lidstaten, gebieden of compartimenten die niet vrij verklaard zijn van die in de lijst opgenomen ziekte.

Artikel 2

Definities

Voor de toepassing van dit besluit wordt verstaan onder:

a) „virale hemorragische septikemie" (VHS): een ziekte die wordt veroorzaakt door het virale-hemorragische-septikemievirus (VHSV), ook bekend als het Egtved-virus, een virus van het geslacht *Novirhabdovirus* uit de familie *Rhabdoviridae*;

b) „infectieuze hematopoëtische necrose" (IHN): een ziekte die wordt veroorzaakt door het infectieuze-hematopoëtische-necrosevirus (IHNV), een virus van het geslacht *Novirhabdovirus* uit de familie *Rhabdoviridae*;

c) „koiherpesvirusziekte" (KHVD): een ziekte die wordt veroorzaakt door het koiherpesvirus (KHV) uit de familie *Alloherpesviridae*. De wetenschappelijke benaming is cyprinide herpesvirus 3 (CyHV-3);

d) „infectieuze zalmanemie" (ISA): een ziekte die wordt veroorzaakt door besmetting met zalmanemievirus (ISAV) met HPR-deletie (deletie in de hypervariabele regio), een virus van het geslacht *Isavirus* uit de familie *Orthomyxoviridae*;

e) „besmetting met *Marteilia refringens*": een ziekte die wordt veroorzaakt door een besmetting met *Marteilia refringens*, een protozo van het taxon *Paramyxida*;

f) „besmetting met *Bonamia ostreae*": een ziekte die wordt veroorzaakt door een besmetting met *Bonamia ostreae*, een protozo van het taxon *Haplosporea*;

g) „wittevlekkenziekte" (WSD): een ziekte (white spot disease) die wordt veroorzaakt door het wittevlekkensyndroomvirus (white spot syndrome virus, WSSV), een dubbelstrengs DNA-virus van het geslacht *Whispovirus* uit de familie *Nimaviridae*.

Artikel 3

Minimale voorschriften voor uitroeiings- en bewakingsprogramma's

De lidstaten zorgen ervoor dat de regels van bijlage I betreffende bewakings- en uitroeiingsprogramma's, bufferzones, bemonsterings- en diagnosemethoden, alsmede de specifieke methoden en gedetailleerde procedures van bijlage II worden nageleefd bij de verlening, intrekking of herinvoering van de ziektevrije status voor een lidstaat of voor een gebied of compartiment daarvan ten aanzien van een of meer van de in de lijst opgenomen ziekten.

Artikel 4

Minimale voorschriften voor diagnosemethoden en specifieke voorschriften

De lidstaten zorgen ervoor dat de bestrijdingsmethoden van bijlage I en de specifieke diagnosemethoden en gedetailleerde procedures van bijlage II worden nageleefd bij de uitvoering van laboratoriumonderzoeken om de aanwezigheid van een in de lijst opgenomen ziekte te bevestigen dan wel uit te sluiten.

Artikel 5

Minimale bestrijdingsmaatregelen voor de inperking van in de lijst opgenomen ziekten en minimale voorschriften voor de opheffing van inperkingsmaatregelen in lidstaten, gebieden of compartimenten die niet vrij verklaard zijn van in de lijst opgenomen ziekten

De lidstaten zorgen ervoor dat de minimale bestrijdingsmaatregelen en minimale voorschriften voor de opheffing van inperkingsmaatregelen van bijlage I worden nageleefd bij de tenuitvoerlegging van bestrijdingsmaatregelen en de opheffing van inperkingsmaatregelen voor een of meer in de lijst opgenomen ziekten in lidstaten of gebieden of compartimenten daarvan die niet vrij verklaard zijn van die in de lijst opgenomen ziekten.

Artikel 6

Intrekkingen

De Beschikkingen 2001/183/EG, 2002/878/EG en 2003/466/EG worden ingetrokken.

Artikel 7

Toepassingsdatum

Dit besluit is van toepassing met ingang van 1 april 2016.

Artikel 8

Adressaten

Dit besluit is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 11 september 2015.

Voor de Commissie
Vytenis ANDRIUKAITIS
Lid van de Commissie

BIJLAGE I

BEWAKINGS- EN BESTRIJDINGSMETHODEN

I. **Inleiding**

Deze bijlage omvat:

a) voorschriften voor uitroeiings- en bewakingsprogramma's, zoals bedoeld in artikel 44 van Richtlijn 2006/88/EG, en de te gebruiken bemonsterings- en diagnosemethoden voor het overeenkomstig hoofdstuk VII van die richtlijn ziektevrij verklaren van lidstaten of zones of compartimenten daarvan;

b) te gebruiken bemonsterings- en diagnosemethoden voor laboratoriumonderzoeken bij verdenking van dan wel ter bevestiging van de aanwezigheid van de in de lijst van deel II van bijlage IV bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen niet-exotische ziekten (hierna de „in de lijst opgenomen ziekten" genoemd), zoals bepaald in artikel 28, onder a), en artikel 57, onder b), van die richtlijn;

c) de te treffen inperkingsmaatregelen in het geval van bevestiging van de aanwezigheid van een in de lijst opgenomen ziekte, zoals bedoeld in artikel 39 van Richtlijn 2006/88/EG, en de te treffen maatregelen met het oog op het verkrijgen van een gezondheidsstatus van categorie III voor een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V.

De voorschriften in deze bijlage hebben betrekking op de volgende in de lijst opgenomen ziekten:

1.	Virale hemorragische septikemie (VHS)	Deel 1
2.	Infectieuze hematopoëtische necrose (IHN)	Deel 1
3.	Koiherpesvirusziekte (KHV-ziekte)	Deel 2
4.	Infectieuze zalmanemie (ISA)	Deel 3
5.	Besmetting met *Marteilia refringens*	Deel 4
6.	Besmetting met *Bonamia ostreae*	Deel 5
7.	Wittevlekkenziekte (white spot disease, WSD)	Deel 6

II. **Definities**

Voor de toepassing van de bijlagen I en II wordt verstaan onder:

a) „continentaal compartiment": een of meer kwekerijen op het continentale deel van een of meer lidstaten, waarvoor een gemeenschappelijk bioveiligheidssysteem geldt en waar een populatie waterdieren met een duidelijk onderscheiden gezondheidsstatus ten aanzien van een specifieke ziekte wordt gehouden;

b) „continentale kwekerij": kwekerij waar aquacultuurdieren worden gehouden en die zich op het continentale deel van het grondgebied van één lidstaat bevindt;

c) „continentaal gebied": een duidelijk begrensd geografisch gebied op het continentale deel van een of meer lidstaten, met een homogeen hydrologisch systeem dat bestaat uit delen van het stroomgebied van de bron(nen) tot aan een natuurlijke of kunstmatige barrière die waterdieren belet om van lager gelegen gedeelten van het stroomgebied stroomopwaarts te migreren, uit een volledig stroomgebied van de bron(nen) ervan tot het estuarium, of uit meer dan een stroomgebied, met inbegrip van de estuaria ervan, als gevolg van de verbinding die er in epidemiologisch opzicht via de estuaria tussen de stroomgebieden bestaat.

d) „officieel besmet verklaarde kwekerij": kwekerij waar waterdieren worden gehouden en waar een of meer van de in de lijst opgenomen ziekten door de bevoegde autoriteit zijn bevestigd overeenkomstig artikel 28, onder a), artikel 29 en artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG.

e) „contactkwekerij": kwekerij waar waterdieren worden gehouden en waarvoor op enigerlei wijze is aangetoond of de sterke verdenking bestaat dat zij is besmet met besmettelijk materiaal uit een officieel besmet verklaarde kwekerij.

DEEL 1

BEWAKINGS- EN BESTRIJDINGSMETHODEN VOOR VIRALE HEMORRAGISCHE SEPTIKEMIE (VHS) EN INFECTIEUZE HEMATOPOËTISCHE NECROSE (IHN)

I. **Voorschriften voor bewakings- en uitroeiingsprogramma's voor het verkrijgen en behouden van de ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van VHS en IHN en inperkingsmaatregelen voor die in de lijst opgenomen ziekten**

I.1. Algemene voorschriften voor gezondheidsinspecties en bemonstering voor VHS en IHN:

a) de gezondheidsinspecties en, in voorkomend geval, de bemonstering worden uitgevoerd in de periode van het jaar waarin de watertemperatuur lager is dan 14 °C of wanneer de watertemperatuur waarschijnlijk haar laagste jaarlijkse waarden bereikt;

b) indien overeenkomstig bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, worden het aantal en de geografische spreiding van de bemonsteringspunten zo bepaald dat een redelijke dekking van de lidstaat, het gebied of het compartiment wordt behaald. De bemonsteringspunten moeten representatief zijn voor de verschillende ecosystemen waarin natuurlijke populaties van gevoelige soorten voorkomen;

c) indien kwekerijen of natuurlijke populaties meer dan één keer per jaar aan gezondheidsinspecties of bemonsteringen moeten worden onderworpen, duren de intervallen tussen de gezondheidsinspecties en tussen de bemonsteringen zo lang mogelijk en ten minste vier maanden, waarbij rekening wordt gehouden met de onder a) vermelde voorschriften met betrekking tot de temperatuur;

d) alle productie-eenheden, zoals vijvers, tanks en netkooien, worden onderworpen aan gezondheidsinspecties waarbij op de aanwezigheid van dode en zwakke vissen en van vissen met abnormaal gedrag wordt gecontroleerd. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan de plaats waar het water wegloopt aangezien zwakke vissen meestal daar te vinden zijn wegens de stroming van het water;

e) de te bemonsteren vis van gevoelige soorten wordt als volgt geselecteerd:

i) indien regenboogforel aanwezig is, wordt uitsluitend die vissoort voor bemonstering geselecteerd, tenzij andere gevoelige soorten aanwezig zijn die typische symptomen van VHS of IHN vertonen; indien geen regenboogforel aanwezig is, moet het monster representatief zijn voor alle andere aanwezige gevoelige soorten;

ii) wanneer zwakke vissen, vissen met abnormaal gedrag of pas gestorven, maar nog niet in staat van ontbinding verkerende vissen aanwezig zijn, worden deze vissen geselecteerd; indien meer dan één waterbron voor de productie van vis wordt gebruikt, worden vissen die alle waterbronnen vertegenwoordigen in het monster opgenomen;

iii) de selectie omvat vissen die zo zijn gekozen dat alle delen van de kwekerij en alle jaarklassen evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn.

I.2. Specifieke voorschriften voor het verkrijgen van de ziektevrije gezondheidsstatus (categorie I) ten aanzien van VHS en IHN

I.2.1. Bewakingsprogramma's:

a) een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus ten aanzien van VHS en/of IHN van categorie III, zoals bedoeld in bijlage III, deel B, bij Richtlijn 2006/88/EG, kan een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekten behalen, mits alle kwekerijen in die lidstaat, dat gebied of dat compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, voldoen aan de voorschriften van bijlage V bij die richtlijn en al die kwekerijen en, indien voorgeschreven volgens bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij die richtlijn, alle overeenkomstig dat deel geselecteerde bemonsteringspunten onder natuurlijke populaties aan een van de volgende bewakingsprogramma's zijn onderworpen:

i) model A — bewakingsprogramma met een looptijd van twee jaar:

de kwekerijen of bemonsteringspunten moeten aan gezondheidsinspecties zijn onderworpen en zijn bemonsterd gedurende een periode van ten minste twee opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 1.A van punt II.

Gedurende die periode van twee jaren moet het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor VHS en/of IHN, en moet elke verdenking van VHS en/of IHN overeenkomstig de bemonsterings- en diagnosemethoden van punt II.3 zijn weerlegd;

ii) model B — bewakingsprogramma met een looptijd van vier jaar met een beperkte steekproefomvang:

de kwekerijen of bemonsteringspunten moeten aan gezondheidsinspecties zijn onderworpen en zijn bemonsterd gedurende een periode van ten minste vier opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 1.B van punt II.

Gedurende die periode van vier jaren moet het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor VHS en/of IHN, en moet elke verdenking van VHS en/of IHN overeenkomstig de bemonsterings- en diagnosemethoden van punt II.3 zijn weerlegd;

b) indien tijdens de uitvoering van het onder a) bedoelde bewakingsprogramma besmetting met VHS en/of IHN is bevestigd in een in dat bewakingsprogramma opgenomen kwekerij, en de gezondheidsstatus van categorie II voor die kwekerij derhalve is ingetrokken, kan die kwekerij onmiddellijk opnieuw de gezondheidsstatus van categorie II verkrijgen en doorgaan met de uitvoering van het bewakingsprogramma om de ziektevrije status te verkrijgen zonder eerst een uitroeiingsprogramma overeenkomstig punt I.2.2 uit te voeren, mits die kwekerij aan de volgende voorwaarden voldoet:

i) zij is een continentale kwekerij met een gezondheidsstatus ten aanzien van VHS en/of IHN die overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 3, bij Richtlijn 2006/88/EG niet afhangt van de gezondheidsstatus van populaties van waterdieren in de omringende natuurlijke wateren ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekten;

ii) zij is leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd; de stillegging duurt ten minste zes weken;

iii) zij is voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van VHS en/of IHN.

I.2.2. Uitroeiingsprogramma's

I.2.2.1. Algemene voorschriften

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van VHS en/of IHN kan een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekten verkrijgen, mits alle kwekerijen in die lidstaat, dat gebied of dat compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, zijn onderworpen aan een uitroeiingsprogramma dat voldoet aan de bepalingen onder a) tot en met e):

a) de minimale bestrijdingsmaatregelen van hoofdstuk V, afdeling 4, van Richtlijn 2006/88/EG moeten effectief zijn toegepast en in de nabijheid van de officieel met VHS of IHN of beide in de lijst opgenomen ziekten besmet verklaarde kwekerij(en) moet een beperkingsgebied zoals bedoeld in artikel 32, onder b), van die richtlijn worden ingesteld, dat een beschermings- en toezichtsgebied omvat.

Het beperkingsgebied moet per geval zijn vastgesteld, rekening houdend met factoren die van invloed zijn op de risico's van de verspreiding van de in de lijst opgenomen ziekte onder kweekvis en wilde vis, zoals: aantal, percentage en verdeling van gestorven vissen in de met VHS en/of IHN besmette kwekerij; de afstand en dichtheid van naburige kwekerijen; de nabijheid van slachthuizen; contactkwekerijen; in de kwekerijen aanwezige soorten; in de door de ziekte getroffen en de naburige kwekerijen toegepaste kweekpraktijken; de hydrodynamische omstandigheden en andere uit epidemiologisch oogpunt significante factoren.

Voor het instellen van de beschermings- en toezichtsgebieden gelden de volgende minimale voorschriften voor de geografische afbakening van die gebieden:

i) in de onmiddellijke omgeving van een officieel met VHS of IHN of beide in de lijst opgenomen ziekten besmet verklaarde kwekerij wordt een beschermingsgebied ingesteld, dat overeenkomt met:

1. in kustgebieden: een gebied dat valt binnen een cirkel met een straal die ten minste de breedte van één intergetijdengebied of, als dit meer is, ten minste 5 km bedraagt, gecentreerd op de officieel met VHS en/of IHN besmet verklaarde kwekerij, of een vergelijkbaar gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald;

2. in in het binnenland gelegen gebieden: het gehele stroomgebied van de officieel met VHS en/of IHN besmet verklaarde kwekerij; de bevoegde autoriteit kan het gebied beperken tot delen van het stroomgebied of tot het areaal van de kwekerij, mits de preventie van de verspreiding van VHS en/of IHN niet in het gedrang komt;

ii) buiten het beschermingsgebied wordt door de bevoegde autoriteit een toezichtsgebied ingesteld, dat overeenkomt met:

1. in kustgebieden: een gebied rondom het beschermingsgebied, bestaande uit elkaar overlappende intergetijdengebieden; of een gebied rondom het beschermingsgebied, vallend binnen een cirkel met een straal van 10 km vanaf het middelpunt van het beschermingsgebied; of een vergelijkbaar gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald;

2. in in het binnenland gelegen gebieden: een uitgebreid gebied buiten het ingestelde beschermingsgebied;

b) alle kwekerijen binnen het beschermingsgebied waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden en die niet officieel met VHS en/of IHN besmet zijn verklaard, worden onderworpen aan een officieel onderzoek dat ten minste uit de volgende onderdelen bestaat:

i) de bemonstering voor het testen van 10 vissen indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op besmetting met VHS en/of IHN worden waargenomen, of van ten minste 30 vissen indien geen klinische of postmortale symptomen worden waargenomen;

ii) één gezondheidsinspectie; in de kwekerijen waar de in punt i) bedoelde tests negatieve resultaten hebben opgeleverd, worden voortaan één keer per maand gedurende de periode waarin de watertemperatuur minder dan 14 °C bedraagt, behalve wanneer visvijvers en netkooien met ijs zijn bedekt, gezondheidsinspecties uitgevoerd, totdat het beschermingsgebied wordt ingetrokken overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

c) alle officieel met VHS en/of IHN besmet verklaarde kwekerijen worden leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd. De stillegging duurt ten minste zes weken. Wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen binnen hetzelfde beschermingsgebied zijn leeggemaakt, vindt gedurende ten minste drie weken een gelijktijdige stillegging plaats. Deze alinea is ook van toepassing op nieuwe kwekerijen die gedurende de uitvoering van het uitroeiingsprogramma officieel besmet verklaard worden.

Tijdens het stilleggen van de officieel besmet verklaarde kwekerijen worden de beschermingsgebieden omgezet in toezichtsgebieden.

De bevoegde autoriteit kan besluiten het leegmaken, reinigen, ontsmetten en stilleggen van andere kwekerijen in de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden verplicht te stellen. De bevoegde autoriteit stelt op basis van een risicobeoordeling per geval vast hoe lang de stillegging van die kwekerijen moet duren;

d) alle officieel met VHS of IHN of beide in de lijst opgenomen ziekten besmet verklaarde kwekerijen en alle andere stilgelegde kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden zoals bedoeld onder c), worden voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met de ziektevrije gezondheidsstatus (categorie I) ten aanzien van VHS en/of IHN.

Het uitzetten van de vis vindt pas plaats wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

e) alle kwekerijen in de (het) onder het uitroeiingsprogramma vallende lidstaat, gebied of compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, en, indien gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, alle overeenkomstig punt I.1 geselecteerde bemonsteringspunten, worden vervolgens aan het bewakingsprogramma van punt I.2.1 onderworpen.

I.2.2.2. Voorschriften voor het opnieuw verkrijgen van de ziektevrije status voor continentale compartimenten die één enkele kwekerij omvatten die eerder vrij was verklaard van VHS en/of IHN

Een continentaal compartiment dat één enkele kwekerij omvat die eerder vrij was verklaard van VHS of IHN of beide in de lijst opgenomen ziekten, waarvan de gezondheidsstatus ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekten overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 3, bij Richtlijn 2006/88/EG niet afhangt van de omringende natuurlijke wateren en waarvan de gezondheidsstatus van categorie I is ingetrokken overeenkomstig artikel 53, lid 3 van die richtlijn, kan onmiddellijk opnieuw de gezondheidsstatus van categorie II verkrijgen zodra de bevoegde autoriteit heeft bevestigd dat aan de volgende voorwaarden is voldaan:

a) de kwekerij waarvan officieel is bevestigd dat zij met VHS en/of IHN besmet is, moet zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd. de stillegging duurt ten minste zes weken;

b) de kwekerij waarvan officieel is bevestigd dat zij met VHS en/of IHN besmet is, is voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van VHS en/of IHN.

I.3. Specifieke voorschriften voor het behouden van de ziektevrije gezondheidsstatus (categorie I) ten aanzien van VHS en/of IHN

Indien overeenkomstig artikel 52 van Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking vereist is om een gezondheidsstatus van categorie I te behouden, worden alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartiment in kwestie waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, onderworpen aan gezondheidsinspecties en wordt vis bemonsterd overeenkomstig tabel 1.C van punt II van dit deel, rekening houdend met het risiconiveau van de kwekerij voor insleep van VHS of IHN of beide in de lijst opgenomen ziekten.

Bij vaststelling van de frequentie van de gezondheidsinspecties voor compartimenten die een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van VHS en/of IHN hebben, die in continentale gebieden liggen en waarvan de gezondheidsstatus ten aanzien van VHS of IHN overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 2, bij Richtlijn 2006/88/EG afhangt van de gezondheidsstatus van de populaties van waterdieren in omringende natuurlijke wateren, wordt het risico op insleep van VHS en/of IHN groot geacht.

De ziektevrije status blijft slechts behouden zolang het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten oplevert voor VHS of IHN of beide in de lijst opgenomen ziekten, en elke verdenking van VHS en/of IHN overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 is weerlegd.

I.4. Voorschriften voor de opheffing van de inperkingsmaatregelen overeenkomstig artikel 39 van Richtlijn 2006/88/EG, namelijk de wijziging van een gezondheidsstatus van categorie V naar een gezondheidsstatus van categorie III

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van VHS en/of IHN, kan een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekten verkrijgen, mits:

a) aan de voorwaarden van punt I.2.2.1, onder a), b) en c), is voldaan. Indien stillegging technisch niet mogelijk is, worden de betrokken kwekerijen onderworpen aan een alternatieve maatregel die een bijna gelijkwaardige waarborg biedt voor de uitroeiing van IHNV en/of VHSV in de kwekerij en haar omgeving;

b) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen en alle andere stilgelegde/overeenkomstig het onder a) bepaalde aan alternatieve maatregelen onderworpen kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden zijn voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I, II of III ten aanzien van VHS en/of IHN;

c) het uitzetten van de vis pas heeft plaatsgevonden nadat alle officieel besmet verklaarde kwekerijen waren leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd/onderworpen aan alternatieve maatregelen zoals bedoeld onder a);

II. **Diagnose- en bemonsteringsmethoden**

II.1. Te bemonsteren organen:

Het te onderzoeken weefselmateriaal is afkomstig van milt, kopnier, en van hart of hersenen. Bij de bemonstering van ouderdieren kan ook ovariële vloeistof of zaadvocht worden onderzocht.

In het geval van klein broed kunnen hele vissen die minder dan 4 cm lang zijn, nadat het stuk achter de anus is verwijderd, met een steriele schaar of scalpel in kleine stukken worden geknipt. Als het monster bestaat uit hele vissen met een lichaamslengte tussen 4 en 6 cm, worden de ingewanden inclusief de nieren verzameld.

Stukjes orgaan van maximaal 10 vissen mogen worden samengevoegd.

II.2. Diagnosemethoden voor het verkrijgen en behouden van de ziektevrije status voor VHS en/of IHN

De diagnosemethode voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van VHS en/of IHN, overeenkomstig de erkende diagnosemethoden en -procedures van bijlage II, deel 1, punt I, is ofwel

a) virusisolatie in celculturen, gevolgd door identificatie met behulp van de enzymgekoppelde immuunadsorbent-techniek (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), de indirecte immunofluorescentietest (indirect fluorescent antibody test, IFAT), de virusneutralisatietest of de realtime-reverse-transcriptase-polymerasekettingreactie (real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-qPCR); ofwel

b) RT-qPCR.

II.3. Bemonsterings- en diagnosemethoden om de aanwezigheid van VHS of IHN te weerleggen dan wel te bevestigen

Wanneer overeenkomstig artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG een verdenking van VHS en/of IHN moet worden bevestigd dan wel weerlegd, worden de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedures nageleefd:

a) de kwekerij waarop de verdenking betrekking heeft wordt onderworpen aan ten minste één gezondheidsinspectie en één bemonstering van 10 vissen indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op besmetting met VHS en/of IHN worden waargenomen, of van ten minste 30 vissen indien geen klinische of postmortale symptomen worden waargenomen; De monsters worden getest met behulp van een of meer van de in de punten i) en ii) vermelde diagnosemethoden, overeenkomstig de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van bijlage II, deel 1, punt II:

   i) conventionele virusisolatie in celculturen, gevolgd door immunochemische of moleculaire identificatie van het virus;

   ii) virusdetectie met behulp van RT-qPCR;

   iii) andere diagnosetechnieken waarvan is aangetoond dat ze vergelijkbaar effectief zijn, zoals de indirecte immunofluorescentietest (IFAT), de enzymgekoppelde immuunadsorbent-techniek (ELISA); RT-PCR en immunohistochemie (IHC).

b) de aanwezigheid van VHS wordt als bevestigd beschouwd indien een of meer van die diagnosemethoden een positief resultaat voor VHSV opleveren. De aanwezigheid van IHN wordt als bevestigd beschouwd indien een of meer van die diagnosemethoden een positief resultaat voor IHNV opleveren. De bevestiging van een eerste geval van of VHS of IHN in lidstaten, gebieden of compartimenten die voordien niet besmet waren, vindt plaats op basis van conventionele virusisolatie in celculturen of RT-qPCR;

c) Een verdenking van VHSV en/of IHNV kan worden weerlegd indien celkweek of RT-qPCR-tests geen verdere aanwijzingen opleveren voor de aanwezigheid van VHSV en/of IHNV.

Tabel 1.A

Bewakingsprogramma voor gebieden en compartimenten voor de in punt I.2.1, onder a), i), bedoelde tweejarige controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van VHS of IHN

Type kwekerij	Aantal gezondheidsinspecties per jaar (twee jaar):	Aantal bemonsteringen per jaar (twee jaar):	Aantal vissen in het monster (1)	
			Aantal opgroeiende vissen	Aantal ouderdieren (2)
a) Kwekerijen met ouderdieren	2	2	50 (eerste inspectie) 75 (tweede inspectie)	30 (eerste of tweede inspectie) 0 (eerste of tweede inspectie)
b) Kwekerijen met uitsluitend ouderdieren	2	1	0	75 (eerste of tweede inspectie)
c) Kwekerijen zonder ouderdieren	2	2	75 (3) (eerste en tweede inspectie)	0

Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 10

(1) De monsters mogen ten vroegste drie weken nadat de vis van zoet naar zout water is overgebracht, worden genomen.
(2) Ovariële vloeistof of zaadvocht van ouderdieren wordt verzameld op het moment van rijping, ten tijde van het strippen.
(3) De monsters moeten worden genomen bij een aantal vissen dat de opsporing van VHSV of IHNV met een betrouwbaarheid van 95 % waarborgt bij een aangenomen prevalentie van 5 %.

Tabel 1.B

Bewakingsprogramma met een beperkte steekproefomvang voor de in punt I.2.1, onder a), i), bedoelde vierjarige controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van VHS of IHN

Type kwekerij	Aantal gezondheidsinspecties per jaar	Aantal bemonsteringen per jaar	Aantal vissen in het monster (1)	
			Aantal opgroeiende vissen	Aantal ouderdieren (2)
Eerste twee jaar van de bewakingsperiode				
a) Kwekerijen met ouderdieren	2	1	0 (eerste inspectie) 30 (tweede inspectie)	0 (eerste inspectie) 0 (tweede inspectie)
b) Kwekerijen met uitsluitend ouderdieren	2	1	0	30 (eerste of tweede inspectie)
c) Kwekerijen zonder ouderdieren	2	1	30 (3) (eerste of tweede inspectie)	0
Laatste twee jaar van de bewakingsperiode				
a) Kwekerijen met ouderdieren	2	2	30 (eerste inspectie) 0 (tweede inspectie)	0 (eerste inspectie) 30 (tweede inspectie)

Type kwekerij	Aantal gezondheidsinspecties per jaar	Aantal bemonsteringen per jaar	Aantal vissen in het monster (1)	
			Aantal opgroeiende vissen	Aantal ouderdieren (2)
b) Kwekerijen met uitsluitend ouderdieren	2	2		30 (eerste en tweede inspectie)
c) Kwekerijen zonder ouderdieren	2	2	30 (3) (eerste en tweede inspectie)	

Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 10

(1) De monsters mogen ten vroegste drie weken nadat de vis van zoet naar zout water is overgebracht, worden genomen.
(2) Ovariële vloeistof of zaadvocht van ouderdieren wordt verzameld op het moment van rijping, ten tijde van het strippen.
(3) De monsters moeten worden genomen bij een aantal vissen dat opsporing van VHSV of IHNV met een betrouwbaarheid van 95 % waarborgt bij een aangenomen prevalentie van 10 %.

Tabel 1.C

Bewakingsprogramma's voor gebieden of compartimenten voor het behouden van de ziektevrije status ten aanzien van VHS of IHN, zoals bedoeld in punt I.3

Risiconiveau	Aantal gezondheidsinspecties	Aantal vissen in het monster (3)
Hoog	Twee per jaar	30 (1) (2)
Gemiddeld	Eén per jaar	30 (1)
Laag	Eén per twee jaar	30 (1)

Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 10

(1) De monsters mogen ten vroegste drie weken nadat de vis van zoet naar zout water is overgebracht, worden genomen.
(2) De monsters moeten worden genomen bij een aantal vissen dat de opsporing van VHSV of IHNV met een betrouwbaarheid van 95 % waarborgt bij een aangenomen prevalentie van 10 %.
(3) Er wordt ten minste één monster per gezondheidsinspectie genomen.

DEEL 2

BEWAKINGS- EN BESTRIJDINGSMETHODEN VOOR KOIHERPESVIRUSZIEKTE (KHVD)

I. **Voorschriften voor bewakings- en uitroeiingsprogramma's voor het verkrijgen en behouden van de ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van KHVD en het inperken van een besmetting met het koiherpesvirus (KHV)**

I.1. Algemene voorschriften

Indien overeenkomstig bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, worden het aantal en de geografische spreiding van de bemonsteringspunten zo bepaald dat een redelijke dekking van de lidstaat, het gebied of het compartiment wordt behaald. De bemonsteringspunten moeten ook representatief zijn voor de verschillende ecosystemen waarin de natuurlijke populaties van gevoelige soorten voorkomen, te weten riviersystemen en meren.

Gerichte bewaking berust op regelmatige monitoring van gebieden met gevoelige soorten. De monitoring van de locaties vindt plaats wanneer de watertemperaturen een niveau hebben bereikt dat gunstig is voor de ontwikkeling van de ziekte (> 15 °C), en ten vroegste twee weken vanaf de datum waarop deze temperaturen zijn bereikt. Alle op de locatie aangetroffen zieke vissen of vissen die abnormaal gedrag vertonen, worden bemonsterd en getest.

Waar mogelijk worden vissen bemonsterd die gedurende een langere periode bij temperaturen binnen het voor het virus gunstige bereik zijn gehouden, dat wil zeggen gedurende twee tot drie weken bij 15 °C tot 26 °C. De volgende aanpak kan echter worden aanvaard:

a) het verzamelen van een subpopulatie ten tijde van het overbrengen van de vis van de winter- naar de zomervijvers en het houden van de vis in hetzelfde waterlichaam als de zomervijver totdat aan de minimumtemperatuurvereisten is voldaan, of

b) het verzamelen van monsters tijdens de oogst of tijdens andere handelingen die in het kader van normale beheerpraktijken met de vis worden uitgevoerd. Indien mogelijk worden de monsters tussen 24 en 72 uur na dergelijke beheerpraktijken verzameld, teneinde de kans op opsporing van KHV te vergroten.

Indien kwekerijen of natuurlijke populaties meer dan één keer per jaar aan gezondheidsinspecties of bemonsteringen moeten worden onderworpen, duren de intervallen tussen de gezondheidsinspecties of de bemonsteringen gedurende het seizoen waarin de watertemperatuur waarschijnlijk haar hoogste jaarlijkse waarden bereikt zonder de bovengrens van 28 °C te overschrijden, zo lang mogelijk.

Alle productie-eenheden, zoals vijvers en tanks, moeten worden onderworpen aan gezondheidsinspecties waarbij op de aanwezigheid van dode en zwakke vissen en van vissen met abnormaal gedrag wordt gecontroleerd.

Cyprinus carpio en kruisingen daarvan, zoals *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, worden verzameld indien zij in de kwekerij aanwezig zijn.

De te bemonsteren vis wordt als volgt geselecteerd:

i) wanneer zwakke vissen, vissen met abnormaal gedrag of pas gestorven, maar nog niet in staat van ontbinding verkerende vissen aanwezig zijn, moeten deze vissen worden geselecteerd;

ii) indien meer dan één waterbron voor de productie van vis wordt gebruikt, moeten vissen die alle waterbronnen vertegenwoordigen voor bemonstering worden opgenomen;

iii) de selectie moet vissen omvatten die zo zijn gekozen dat alle delen van de kwekerij en alle jaarklassen evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn.

I.2. Specifieke voorschriften voor het verkrijgen van de ziektevrije gezondheidsstatus (categorie I) ten aanzien van KHVD

I.2.1. Bewakingsprogramma's

a) een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus ten aanzien van KHVD van categorie III kan een gezondheidsstatus van categorie I behalen, indien alle kwekerijen in die lidstaat, dat gebied of dat compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, voldoen aan de voorschriften voor de ziektevrije status van bijlage V bij die richtlijn en al die kwekerijen en, indien voorgeschreven volgens deel I, punt 2, tweede alinea, van die bijlage, alle overeenkomstig dat deel geselecteerde bemonsteringspunten onder natuurlijke populaties aan een van de volgende bewakingsprogramma's zijn onderworpen:

i) model A — bewakingsprogramma met een looptijd van twee jaar:

de kwekerijen of bemonsteringspunten moeten aan gezondheidsinspecties zijn onderworpen en zijn bemonsterd gedurende een periode van ten minste twee opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 2.A van punt III.

Gedurende die periode van twee jaren moet het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor KHV en moet elke verdenking van KHVD overeenkomstig de diagnosemethoden van punt III.2 zijn weerlegd;

ii) model B — bewakingsprogramma met een looptijd van vier jaar met een beperkte steekproefomvang:

de kwekerijen of bemonsteringspunten moeten aan gezondheidsinspecties zijn onderworpen en zijn bemonsterd gedurende een periode van ten minste vier opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 2.B van punt III.

Gedurende die periode van vier jaren moet het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor KHV en moet elke verdenking van KHVD overeenkomstig de diagnosemethoden van punt III.2 zijn weerlegd;

b) indien tijdens de uitvoering van het onder a) bedoelde vierjarige bewakingsprogramma besmetting met KHV is bevestigd in een in dat bewakingsprogramma opgenomen kwekerij, en de gezondheidsstatus van categorie II daarvan derhalve is ingetrokken, kan die kwekerij onmiddellijk opnieuw de gezondheidsstatus van categorie II verkrijgen en doorgaan met de uitvoering van het bewakingsprogramma om de ziektevrije status te verkrijgen zonder eerst een uitroeiingsprogramma zoals beschreven in punt I.2.2 uit te voeren, mits die kwekerij aan de volgende voorwaarden voldoet:

i) zij is een continentale kwekerij met een gezondheidsstatus ten aanzien van KHVD die overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 3, bij Richtlijn 2006/88/EG niet afhangt van de gezondheidsstatus van populaties van waterdieren in de omringende natuurlijke wateren ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte;

ii) zij is leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd; de stillegging duurt ten minste zes weken;

iii) zij is voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van KHVD.

I.2.2. Uitroeiingsprogramma's

I.2.2.1. Algemene voorschriften

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van KHVD kan een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, indien alle kwekerijen in die lidstaat, dat gebied of dat compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, ten minste aan het volgende uitroeiingsprogramma zijn onderworpen:

a) de minimale bestrijdingsmaatregelen van hoofdstuk V, afdeling 4, van Richtlijn 2006/88/EG zijn effectief toegepast en in de nabijheid van de officieel met KHV besmet verklaarde kwekerij(en) is een beperkingsgebied zoals bedoeld in artikel 32, onder b), van die richtlijn ingesteld, dat een beschermings- en toezichtsgebied omvat.

Het beperkingsgebied moet per geval zijn vastgesteld, rekening houdend met factoren die van invloed zijn op de risico's van de verspreiding van KHVD onder kweekvis en wilde vis, zoals: aantal, percentage en verdeling van gestorven vissen in de met KHV besmette kwekerij; de afstand en dichtheid van naburige kwekerijen; de nabijheid van slachthuizen; contactkwekerijen; de in de kwekerijen aanwezige soorten; de in de door de ziekte getroffen en de naburige kwekerijen toegepaste kweekpraktijken; de hydrodynamische omstandigheden en andere uit epidemiologisch oogpunt significante factoren.

Voor het instellen van de beschermings- en toezichtsgebieden gelden de volgende minimale voorschriften voor de geografische afbakening van die gebieden:

i) in de onmiddellijke omgeving van een officieel met KHV besmet verklaarde kwekerij wordt een beschermingsgebied ingesteld, dat overeenkomt met het gehele stroomgebied van de officieel met KHV besmet verklaarde kwekerij; de bevoegde autoriteit kan het gebied beperken tot delen van het stroomgebied, mits de preventie van de verspreiding van KHVD niet in het gedrang komt;

ii) buiten het beschermingsgebied wordt een toezichtsgebied ingesteld, dat overeenkomt met een uitgebreid gebied buiten het ingestelde beschermingsgebied;

b) alle kwekerijen binnen het beschermingsgebied waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden en die niet officieel met KHV besmet zijn verklaard, worden onderworpen aan een officieel onderzoek dat ten minste uit de volgende onderdelen bestaat:

i) de bemonstering voor het testen van 10 vissen indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op KHVD worden waargenomen, of van 30 vissen indien geen klinische of postmortale symptomen worden waargenomen;

ii) één gezondheidsinspectie; in de kwekerijen waar de in punt III.2 bedoelde tests negatieve resultaten hebben opgeleverd, worden voortaan één keer per maand gedurende het seizoen waarin de watertemperatuur waarschijnlijk > 15 °C bedraagt, gezondheidsinspecties uitgevoerd, totdat het beschermingsgebied wordt ingetrokken overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

c) alle officieel met KHV besmet verklaarde kwekerijen worden leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd. De stillegging duurt ten minste zes weken. Wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen binnen hetzelfde beschermingsgebied zijn leeggemaakt, vindt gedurende ten minste drie weken een gelijktijdige stillegging plaats. Deze alinea is ook van toepassing op nieuwe kwekerijen die gedurende de uitvoering van het uitroeiingsprogramma officieel besmet verklaard worden.

Tijdens het stilleggen van de officieel besmet verklaarde kwekerijen worden de beschermingsgebieden omgezet in toezichtsgebieden.

De bevoegde autoriteit kan besluiten het leegmaken, reinigen, ontsmetten en stilleggen van andere kwekerijen in de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden verplicht te stellen. De bevoegde autoriteit stelt op basis van een risicobeoordeling per geval vast hoe lang de stillegging moet duren;

d) alle officieel met KHV besmet verklaarde kwekerijen en alle andere stilgelegde kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden worden voorzien van:

i) nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van KHVD; of

ii) gedurende een overgangsperiode tot en met 31 december 2020, met nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een goedgekeurd bewakingsprogramma voor KHVD.

Het uitzetten van de vis vindt pas plaats wanneer alle officieel met KHV besmet verklaarde kwekerijen zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

e) alle kwekerijen in de (het) onder het uitroeiingsprogramma vallende lidstaat, gebied of compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, en, indien gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, alle overeenkomstig punt I.1 geselecteerde bemonsteringspunten, moeten vervolgens ten minste aan het bewakingsprogramma van punt I.2.1 zijn onderworpen.

I.2.2.2. Voorschriften voor het opnieuw verkrijgen van de ziektevrije status voor continentale compartimenten die één enkele kwekerij omvatten die eerder vrij was verklaard van KHVD

Een continentaal compartiment dat één enkele kwekerij omvat met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van KHVD, waarvan de gezondheidsstatus ten aanzien van KHVD overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 3, bij Richtlijn 2006/88/EG niet afhangt van de omringende natuurlijke wateren en waarvan de status van categorie I is ingetrokken overeenkomstig artikel 53, lid 3 van die richtlijn, kan onmiddellijk opnieuw de gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van KHVD verkrijgen zodra de bevoegde autoriteit heeft bevestigd dat aan de volgende voorwaarden is voldaan:

a) de kwekerij is leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd; de stillegging heeft ten minste zes weken geduurd;

b) de kwekerij is voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I of uit compartimenten met een goedgekeurd bewakingsprogramma voor KHVD (gezondheidsstatus van categorie II).

I.3. Specifieke voorschriften voor het behouden van een status van categorie I ten aanzien van KHVD

Indien overeenkomstig artikel 52 van Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking vereist is om een gezondheidsstatus van categorie I te behouden, worden alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartiment in kwestie waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, onderworpen aan gezondheidsinspecties en bemonsterd overeenkomstig tabel 2.B van punt III van dit deel, rekening houdend met het risiconiveau van de kwekerij voor insleep van KHV.

De frequentie van de gezondheidsinspecties voor compartimenten van categorie I ten aanzien van KHVD die in continentale gebieden liggen en die een of meer kwekerijen omvatten waarvan de gezondheidsstatus ten aanzien van KHVD overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 2, bij Richtlijn 2006/88/EG afhangt van de gezondheidsstatus van de omringende natuurlijke wateren ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte, moet overeenstemmen met het in tabel 2.C vermelde aantal voor een hoog risiconiveau.

In lidstaten, gebieden of compartimenten waar het aantal kwekerijen beperkt is en gerichte bewaking bij deze kwekerijen onvoldoende epidemiologische gegevens oplevert, moeten de bewakingsprogramma's voor het behouden van de ziektevrije status overeenkomstig punt I.1 geselecteerde bemonsteringspunten omvatten.

Die bemonsteringspunten worden volgens het beginsel van een roterende steekproef (50 % van de bemonsteringspunten per jaar) geïnspecteerd en bemonsterd. De bemonstering wordt uitgevoerd overeenkomstig tabel 2.C van punt III. De monsters worden geselecteerd, voorbewerkt en onderzocht zoals beschreven in punt II en de laboratoriumonderzoeken moeten negatieve resultaten ten aanzien van de aanwezigheid van de verwekker van KHVD opleveren.

De ziektevrije status blijft slechts behouden zolang het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten oplevert voor KHVD, en elke verdenking van KHVD moet overeenkomstig de diagnosemethoden van punt III.2 worden weerlegd.

I.4. Specifieke voorschriften voor de opheffing van de inperkingsmaatregelen overeenkomstig artikel 39 van Richtlijn 2006/88/EG voor het verkrijgen van een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van KHVD in lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie V

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van KHVD, kan een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, mits:

a) aan de voorwaarden van punt I.2.2.1, onder a), b) en c), is voldaan. Indien stillegging technisch niet mogelijk is, worden de betrokken kwekerijen onderworpen aan een alternatieve maatregel die een bijna gelijkwaardige waarborg biedt voor de uitroeiing van KHV in de kwekerij en haar omgeving;

b) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen en alle andere stilgelegde/overeenkomstig het onder a) bepaalde aan alternatieve maatregelen onderworpen kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden zijn voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I, II of III ten aanzien van KHVD;

c) het uitzetten van de vis pas heeft plaatsgevonden nadat alle officieel besmet verklaarde kwekerijen waren leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd/onderworpen aan alternatieve maatregelen zoals bedoeld onder a);

II. **Diagnose- en bemonsteringsmethoden voor bewaking met het oog op het verkrijgen en behouden van de ziektevrije status ten aanzien van KHVD**

II.1. Monsters

Het te onderzoeken weefselmateriaal bestaat uit delen van de kieuw en de nier. Stukjes orgaan van maximaal twee vissen mogen worden samengevoegd.

II.2. Diagnosemethoden voor de bewaking met het oog op het verkrijgen en behouden van de ziektevrije status ten aanzien van KHVD

De diagnosemethode voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van KHVD is realtime-PCR (qPCR), overeenkomstig de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van bijlage II, deel 2, punt II.

III. **Diagnose- en bemonsteringsmethoden voor officiële onderzoeken om een verdenking van KHVD te bevestigen dan wel te weerleggen**

III.1. Monsters

Het te onderzoeken weefselmateriaal bestaat uit delen van de kieuw en de nier. Stukjes orgaan van maximaal twee vissen mogen worden samengevoegd.

III.2. Officieel onderzoek en diagnosemethoden om een besmetting met KHV te weerleggen dan wel te bevestigen

Wanneer overeenkomstig artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG een verdenking van KHVD moet worden bevestigd dan wel weerlegd, wordt de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedure nageleefd:

a) het officiële onderzoek omvat ten minste één gezondheidsinspectie en één bemonstering van 10 vissen indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op besmetting met KHV worden waargenomen, of van 30 vissen indien geen klinische of postmortale symptomen worden waargenomen; De monsters worden getest met behulp van de onder b) vermelde diagnosemethode, overeenkomstig de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van bijlage II, deel 2, punt II;

b) de aanwezigheid van een besmetting met KHV wordt als bevestigd beschouwd indien KHV is aangetoond met behulp van PCR;

een verdenking van KHVD kan worden weerlegd indien deze test geen verdere aanwijzingen oplevert voor de aanwezigheid van KHV.

Tabel 2.A

Bewakingsprogramma voor gebieden en compartimenten voor de in punt I.2.1 bedoelde tweejarige controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van KHVD

		Aantal klinische inspecties per jaar (twee jaar)	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar (twee jaar)	Aantal vissen in het monster
Kwekerijen/bemonsteringslocaties	Eerste twee jaar van de bewakingsperiode	2	2	75 [1]
	Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 2			

[1] De monsters moeten worden genomen bij een aantal vissen dat de opsporing van KHV met een betrouwbaarheid van 95 % waarborgt bij een aangenomen prevalentie van 5 %.

Tabel 2.B

Bewakingsprogramma voor gebieden en compartimenten voor de in punt I.2.1 bedoelde vierjarige controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van KHVD

		Aantal klinische inspecties per jaar	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar	Aantal vissen in het monster
Kwekerijen/bemonsteringslocaties	Eerste twee jaar van de bewakingsperiode	1	1	30
Kwekerijen/bemonsteringslocaties	Laatste twee jaar van de bewakingsperiode	2	2	30
	Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 2			

Tabel 2.C

Bewakingsprogramma's voor gebieden of compartimenten voor het behouden van de ziektevrije status ten aanzien van KHVD, zoals bedoeld in punt I.3

Risiconiveau	Aantal gezondheidsinspecties	Aantal vissen in het monster
Hoog	Twee per jaar	30
Gemiddeld	Eén per jaar	30
Laag	Eén per twee jaar	30

Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 2

Tabel 2.D

Bewakingsprogramma's voor het behouden van de ziektevrije status ten aanzien van KHVD van lidstaten, gebieden of compartimenten waar het aantal kwekerijen beperkt is en gerichte bewaking bij deze kwekerijen onvoldoende epidemiologische gegevens oplevert, zoals bedoeld in punt I.3

	Aantal klinische inspecties per jaar	Aantal laboratoriumonder-zoeken per jaar	Aantal vissen in het monster
Bemonsteringspunten	Eén per twee jaar	Eén per twee jaar	30

Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 2

DEEL 3

BEWAKINGS- EN BESTRIJDINGSMETHODEN VOOR INFECTIEUZE ZALMANEMIE (ISA)

I. **Voorschriften voor bewakings- en uitroeiingsprogramma's voor het verkrijgen en behouden van een ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van ISA en het inperken van een besmetting met ISAV met HPR-deletie**

I.1. Algemene voorschriften

Indien gezondheidsinspecties en bemonstering van kwekerijen overeenkomstig bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij Richtlijn 2006/88/EG meer dan één keer per jaar moeten worden uitgevoerd, duren de intervallen tussen de gezondheidsinspecties of de bemonsteringen zo lang mogelijk.

Indien overeenkomstig bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, worden het aantal en de geografische spreiding van de bemonsteringspunten zo bepaald dat een redelijke dekking van de lidstaat, het gebied of het compartiment wordt behaald. De bemonsteringspunten moeten ook representatief zijn voor de verschillende ecosystemen waarin de natuurlijke populaties van gevoelige soorten voorkomen.

Bij de gezondheidsinspecties worden alle productie-eenheden, zoals vijvers, tanks en netkooien, op de aanwezigheid van dode en zwakke vissen en van vissen met abnormaal gedrag gecontroleerd. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan de plaats waar het water wegloopt aangezien zwakke vissen meestal daar te vinden zijn wegens de stroming van het water.

De te bemonsteren vis wordt als volgt geselecteerd:

a) alleen stervende of pas gestorven, maar nog niet in staat van ontbinding verkerende vissen worden geselecteerd; met name vissen die anemie, bloedingen of andere klinische symptomen vertonen die wijzen op doorbloedingsstoornissen, worden bij voorrang verzameld;

b) indien Atlantische zalm een van de gevoelige soorten op de locatie is, krijgen monsters van Atlantische zalm voorrang. Indien er geen Atlantische zalm in de viskwekerij aanwezig is, moeten andere gevoelige soorten worden bemonsterd;

c) indien meer dan één waterbron voor de productie van vis wordt gebruikt, worden vissen die alle waterbronnen vertegenwoordigen in het monster opgenomen;

d) de selectie omvat vissen die zo zijn gekozen dat alle productie-eenheden van de kwekerij, zoals netkooien, tanks en vijvers, en alle jaarklassen evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn.

I.2. Specifieke voorschriften voor het verkrijgen van een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van ISA

I.2.1. Bewakingsprogramma's

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus ten aanzien van ISA van categorie III, overeenkomstig bijlage III, deel B, bij Richtlijn 2006/88/EG, kan een gezondheidsstatus ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte van categorie I behalen, indien alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartimenten waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, voldoen aan de relevante voorschriften van bijlage V bij die richtlijn en al die kwekerijen en, indien voorgeschreven volgens bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij die richtlijn, alle overeenkomstig dat punt geselecteerde bemonsteringspunten onder natuurlijke populaties aan het volgende bewakingsprogramma zijn onderworpen:

a) de kwekerijen of bemonsteringspunten zijn aan gezondheidsinspecties onderworpen en bemonsterd gedurende een periode van ten minste twee opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 3.A van punt II;

b) gedurende die periode van twee jaren moet het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor ISAV met HPR-deletie en moet elke verdenking van ISA overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 zijn weerlegd;

c) indien tijdens de uitvoering van het bewakingsprogramma ISA is bevestigd in een in dat bewakingsprogramma opgenomen kwekerij, en de gezondheidsstatus van categorie II daarvan derhalve is ingetrokken, moet een uitroeiingsprogramma overeenkomstig punt I.2.2 zijn uitgevoerd.

I.2.2. Uitroeiingsprogramma's

I.2.2.1. Algemene voorschriften

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van ISA kan een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, indien alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, zijn onderworpen aan een uitroeiingsprogramma dat voldoet aan de bepalingen onder a) tot en met e) hieronder:

a) de minimale bestrijdingsmaatregelen van hoofdstuk V, afdeling 3, van Richtlijn 2006/88/EG zijn effectief toegepast en met name is in de nabijheid van de kwekerij(en) die officieel met ISAV met HPR-deletie besmet zijn verklaard of waar ISA is bevestigd, een beperkingsgebied zoals bedoeld in artikel 32, onder b), van die richtlijn ingesteld, dat een beschermings- en toezichtsgebied omvat.

Het beperkingsgebied moet per geval zijn vastgesteld, rekening houdend met factoren die van invloed zijn op de risico's van de verspreiding van ISA onder kweekvis of wilde vis, zoals: aantal, percentage en verdeling van gestorven vissen in de kwekerij of de kwekerij die is besmet met ISAV met HPR-deletie of waar de aanwezigheid van ISA is bevestigd; de afstand en dichtheid van naburige kwekerijen; de nabijheid van slachthuizen; contactkwekerijen; de in de kwekerijen aanwezige soorten; de in de door de ziekte getroffen en de naburige kwekerijen toegepaste kweekpraktijken; de hydrodynamische omstandigheden en andere uit epidemiologisch oogpunt significante factoren.

Voor het instellen van de beschermings- en toezichtsgebieden gelden de volgende minimale voorschriften voor de geografische afbakening van die gebieden:

i) in de onmiddellijke omgeving van een officieel met ISA besmet verklaarde kwekerij wordt een beschermingsgebied ingesteld, dat overeenkomt met:

1. in kustgebieden: een gebied dat valt binnen een cirkel met een straal die ten minste de breedte van één intergetijdengebied of, als dit meer is, ten minste 5 km bedraagt, gecentreerd op de officieel met ISA besmet verklaarde kwekerij, of een vergelijkbaar gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald;

2. in in het binnenland gelegen gebieden: het gehele stroomgebied van de officieel met ISA besmet verklaarde kwekerij; de bevoegde autoriteit kan het gebied beperken tot delen van het stroomgebied, mits de preventie van de verspreiding van ISA niet in het gedrang komt;

ii) buiten het beschermingsgebied wordt een toezichtsgebied ingesteld, dat overeenkomt met:

1. in kustgebieden: een gebied rondom het beschermingsgebied, bestaande uit elkaar overlappende intergetijdengebieden; of een gebied rondom het beschermingsgebied, vallend binnen een cirkel met een straal van 10 km vanaf het middelpunt van het beschermingsgebied; of een vergelijkbaar gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald; of

2. in in het binnenland gelegen gebieden: een uitgebreid gebied buiten het ingestelde beschermingsgebied;

b) alle kwekerijen binnen het beschermingsgebied waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden en die niet officieel met ISA besmet zijn verklaard, worden onderworpen aan een officieel onderzoek dat ten minste uit de volgende onderdelen bestaat:

i) de bemonstering voor het testen van ten minste 10 stervende vissen indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op ISA worden waargenomen, of van ten minste 30 vissen indien geen klinische of postmortale symptomen worden waargenomen;

ii) één gezondheidsinspectie; in de kwekerijen waar de in punt i) bedoelde tests negatieve resultaten hebben opgeleverd, worden voortaan één keer per maand gezondheidsinspecties uitgevoerd, totdat het beschermingsgebied wordt ingetrokken overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

c) alle kwekerijen die officieel met ISAV met HPR-deletie besmet zijn verklaard of waar de aanwezigheid van ISA is bevestigd, worden leeggemaakt, gereinigd, ontsmet, en gedurende ten minste drie maanden stilgelegd; De beschermings- en toezichtsgebieden kunnen worden opgeheven wanneer alle kwekerijen in het beschermingsgebied zijn leeggemaakt, gereinigd en ontsmet en er vervolgens gedurende ten minste zes weken een gelijktijdige stillegging heeft plaatsgevonden.

Tijdens het stilleggen van de officieel besmet verklaarde kwekerijen worden de beschermingsgebieden omgezet in toezichtsgebieden.

De bevoegde autoriteit kan besluiten het leegmaken, reinigen, ontsmetten en stilleggen van andere kwekerijen in de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden verplicht te stellen. De bevoegde autoriteit stelt op basis van een risicobeoordeling per geval vast hoe lang de stillegging van die kwekerijen moet duren;

d) alle kwekerijen die officieel met ISAV met HPR-deletie besmet zijn verklaard of waar de aanwezigheid van ISA is bevestigd, alsmede alle andere stilgelegde kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden, worden voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten van categorie I) ten aanzien van ISA.

Het uitzetten van de vis vindt pas plaats wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

e) alle kwekerijen in de (het) onder het uitroeiingsprogramma vallende lidstaat, gebied of compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, en, indien gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, alle overeenkomstig punt I.1 geselecteerde bemonsteringspunten, worden vervolgens aan het bewakingsprogramma van punt I.2.1 onderworpen.

I.2.2.2. Voorschriften voor het opnieuw verkrijgen van de ziektevrije status voor continentale compartimenten die één enkele kwekerij omvatten waarvan eerder was verklaard dat deze een gezondheidsstatus van categorie I had

Een continentaal compartiment dat één enkele kwekerij omvat met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van ISA, waarvan de gezondheidsstatus overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 3, bij Richtlijn 2006/88/EG niet afhangt van de omringende natuurlijke wateren en waarvan de gezondheidsstatus van categorie I is ingetrokken overeenkomstig artikel 53, lid 3 van die richtlijn, kan deze onmiddellijk opnieuw verkrijgen zodra de bevoegde autoriteit heeft bevestigd dat aan de volgende voorwaarden is voldaan:

a) de kwekerij is leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd; de stillegging duurt ten minste zes weken;

b) zij is voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van ISA.

I.3. Minimale bestrijdingsvoorschriften voor het behouden van een status van categorie I ten aanzien van ISA

Indien overeenkomstig artikel 52 van Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking vereist is om een gezondheidsstatus van categorie I te behouden, worden alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartiment in kwestie waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, onderworpen aan gezondheidsinspecties en bemonsterd overeenkomstig tabel 3.B ([1]) van punt II van dit deel, rekening houdend met het risiconiveau van de kwekerij voor insleep van ISA.

Bij vaststelling van de frequentie van de gezondheidsinspecties voor een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van ISA voor compartimenten die in continentale gebieden liggen en waarvan de gezondheidsstatus ten aanzien van ISA afhangt van de gezondheidsstatus van de omringende natuurlijke wateren waarin de Atlantische zalm (*Salmo salar*) voorkomt, wordt het risico op insleep van ISA groot geacht.

De ziektevrije status ten aanzien van ISA kan slechts behouden blijven zolang het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten heeft opgeleverd voor ISAV met HPR-deletie en elke verdenking van ISA overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 is weerlegd.

I.4. Specifieke voorschriften voor het verkrijgen van een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van ISAV met HPR-deletie in lidstaten, gebieden of compartimenten die voorheen over een gezondheidsstatus van categorie V beschikten

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van ISA, kan een status van categorie III verkrijgen, mits:

a) aan de voorwaarden van punt I.2.2.1, onder a), b) en c), is voldaan. Indien stillegging technisch niet mogelijk is, worden de kwekerijen onderworpen aan een alternatieve maatregel die een bijna gelijkwaardige waarborg biedt voor de uitroeiing van ISAV in de kwekerij en haar omgeving;

b) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen en alle andere stilgelegde of overeenkomstig het onder a) bepaalde aan alternatieve maatregelen onderworpen kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden zijn voorzien van nieuw uitgezette vis afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I, II of III ten aanzien van ISA;

c) het uitzetten van de vis heeft pas plaatsgevonden nadat alle officieel besmet verklaarde kwekerijen waren leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd/onderworpen aan alternatieve maatregelen zoals bedoeld onder a);

d) gedurende de periode van twee jaar na de voltooiing van de onder a), b) en c) bedoelde maatregelen de aanwezigheid van ISAV met HPR-deletie niet is bevestigd en tijdens deze periode gerezen verdenkingen overeenkomstig de procedures van punt II.3 zijn weerlegd.

([1]) Niet van toepassing op kwekerijen waar alleen de regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) en/of de zeeforel (*Salmo trutta*) worden gekweekt en waarvan de watertoevoer afkomstig is van bronnen van zoet water waarin de Atlantische zalm (*Salmo salar*) niet voorkomt.

II. **Diagnosemethoden en officiële onderzoeken**

II.1. Monsters

Het te onderzoeken weefselmateriaal is:

a) histologie: kopnier, lever, hart, alvleesklier, darm, milt en kieuw;

b) immunohistochemie: rompnier en hart, met inbegrip van kleppen en *bulbus arteriosus*;

c) RT-qPCR-analyse: rompnier en hart;

d) Viruskweek: rompnier, hart, lever en milt.

Stukjes orgaan van maximaal vijf vissen mogen worden samengevoegd.

II.2. Diagnosemethoden voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van ISA

De te gebruiken diagnosemethode voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van ISA overeenkomstig de punten I.2 en I.3 is RT-qPCR, gevolgd door het sequencen van positieve monsters overeenkomstig de gedetailleerde methoden en procedures van bijlage II, deel 3.

In het geval RT-qPCR een positief resultaat oplevert, worden aanvullende monsters getest alvorens de eerste controlemaatregelen, zoals bedoeld in artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG, worden uitgevoerd.

Die monsters worden als volgt getest overeenkomstig de gedetailleerde methoden en procedures van bijlage II, deel 3:

a) screenen van de monsters met behulp van RT-qPCR, met inbegrip van het sequencen van het HE-gen om HPR-deletie te verifiëren;

en

b) onderzoek in weefselpreparaten met behulp van specifieke antilichamen tegen ISAV (te weten IHC op gefixeerde coupes of IFAT op imprints (afdrukken) van weefsel; of

c) isoleren en identificeren van ISAV in celcultuur van ten minste één monster van om het even welke vis uit de kwekerij.

II.3. Officieel onderzoek en diagnosemethoden om de aanwezigheid van ISA te weerleggen dan wel te bevestigen

Wanneer overeenkomstig artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG een verdenking van ISA moet worden bevestigd dan wel weerlegd, wordt de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedure nageleefd:

a) het officiële onderzoek, dat ten minste één gezondheidsinspectie en één bemonstering van 10 stervende vissen omvat indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op ISA worden waargenomen. Indien geen klinische of postmortale symptomen die wijzen op ISA worden waargenomen, wordt de gezondheidsinspectie gevolgd door een gerichte bemonstering van ten minste 30 stervende vissen of zojuist gestorven, in normale staat verkerende vissen overeenkomstig punt I.1. De monsters worden getest overeenkomstig de onder b) vermelde diagnosemethoden;

b) in het geval RT-qPCR een positief resultaat voor ISAV met HPR-deletie oplevert, worden aanvullende monsters getest alvorens de eerste controlemaatregelen, zoals bedoeld in artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG, worden uitgevoerd. Een verdenking van besmetting met ISA wordt aan de hand van de volgende criteria bevestigd met behulp van de methoden en procedures van bijlage II, deel 3:

   i) aantonen van ISAV met behulp van RT-qPCR, met inbegrip van het sequencen van het HE-gen om HPR-deletie te verifiëren, en aantonen van ISAV in weefselpreparaten met behulp van specifieke antilichamen tegen ISAV (te weten IHC op gefixeerde coupes of IFAT op imprints (afdrukken) van weefsel,

   of

ii) aantonen van ISAV met behulp van RT-qPCR, met inbegrip van het sequencen van het HE-gen om HPR-deletie te verifiëren, en

isoleren en identificeren van ISAV in celcultuur van ten minste één monster van om het even welke vis uit de kwekerij;

c) indien klinische, macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen of histopathologische bevindingen die op ISA wijzen, worden vastgesteld, moeten deze bevindingen worden bevestigd door middel van virusdetectie met behulp van twee diagnosemethoden die op onderling onafhankelijke detectiebeginselen berusten, zoals RT-qPCR en IHC, overeenkomstig bijlage II, deel 3.

Een verdenking van ISA kan worden weerlegd indien gedurende twaalf maanden vanaf de datum waarop de verdenking is gerezen, tests en inspecties geen verdere aanwijzingen voor de aanwezigheid van ISA hebben opgeleverd.

Tabel 3.A

Bewakingsprogramma voor gebieden en compartimenten voor de in punt I.2.1 bedoelde tweejarige controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van ISA

Jaar van het bewakingsprogramma	Aantal gezondheidsinspecties per jaar (twee jaar)	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar (twee jaar)	Aantal te bemonsteren vissen per jaar
Jaar 1	6	2 (1)	2 * 75 (2)
Jaar 2	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) De monsters moeten worden verzameld, opgeslagen en onderzocht gedurende twee jaarlijkse testperioden van elk één maand (namelijk in het voor- en in het najaar) of, in voorkomend geval, op basis van praktische overwegingen.
(2) Maximumaantal vissen per verzamelmonster: 5.

Tabel 3.B

Bewakingsprogramma's voor gebieden of compartimenten voor het behouden van de ziektevrije status ten aanzien van ISA, zoals bedoeld in punt I.3 (2)

Risiconiveau	Aantal gezondheidsinspecties per jaar	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar	Aantal te bemonsteren vissen per jaar
Hoog	2	2 (1)	2 * 30
Gemiddeld	1	1 (1)	30
Laag	Eén per twee jaar	Eén per twee jaar	Dertig per twee jaar

(1) De monsters moeten worden verzameld en onderzocht gedurende twee jaarlijkse testperioden van elk één maand (namelijk in het voor- en in het najaar) of, in voorkomend geval, op basis van praktische overwegingen.
(2) Niet van toepassing op kwekerijen waar alleen de regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) en/of de zeeforel (*Salmo trutta*) worden gekweekt en waarvan de watertoevoer afkomstig is van bronnen van zoet water waarin de Atlantische zalm (*Salmo salar*) niet voorkomt.

DEEL 4

BEWAKINGS- EN BESTRIJDINGSMETHODEN VOOR BESMETTING MET *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Voorschriften voor bewakings- en uitroeiingsprogramma's voor het verkrijgen en behouden van een ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens***

I.1. Algemene voorschriften

De gezondheidsinspecties en, in voorkomend geval, de bemonstering voor laboratoriumonderzoek worden uitgevoerd in de periode van het jaar waarvan bekend is dat de prevalentie van de parasiet in de lidstaat, het gebied of het compartiment maximaal is. Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, wordt de bemonstering onmiddellijk nadat de watertemperatuur de grens van 17 °C heeft overschreden, uitgevoerd.

Indien overeenkomstig de voorschriften van deel 4 weekdieren moeten worden bemonsterd, zijn de volgende criteria van toepassing:

a) indien *Ostrea* spp. en *Mytilus* spp. in de productie-eenheden of in het productiegebied aanwezig zijn, worden beide geslachten bemonsterd, waarbij de monsters dezelfde grootte hebben. Indien slechts één van deze geslachten aanwezig is, wordt dit geslacht bemonsterd. Indien noch het geslacht *Ostrea*, noch het geslacht *Mytilus* aanwezig zijn, moet het monster representatief zijn voor alle andere aanwezige gevoelige soorten;

b) als zwakke, openstaande of pas gestorven, maar nog niet in staat van ontbinding verkerende weekdieren in de productie-eenheden aanwezig zijn, worden bij voorkeur die weekdieren geselecteerd. Indien dergelijke weekdieren niet aanwezig zijn, moet de selectie de oudste gezonde weekdieren omvatten;

c) bij de bemonstering van weekdierkwekerijen waar meer dan één waterbron voor de productie van weekdieren wordt gebruikt, worden weekdieren die alle waterbronnen vertegenwoordigen in het monster opgenomen, zodat alle delen van het bedrijf evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn;

d) bij de bemonstering in weekdierkweekgebieden worden weekdieren van een voldoende aantal bemonsteringspunten in het monster opgenomen, zodat alle delen van het weekdierkweekgebied evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn. De voornaamste factoren waarmee rekening moet worden gehouden bij de selectie van deze bemonsteringspunten zijn: bemonsteringspunten waar *Marteilia refringens* eerder is geconstateerd, dichtheid van de bestanden, waterstromen, aanwezigheid van gevoelige soorten, aanwezigheid van vectorsoorten, bathymetrische kenmerken en beheerpraktijken. De bemonstering omvat ook natuurlijke gronden.

I.2. Specifieke voorschriften voor het verkrijgen van een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van *Marteilia refringens*

I.2.1. Bewakingsprogramma's

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens* kan een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, indien alle kwekerijen of weekdierkweekgebieden in de lidstaat, het gebied of het compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, ten minste zijn onderworpen aan het volgende bewakingsprogramma, dat gezondheidsinspecties en bemonstering voor testdoeleinden omvat:

bewakingsprogramma met een looptijd van twee jaar:

a) de kwekerijen of weekdierkweekgebieden zijn aan gezondheidsinspecties onderworpen en bemonsterd gedurende een periode van ten minste twee opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 4.A van punt II;

b) gedurende die periode van twee jaren heeft het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten opgeleverd voor *Marteilia refringens* en is elke verdenking van *Marteilia refringens* overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 weerlegd;

c) indien *Ostrea edulis, Mytilus edulis* of *Mytilus galloprovincialis*, afkomstig uit een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie I, in het monster moeten worden opgenomen, moeten zij niet later dan in het voorjaar net vóór de periode waarin het bewakingsprogramma wordt uitgevoerd, in de kwekerij of het weekdierkweekgebied zijn binnengebracht.

I.2.2. Uitroeiingsprogramma's

De uitroeiing van *Marteilia refringens* wordt in de meeste gevallen als onmogelijk beschouwd, maar in het geval de lidstaat dit wel haalbaar acht, is het volgende model voor een uitroeiingsprogramma van toepassing.

Een lidstaat, gebieden of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens* kan een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, indien alle kwekerijen of weekdierkweekgebieden in die lidstaat, dat gebied of dat compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, ten minste aan het volgende uitroeiingsprogramma zijn onderworpen:

a) de maatregelen van hoofdstuk V, afdeling 3, van Richtlijn 2006/88/EG zijn effectief toegepast en met name is in de nabijheid van de (het) officieel met *Marteilia refringens* besmet verklaarde kwekerij(en) of weekdierkweekgebied(en) een beperkingsgebied zoals bedoeld in artikel 32, onder b), van die richtlijn ingesteld, dat een beschermings- en toezichtsgebied omvat.

Het beperkingsgebied wordt per geval vastgesteld, rekening houdend met factoren die van invloed zijn op de risico's van de verspreiding van *Marteilia refringens*, zoals: aantal, percentage en verdeling van gestorven weekdieren in de (het) met *Marteilia refringens* besmette kwekerij of weekdierkweekgebied, met inbegrip van wilde weekdieren; de afstand en dichtheid van naburige kwekerijen of weekdierkweekgebieden, met inbegrip van wilde weekdieren; de nabijheid van verwerkingsinrichtingen, contactkwekerijen of weekdierkweekgebieden; de in de kwekerijen of weekdierkweekgebieden aanwezige soorten, in het bijzonder gevoelige soorten en vectorsoorten; de in de door de ziekte getroffen en de naburige kwekerijen of weekdierkweekgebieden toegepaste kweekpraktijken; de hydrodynamische omstandigheden en andere uit epidemiologisch oogpunt significante factoren.

Voor het instellen van de beschermings- en toezichtsgebieden gelden de volgende minimale voorschriften:

i) in de onmiddellijke omgeving van een officieel met *Marteilia refringens* besmet verklaard(e) kwekerij of weekdierkweekgebied wordt een beschermingsgebied ingesteld, dat overeenkomt met een gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald;

ii) buiten het beschermingsgebied wordt een toezichtsgebied ingesteld, dat overeenkomt met een rondom het beschermingsgebied gelegen gebied, dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald;

b) alle kwekerijen en weekdierkweekgebieden binnen het beschermingsgebied waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden en die niet officieel met *Marteilia refringens* besmet zijn verklaard, worden onderworpen aan een officieel onderzoek dat ten minste de bemonstering voor het testen van 150 weekdieren na aanvang van de periode waarin *Marteilia refringens* wordt overgebracht. Wanneer die periode niet bekend is, begint de bemonstering in de periode nadat de watertemperatuur de grens van 17 °C heeft overschreden;

c) alle officieel met *Marteilia refringens* besmet verklaarde kwekerijen en weekdierkweekgebieden worden leeggemaakt, stilgelegd en indien mogelijk gereinigd, en ontsmet.

De stillegging duurt ten minste:

i) twee maanden voor kwekerijen en weekdierkweekgebieden die beperkt in verbinding staan met de omliggende wateren, zoals broedvoorzieningen (hatchery's) en opkweekvoorzieningen (nursery's);

ii) twee maanden voor kwekerijen en weekdierkweekgebieden met onbeperkte verbindingen met de omliggende wateren, mits de besmette weekdieren van gevoelige soorten en de weekdieren van gevoelige soorten met epidemiologische verbanden met de (het) besmette kwekerij of weekdierkweekgebied zijn geoogst of verwijderd vóór de periode van het jaar waarvan bekend is dat de prevalentie van *Marteilia refringens* maximaal is, of wanneer die periode niet bekend is, vóór de periode waarin de watertemperatuur de grens van 17 °C zal overschrijden;

iii) veertien maanden voor kwekerijen en weekdierkweekgebieden met onbeperkte verbindingen met de omliggende wateren, indien de besmette weekdieren van gevoelige soorten en de weekdieren van gevoelige soorten met epidemiologische verbanden met de (het) besmette kwekerij of weekdierkweekgebied niet zijn geoogst of verwijderd vóór de periode van het jaar waarvan bekend is dat de prevalentie van *Marteilia refringens* maximaal is, of wanneer die gegevens niet beschikbaar zijn, indien de weekdieren van gevoelige soorten niet zijn geoogst of verwijderd vóór de periode waarin de watertemperatuur de grens van 17 °C zal overschrijden.

Wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen en weekdierkweekgebieden zijn leeggemaakt, vindt gedurende ten minste vier weken een gelijktijdige stillegging plaats.

De bevoegde autoriteit kan naargelang het geval besluiten het leegmaken, reinigen, ontsmetten en stilleggen van andere kwekerijen of weekdierkweekgebieden in de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden verplicht te stellen. De bevoegde autoriteit stelt op basis van een risicobeoordeling per geval vast hoe lang de stillegging moet duren;

d) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen of weekdierkweekgebieden en alle andere stilgelegde kwekerijen of weekdierkweekgebieden binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden worden voorzien van nieuw uitgezette weekdieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I) ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens*.

Het uitzetten van de weekdieren vindt pas plaats wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd overeenkomstig punt I.2.2, onder c);

e) alle kwekerijen en weekdierkweekgebieden in de (het) onder het uitroeiingsprogramma vallende lidstaat, gebied of compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, worden vervolgens aan het bewakingsprogramma van punt I.2.1 van dit deel onderworpen.

I.3. Specifieke voorschriften voor het behouden van de ziektevrije gezondheidsstatus (categorie I) ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens*

Indien overeenkomstig artikel 52 van Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking vereist is om een gezondheidsstatus van categorie I te behouden, worden alle kwekerijen of weekdierkweekgebieden in de lidstaat, het gebied of het compartiment in kwestie waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, onderworpen aan gezondheidsinspecties en bemonsterd overeenkomstig tabel 4.B van punt II, rekening houdend met het risiconiveau van de kwekerij of het weekdierkweekgebied voor insleep van *Marteilia refringens*.

De ziektevrije status kan slechts behouden blijven zolang alle monsters bij gebruik van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor *Marteilia refringens*, en elke verdenking van *Marteilia refringens* overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 is weerlegd.

I.4. Voorschriften voor de opheffing van de inperkingsmaatregelen overeenkomstig artikel 39 van Richtlijn 2006/88/EG (wijziging van een gezondheidsstatus van categorie V naar een gezondheidsstatus van categorie III) ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens*

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens*, kan een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, mits:

a) aan de voorwaarden van punt I.2.2, onder a), b) en c), is voldaan. Indien stillegging technisch niet mogelijk is, worden de kwekerijen onderworpen aan een alternatieve maatregel die een bijna gelijkwaardige waarborg biedt voor de uitroeiing van *Marteilia refringens* in de kwekerij en haar omgeving;

b) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen of weekdierkweekgebieden en alle andere stilgelegde/overeenkomstig het onder a) bepaalde aan alternatieve maatregelen onderworpen kwekerijen of weekdierkweekgebieden binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden zijn voorzien van nieuw uitgezette weekdieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I, II of III ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens*;

c) het uitzetten van de weekdieren pas heeft plaatsgevonden nadat alle officieel besmet verklaarde kwekerijen of weekdierkweekgebieden waren leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd, dan wel onderworpen aan alternatieve maatregelen zoals bedoeld onder a);

d) gedurende de periode van twee jaar na de voltooiing van de onder a), b) en c) bedoelde maatregelen besmetting met *Marteilia refringens* niet is bevestigd en tijdens deze periode gerezen verdenkingen overeenkomstig de procedures van punt II.3 zijn weerlegd.

II. **Diagnosemethoden en officiële onderzoeken**

II.1. Monsters

Het hele dier wordt naar het laboratorium gezonden voor de uitvoering van de in de punten II.2 en II.3 bedoelde diagnostische tests.

II.2. Diagnosemethoden voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens*

De te gebruiken diagnosemethoden voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens*, overeenkomstig de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van bijlage II, deel 4, zijn histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel, of PCR.

II.3. Officieel onderzoek en diagnosemethoden om de aanwezigheid van besmetting met *Marteilia refringens* te bevestigen of de verdenking van een dergelijke besmetting te weerleggen

Wanneer overeenkomstig artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG een verdenking van besmetting met *Marteilia refringens* moet worden bevestigd dan wel weerlegd, wordt de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedure nageleefd:

a) het officiële onderzoek omvat ten minste één bemonstering van 30 weekdieren van gevoelige soorten, indien de verdenking op een mortaliteitsverslag berust of, indien dit niet het geval is, van 150 weekdieren van gevoelige soorten na aanvang van de periode waarin *Marteilia refringens* wordt overgebracht. Wanneer die periode niet bekend is, begint de bemonstering in de periode nadat de watertemperatuur de grens van 17 °C heeft overschreden;

b) De monsters worden getest met behulp van de in punt i) vermelde diagnosemethoden, overeenkomstig de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van bijlage II, deel 4, punt I:

i) de aanwezigheid van *Marteilia refringens* wordt als bevestigd beschouwd bij een positief resultaat op basis van histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel of in-situhybridisatie, in combinatie met een positief resultaat op basis van door sequencing aangevulde PCR;

ii) de verdenking van besmetting met *Marteilia refringens* kan worden weerlegd indien de in punt i) bedoelde tests geen verdere aanwijzingen opleveren voor de aanwezigheid van *Marteilia refringens*.

Tabel 4.A

Bewakingsprogramma voor lidstaten, gebieden of compartimenten voor de in punt I.2.1 bedoelde controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van *Marteilia refringens*

	Aantal gezondheidsinspecties per jaar	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar	Aantal weekdieren in het monster
Kwekerijen of weekdierkweekgebieden	1	1	150

Tabel 4.B

Bewakingsprogramma's voor lidstaten, gebieden of compartimenten voor het behouden van de ziektevrije status ten aanzien van *Marteilia refringens*, zoals bedoeld in punt I.3

Risiconiveau	Aantal gezondheidsinspecties	Aantal laboratoriumonderzoeken	Aantal weekdieren in het monster
Hoog	Eén per jaar	Eén per twee jaar	150
Gemiddeld	Eén per twee jaar	Eén per twee jaar	150
Laag	Eén per twee jaar	Om de vier jaar	150

DEEL 5

BEWAKINGS- EN BESTRIJDINGSMETHODEN VOOR BESMETTING MET *BONAMIA OSTREAE*

I. **Voorschriften voor bewakings- of uitroeiingsprogramma's voor het verkrijgen en behouden van een ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae***

I.1. Algemene voorschriften

De gezondheidsinspecties en, in voorkomend geval, de bemonstering van productie-eenheden worden uitgevoerd in de periode van het jaar waarvan bekend is dat de prevalentie van *Bonamia ostreae* in de lidstaat, het gebied of het compartiment maximaal is. Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, wordt de bemonstering in de winter of in het vroege voorjaar uitgevoerd.

Indien overeenkomstig de voorschriften van deel 5 weekdieren moeten worden bemonsterd, zijn de volgende criteria van toepassing:

a) Indien *Ostrea edulis* aanwezig is, bestaat het monster volledig uit die oestersoort. Indien *Ostrea edulis* niet aanwezig is, moet het monster representatief zijn voor alle andere aanwezige gevoelige soorten;

b) als zwakke, openstaande of pas gestorven, maar nog niet in staat van ontbinding verkerende weekdieren aanwezig zijn, worden bij voorkeur die weekdieren geselecteerd. Indien dergelijke weekdieren niet aanwezig zijn, moet de selectie de oudste gezonde weekdieren omvatten;

c) bij de bemonstering van kwekerijen waar meer dan één waterbron voor de productie van weekdieren wordt gebruikt, worden weekdieren die alle waterbronnen vertegenwoordigen in het monster opgenomen, zodat alle delen van het bedrijf evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn;

d) bij de bemonstering in weekdierkweekgebieden worden weekdieren van een voldoende aantal bemonsteringspunten in het monster opgenomen. De voornaamste factoren waarmee rekening moet worden gehouden bij de selectie van die bemonsteringspunten zijn: punten waar *Bonamia ostreae* eerder is geconstateerd, dichtheid van de bestanden, waterstromen, de aanwezigheid van gevoelige soorten, de aanwezigheid van vectorsoorten, bathymetrische kenmerken en beheerpraktijken. De bemonstering omvat ook natuurlijke gronden binnen de kweekgebieden of aangrenzend daaraan.

I.2. Specifieke voorschriften voor het verkrijgen van een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van *Bonamia ostreae*

I.2.1. Bewakingsprogramma's

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van *Bonamia ostreae* kan opnieuw een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, indien alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, ten minste zijn onderworpen aan het volgende bewakingsprogramma, dat gezondheidsinspecties en bemonstering voor testdoeleinden omvat:

bewakingsprogramma met een looptijd van twee jaar:

a) de kwekerijen en weekdierkweekgebieden waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, zijn aan gezondheidsinspecties onderworpen en bemonsterd gedurende een periode van ten minste twee opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 5.A van dit deel;

b) gedurende die periode van twee jaren heeft het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten opgeleverd voor *Bonamia ostreae* en is elke verdenking van *Bonamia ostreae* overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 weerlegd;

c) indien *Ostrea edulis*, afkomstig uit een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie I, in het monster moeten worden opgenomen, moeten zij niet later dan in het najaar net vóór de periode waarin het bewakingsprogramma wordt uitgevoerd, in de kwekerij of het weekdierkweekgebied zijn binnengebracht.

I.2.2. Uitroeiingsprogramma's

De uitroeiing van *Bonamia ostreae* wordt in de meeste gevallen als onmogelijk beschouwd, maar in het geval de lidstaat dit wel haalbaar acht, is het volgende model voor een uitroeiingsprogramma van toepassing.

Een lidstaat, gebieden of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van *Bonamia ostreae* kan opnieuw een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, indien alle kwekerijen of weekdierkweekgebieden in de lidstaat, het gebied of het compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, ten minste aan het volgende uitroeiingsprogramma zijn onderworpen:

a) de minimale bestrijdingsmaatregelen van hoofdstuk V, afdeling 3, van Richtlijn 2006/88/EG zijn effectief toegepast en met name is in de nabijheid van de (het) officieel met *Bonamia ostreae* besmet verklaarde kwekerij(en) of weekdierkweekgebied(en) een beperkingsgebied zoals bedoeld in artikel 32, onder b), van die richtlijn ingesteld, dat een beschermings- en toezichtsgebied omvat.

Het beperkingsgebied wordt per geval vastgesteld, rekening houdend met factoren die van invloed zijn op de risico's van de verspreiding van die in de lijst opgenomen ziekte, zoals: aantal, percentage, leeftijd en verdeling van gestorven weekdieren in de (het) met *Bonamia ostreae* besmette kwekerij of weekdierkweekgebied, met inbegrip van wilde weekdieren; de afstand en dichtheid van naburige kwekerijen of weekdierkweekgebieden, met inbegrip van wilde weekdieren; de nabijheid van verwerkingsinrichtingen, contactkwekerijen of weekdierkweekgebieden; de in de kwekerijen of weekdierkweekgebieden aanwezige soorten, in het bijzonder gevoelige soorten en vectorsoorten; in de door de ziekte getroffen en naburige bedrijven of kweekgebieden van weekdieren toegepaste kweekpraktijken; hydrodynamische omstandigheden en andere uit epidemiologisch oogpunt significante factoren.

Voor het instellen van de beschermings- en toezichtsgebieden gelden de volgende minimale voorschriften:

i) in de onmiddellijke omgeving van een officieel met *Bonamia ostreae* besmet verklaard(e) kwekerij of weekdierkweekgebied wordt een beschermingsgebied ingesteld, dat overeenkomt met een gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald;

ii) buiten het beschermingsgebied wordt een toezichtsgebied ingesteld, dat overeenkomt met een rondom het beschermingsgebied gelegen gebied, dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald;

b) alle kwekerijen en weekdierkweekgebieden binnen het beschermingsgebied waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden en die niet officieel met *Bonamia ostreae* besmet zijn verklaard, worden onderworpen aan een officieel onderzoek dat ten minste de bemonstering voor het testen van 150 weekdieren van gevoelige soorten na aanvang van de periode waarin *Bonamia ostreae* wordt overgebracht. Wanneer die periode niet bekend is, begint de bemonstering in de winter of het vroege voorjaar;

c) alle officieel met *Bonamia ostreae* besmet verklaarde kwekerijen en weekdierkweekgebieden worden leeggemaakt, stilgelegd en indien mogelijk gereinigd, en ontsmet. De stillegging duurt ten minste zes maanden.

Wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen of weekdierkweekgebieden zijn leeggemaakt, vindt gedurende ten minste vier weken een gelijktijdige stillegging plaats.

De bevoegde autoriteit kan naargelang het geval besluiten het leegmaken, reinigen, ontsmetten en stilleggen van andere kwekerijen of weekdierkweekgebieden in de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden verplicht te stellen. De bevoegde autoriteit stelt op basis van een risicobeoordeling per geval vast hoe lang de stillegging moet duren;

d) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen of weekdierkweekgebieden en alle andere stilgelegde kwekerijen of weekdierkweekgebieden binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden worden voorzien van nieuw uitgezette weekdieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I) ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae*. Het uitzetten van de weekdieren vindt pas plaats wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd overeenkomstig punt I.2.2, onder c);

e) alle kwekerijen en weekdierkweekgebieden in de (het) onder het uitroeiingsprogramma vallende lidstaat, gebied of compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, moeten vervolgens aan het bewakingsprogramma van punt I.2 worden onderworpen.

I.3. Specifieke voorschriften voor het behouden van de ziektevrije gezondheidsstatus (categorie I) ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae*

Indien overeenkomstig artikel 52 van Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking vereist is om een gezondheidsstatus van categorie I te behouden, worden alle kwekerijen of weekdierkweekgebieden in de lidstaat, het gebied of het compartiment in kwestie waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, onderworpen aan gezondheidsinspecties en bemonsterd overeenkomstig tabel 5.B van punt II van dit deel, rekening houdend met het risiconiveau van de kwekerij of het weekdierkweekgebied voor insleep van besmetting met *Bonamia ostreae*.

De ziektevrije status ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae* kan slechts behouden blijven zolang alle monsters bij gebruik van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor *Bonamia ostreae* en elke verdenking van *Bonamia ostreae* overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 is weerlegd.

I.4. Voorschriften voor de opheffing van de inperkingsmaatregelen overeenkomstig artikel 39 van Richtlijn 2006/88/EG (de wijziging van een gezondheidsstatus van categorie V naar een gezondheidsstatus van categorie III) ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae*

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae*, kan een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van die ziekte verkrijgen, mits:

a) aan de voorwaarden van punt I.2.2, onder a), b) en c), is voldaan. Indien stillegging technisch niet mogelijk is, worden de kwekerijen onderworpen aan een alternatieve maatregel die een bijna gelijkwaardige waarborg biedt voor de uitroeiing van *Bonamia ostreae* in de kwekerij en haar omgeving;

b) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen of weekdierkweekgebieden en alle andere stilgelegde/overeenkomstig het onder a) bepaalde aan alternatieve maatregelen onderworpen kwekerijen of weekdierkweekgebieden binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden zijn voorzien van nieuw uitgezette weekdieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I, II of III ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae*;

c) het uitzetten van de weekdieren pas heeft plaatsgevonden nadat alle officieel besmet verklaarde kwekerijen of weekdierkweekgebieden waren leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd/onderworpen aan alternatieve maatregelen zoals bedoeld onder a);

d) gedurende de periode van twee jaar na de voltooiing van de onder a), b) en c) bedoelde maatregelen besmetting met *Bonamia ostreae* niet is bevestigd en tijdens deze periode gerezen verdenkingen overeenkomstig de procedures van punt II.3 zijn weerlegd.

II. **Diagnosemethoden en diagnostische criteria**

II.1. Monsters

Het hele dier wordt naar het laboratorium gezonden voor de uitvoering van de in de punten II.2 en II.3 bedoelde diagnostische tests.

II.2. Diagnosemethoden voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae*

De te gebruiken diagnosemethode voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae* zijn histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel, of PCR. Bij de toepassing van deze diagnosemethoden worden de desbetreffende gedetailleerde methoden en procedures van bijlage II, deel 5, gevolgd.

II.3. Diagnostische criteria om de aanwezigheid van besmetting met *Bonamia ostreae* te bevestigen of de verdenking van een dergelijke besmetting te weerleggen

Wanneer overeenkomstig artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG een verdenking van besmetting met *Bonamia ostreae* moet worden bevestigd dan wel weerlegd, wordt de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedure nageleefd:

het officiële onderzoek omvat ten minste één bemonstering van 30 weekdieren van gevoelige soorten, indien de verdenking op een mortaliteitsverslag berust of, indien dit niet het geval is, van 150 weekdieren van gevoelige soorten na aanvang van de periode waarin *Bonamia ostreae* wordt overgebracht. Wanneer die periode niet bekend is, begint de bemonstering in de winter of het vroege voorjaar. De monsters worden getest met behulp van de in punt i) vermelde diagnosemethoden, overeenkomstig de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van bijlage II, deel 5, punt I:

i) de aanwezigheid van *Bonamia ostreae* wordt als bevestigd beschouwd bij een positief resultaat op basis van histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel of in-situhybridisatie, in combinatie met een positief resultaat op basis van door sequencing aangevulde PCR, overeenkomstig de erkende methoden en procedures van bijlage II, deel 5;

ii) de verdenking van besmetting met *Bonamia ostreae* wordt weerlegd indien die tests geen verdere aanwijzingen opleveren voor de aanwezigheid van *Bonamia ostreae*.

Tabel 5.A

Bewakingsprogramma voor lidstaten, gebieden of compartimenten voor de in punt I.2.1 bedoelde controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van *Bonamia ostreae*

	Aantal gezondheidsinspecties per jaar	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar	Aantal weekdieren in het monster
Kwekerijen of weekdierkweekgebieden	1	1	150

Tabel 5.B

Bewakingsprogramma's voor lidstaten, gebieden of compartimenten voor het behouden van de ziektevrije status ten aanzien van *Bonamia ostreae*, zoals bedoeld in punt I.3

Risiconiveau	Aantal gezondheidsinspecties	Aantal laboratoriumonderzoeken	Aantal weekdieren in het monster
Hoog	Eén per jaar	Eén per twee jaar	150
Gemiddeld	Eén per twee jaar	Eén per twee jaar	150
Laag	Eén per twee jaar	Om de vier jaar	150

DEEL 6

BEWAKINGS- EN BESTRIJDINGSMETHODEN VOOR WITTEVLEKKENZIEKTE (WHITE SPOT DISEASE, WSD)

I. **Voorschriften voor bewakings- en uitroeiingsprogramma's voor het verkrijgen en behouden van een ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van WSD en het inperken van een besmetting met WSSV**

I.1. Algemene voorschriften voor inspecties en bemonstering

De bemonstering van schaaldieren voor laboratoriumonderzoek wordt uitgevoerd wanneer de watertemperatuur waarschijnlijk haar hoogste jaarlijkse waarde bereikt. Dit voorschrift inzake de watertemperatuur is tevens van toepassing op gezondheidsinspecties, voor zover deze haalbaar en passend zijn.

Indien overeenkomstig de voorschriften van dit deel gekweekte schaaldieren moeten worden bemonsterd, zijn de volgende criteria van toepassing:

a) als zwakke of stervende schaaldieren in de productie-eenheden aanwezig zijn, worden bij voorkeur die schaaldieren geselecteerd. Indien dergelijke schaaldieren niet aanwezig zijn, dan moeten de verschillende groottecohorten, dat wil zeggen juvenielen en adulten, van de geselecteerde gevoelige soorten evenredig in het monster zijn vertegenwoordigd;

b) indien meer dan één waterbron voor de productie van schaaldieren wordt gebruikt, moeten gevoelige schaaldieren die alle waterbronnen vertegenwoordigen voor bemonstering worden opgenomen.

Indien overeenkomstig bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, worden het aantal en de geografische spreiding van de bemonsteringspunten zo bepaald dat een redelijke dekking van de lidstaat, het gebied of het compartiment wordt behaald. De bemonsteringspunten moeten ook representatief zijn voor de verschillende ecosystemen waarin de natuurlijke populaties van gevoelige soorten voorkomen, te weten mariene, estuarium- en riviersystemen en meren.

Indien overeenkomstig bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, worden de te bemonsteren schaaldieren als volgt geselecteerd:

i) in mariene en estuariumgebieden worden een of meer van de volgende soorten geselecteerd: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* of peneïdegarnalensoorten, te weten *Penaeus japonicus, Penaeus kerathurus, Penaeus semisulcatus*. Indien die soorten niet aanwezig zijn, moet het monster representatief zijn voor andere aanwezige gevoelige soorten van de orde Decapoda (tienpotigen); Gezien de brede verscheidenheid van gevoelige gastheren kunnen de gastheren worden geselecteerd uit geslachten of families van de orde Decapoda waarvan de gevoeligheid experimenteel of op natuurlijke wijze is aangetoond;

ii) in riviersystemen en meren worden een of meer van de volgende soorten geselecteerd: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* of *Orconectes limosus*. Indien die soorten niet aanwezig zijn, moet het monster representatief zijn voor andere aanwezige gevoelige soorten van de orde Decapoda; Gezien de brede verscheidenheid van gevoelige gastheren kunnen de gastheren worden geselecteerd uit geslachten of families van de orde Decapoda waarvan de gevoeligheid experimenteel of op natuurlijke wijze is aangetoond;

iii) als zwakke of stervende schaaldieren aanwezig zijn, worden bij voorkeur die schaaldieren geselecteerd. Indien dergelijke schaaldieren niet aanwezig zijn, dan moeten de verschillende groottecohorten, dat wil zeggen juvenielen en volwassen dieren, van de geselecteerde gevoelige soorten evenredig in het monster zijn vertegenwoordigd.

I.2. Specifieke voorschriften voor het verkrijgen van een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van WSD

I.2.1. Bewakingsprogramma's

a) Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus ten aanzien van WSD van categorie III, overeenkomstig bijlage III, deel B, bij Richtlijn 2006/88/EG, kan een gezondheidsstatus ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte van categorie I behalen, indien alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartimenten waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, voldoen aan de relevante voorschriften van bijlage V bij die richtlijn en al die kwekerijen en, indien voorgeschreven volgens bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij die richtlijn, alle overeenkomstig dat punt geselecteerde bemonsteringspunten onder natuurlijke populaties aan het volgende bewakingsprogramma met een looptijd van twee jaar zijn onderworpen, dat gezondheidsinspecties en bemonstering voor testdoeleinden omvat.

De kwekerijen of bemonsteringspunten zijn aan gezondheidsinspecties onderworpen en bemonsterd gedurende een periode van ten minste twee opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 6.A van punt II;

Gedurende die periode van twee jaren moet het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor besmetting met WSD en moet elke verdenking van WSD overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 zijn weerlegd.

b) Indien tijdens de uitvoering van het onder a) bedoelde bewakingsprogramma besmetting met WSSV is bevestigd in een in dat bewakingsprogramma opgenomen kwekerij, en de gezondheidsstatus van categorie II daarvan derhalve is ingetrokken, kan die kwekerij onmiddellijk opnieuw de gezondheidsstatus van categorie II verkrijgen en doorgaan met de uitvoering van het bewakingsprogramma om de ziektevrije status te verkrijgen zonder eerst een uitroeiingsprogramma zoals beschreven in punt I.2.2 uit te voeren, mits:

i) zij een continentale kwekerij is met een gezondheidsstatus ten aanzien van WSD die overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 3, bij Richtlijn 2006/88/EG niet afhangt van de gezondheidsstatus van de omringende natuurlijke wateren ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte;

ii) zij is leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd; de stillegging duurt ten minste zes weken;

iii) zij is voorzien van nieuw uitgezette schaaldieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van WSD.

I.2.2. Uitroeiingsprogramma's

I.2.2.1. Algemene voorschriften

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van WSD kan een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, indien alle kwekerijen in de lidstaat, het gebieden of het compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, ten minste aan het volgende uitroeiingsprogramma zijn onderworpen:

a) de minimale bestrijdingsmaatregelen van hoofdstuk V, afdeling 4, van Richtlijn 2006/88/EG zijn effectief toegepast en in de nabijheid van de officieel met WSD besmet verklaarde kwekerij(en) is een beperkingsgebied zoals bedoeld in artikel 32, onder b), van die richtlijn ingesteld, dat een beschermings- en toezichtsgebied omvat.

Het beperkingsgebied moet per geval zijn vastgesteld, rekening houdend met factoren die van invloed zijn op de risico's van de verspreiding van WSD onder gekweekte en wilde schaaldieren, zoals: aantal, percentage en verdeling van gestorven schaaldieren in de met WSD besmette kwekerij; de afstand en dichtheid van naburige kwekerijen; contactkwekerijen; de in de kwekerijen aanwezige soorten; de in de door de ziekte getroffen en de naburige kwekerijen toegepaste kweekpraktijken; hydrodynamische omstandigheden en andere uit epidemiologisch oogpunt significante factoren.

Voor het instellen van de beschermings- en toezichtsgebieden gelden de volgende minimale voorschriften:

i) in de onmiddellijke omgeving van een officieel met WSD besmet verklaarde kwekerij wordt een beschermingsgebied ingesteld, dat overeenkomt met:

1. in mariene en estuariumgebieden: het gebied dat valt binnen een cirkel met een straal die ten minste de breedte van één intergetijdengebied of, als dit meer is, ten minste 5 km bedraagt, gecentreerd op de officieel met WSD besmet verklaarde kwekerij, of een vergelijkbaar gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald; of

2. in zoet water: het gehele stroomgebied van de officieel met WSD besmet verklaarde kwekerij; de bevoegde autoriteit kan het beschermingsgebied beperken tot delen van het stroomgebied, mits de preventie van de verspreiding van WSD niet in het gedrang komt;

ii) buiten het beschermingsgebied wordt een toezichtsgebied ingesteld, dat overeenkomt met:

1. in mariene gebieden: een gebied rondom het beschermingsgebied, bestaande uit elkaar overlappende intergetijdengebieden; of een gebied rondom het beschermingsgebied, vallend binnen een cirkel met een straal van 10 km vanaf het middelpunt van het beschermingsgebied; of een vergelijkbaar gebied dat op basis van geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald; of

2. in zoet water: een uitgebreid gebied buiten het ingestelde beschermingsgebied;

b) alle kwekerijen binnen het beschermingsgebied waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden en die niet officieel met WSD besmet zijn verklaard, worden onderworpen aan een officieel onderzoek dat ten minste uit de volgende onderdelen bestaat:

i) de bemonstering voor het testen van 10 schaaldieren indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op besmetting met WSD worden waargenomen, of van 150 schaaldieren indien geen klinische of postmortale symptomen worden waargenomen; en

ii) één gezondheidsinspectie; in de kwekerijen waar de in punt i) bedoelde tests negatieve resultaten hebben opgeleverd, worden voortaan één keer per maand gezondheidsinspecties uitgevoerd gedurende het seizoen waarin de watertemperatuur waarschijnlijk haar hoogste jaarlijkse waarden bereikt, totdat het beschermingsgebied is ingetrokken overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

c) alle officieel met WSD besmet verklaarde kwekerijen worden leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd. De stillegging duurt ten minste zes weken. Wanneer alle officieel besmet verklaarde kwekerijen zijn leeggemaakt, vindt gedurende ten minste drie weken een gelijktijdige stillegging plaats. Deze alinea is ook van toepassing op nieuwe kwekerijen die gedurende de uitvoering van het uitroeiingsprogramma officieel besmet verklaard worden.

Tijdens het stilleggen van de officieel besmet verklaarde kwekerijen worden de beschermingsgebieden omgezet in toezichtsgebieden.

De bevoegde autoriteit kan besluiten het leegmaken, reinigen, ontsmetten en stilleggen van andere kwekerijen in de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden verplicht te stellen. De bevoegde autoriteit stelt op basis van een risicobeoordeling per geval vast hoe lang die stillegging moet duren;

d) alle officieel besmet verklaarde kwekerijen en alle andere stilgelegde kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden worden voorzien van:

i) nieuw uitgezette schaaldieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van WSD; of

ii) gedurende een overgangsperiode tot en met 31 december 2020, met nieuw uitgezette schaaldieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een goedgekeurd bewakingsprogramma voor WSD.

Het uitzetten van de vis vindt pas plaats wanneer alle officieel met WSD besmet verklaarde kwekerijen zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd overeenkomstig punt I.2.2.1, onder c);

e) alle kwekerijen in de (het) onder het uitroeiingsprogramma vallende lidstaat, gebied of compartiment waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, en, indien gerichte bewaking bij natuurlijke populaties vereist is, alle overeenkomstig bijlage V, deel I, punt 2, tweede alinea, bij die richtlijn geselecteerde bemonsteringspunten, moeten vervolgens ten minste aan het bewakingsprogramma van punt I.2.1 worden onderworpen.

I.2.2.2. Voorschriften voor het opnieuw verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van WSD voor continentale compartimenten die één enkele kwekerij omvatten die eerder vrij was verklaard van WSD

Een continentaal compartiment dat één enkele kwekerij omvat met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van WSD, waarvan de gezondheidsstatus ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte overeenkomstig bijlage V, deel II, punt 3, bij Richtlijn 2006/88/EG niet afhangt van de omringende natuurlijke wateren en waarvan de status van categorie I is ingetrokken overeenkomstig artikel 53, lid 3 van die richtlijn, kan onmiddellijk opnieuw de gezondheidsstatus van categorie I verkrijgen zodra de bevoegde autoriteit heeft bevestigd dat aan de volgende voorwaarden is voldaan:

a) de kwekerij met WSD is leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd; de stillegging heeft ten minste zes weken geduurd;

b) de kwekerij met WSD is voorzien van nieuw uitgezette schaaldieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I ten aanzien van WSD.

I.3. Specifieke voorschriften voor het behouden van de ziektevrije gezondheidsstatus (categorie I) ten aanzien van WSD

Indien overeenkomstig artikel 52 van Richtlijn 2006/88/EG gerichte bewaking vereist is om een gezondheidsstatus van categorie I te behouden, ondergaan alle kwekerijen in de lidstaat, het gebied of het compartiment in kwestie waar de in de lijst in bijlage IV, deel II, bij die richtlijn opgenomen gevoelige soorten worden gehouden, gezondheidsinspecties en bemonstering overeenkomstig tabel 6.B van punt II, rekening houdend met het risiconiveau van de kwekerij voor insleep van WSD.

In lidstaten, gebieden of compartimenten waar het aantal kwekerijen beperkt is en gerichte bewaking bij die kwekerijen onvoldoende epidemiologische gegevens oplevert, moeten de bewakingsprogramma's voor het behouden van de ziektevrije status overeenkomstig punt I.1 geselecteerde bemonsteringspunten omvatten.

Die bemonsteringspunten worden volgens het beginsel van een roterende steekproef (50 % van de bemonsteringspunten per jaar) geïnspecteerd en bemonsterd. De bemonstering wordt uitgevoerd overeenkomstig tabel 6.B van punt II. De monsters worden geselecteerd, voorbewerkt en onderzocht overeenkomstig de diagnose- en bemonsteringsmethoden van punt II en de laboratoriumonderzoeken moeten negatieve resultaten ten aanzien van de aanwezigheid van de verwekker van WSD opleveren.

De ziektevrije status blijft slechts behouden zolang het testen van alle monsters met behulp van de diagnose- en bemonsteringsmethoden van punt II.2 negatieve resultaten oplevert voor WSD, en elke verdenking van WSD moet overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 worden weerlegd.

I.4. Voorschriften voor de opheffing van de inperkingsmaatregelen overeenkomstig artikel 39 van Richtlijn 2006/88/EG (de wijziging van een gezondheidsstatus van categorie V naar een gezondheidsstatus van categorie III) ten aanzien van WSD

Een lidstaat, gebied of compartiment met een gezondheidsstatus van categorie V ten aanzien van WSD, kan een gezondheidsstatus van categorie III ten aanzien van die in de lijst opgenomen ziekte verkrijgen, mits:

a) aan de voorwaarden van punt I.2.2.1, onder a), b) en c), is voldaan. Indien stillegging technisch niet mogelijk is, worden de kwekerijen onderworpen aan een alternatieve maatregel die een bijna gelijkwaardige waarborg biedt voor de uitroeiing van WSSV in de kwekerij en haar omgeving;

b) alle officieel met WSD besmet verklaarde kwekerijen en alle andere stilgelegde/overeenkomstig het onder a) bepaalde aan alternatieve maatregelen onderworpen kwekerijen binnen de ingestelde beschermings- en toezichtsgebieden zijn voorzien van nieuw uitgezette schaaldieren afkomstig uit lidstaten, gebieden of compartimenten met een gezondheidsstatus van categorie I, II of III ten aanzien van WSD;

c) het uitzetten van de schaaldieren pas heeft plaatsgevonden nadat alle officieel met WSD besmet verklaarde kwekerijen waren leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd/onderworpen aan alternatieve maatregelen zoals bedoeld onder a);

d) gedurende de periode van twee jaar na de voltooiing van de onder a) en b) bedoelde maatregelen WSD niet is aangetoond en tijdens deze periode gerezen verdenkingen overeenkomstig de procedures van punt II.3 zijn weerlegd.

II. **Diagnose- en bemonsteringsmethoden**

II.1. Monsters

Monsters van de epidermis van het integument, uitgeprepareerd dan wel aanwezig in de looppoten, zwempoten, monddelen of kieuwen van het proefdier worden vóór het prepareren van monsters voor tweestaps PCR gefixeerd in 95 % ethanol.

Ter ondersteuning van met PCR verkregen diagnostische gegevens kunnen ook andere monsters worden genomen, die worden gefixeerd voor histologie en transmissie-elektronenmicroscopie.

II.2. Diagnosemethoden voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van WSD

De te gebruiken diagnosemethode voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van WSD, overeenkomstig de gedetailleerde methoden en procedures van bijlage II, deel 6, is tweestaps PCR.

indien tweestaps PCR een positief resultaat oplevert, moet dit worden bevestigd door het amplicon te sequencen alvorens de eerste controlemaatregelen, zoals bedoeld in artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG, worden uitgevoerd, en wel, voor zover mogelijk, onder praktijkomstandigheden door het aantonen van pathognomonische symptomen van WSD in die geselecteerde gevoelige gastheren met behulp van histologie en transmissie-elektronenmicroscopie.

II.3. Officieel onderzoek en diagnosemethoden om de verdenking van besmetting met WSD te weerleggen of de aanwezigheid van een dergelijke besmetting te bevestigen

Wanneer overeenkomstig artikel 28 van Richtlijn 2006/88/EG de aanwezigheid van besmetting met WSD moet worden bevestigd of de verdenking van een dergelijke besmetting moet worden weerlegd, wordt de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedure nageleefd:

a) het officiële onderzoek omvat ten minste één gezondheidsinspectie en één bemonstering van 10 schaaldieren indien klinische of postmortale symptomen die wijzen op besmetting met WSD worden waargenomen, of van 150 schaaldieren indien geen klinische of postmortale symptomen worden waargenomen; De monsters worden getest overeenkomstig de in punt II.2 vermelde diagnosemethode (tweestaps PCR);

b) de aanwezigheid van WSD wordt als bevestigd beschouwd indien tweestaps PCR gevolgd door sequencing, overeenkomstig de gedetailleerde methoden en procedures van bijlage II, deel 6, een positief resultaat voor WSSV oplevert en pathognomonische symptomen van WSD worden waargenomen bij de geselecteerde gastheren.

De verdenking van WSD kan worden weerlegd indien die tests geen verdere aanwijzingen opleveren voor de aanwezigheid van WSD.

Tabel 6.A

Bewakingsprogramma voor lidstaten, gebieden en compartimenten voor de in punt I.2.1 bedoelde tweejarige controleperiode voorafgaande aan het verkrijgen van de ziektevrije status ten aanzien van WSD

	Aantal klinische inspecties per jaar	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar	Aantal schaaldieren in het monster
Kwekerijen/bemonsteringslocaties	1	1	150

Tabel 6.B

Bewakingsprogramma's voor lidstaten, gebieden of compartimenten voor het behouden van de ziektevrije status ten aanzien van WSD, zoals bedoeld in punt I.3

Risiconiveau	Aantal gezondheidsinspecties	Aantal laboratoriumonderzoeken	Aantal schaaldieren in het monster
Hoog	Eén per jaar	Eén per twee jaar	150
Gemiddeld	Eén per twee jaar	Eén per twee jaar	150
Laag	Eén per twee jaar	Eén per vier jaar	150

BIJLAGE II

GEDETAILLEERDE DIAGNOSEMETHODEN EN -PROCEDURES

I. **Inleiding**

Deze bijlage bevat de gedetailleerde procedures voor de diagnosemethoden die moeten worden gebruikt voor het laboratoriumonderzoek in het kader van de uitroeiings- en bewakingsprogramma's zoals bedoeld in bijlage I bij dit besluit, en om een verdenking van de aanwezigheid van de volgende in de lijst van deel II van bijlage IV bij Richtlijn 2006/88/EG opgenomen niet-exotische ziekten (hierna „in de lijst opgenomen ziekten" genoemd) te bevestigen of te weerleggen, overeenkomstig artikel 57, onder b), van die richtlijn:

1.	Virale hemorragische septikemie (VHS)	Deel 1
2.	Infectieuze hematopoëtische necrose (IHN)	Deel 1
3.	Koiherpesvirusziekte (KHV-ziekte)	Deel 2
4.	Infectieuze zalmanemie (ISA)	Deel 3
5.	Besmetting met *Marteilia refringens*	Deel 4
6.	Besmetting met *Bonamia ostreae*	Deel 5
7.	Wittevlekkenziekte (white spot disease, WSD)	Deel 6

II. **Definities**

Voor de toepassing van deze bijlage wordt verstaan onder „transportmedium": een celkweekmedium met 10 % kalfsserum en met 200 IE penicilline, 200 µg streptomycine en 200 µg kanamycine per milliliter, of met andere antibiotica waarvan de werkzaamheid is aangetoond.

DEEL 1

GEDETAILLEERDE DIAGNOSEMETHODEN EN -PROCEDURES VOOR DE BEWAKING EN DE BEVESTIGING VAN IHN EN VHS

I. **Diagnosemethoden en -procedures voor de bewaking van VHS en IHN**

Bij het uitvoeren van bemonstering en laboratoriumonderzoek met het oog op het verkrijgen of behouden van de ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van IHN of VHS overeenkomstig bijlage I, deel 1, punt I, aan de hand van de in deel 1, punten II.1 en II.2, van die bijlage bedoelde diagnosemethoden, zijn de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van de punten I.1 tot en met I.6 hieronder van toepassing.

I.1. Voorbewerking en verzending van vismonsters

I.1.1. Weefsels voor virologisch onderzoek op celcultuur

Vóór verzending of overbrenging naar het laboratorium worden bij de vissen met steriele dissectie-instrumenten stukjes weggenomen uit de te onderzoeken organen; deze stukjes moeten in steriele plastic buisjes worden gedaan die zijn gevuld met een transportmedium.

De hoeveelheid vismateriaal die geschikt is voor virologisch onderzoek op celcultuur en met behulp van RT-qPCR hangt af van de grootte van de vis. Dat wil zeggen dat de te bemonsteren weefsels worden gevormd door: de hele vis voor dooierzakbroed (lichaamslengte < 4 cm), ingewanden met inbegrip van nier (4 cm < lichaamslengte < 6 cm) of, voor grotere vissen, nier, milt, hart en/of hersenen, en ovariële vloeistof van ouderdieren ten tijde van het paaien.

Ovariële vloeistof of zaadvocht of stukjes orgaan van maximaal 10 vissen mogen tot één verzamelmonster worden samengevoegd in een steriel buisje waarin zich ten minste 4 ml transportmedium bevindt. Ieder monster bevat ten minste 0,5 g weefsel.

Met het virologisch onderzoek op celcultuur wordt zo snel mogelijk begonnen en in elk geval uiterlijk 48 uur na de bemonstering. In uitzonderlijke gevallen mag uiterlijk 72 uur na de bemonstering met het virologisch onderzoek worden begonnen, op voorwaarde dat het voor onderzoek verzamelde materiaal met een transportmedium is beschermd en dat tijdens het vervoer aan de temperatuurvoorschriften kan worden voldaan.

I.1.2. Monsters voor analyse met behulp van reverse-transcriptase-polymerasekettingreactie (RT-PCR of RT-qPCR)

De vismonsters worden overeenkomstig de procedure van punt I.1.1 genomen met gebruikmaking van een steriel instrument en overgebracht in een steriel plastic buisje waarin zich transportmedium bevindt. Weefsel van 10 vissen mag tot één verzamelmonster worden samengevoegd in een buisje. Bij een kleine hoeveelheid inoculum mag echter weefsel van ten hoogste vijf vissen worden gebruikt. In plaats hiervan mogen monsters worden samengevoegd in RNA-stabilisatiereagentia, bijvoorbeeld 0,2 g weefsel/ml reagens overeenkomstig de aanbevelingen van de fabrikant, hoewel elke vis afzonderlijk moeten worden verwerkt en niet met andere vissen mag worden samengevoegd in de monsters, vanwege de kleine hoeveelheid voor extractie te gebruiken materiaal.

De vis mag ook in zijn geheel naar het laboratorium worden gestuurd.

I.2. Verzending van vismonsters

Buisjes met visweefsels in transportmedium voor celkweek of RT-PCR/RT-qPCR-analyse worden in geïsoleerde recipiënten geplaatst, zoals dikwandige polystyreendozen, samen met voldoende ijs of een alternatief koelmiddel met een vergelijkbaar koelvermogen, zodat de monsters tijdens het vervoer naar het laboratorium koel worden gehouden. Het invriezen van de monsters moet echter worden vermeden. De temperatuur van het monster tijdens het vervoer mag nooit meer dan 10 °C bedragen en bij aankomst moet de transportdoos nog ijs bevatten of moeten een of meer koelelementen nog geheel of gedeeltelijk bevroren zijn.

De vis mag ook in zijn geheel naar het laboratorium worden verzonden indien tijdens het vervoer aan de temperatuurvoorschriften van de eerste alinea kan worden voldaan. Hele vis wordt in absorberend papier gewikkeld en zo in een plastic zak verpakt voor verzending. De vis mag ook levend worden verzonden.

I.3. Verzamelen van aanvullend diagnostisch materiaal

Indien het diagnostisch laboratorium dit toestaat, kan van de vissen ook ander weefselmateriaal worden verzameld en voor aanvullende tests worden voorbewerkt.

I.4. Voorbewerking van monsters voor celcultuuronderzoek en RT-qPCR

I.4.1. Invriezen in uitzonderingsgevallen

Indien het vanwege praktische problemen niet mogelijk is de monsters binnen 48 uur na de verzameling van het visweefsel te verwerken, kan worden aanvaard dat de weefselmonsters bij – 20 °C of lager in transportmedium worden ingevroren en het virologisch onderzoek binnen 14 dagen alsnog wordt uitgevoerd. Het visweefsel mag echter slechts één keer worden ingevroren en ontdooid vóór het onderzoek. Elke keer dat monsters van visweefsel worden ingevroren, worden aantekeningen bijgehouden van de precieze reden hiervoor.

I.4.2. Homogeniseren van de organen

In het laboratorium wordt het visweefsel in de buisjes volledig gehomogeniseerd (met een stomacher, een mixer of een vijzel en stamper met steriel zand) en het homogenaat wordt vervolgens gesuspendeerd in het oorspronkelijke transportmedium.

Als het monster bestaat uit hele vis die minder dan cm lang is, wordt de vis, nadat het stuk achter de anus is verwijderd, met een steriele schaar of scalpel in kleine stukken geknipt. Als het monster bestaat uit hele vis met een lengte tussen 4 en 6 cm, worden de ingewanden inclusief de nieren verzameld. Als het monster bestaat uit hele vis die langer is dan 6 cm, worden de weefselmonsters genomen als omschreven in punt I.1. De weefselmonsters worden met een steriele schaar of scalpel in kleine stukken geknipt die vervolgens worden gehomogeniseerd zoals in de eerste alinea van dit punt beschreven en in het transportmedium worden gesuspendeerd.

De verhouding tussen het weefselmateriaal en het transportmedium wordt in het laboratorium zo bijgesteld dat deze uiteindelijk 1:10 bedraagt.

I.4.3. Centrifugeren van het homogenaat

Het homogenaat wordt gecentrifugeerd in een op 2 tot 5 °C gekoelde centrifuge bij 2 000 tot 4 000 × *g* gedurende 15 minuten; het supernatans wordt verzameld en kan met antibiotica worden behandeld, hetzij gedurende 4 uur bij 15 °C, hetzij een hele nacht bij 4 tot 8 °C. Als het monster in het transportmedium is vervoerd, hoeft het supernatans niet meer met antibiotica te worden behandeld.

Indien het vanwege praktische problemen (bv. defecte incubator, problemen met celculturen enz.) niet mogelijk is de cellen te inoculeren binnen 48 uur nadat de monsters van het visweefsel zijn genomen, mag het supernatans bij – 80 °C worden ingevroren en mag het virologisch onderzoek alsnog in de daaropvolgende 14 dagen worden verricht.

Indien het verzamelde supernatans binnen 48 uur na de bemonstering wordt opgeslagen bij – 80 °C, mag het nog slechts één keer opnieuw voor virologisch onderzoek worden gebruikt.

Voordat de cellen worden geïnoculeerd, wordt het supernatans gemengd met gelijke delen van een adequate verdunning van een mengsel van antisera tegen inheemse serotypen van het IPN-virus (infectieuze pancreatische necrose); dit mengsel wordt dan geïncubeerd gedurende ten minste één uur bij 15 °C of gedurende ten hoogste 18 uur bij 4 °C. De titer van het antiserum, bepaald met behulp van een 50 %-plaqueneutralisatietest, bedraagt ten minste 1:2 000.

De behandeling van alle inocula met antiserum tegen het IPN-virus heeft tot doel een cytopathologisch effect (CPE) ten gevolge van de ontwikkeling van het IPN-virus in geïnoculeerde celculturen te voorkomen. Door deze behandeling wordt de duur van het virologisch onderzoek ingekort en vermindert het aantal gevallen waarin het ontstaan van een CPE als mogelijke indicator voor de aanwezigheid van VHSV of IHNV zou moeten worden aangemerkt.

Als de monsters afkomstig zijn van productie-eenheden die als vrij van IPN worden beschouwd, is het niet verplicht de inocula met antiserum tegen het IPN-virus te behandelen.

I.4.4. Voorbewerking van monsters voor bewakingsprogramma's op basis van RT-PCR en RT-qPCR

Als de monsters in transportmedium zijn verzameld, wordt de procedure van de punten I.4.2 en I.4.3 gevolgd. Na centrifugering wordt het supernatans verzameld en wordt RNA geëxtraheerd. Indien het vervolgonderzoek niet direct na het centrifugeren wordt uitgevoerd, worden de monsters onmiddellijk ingevroren bij – 20 °C of lager.

Voor de analyse van visweefsel in RNA-stabilisatiereagens moeten de vervolgwerkzaamheden worden uitgevoerd binnen de volgende termijnen, naargelang de temperatuur waarbij de monsters worden bewaard:

bij 37 °C bewaarde monsters: één dag;

bij 25 °C bewaarde monsters: één week;

bij 4 °C bewaarde monsters: één maand;

bij – 20 °C bewaarde monsters: voor onbepaalde tijd

Verzamelmonsters in RNA-stabilisatiereagens worden behandeld als afzonderlijke monsters in RNA-stabilisatiereagens. Voor verzamelmonsters in RNA-stabilisatiereagens mag de monsterhoeveelheid niet hoger zijn dan aanbevolen door de fabrikant voor extractie met RNA-kits, zoals de RNeasy Mini Kit (Qiagen) en dergelijke. Indien grotere verzamelmonsters worden gebruikt dan moeten de extractiekits of methoden hiermee overeenstemmen.

Monsters in RNA-stabilisatiereagentia mogen niet voor celkweek worden gebruikt.

I.4.5. Samenvoegen van monsters voor RT-qPCR

Aangezien de RT-qPCR-protocollen een vergelijkbare of hogere sensitiviteit hebben ten opzichte van de celkweekmethoden, kan worden aanvaard dat supernatans van gehomogeniseerd visweefselmateriaal van samengevoegde organen van ten hoogste 10 vissen in celkweekmedium wordt gebruikt voor PCR. Aangezien in vergelijking met celkweek bij PCR echter veel minder inoculum wordt gebruikt, moeten alle visweefsels zorgvuldig worden gehomogeniseerd voordat het materiaal voor extractie wordt samengevoegd.

Hetzelfde beginsel wordt ook toegepast bij monsters in RNA-stabilisatiereagentia. In dat geval is het echter vaak moeilijk representatief materiaal van tot wel 10 vissen in één buisje te verzamelen, en wordt het aantal vissen per verzamelmonster derhalve teruggebracht tot 2 tot 5.

I.5. Virologisch onderzoek op celcultuur

I.5.1. Celculturen en groeimedia

Cellen van hetzij de cellijn BF-2 (Bluegill fry cell line — 2, van broed van *Lepomis macrochirus*), hetzij de cellijn RTG-2 (Rainbow trout gonad cell line — 2, van gonaden van de regenboogforel), en hetzij EPC-cellen (*Epithelioma papulosum cyprini*), hetzij FHM-cellen (Fathead minnow, dikkop-elrits) worden bij 20 tot 30 °C gekweekt in een geschikt medium, te weten Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) of varianten daarvan waaraan 10 % foetaal runderserum en de normale concentraties antibiotica zijn toegevoegd.

Voor culturen in gesloten recipiënten wordt het medium gebufferd met bicarbonaat. Bij celculturen in open recipiënten mag het medium worden gebufferd met tris(hydroxymethyl)aminomethaan-HCl (tris-HCl) (23 mM) en natriumbicarbonaat (6 mM). De pH moet 7,6 ± 0,2 bedragen.

Voor het inoculeren met visweefselmateriaal worden, voor zover mogelijk, jonge, gewoonlijk één dag oude, celculturen in monolaag gebruikt; tussen 4 en 48 uur oude culturen kunnen echter worden aanvaard. De cellen moeten ten tijde van het inoculeren actief groeien.

I.5.2. Inoculeren van celculturen

De met antibiotica behandelde orgaansuspensie wordt op de celculturen geënt in twee verdunningen, namelijk de primaire verdunning en een verdunning 1:10 daarvan, zodat de uiteindelijke verdunning van het weefselmateriaal in het celkweekmedium 1:100, respectievelijk 1:1 000 bedraagt (teneinde homologe interferentie te voorkomen). Ten minste twee cellijnen worden geïnoculeerd zoals bedoeld in punt I.5.1. De verhouding tussen de hoeveelheid inoculum en het volume van het celkweekmedium moet ongeveer 1:10 bedragen.

Voor iedere verdunning en iedere cellijn wordt een celoppervlak van ten minste 2 cm^2 gebruikt, wat overeenstemt met één welletje van een celkweekplaat met 24 welletjes. Waar mogelijk worden celkweekplaten gebruikt.

I.5.3. Incuberen van celculturen

De geïnoculeerde celculturen worden gedurende zeven tot tien dagen bij 15 °C geïncubeerd. Wanneer de kleur van het celkweekmedium van rood naar geel omslaat, wat wijst op de verzuring van het medium, wordt de pH bijgesteld met een steriele bicarbonaatoplossing of een stof met dezelfde werking, om ervoor te zorgen dat de cellen gevoelig blijven voor virusinfectie.

Om de gevoeligheid van de celculturen voor infectie te verifiëren wordt ten minste om de zes maanden of telkens als wordt vermoed dat de gevoeligheid van de cellen is verminderd, een titratie uitgevoerd met VHSV en IHNV uit de ingevroren voorraad. Indien mogelijk wordt daarbij de procedure van punt III gevolgd.

I.5.4. Microscopische waarnemingen

Regelmatig (ten minste driemaal per week) worden de geïnoculeerde celculturen op de aanwezigheid van CPE worden gecontroleerd onder een microscoop met vergroting 40-150 ×. Wanneer een duidelijk CPE wordt geconstateerd, moet onmiddellijk worden begonnen met de identificatie van het virus overeenkomstig punt I.6.

I.5.5. Doorkweek

Als na de eerste incubatie gedurende zeven tot tien dagen geen CPE is waargenomen, wordt doorgekweekt op verse celculturen met ongeveer hetzelfde celoppervlak als de primaire cultuur.

Zeven tot tien dagen na het inoculeren worden gelijke hoeveelheden van het medium (supernatans) van alle culturen of welletjes van de primaire cultuur naar cellijn samengevoegd. Die mengsels worden vervolgens, overeenkomstig het bepaalde in punt I.5.2, geïnoculeerd op homologe celculturen, onverdund en in een verdunning 1:10 (wat resulteert in uiteindelijke verdunningen van het supernatans van 1:10, respectievelijk 1:100). In plaats hiervan kunnen ook aliquote delen van 10 % van het medium van de primaire cultuur rechtstreeks worden geïnoculeerd in een welletje met een verse celcultuur (doorkweek van het ene welletje in het andere). Vóór de inoculatie kan een pre-incubatie van alle verdunningen met het antiserum tegen IPN-virus in een adequate verdunning worden toegepast overeenkomstig punt I.4.3.

De geïnoculeerde culturen worden vervolgens gedurende zeven tot tien dagen bij 15 °C geïncubeerd en gecontroleerd overeenkomstig punt I.5.4.

Indien een toxisch CPE wordt waargenomen in de eerste drie dagen van de bebroeding, wordt in dat stadium doorgekweekt, maar de cellen worden dan gedurende zeven dagen geïncubeerd en nogmaals doorgekweekt en gedurende zeven dagen geïncubeerd. Indien na drie dagen een toxisch CPE wordt waargenomen, worden de cellen nog een keer gepasseerd en geïncubeerd zodat in totaal ook 14 dagen zijn verstreken sedert de primaire inoculatie. In de laatste zeven dagen van de incubatie zou geen toxiciteit mogen worden waargenomen.

Als er ondanks behandeling met antibiotica sprake is van een bacteriële verontreiniging, wordt het supernatans vóór de doorkweek gedurende 15 tot 30 minuten bij een temperatuur van 2 tot 5 °C gecentrifugeerd bij 2 000 tot 4 000 × *g*, en/of gefiltreerd met een filter van 0,45 µm (membraanfilter met een geringe eiwitbinding). Daarnaast gelden voor doorkweek dezelfde procedures als voor toxisch CPE zoals omschreven in de vierde alinea van dit punt.

Indien geen CPE optreedt, kan het resultaat van de test als negatief worden aangemerkt.

I.6. Virusidentificatie

Wanneer in een celcultuur CPE wordt geconstateerd, wordt het medium (supernatans) verzameld en onderzocht met behulp van één of meer van de volgende technieken: enzymgekoppelde immuunadsorbent-techniek (ELISA), immunofluorescentie (IF), neutralisatie, RT-PCR of RT-qPCR. Indien met de tests het virus niet binnen een week met zekerheid kan worden geïdentificeerd, wordt het supernatans naar het nationaal referentielaboratorium of naar het EU-referentielaboratorium voor visziekten, zoals bedoeld in bijlage VI bij Richtlijn 2006/88/EG, verzonden voor onmiddellijke identificatie.

I.6.1. ELISA

Er wordt een dubbel-antilichaam-sandwich-ELISA uitgevoerd om het virusisolaat te identificeren. Microtiterplaten worden gecoat met 50 µl per welletje (0,9 pg) aantoonbaar hoogwaardige, met proteïne A gezuiverde immunoglobulinen (Ig) uit konijnantisera tegen IHNV of VSHV, verdund in carbonaatbuffer (pH 9,6) met 15 mM natriumazide, en tussen 18 uur en twee weken bij 4 °C geïncubeerd.

Op een verdunningsplaat wordt elk monster, met daarin 1 % Triton X-100 en de positieve controles, verdund met bufferoplossing (namelijk fosfaatgebufferde zoutoplossing (phosphate buffered saline, PBS)-T-BSA, 1 % BSA) in een viervoudige verdunning: onverdund, 1:4, 1:16, 1:64. De ELISA-platen worden gewassen in PBS met 0,05 % Tween-20 (PBS-T) en 50 µl van elke verdunning wordt overgebracht van de verdunningsplaat naar de gewassen en gecoate ELISA-plaat.

De ELISA-platen worden vervolgens gedurende 30 minuten bij 37 °C geïncubeerd. Daarna worden de platen gewassen en gedurende 30 minuten bij 37 °C geïncubeerd met specifieke monoklonale antilichamen (te weten MAb IP5B11 voor het aantonen van VSHV en Hyb 136-3 voor het aantonen van IHNV). 50 µl met mierikswortelperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) geconjugeerde konijn-antimuis-antilichamen, verdund met PBS-T-BSA tot een verhouding 1:1 000 PBS-T-BSA, worden overbracht naar de ELISA-plaat.

Ten slotte worden, na nogmaals wassen, de reacties op gang gebracht door toevoeging van 50 µl *o*-fenyleendiamine (ortho-phenylenediamine, OPD) per welletje. De ELISA-platen worden gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur en in het donker geïncubeerd en de reactie wordt gestopt door toevoeging van 100 µl 0,5 M H_2SO_4 per welletje.

De extinctie wordt bij een golflengte van 492 en 620 nm in een ELISA-afleesapparaat gemonitord. De monsters worden als positief of negatief aangemerkt na vergelijking van de testresultaten met de extinctiewaarden voor de positieve en negatieve controles. Over het algemeen worden monsters met een gecombineerde extinctie (E) < 0,5 voor onverdund materiaal als negatief aangemerkt, monsters met waarden voor E tussen 0,5 en 1,0 als verdacht en monsters met waarden voor E > 1,0 als positief.

ELISA-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, kunnen worden gebruikt in plaats van de in dit punt bedoelde variant.

I.6.2. Immunofluorescentie — IF

De identificatie van de in de lijst opgenomen ziekteverwekkers VHSV en IHNV wordt uitgevoerd door cellen te besmetten op „zwarte" microtiterplaten met 96 welletjes, op conventionele microtiterplaten met 24 welletjes of op dekglaasjes in microtiterplaten met 24 welletjes. Wanneer VHSV en/of IHNV worden geïdentificeerd door besmetting van cellen op dekglaasjes, is het volgende protocol van toepassing:

a) op de dekglaasjes worden cellen aangebracht in een zodanige verhouding dat er na 24 uur groei een confluentie optreedt van 60 tot 90 %. Waar mogelijk worden EPC-cellen gebruikt, omdat zij zich stevig aan glas hechten, maar ook andere cellijnen zoals BF-2, RTG-2 of FHM mogen worden gebruikt. enkellaagse celculturen van één dag oud worden tweevoudig geïnoculeerd met 150 µl celcultuursupernatans in twee verdunningen (1:10 en 1:1 000) en vervolgens gedurende 24 uur bij 15 °C geïncubeerd;

b) vervolgens wordt het celkweekmedium verwijderd en worden de besmette enkellaagse cellagen gefixeerd met 0,5 ml van een ijskoude waterige acetonoplossing (80 % vol:vol). Het fixeren gebeurt gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur in een zuurkast, waarna de acetonoplossing wordt verwijderd en de dekglaasjes gedurende ten minste 30 minuten aan de lucht worden gedroogd. In deze fase worden de platen ofwel direct verwerkt, ofwel opgeslagen bij – 20 °C opgeslagen voor verder gebruik;

c) specifieke monoklonale antilichamen (te weten MAb IP5B11 voor het aantonen van VSHV en Hyb 136-3 voor het aantonen van IHNV) worden in 0,01 M PBST, pH 7,2 verdund in de door de leverancier van de monoklonale antilichamen aanbevolen verdunningsverhouding; per welletje wordt 50 tot en met 100 µl aan de gefixeerde monolaag toegevoegd en de platen worden gedurende één uur bij 37 °C in een vochtige kamer geïncubeerd;

d) de dekglaasjes worden voorzichtig driemaal gewassen met PBS met 0,05 % Tween-20 (PBS-T), en na de laatste keer afspoelen wordt de buffer volledig verwijderd. De cellen worden vervolgens gedurende één uur bij 37 °C geïncubeerd met antimuis-immunoglobuline, geconjugeerd met fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) of tetramethyl-rhodamine-5-(en 6-)isothiocyanaat (TRITC), als voornaamste antilichaam, verdund overeenkomstig de aanwijzingen van de leverancier, opnieuw in PBS-T gewassen, en gedroogd. De gekleurde culturen worden met glycerol-fysiologisch zout op objectglazen aangebracht en onder invallend uv-licht onderzocht. Daarbij wordt gebruikgemaakt van een oculair met vergroting 10 × of 12 × en van een objectief met vergroting 25 × of 40 × en met een diafragma > 0,7, respectievelijk > 1,3.

In plaats hiervan mogen ook andere IF-technieken (van referentiekwaliteit qua celculturen, fixatie en antilichamen) waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

I.6.3. Neutralisatie

De cellen worden uit het verzamelde supernatans verwijderd door centrifugeren (2 000 tot 4 000 × *g*) of door membraanfiltrering (0,45 µm) met een membraanfilter met een geringe eiwitbinding, en het supernatans wordt verdund in celkweekmedium tot een verhouding 1:100 en 1:10 000.

Aan aliquote delen van ten minste twee supernatansverdunningen wordt telkens een zelfde hoeveelheid van elk van de onderstaande reagentia toegevoegd en deze mengsels worden vervolgens 60 minuten bij 15 °C geïncubeerd:

a) serum met groepspecifieke antilichamen tegen VHSV in een verdunning van 1:50 (vol:vol);

b) serum met groepspecifieke antilichamen tegen IHNV in een verdunning van 1:50 (vol:vol);

c) mengsel van antisera tegen inheemse serotypen van IPNV in een verdunning van 1:50 (vol:vol);

d) alleen medium (positieve controle).

Ten minste twee celculturen worden geïnoculeerd met telkens 50 µl van iedere combinatie van viraal supernatans en serum en vervolgens bij 15 °C geïncubeerd. De ontwikkeling van CPE wordt gecontroleerd overeenkomstig punt I.5.4.

VHSV-stammen en -isolaten die niet reageren in neutralisatietests worden aan de hand van IF of ELISA geïdentificeerd.

In plaats hiervan mogen ook andere neutralisatietests waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Voorbewerking van viraal RNA

Alle werkzaamheden met RNA worden op ijs en met handschoenen uitgevoerd.

RNA wordt geëxtraheerd met behulp van de fenol-chloroform-methode of affiniteitschromatografie in kolommen, overeenkomstig de instructies van de fabrikant. Er mag gebruik worden gemaakt van in de handel verkrijgbare RNA-extractiekits die hoogwaardig RNA produceren dat geschikt is voor gebruik met de RT-PCR-protocollen zoals omschreven in de punten hieronder.

Het RNA wordt opnieuw gesuspendeerd in gedestilleerd RNase-vrij water (dat wil zeggen water behandeld met 0,1 % diethylpyrocarbonaat) of een geschikte elutiebuffer.

I.6.4.2. RT-PCR

Voor het aantonen van IHNV worden de volgende primers gebruikt:

Forward primer 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

Reverse primer 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

De volgende cycli worden gebruikt (enkelstaps RT-PCR): 1 cyclus: 50 °C gedurende 30 minuten, 1 cyclus: 95 °C gedurende 2 minuten, 30 cycli: 95 °C gedurende 30 seconden, 50 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende 60 seconden; 1 cyclus: 72 °C gedurende 7 minuten en temperatuurdoordrenking bij 4 °C.

Voor het aantonen van VHSV worden de volgende primers gebruikt:

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

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

De volgende cycli worden gebruikt (enkelstaps RT-PCR): 50 °C gedurende 30 minuten, 95 °C gedurende 15 minuten, 35 cycli van 94 °C gedurende 30 seconden, 55 °C gedurende 30 seconden en 68 °C gedurende 60 seconden. Vervolgens wordt de reactie gedurende 7 minuten op 68 °C gehouden.

De hoeveelheid en specificiteit van de RT-PCR reacties worden geëvalueerd met behulp van gelelektroforese in 1,5 %-agarosegel met ethidiumbromide en geobserveerd met behulp van transilluminatie met uv-licht. Voor IHNV kan een PCR-amplicon van 693 bp worden waargenomen. Voor VHSV bedraagt de grootte 505 bp.

De resultaten kunnen variëren naargelang de omstandigheden waaronder PCR is uitgevoerd; met name kan afhankelijk van de gebruikte thermocycler optimalisering van de temperatuurprotocollen nodig zijn. Bovendien kunnen fout-positieve resultaten optreden als gevolg van onjuiste hybridisatie van de primers of laboratoriumverontreiniging. Om elke twijfel te vermijden, moeten daarom adequate positieve en negatieve controles en sequentieamplicons worden opgenomen. Voor de VHSV-primers moet bijzonder voorzichtig te werk worden gegaan indien BF-2-cellen worden gebruikt, aangezien de primers kunnen reageren met DNA/RNA van de cellijn en fout-positieve resultaten van vergelijkbare grootte kunnen produceren. Bij het testen van supernatans van BF-2-cellen moeten alle geamplificeerde PCR-fragmenten worden gesequencet.

I.6.4.3. RT-qPCR voor VHSV

Voor VHSV wordt de amplificatie uitgevoerd met behulp van de volgende primers en probe:

Forward primer: 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′;

Reverse primer: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′;

en de probe: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Enkelstaps RT-qPCR:

Bij elke RT-qPCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. Opeenvolging van cycli: 50 °C gedurende 30 minuten, 95 °C gedurende 15 minuten, 40 cycli van 94 °C gedurende 15 seconden, 60 °C gedurende 40 seconden, 72 °C gedurende 20 seconden; zo nodig aan te passen. In plaats hiervan mogen ook andere RT-PCR- of RT-qPCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

I.6.4.4. RT-qPCR voor IHNV

Voor IHNV wordt de amplificatie uitgevoerd met behulp van de volgende primers en probe:

Forward primer: 5′-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′;

Reverse primer: 5′-TTCTTTGCGGCTTGGTTGA-3′;

en de probe: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Tweestaps RT-qPCR:

Aangezien de volgende analyse berust op een amplificatie in twee stappen, moet bijzonder voorzichtig te werk worden gegaan bij het hanteren van de buisjes tussen de twee reacties in, om besmetting te voorkomen.

Opeenvolging van cycli (na de RT-stap): 50 °C gedurende 2 minuten, 95 °C gedurende 10 minuten, gevolgd door 40 cycli van 95 °C gedurende 15 seconden en 60 °C gedurende 1 minuut; zo nodig aan te passen.

In plaats hiervan mogen ook andere RT-PCR- of RT-qPCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

II. **Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de bevestiging van dan wel het weerleggen van een verdenking van VHS en/of IHN bij vermoedelijke uitbraken**

Wanneer overeenkomstig artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG laboratoriumonderzoek moet worden uitgevoerd om de aanwezigheid van IHN en/of VHS te bevestigen of te weerleggen aan de hand van de in bijlage I, deel 1, punt II.3, bedoelde diagnosemethoden, zijn de volgende gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van toepassing:

a) conventionele virusisolatie gevolgd door serumneutralisatie, immunochemische of moleculaire virusidentificatie;

b) virusdetectie met behulp van RT-PCR of RT-qPCR;

c) Andere diagnosetechnieken, zoals IFAT, ELISA, RT-PCR en IHC.

II.1. Conventionele virusisolatie gevolgd door serologische virusidentificatie

II.1.1. Selectie van monsters

Ten minste tien vissen met typische symptomen van IHN of VHS worden voor onderzoek geselecteerd.

II.1.2. Voorbewerking en verzending van vismonsters

Bij de voorbewerking en verzending met het oog op conventionele virusisolatie moeten de methoden en procedures van punt I.2 worden gevolgd.

II.1.3. Verzamelen van aanvullend diagnostisch materiaal

Bij het verzamelen van aanvullend diagnostisch materiaal met het oog op conventionele virusisolatie moeten de methoden en procedures van punt I.3 worden gevolgd.

II.1.4. Voorbewerking van monsters voor celcultuuronderzoek

Bij de voorbewerking van monsters voor celcultuuronderzoek met het oog op conventionele virusisolatie moeten de methoden en procedures van punt I.4 worden gevolgd.

II.1.5. Virologisch onderzoek op celcultuur

Bij virologisch onderzoek met het oog op conventionele virusisolatie moeten de methoden en procedures van punt I.5 worden gevolgd.

II.1.6. Virusidentificatie

Bij virusidentificatie met het oog op conventionele virusisolatie moeten de methoden en procedures van punt I.6 worden gevolgd.

II.2. Virusdetectie met behulp van RT-qPCR

II.2.1. Selectie van monsters

Bij de selectie van monsters met het oog op virusdetectie met behulp van RT-qPCR moeten de methoden en procedures van punt I.1.2 worden gevolgd.

II.2.2. Voorbewerking en verzending van vismonsters

Bij de voorbewerking en verzending met het oog op virusdetectie met behulp van RT-qPCR moeten de methoden en procedures van punt I.2 worden gevolgd.

II.2.3. Verzamelen van aanvullend diagnostisch materiaal

Bij het verzamelen van aanvullend diagnostisch materiaal met het oog op virusdetectie met behulp van RT-qPCR moeten de methoden en procedures van punt I.3 worden gevolgd.

II.2.4. Voorbewerking van monsters voor RT-qPCR

Bij de voorbewerking van monsters met het oog op virusdetectie met behulp van RT-qPCR moeten de methoden en procedures van punt I.6.4.1 worden gevolgd.

II.2.5. RT-qPCR

Bij virusdetectie met behulp van RT-qPCR moeten de methoden en procedures van de punten I.6.4.1, I.6.4.3 en I.6.4.4 worden gevolgd.

II.3. Andere diagnosetechnieken

ELISA, de indirecte immunofluorescentietest (IFAT), of RT-PCR kunnen overeenkomstig het bepaalde in punt I.6.1, punt I.6.2, respectievelijk punt I.6.4 worden uitgevoerd op overeenkomstig punt I.4.3 voorbewerkt supernatans. Op weefselmateriaal mogen andere diagnosetechnieken worden toegepast, bijvoorbeeld IFAT op vriescoupes of immunohistochemische tests op in formaline gefixeerd weefselmateriaal. Die snelle technieken moeten binnen 48 uur na bemonstering met een virologisch onderzoek overeenkomstig het bepaalde in punt II, onder a) of b), worden aangevuld indien:

a) een negatief resultaat werd verkregen; of

b) een positief resultaat werd verkregen met materiaal van het eerste geval van IHN of VHS.

III. **Procedure voor titratie om de gevoeligheid van de celculturen voor infectie te verifiëren**

Bij het uitvoeren van titratie om de gevoeligheid van de celculturen voor infectie te verifiëren, zoals bedoeld in punt I.5.3, moeten de procedures in de volgende alinea's van dit punt worden gevolgd.

Er worden ten minste twee VHSV-isolaten en één IHNV-isolaat gebruikt. De isolaten moeten representatief zijn voor de grootste virusgroep in de Europese Unie, dat wil zeggen voor VHSV één pathogeen isolaat uit regenboogforel in zoet water en een marien isolaat dat pathogeen is voor tarbot, en voor IHNV een pathogene regenboogforelstam uit de Europese Unie. Er moeten duidelijk gedefinieerde isolaten uit de lidstaten worden gebruikt. In celkweekflessen worden batches van virus met een laag aantal overentingen gekweekt in BF-2- of RTG-2-cellen voor VHSV, en in EPC- of FHM-cellen voor IHNV. Er moet een celkweekmedium met ten minste 10 % serum worden gebruikt. Voor de inoculatie moet een lage MOI (< 1) worden gebruikt.

Bij volledig CPE wordt het virus geoogst door centrifugeren van het celcultuursupernatans bij 2 000 × *g* gedurende 15 min; filtersterilisatie over een membraanfilter van 0,45 µm en verdeling in geëtiketteerde cryobuizen. Het virus wordt bij – 80 °C bewaard.

Een week na invriezing worden drie duplobuizen met elk virus onder koud water ontdooid en getitreerd op hun respectieve cellijnen. Ten minste om de zes maanden, of als het vermoeden bestaat dat de gevoeligheid van een cellijn is verminderd, wordt elk virusisolaat ontdooid en getitreerd.

Titratieprocedures moeten uitvoerig worden beschreven en telkens moet dezelfde procedure worden gevolgd.

Bij titratie door eindpuntverdunning worden ten minste zes duplo's voor iedere verdunningsstap gebruikt. De titers worden vergeleken met eerder verkregen titers. Als de titer van een van de drie virusisolaten met een factor 2 log of meer afneemt ten opzichte van de eerder verkregen titer, mag de cellijn niet langer worden gebruikt voor controledoeleinden.

Als in een laboratorium verschillende cellijnen worden bewaard, worden deze cellijnen afzonderlijk onderzocht.

De gegevens moeten ten minste 10 jaar worden bewaard.

DEEL 2

GEDETAILLEERDE DIAGNOSEMETHODEN EN -PROCEDURES VOOR DE BEWAKING EN DE BEVESTIGING VAN KHV-ZIEKTE (KHVD)

I. **Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de bevestiging van de aanwezigheid dan wel het weerleggen van een verdenking van KHVD**

Wanneer overeenkomstig artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG laboratoriumonderzoek moet worden uitgevoerd om de aanwezigheid van KHVD te bevestigen of een verdenking van KHVD te weerleggen aan de hand van de in bijlage I, deel 2, punt III, bedoelde diagnosemethoden, zijn de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van de punten I.1 en I.2 van dit deel van toepassing.

I.1. Voorbewerking van vismonsters

Voor diagnosedoeleinden kan de vis (levend of gedood en afzonderlijk verpakt in verzegelde aseptische recipiënten) worden verzonden; in plaats hiervan kunnen ook bevroren organen of stukjes orgaan, geconserveerd in ethanol met een zuiverheid van 80 tot 100 % of viraal transportmedium (voor verwerking binnen 48 uur na de monsterneming) worden gebruikt voor het testen met behulp van methoden op basis van conventionele PCR of qPCR.

Voor het aantonen van KHV worden de kieuwen en nieren verzameld; daarnaast kunnen milt, hersenen en darm worden opgenomen in een apart aanvullend monster. In acute gevallen mag weefselmateriaal van maximaal vijf vissen tot een verzamelmonster worden samengevoegd.

Voorts kunnen in bepaalde gevallen (met name wanneer bij zeer waardevolle vissen een verdenking van de aanwezigheid van KHVD is gerezen) monsters worden genomen waarvoor het dier niet hoeft te worden gedood, zoals bloed, kieuwuitstrijkje, kieuwbiopsie of slijmuitstrijkje.

I.1.1. DNA-extractie

DNA wordt geëxtraheerd overeenkomstig de standaardprocedures.

Er mag gebruik worden gemaakt van de in de handel verkrijgbare DNA-extractiekits die hoogwaardig DNA produceren dat geschikt is voor gebruik met de PCR-protocollen zoals bedoeld in punt I.2.

I.2. Aantonen en identificatie van ziekteverwekkers door middel van op polymerasekettingreactie (PCR) gebaseerde methoden

I.2.1. qPCR voor het aantonen van KHV

Voor het aantonen van KHV met behulp van qPCR, wordt de volgende qPCR-test gebruikt:

Forward primer (KHV-86f): 5′-GACGCCGGAGACCTTGTG-3′;

Reverse primer (KHV-163r): 5′-CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3′;

en de probe (KHV-109p): 5′-FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-3′.

Opeenvolging van cycli: één cyclus van 95 °C gedurende 15 minuten, gevolgd door 40 cycli van 94 °C gedurende 15 seconden en 60 °C gedurende 60 seconden. Bij elke RT-qPCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. In plaats hiervan mogen echter ook andere qPCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

I.2.2. Conventionele PCR voor het aantonen van KHV

De in dit punt beschreven test, die gericht is op het gen van KHV dat codeert voor thyminekinase (TK), moet worden gebruikt. In plaats hiervan mogen echter ook andere PCR-tests waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar gevoelig en specifiek zijn, worden gebruikt.

Forward primer (KHV-TKf): 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′;

Reverse primer (KHV-TKr): 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Opeenvolging van cycli: één cyclus van 95 °C gedurende 5 minuten, gevolgd door 35 cycli van 95 °C gedurende 30 seconden, 52 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende een minuut en één cyclus van 72 °C gedurende 10 minuten. Het product moet een grootte van 409 bp hebben.

De resultaten kunnen variëren naargelang de omstandigheden waaronder PCR is uitgevoerd; met name kan afhankelijk van de gebruikte thermocycler optimalisering van de temperatuurprotocollen nodig zijn. Bovendien kunnen fout-positieve resultaten optreden als gevolg van onjuiste hybridisatie van de primers of verontreiniging. Bij elke PCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. In plaats hiervan mogen echter ook andere PCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

De eerste opsporing van het virus in een gebied moet worden bevestigd door middel van sequencing of door de monsters voor onmiddellijke identificatie te verzenden naar een nationaal referentielaboratorium of naar het EU-referentielaboratorium voor visziekten, zoals bedoeld in bijlage VI bij Richtlijn 2006/88/EG.

II. **Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de bewaking van KHVD**

Bij het uitvoeren van bemonstering en laboratoriumonderzoek met het oog op het verkrijgen of behouden van bepaalde gezondheidsstatussen ten aanzien van KHVD overeenkomstig bijlage I, deel 2, punt I, aan de hand van de in deel 2, punt II of III, van die bijlage bedoelde diagnosemethoden, zijn de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van de punten II.1 en II.2 van dit deel van toepassing.

II.1. Voorbewerking van vismonsters

Waar mogelijk worden vissen bemonsterd die gedurende een langere periode bij temperaturen binnen het voor het virus gunstige bereik zijn gehouden, dat wil zeggen gedurende twee tot drie weken bij 15 °C tot 26 °C. Voor zover mogelijk worden de monsters 24 uur, maar niet later dan 72 uur na beheerpraktijken die het virus in vis met een dragerstatus kunnen reactiveren, zoals vangen in netten of vervoer, teneinde de kans op opsporing van KHV te vergroten.

Met het oog op de bewaking van KHVD kan de vis levend of gedood en afzonderlijk verpakt in verzegelde aseptische recipiënten worden verzonden; in plaats hiervan kunnen ook bevroren organen of stukjes orgaan, geconserveerd in alcohol met een zuiverheid van 80 tot 100 % of viraal transportmedium (voor verwerking binnen 48 uur na de monsterneming) worden gebruikt voor het testen met behulp van methoden op basis van PCR. Voor de bewaking van KHVD wordt weefsel van de kieuwen en nieren verzameld.

Voor de bewaking van KHVD wordt het samenvoegen van monsters zoveel mogelijk vermeden. Indien toch noodzakelijk mag weefselmateriaal van maximaal twee vissen worden samengevoegd. Grotere monsters worden met een vijzel en stamper of een stomacher gehomogeniseerd en vóór de klaring worden deelmonsters genomen voor DNA-extractie. In plaats hiervan kunnen ook deelmonsters worden verzameld van elk weefsel in het monster, die in „lysis-buisjes” worden overgebracht.

II.1.1. DNA-extractie

DNA wordt geëxtraheerd overeenkomstig de standaardprocedures. Er mag gebruik worden gemaakt van in de handel verkrijgbare DNA-extractiekits die hoogwaardig DNA produceren dat geschikt is voor gebruik met de PCR-protocollen zoals omschreven in punt II.2.

De aanvaardbare verhouding tussen weefsel en medium bedraagt 1:9 w/v. In de tests wordt 20 tot 25 mg weefselmateriaal gebruikt.

II.2. Bewaking van KHVD met behulp van methoden op basis van PCR

Voor de bewaking van KHV wordt een qPCR gebruikt. Indien positieve monsters worden aangetroffen in een gebied waar de aanwezigheid van KHV tot nu toe nog niet was bevestigd, moeten de resultaten van de test worden bevestigd:

a) door het sequencen van een door PCR of geneste PCR uit de monsters verkregen product.

de verkregen gecorrigeerde consensussequentie moet (voor ten minste 98 %) met de referentiesequenties overeenkomen;

b) of door monsters voor bevestiging naar een nationaal referentielaboratorium te verzenden.

II.2.1. qPCR voor het aantonen van KHV

De als volgt omschreven qPCR wordt toegepast:

Forward primer (KHV-86f): 5′-GACGCCGGAGACCTTGTG-3′;

Reverse primer (KHV-163r): 5′-CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3′;

en de probe (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-3′.

Opeenvolging van cycli: één cyclus van 95 °C gedurende 15 minuten, gevolgd door 50 cycli van 94 °C gedurende 15 seconden en 60 °C gedurende 60 seconden.

De resultaten kunnen variëren naargelang de omstandigheden waaronder qPCR is uitgevoerd; met name kan afhankelijk van de gebruikte thermocycler optimalisering van de temperatuurprotocollen nodig zijn. Bovendien kunnen fout-positieve resultaten optreden als gevolg van onjuiste hybridisatie van de primers of laboratoriumverontreiniging. Bij elke qPCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. In plaats hiervan mogen echter ook andere qPCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

II.2.2. Conventionele PCR voor de bevestiging van opgespoord KHV

Voor bevestiging van de aanwezigheid van besmetting met KHV wordt de in tabel 2.1 hieronder omschreven generieke geneste PCR gebruikt, gevolgd door sequencing van het geamplificeerde product.

Tabel 2.1

Primers en voorwaarden voor geneste PCR-test gericht op alle cyprinide herpesvirussen (CyHV-1, CyHV-2 en CyHV-3).

Naam van primer	Sequentie	Opeenvolging van cycli	Grootte van het product
CyHVpol-forward	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	Eerste PCR-ronde *1 cyclus:* 95 °C, 2 minuten *40 cycli:* 95 °C, 30 seconden 55 °C, 30 seconden 72 °C, 45 seconden *1 cyclus:* 72 °C, 10 minuten.	362 bp
CyHVpol-reverse	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Naam van primer	Sequentie	Opeenvolging van cycli	Grootte van het product
CyHVpol-internal forward	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	Tweede PCR-ronde *1 cyclus:* 95 °C, 2 minuten *40 cycli:* 95 °C, 30 seconden 55 °C, 30 seconden 72 °C, 45 seconden *1 cyclus:* 72 °C, 10 minuten.	339 bp
CyHVpol-internal reverse	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

De resultaten kunnen variëren naargelang de omstandigheden waaronder PCR is uitgevoerd; met name kan afhankelijk van het gebruikte PCR-apparaat optimalisering van de temperatuurprotocollen nodig zijn. Bovendien kunnen fout-positieve resultaten optreden als gevolg van onjuiste hybridisatie van de primers of laboratoriumverontreiniging. Bij elke PCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. In plaats hiervan mogen andere PCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

Het sequencen kan worden uitgevoerd door het laboratorium of door een extern gespecialiseerd sequencingbedrijf. De resultaten van het sequencen worden geanalyseerd door de sequenties te vergelijken met de bekende referentiesequenties van KHV (GenBank-volgnummers AP008984, DQ657948 en DQ177346). De verkregen gecorrigeerde consensussequentie moet voor ten minste 98 % met die referentiesequenties overeenkomen;

DEEL 3

GEDETAILLEERDE DIAGNOSEMETHODEN EN -PROCEDURES VOOR DE BEWAKING EN DE BEVESTIGING VAN INFECTIEUZE ZALMANEMIE (ISA)

I. **Bemonsteringsprocedures voor de bewaking en bestrijding van ISA**

Bij het uitvoeren van bemonstering en laboratoriumonderzoek in het kader van de bewakings- en uitroeiingsprogramma's van bijlage I, deel 3, of om de aanwezigheid van ISA te bevestigen of te weerleggen overeenkomstig artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG, zijn de gedetailleerde methoden en procedures van de punten I.1, I.2 en I.3 van dit deel van toepassing.

I.1. Voorbewerking van vismonsters

Voor laboratoriumonderzoek naar de aanwezigheid van ISA, worden de monsters voor zover mogelijk niet samengevoegd. Voor de bewaking van ISA is het echter toegestaan 2 tot 5 vissen tot een verzamelmonster samen te voegen.

Van alle bemonsterde vissen worden monsters voor analyse met behulp van reverse-transcriptase-polymeraseketting-reactie (RT-PCR) genomen. Met gebruikmaking van een steriel instrument wordt een stukje rompnier uit de vis weggenomen en overgebracht in een microcentrifugebuisje dat is gevuld met 1 ml RNA-preservatievloeistof waarvan de werkzaamheid is aangetoond. Weefsel van maximaal vijf vissen mag tot één verzamelmonster worden samengevoegd in een buisje met transportoplossing. Het gewicht van het weefsel in een monster moet 0,5 g bedragen. Indien de vissen te klein zijn om een monster van het voorgeschreven gewicht te verkrijgen, mogen stukjes nier, hart, milt, lever, of pyloruscaeca (in die volgorde) worden genomen om aan het totaal van 0,5 g te komen.

Weefsel voor histopathologisch onderzoek mag uitsluitend worden weggenomen uit zojuist gedode, in normale staat verkerende vissen die klinische of postmortale symptomen vertonen die wijzen op de aanwezigheid van ISA. Van alle eventuele externe en interne lesies worden monsters genomen, en in elk geval worden met een scalpel monsters van rompnier, hart, lever, alvleesklier, darm, kieuw en milt uit de individuele vissen weggnomen, die worden overgebracht in 8-10 % (vol:vol) gebufferd formaline-fysiologisch zout. De verhouding fixeermiddel-weefsel moet ten minste 20:1 zijn, om van een goede conservering van de weefsels verzekerd te zijn. Voor immunohistochemie (IHC) worden monsters van de rompnier en het hart genomen.

Van alle bemonsterde vissen worden weefselmonsters bestemd voor virologisch onderzoek op celcultuur genomen. Met gebruikmaking van een steriel instrument worden stukjes lever, kop- of rompnier, hart en milt uit de vis weggenomen en overgebracht in steriele plastic buisjes die zijn gevuld met 9 ml transportmedium. Weefsels van maximaal vijf vissen mogen tot één verzamelmonster worden samengevoegd in een buisje met transportoplossing. Het gewicht van het weefsel in een monster moet 1,0 ± 0,5 g bedragen.

I.2. Verzending van vismonsters

De vis mag in zijn geheel naar het laboratorium worden vervoerd indien tijdens het vervoer aan de temperatuurvoorschriften van de derde alinea van dit punt kan worden voldaan. Hele vissen worden daartoe in absorberend papier gewikkeld en in plastic zakken vervoerd, gekoeld zoals in die alinea omschreven.

De vis mag ook levend worden verzonden, maar alleen onder het toezicht van het nationale referentielaboratorium voor visziekten en rekening houdend met de bijkomende kwesties van ontsmetting en bioveiligheid bij het vervoer van levende vis.

Bloedmonsters en buisjes met visweefsels voor virologisch onderzoek of RT-PCR-analyse worden in geïsoleerde recipiënten geplaatst, zoals dikwandige polystyreendozen, samen met voldoende ijs of koelelementen, zodat de monsters tijdens het vervoer naar het laboratorium koel worden gehouden. Het invriezen van de monsters moet worden vermeden en bij aankomst van de zending moet de transportdoos nog ijs bevatten of moeten een of meer koelelementen nog geheel of gedeeltelijk bevroren zijn.. In uitzonderlijke omstandigheden mogen monsters voor RT-PCR-analyse en monsters voor virologisch onderzoek momentaan worden ingevroren en bij – 20 °C of lager naar het laboratorium worden vervoerd.

Voor RT-PCR-analyse van in RNAlater (reagens voor stabilisatie van ribonucleïnezuur (RNA)) bewaarde weefsels, moet RNA-extractie worden uitgevoerd binnen de volgende termijnen, naargelang de temperatuur waarbij de monsters worden bewaard:

bij 37 °C bewaarde monsters: één dag;

bij 25 °C bewaarde monsters: één week;

bij 4 °C bewaarde monsters: één maand;

bij – 20 °C bewaarde monsters: voor onbepaalde tijd.

Als visweefsels voor histologisch onderzoek in fixeermiddel worden vervoerd, moeten ze worden vervoerd in niet-lekkende buisjes in stootbestendige recipiënten. Het invriezen van die monsters moet worden vermeden.

Met het virologisch onderzoek op celcultuur wordt zo snel mogelijk begonnen en in elk geval uiterlijk 48 uur na de bemonstering. In uitzonderlijke gevallen mag uiterlijk 72 uur na de bemonstering met het virologisch onderzoek worden begonnen, op voorwaarde dat het voor onderzoek verzamelde materiaal met een transportmedium is beschermd en dat tijdens het vervoer aan de temperatuurvoorschriften kan worden voldaan.

I.3. Verzamelen van aanvullend diagnostisch materiaal

Onder voorbehoud van goedkeuring van het diagnostisch laboratorium mogen andere dan de in punt I.2 bedoelde visweefsels voor aanvullend onderzoek worden verzameld en voorbewerkt.

II. **Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de bewaking en de bevestiging van de aanwezigheid dan wel het weerleggen van een verdenking van ISA**

Bij het uitvoeren van laboratoriumonderzoek met het oog op het verkrijgen of behouden van een bepaalde gezondheidsstatus ten aanzien van ISA overeenkomstig bijlage I, deel 3, punt I, of om de aanwezigheid van ISA te bevestigen of een verdenking van ISA te weerleggen overeenkomstig artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG aan de hand van de diagnosemethoden van bijlage I, deel 3, punt II, zijn de gedetailleerde methoden en -procedures van de volgende punten II.1 tot en met II.5 van toepassing.

II.1. Onderzoek van monsters met behulp van RT-PCR

Voor het screenen op ISAV wordt RT-qPCR als diagnosemethode gebruikt. Aangezien de resultaten kunnen variëren naargelang de omstandigheden waaronder RT-qPCR is uitgevoerd, moeten adequate positieve en negatieve controles en amplicons worden opgenomen om elke twijfel te vermijden.

II.1.1. Extractie van het totale RNA

Alle werkzaamheden met RNA worden op ijs en met handschoenen uitgevoerd.

Het totale RNA wordt geëxtraheerd met behulp van de fenol-chloroform-methode of affiniteitschromatografie in kolommen, overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant.

Het gezuiverde RNA wordt opnieuw gesuspendeerd in gedestilleerd RNase-vrij water (dat wil zeggen water behandeld met 0,1 % diethylpyrocarbonaat).

De concentratie en zuiverheid van het geëxtraheerde RNA worden geschat door de optische dichtheid bij 260 en 280 nm te meten. Een andere mogelijke aanpak is om interne controles op te nemen die gericht zijn tegen het virusgenoom, zoals bedoeld in punt II.1.3.

II.1.2. RT-PCR voor het aantonen van ISAV

Verscheidene RT-PCR-methoden kunnen worden gebruikt voor amplificatie van het ISAV-genoom Een tweestaps RT-PCR kan worden uitgevoerd, waarbij de RT- en de PCR-reactiestap in twee afzonderlijke buisjes worden uitgevoerd. Een reactie in één stap, waarbij de twee reacties in één buisje worden uitgevoerd, mag echter ook worden gebruikt. De uit één stap bestaande methode wordt waar mogelijk gebruikt, omdat het risico op kruisbesmetting bij de test in één buisje zo klein mogelijk worden gehouden aangezien er geen inhoud overgebracht hoeft te worden en omdat deze methode als even gevoelig wordt beschouwd als de tweestaps methode.

De in dit punt beschreven primers en test, te weten primerpaar ILA1 of ILA2, gericht op segment 8 en geschikt bevonden voor het aantonen van ISAV bij uitbraken en bij dragervissen, moeten worden gebruikt. De reverse primer ILA2 komt niet overeen met isolaten uit Noord-Amerika en in dat geval wordt een andere primerset gebruikt.

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

Reverse primer (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Opeenvolging van cycli: één cyclus van 50 °C gedurende 30 minuten, één cyclus van 94 °C gedurende 15 minuten, 40 cycli van 94 °C gedurende 30 seconden, 55 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende 60 seconden; één cyclus van 72 °C gedurende 5 min. Grootte van het product: 155 bp.

De resultaten kunnen variëren naargelang de omstandigheden waaronder PCR is uitgevoerd; met name kan afhankelijk van het gebruikte PCR-apparaat optimalisering van de temperatuurprotocollen nodig zijn. Bovendien kunnen fout-positieve resultaten optreden als gevolg van onjuiste hybridisatie van de primers of laboratoriumverontreiniging. Bij elke PCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. In plaats hiervan mogen echter ook andere RT-PCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

II.1.3. RT-qPCR voor het aantonen van ISAV

Door RT-qPCR te gebruiken, kan een grotere specificiteit en waarschijnlijk ook een grotere gevoeligheid worden behaald. Deze methode kan sneller worden uitgevoerd aangezien er geen gelelektroforesestap nodig en er bestaat minder risico op kruisbesmetting aangezien de hoeveelheid viraal genomisch RNA in het monsterbuisje kan worden geraamd. Een nadeel van de RT-qPCR-test is dat het vaak niet mogelijk is geamplificeerde producten te sequencen. Indien er echter twijfel bestaat over de specificiteit van het geamplificeerde product, moet een andere voor ISAV specifieke test worden uitgevoerd om het resultaat te verifiëren.

De in dit punt beschreven test, die gericht is op segment 8, moet worden gebruikt. Door deze test moeten isolaten uit de Europese Unie, de Europese Vrijhandelsassociatie en Noord-Amerika worden gedekt. Waar mogelijk moet de uit één stap bestaande methode worden gebruikt, aangezien het risico op kruisbesmetting bij een test in één buisje zo klein mogelijk wordt gehouden.

Forward primer: 5′-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3′;

Reverse primer: 5′-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3′;

en de probe: 5′-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC — *MGBNFQ*-3′.

Bij elke qPCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. Opeenvolging van cycli: één cyclus van 50 °C gedurende 30 minuten, één cyclus van 95 °C gedurende 15 minuten, 40 cycli van 94 °C gedurende 15 seconden, 60 °C gedurende 60 seconden; zo nodig aan te passen. In plaats hiervan mogen ook andere RT-PCR- of RT-qPCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

II.1.4. Sequencen van geamplificeerde PCR-producten

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

Reverse primer (ILAs6-2R): 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA-3′.

Bij elke PCR-run worden op de plaat no-template-controles en positieve controles opgenomen. Opeenvolging van cycli (eenstaps RT-PCR): één cyclus van 50 °C gedurende 30 minuten, één cyclus van 94 °C gedurende 15 minuten, 40 cycli van 94 °C gedurende 30 seconden, 55 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende 60 seconden, één cyclus van 72 °C gedurende 5 minuten; zo nodig aan te passen. In plaats hiervan mogen ook andere RT-PCR- of RT-qPCR-varianten waarvan is aangetoond dat zij vergelijkbaar effectief zijn, worden gebruikt.

Ook kan de volgende methode voor het sequencen van HPR in segment 6 worden gebruikt:

Forward primer: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′;

Reverse primer: 5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′;.

Grootte van het product: 304 nt indien HPR0.

RT-PCR-tests die vergelijkbaar gevoelig en specifiek zijn als de in dit punt beschreven tests mogen ook worden gebruikt.

De zuiverheid van het geamplificeerde RT-PCR-product wordt vóór het sequencen gecontroleerd met behulp van gelelektroforese. Als slecht één zuiver fragment verschijnt, wordt dit direct uit de PCR-reactie gezuiverd. Indien meerdere geamplificeerde fragmenten aanwezig zijn, wordt het van belang geachte fragment gezuiverd met behulp van gelelektroforese. Het zuiveren van PCR-fragmenten uit oplossingen of agarosegels gebeurt met behulp van het PCR-fragment-affiniteitschromatografie in kolommen, overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant.

Het sequencen wordt met behulp van amplificatieprimers door externe gespecialiseerde sequencingbedrijven uitgevoerd. De resultaten worden met de BLAST-zoekmachine geanalyseerd en de sequenties vergeleken met andere bekende sequenties in de nucleotidendatabank van het US National Centre for Biotechnical Information (NCBI).

De sequencing moet elke twijfel over de specificiteit van een geamplificeerd RT-PCR-product wegnemen.

II.2. ISAV-isolatie op celculturen

II.2.1. Voorbewerking van monsters

Het weefsel kan bij – 80 °C worden bewaard. Het weefsel mag slechts één keer worden ingevroren en ontdooid vóór het onderzoek. Voor bewakings- en bestrijdingsdoeleinden wordt het onderzoek zo snel mogelijk uitgevoerd.

Elk monster (bestaande uit weefsels in een transportoplossing) wordt met behulp van een gevalideerd stomacher volledig gehomogeniseerd en daarna bij 2 000-4 000 × *g* gedurende 15 minuten gecentrifugeerd bij 0-6 °C, waarna het supernatans wordt gefiltreerd (0,45 µm) en geïncubeerd met een gelijk volume van een passend verdund mengsel van antisera tegen de inheemse serotypen van IPNV. De titer van het antiserum, bepaald met behulp van een 50 %-plaqueneutralisatietest, moet ten minste 1:2 000 bedragen. Het mengsel wordt gedurende één uur bij 15 °C geïncubeerd. Dit doet dienst als het inoculum.

Alle inocula worden met een antiserum tegen het IPN-virus (infectieuze pancreatische necrose; in sommige delen van Europa wordt dit virus gevonden bij 50 % van de vismonsters) behandeld om te vermijden dat het IPN-virus een cytopathologisch effect (CPE) doet ontstaan in de geënte celculturen. Een dergelijke behandeling kan worden uitgevoerd om de duur van het virologisch onderzoek in te korten en het aantal gevallen waarin het ontstaan van een CPE als mogelijke indicator voor de aanwezigheid van VHSV of IHNV zou moeten worden aangemerkt, te verminderen. Als de monsters afkomstig zijn van productie-eenheden die als vrij van IPN worden beschouwd, is het niet verplicht de inocula met antiserum tegen het IPN-virus te behandelen.

II.2.2. Inoculeren op celculturen

Voor de primaire isolatie van ISAV worden ASK-cellen (Atlantic salmon kidney cells, niercellen van de Atlantische zalm) gebruikt. Andere cellijnen kunnen ook worden gebruikt als de werkzaamheid en gevoeligheid voor het isoleren van ISAV daarvan is aangetoond, waarbij de stamvariabiliteit in acht moet worden genomen, evenals het vermogen van verschillende stammen zich in verschillende cellijnen te vermenigvuldigen. De ASK-cellen lijken geschikt te zijn voor de isolatie en groei van de op dit moment bekende virusisolaten, zolang virus met een laag aantal overentingen wordt gebruikt. In ASK-cellen kan een duidelijkere cytopathologisch effect (CPE) optreden dan in andere gevoelige cellijnen, zoals SHK-1 (Salmon head kidney-1, van zalmkopnier).

ASK-cellen (aantal overentingen 65 of kleiner) worden gecultiveerd in een L-15-medium dat 10 % serum van runderfoetussen bevat, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamine en 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-mercapto-ethanol in microtiterplaten. Een orgaansuspensie die met antiserum is behandeld, wordt door inoculeren ingebracht in jonge, actief groeiende celculturen teneinde een eindoplossing van weefselmateriaal in het kweekmedium te geven van 1:1 000. Voor elke orgaansuspensie wordt 40 µl inoculum toegevoegd aan een welletje dat 2 ml kweekmedium bevat. Om de kans op kruisbesmetting zo klein mogelijk te houden, worden gescheiden platen met twaalf of 24 welletjes gebruikt voor monsters afkomstig van verschillende viskwekerijlocaties.

Eén plaat blijft niet-geïnoculeerd om als negatieve controle te dienen. Een andere plaat wordt geïnoculeerd met een referentie-isolaat van ISAV om als positieve controle te dienen; dit gebeurt zoals hieronder beschreven. 100 µl van een moederstampreparaat van ISAV (minimale titer 10^7 weefselcultuur-infectiedosis bij het 50 %-eindpunt (TCID50 ml^{-1})) wordt in het eerste welletje geïnoculeerd, waarna wordt gemengd. Een deel hiervan wordt uit het eerste naar het tweede welletje overgebracht om een verdunning van 1:10 te bereiden, waarna weer wordt gemengd. Dat wordt voor een aantal welletjes op de plaat herhaald, zodat er zes decimale verdunningen zijn. Moederstam-ISA-virus mag bij – 80 °C gedurende ten minste twee jaar worden bewaard, maar als het eenmaal is ontdooid moet het binnen drie dagen worden gebruikt. Draag er zorg voor dat kruisbesmetting van de testplaten met materiaal van de positieve controles wordt voorkomen. Daartoe worden de positieve controles gescheiden gehouden van de testplaten. In plaats van bij elke inoculatie een positieve controle op te nemen, kan ook om de zes maanden de gevoeligheid van ASK-cellen voor ISAV-isolaten worden getest.

De monsters worden bij 15 ± 2 °C gedurende maximaal 15 dagen geïncubeerd. Met behulp van een microscoop worden de celculturen tweemaal op CPE onderzocht, vijf tot zeven dagen na het inoculeren en 12 tot 14 dagen na het inoculeren. Als een van de kweken CPE vertoont, wordt onmiddellijk begonnen met de identificatie van het virus overeenkomstig punt II.2.4. Als op dag 14 nog geen CPE wordt waargenomen, wordt een indirecte immunofluorescentietest (IFAT), hemadsorptietest of RT-PCR uitgevoerd.

II.2.3. Doorkweek

Doorkweek moet tussen dag 13 en dag 15 worden uitgevoerd. Supernatans van de culturen wordt toegevoegd aan de welletjes van microtiterplaten waarin zich verse, actief groeiende cellen bevinden, in een adequate verdunning (1/10), waarna gedurende maximaal 18 dagen bij 14 ± 2 °C wordt geïncubeerd. Met behulp van een microscoop worden de celculturen dan tweemaal op CPE onderzocht, eenmaal vijf tot zeven dagen na het inoculeren en eenmaal na 14 tot 18 dagen. Als een van de kweken CPE vertoont, wordt onmiddellijk begonnen met de identificatie van het virus overeenkomstig punt II.2.4. Als ook na 14 tot 18 dagen geen CPE wordt gevonden, wordt een hemadsorptietest of een RT-PCR-test uitgevoerd.

Als zich in de eerste zeven dagen na het inoculeren cytotoxiciteit voordoet, wordt in dat stadium een doorkweek uitgevoerd, en de cellen worden dan gedurende 14 tot 18 dagen geïncubeerd en opnieuw doorgekweekt in een tweede 14- tot 18-daagse incubatieperiode. Als zich pas na zeven dagen cytotoxiciteit voordoet, wordt eenmaal een doorkweek uitgevoerd; de cellen worden dan geïncubeerd tot de totale periode van 28 tot 36 dagen incubatie is bereikt sedert het eerste inoculeren.

Als zich in de primaire cultuur een bacteriële verontreiniging voordoet, wordt de test overgedaan met het weefselhomogenaat dat bij – 80 °C is bewaard. Voorafgaand aan het inoculeren wordt het weefselhomogenaat bij 4 000 × *g* gedurende 15 tot 30 minuten bij 0-6 °C gecentrifugeerd, waarna het supernatans bij 0,22 µm wordt gefiltreerd. Als de bacteriële verontreiniging zich gedurende de doorkweekstap voordoet, wordt het supernatans bij 0,22 µm gefiltreerd, op verse cellen geïnoculeerd en gedurende een extra 14 tot 18 dagen geïncubeerd.

II.2.4. Virusidentificatietests

Als op enig moment CPE wordt geconstateerd, of als een hemadsorptieproef positief uitvalt, wordt een virusidentificatietest uitgevoerd. RT-PCR overeenkomstig punt II.1 en immunofluorescentie (IF) overeenkomstig punt II.2.6 zijn de te verkiezen methoden voor het aantonen van ISAV. Als wordt vermoed dat andere virussen aanwezig kunnen zijn, worden extra virusidentificatietests uitgevoerd. Als het met behulp van deze tests niet mogelijk is binnen een week tot een definitieve identificatie van het virus te komen, wordt het supernatans voor onmiddellijke identificatie doorgestuurd naar

a) het referentielaboratorium voor ISA van de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE); of

b) een nationaal referentielaboratorium of het EU-referentielaboratorium voor visziekten, zoals bedoeld in bijlage VI bij Richtlijn 2006/88/EG.

II.2.5. Hemadsorptie

Aangezien replicatie van ISAV in celculturen niet altijd CPE tot gevolg heeft, wordt elk welletje onderworpen aan een RT-PCR-test of een hemadsorptietest overeenkomstig dit punt, of aan een IF-test overeenkomstig punt II.2.6.

Het celkweekmedium wordt uit elk welletje verwijderd, ook uit die met de positieve en de negatieve controles, en in geëtiketteerde steriele buisjes gedaan. Aan elk welletje wordt 500 µl van een 0,2 % (vol:vol) suspensie van gewassen rode bloedlichaampjes van konijn of paard toegevoegd, of een 0,05 % (vol:vol) suspensie van gewassen rode bloedcellen van regenboogforel of Atlantische zalm, waarna gedurende 45 minuten bij kamertemperatuur wordt geïncubeerd. De rode bloedcellen worden dan verwijderd en elk welletje wordt tweemaal gewassen met L-15-medium. Elk welletje wordt vervolgens onderzocht met een microscoop.

De aanwezigheid van clusters van rode bloedcellen, gehecht aan het oppervlak van ASK-cellen, is een aanwijzing dat mogelijk een besmetting met een orthomyxovirus is opgetreden. Als de hemadsorptieproef positief uitvalt, wordt onmiddellijk een virusidentificatietest uitgevoerd overeenkomstig punt II.2.4.

II.2.6. Immunofluorescentie (IF)

ASK-cellen (aantal overentingen 65 of kleiner) worden gecultiveerd in een L-15-medium dat 10 % serum van runderfoetussen bevat, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamine en 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-mercapto-ethanol in microtiterplaten en worden gebruikt bij een confluentie van meer dan 50 %. Andere cellijnen of kweekmedia mogen worden gebruikt als de werkzaamheid daarvan is aangetoond. 225 µl supernatans van een cultuur die vermoedelijk met het virus is geïnfecteerd, wordt toegevoegd aan telkens twee welletjes, waarna wordt gemengd en 225 µl wordt overgebracht naar nog eens twee welletjes, hetgeen een verdunning van 1:5 oplevert. Twee extra welletjes blijven niet-geïnoculeerd om als controle te dienen. De monsters van verschillende kwekerijen worden op aparte platen onderzocht, evenals het controlemateriaal. Als controle wordt een referentie-isolaat van ISAV gebruikt.

De platen worden bij 14 ± 2 °C geïncubeerd en gedurende maximaal zeven dagen met behulp van een microscoop onderzocht. Indien een vroeg CPE wordt waargenomen, of binnen zeven dagen geen CPE wordt waargenomen, worden zij daarna gefixeerd. Daartoe worden de welletjes gewassen met fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) en gefixeerd door incuberen met 80 % aceton, gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur. De platen worden dan aan de lucht gedroogd en ofwel onmiddellijk gekleurd ofwel bij 0-6 °C gedurende niet meer dan 24 uur bewaard alvorens te worden gekleurd.

Duplo-welletjes worden gekleurd met een mengsel van de monoklonale antilichamen (monoclonal antibodies, MAb's) 3H6F8 en 1OC9F5 tegen ISAV, of met een ander MAb waarvan de werkzaamheid en specificiteit zijn aangetoond, en vervolgens verdund in PBS en bij 37 ± 4 °C gedurende 30 minuten geïncubeerd. De MAb's worden dan verwijderd en de platen worden driemaal met 0,05 % Tween-20 in PBS gewassen. Dan wordt een antimuis-IgG-fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC)-conjugaat, verdund in PBS, aan elk welletje toegevoegd, waarna bij 37 ± 4 °C gedurende 30 minuten wordt geïncubeerd. De verdunningen van de verschillende batches MAb's en FITC-conjugaat moeten in elk laboratorium worden geoptimaliseerd. Antilichamen worden verwijderd en de platen worden driemaal gewassen met 0,05 % Tween-20 in PBS.

De welletjes worden onmiddellijk onderzocht met behulp van een omgekeerde microscoop voor fluorescentiemicroscopie en voorzien van een geschikt filter voor de excitatie van FITC. Het resultaat is positief als fluorescerende cellen worden waargenomen. Een test is slechts geldig als de positieve controles ook positief zijn en de negatieve negatief.

II.3. Het onderzoeken van andere weefsels

De in punt II.2.6 bedoelde techniek kan ook op andere weefsels van vis worden toegepast, zoals van de lever, de milt en het hart, vooropgesteld dat een redelijke hoeveelheid endotheliale cellen, leukocyten of lymfocyten op het glaasje kan worden gebracht. De werkwijze voor het kleuren blijft voor alle weefsels dezelfde, hoewel het bij sommige weefsels de voorkeur kan verdienen het kleuren met propidiumjodide achterwege te laten en te vertrouwen op de faseverlichting om de celsoorten in de imprint te identificeren.

II.4. Histologie

In paraffine ingebedde doorsneden worden in plakjes van 5 µm gesneden en gekleurd met hematoxyline en eosine.

Bij klinisch zieke Atlantische zalm treden wisselende histologische veranderingen op, maar deze kunnen onder meer omvatten:

a) talrijke rode bloedcellen in de centrale veneuze sinus en de lamellaire capillairen van de kieuwen, waar ook thrombi van rode bloedcellen gevormd kunnen worden;

b) multifocale tot confluente petechiën en/of necrose van hepatocyten op enige afstand van grotere vaten in de lever; multifocale opeenhoping van rode bloedcellen in verwijde hepatische sinusoïden

c) opeenhoping van rode bloedcellen in bloedvaten van de intestinale lamina propria van de darm, mogelijk leidend tot bloedingen in de lamina propria;

d) uitgezet miltstroma als gevolg van opeenhoping van rode bloedcellen;

e) lichte multifocale tot uitgebreide diffuse interstitiële bloedingen met tubulusnecrose in de hermorragische gebieden, opeenhoping van rode bloedcellen in de nierglomeruli;

f) erythrofagocytose in de milt en secundaire bloedingen in lever en nier.

II.5. Immunohistochemie (IHC)

Polyklonale antilichamen tegen ISAV-nucleoproteïne worden toegepast op paraffinecoupes van met formaline gefixeerd weefsel. De te onderzoeken organen zijn rompnier en hart (overgangsgebied met inbegrip van alle drie de kamers en kleppen). Gevallen waarin op basis van pathologische symptomen een verdenking bestaat, moeten door middel van een positieve IHC worden geverifieerd. Histologische coupes worden overeenkomstig de standaardmethoden voorbewerkt.

1. Voorbewerking van weefselcoupes

De weefsels worden overeenkomstig standaardprotocollen gedurende ten minste één dag gefixeerd in neutrale fosfaatgebufferde formaline 10 %, gedehydreerd in een ethanolreeks, geklaard in xyleen en ingebed in paraffine. Coupes met een dikte van ongeveer 5 µm (voor IHC op met poly-L-lysine gecoate objectglaasjes aangebracht) worden gedurende 20 minuten bij 56 tot 58 °C (max. 60 °C) verhit, van was ontdaan in xyleen, gerehydreerd in een ethanolreeks en gekleurd met hematoxyline en eosine met het oog op pathomorfologische en IHC-analyse overeenkomstig punt 2).

2. Kleuringsprocedure voor IHC

Alle incubaties worden uitgevoerd bij kamertemperatuur op een schudplaat, tenzij in dit besluit anders is bepaald:

a) de antigenen worden teruggewonnen door de coupes in 0,1 M citraatbuffer pH 6,0 te koken gedurende 2 × 6 minuten, gevolgd door blokkeren met 5 % vetvrije droge stof van melk en 2 % geitenserum in 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) gedurende 20 minuten;

b) vervolgens worden de coupes een hele nacht geïncubeerd met primair antilichaam (monospecifiek konijnantilichaam tegen ISAV-nucleoproteïne) verdund in TBS met 1 % vetvrije droge stof van melk, en daarna driemaal gewassen in TBS met 0,1 % Tween 20;

c) voor het aantonen van gebonden antilichamen worden de coupes gedurende 60 minuten geïncubeerd met alkalische-fosfatasegeconjugeerde antilichamen tegen konijnen-IgG. Na een laatste keer wassen worden echtrood (1 mg ml^{-1}) en naftol-AS-MX- fosfaat (0,2 mg ml^{-1}) met 1 mM levamisol in 0,1 M TBS (pH 8,2) toegevoegd; gedurende 20 minuten laten ontwikkelen. De coupes worden vervolgens in leidingwater gewassen alvorens te worden tegengekleurd met Harris-hematoxyline en te worden ingesloten met waterig insluitmiddel. ISAV-positieve en ISAV-negatieve weefselcoupes worden in elke testopstelling opgenomen als controles.

3. Interpretatie van de resultaten van IHC

De resultaten van de IHC-test worden geïnterpreteerd zoals onder a) en b) beschreven:

a) controlecoupes worden als positief aangemerkt, wanneer wordt geconstateerd dat de controlecoupes een duidelijk zichtbare rode (roodachtige) kleuring van het cytoplasma en intranucleare kleuring vertonen van endotheelcellen in bloedvaten van het endocard. Een coupe van het testmonster wordt alleen als positief aangemerkt indien een dergelijke duidelijke intranucleaire rode kleuring van de endotheelcellen wordt waargenomen;

b) controlecoupes worden als negatief aangemerkt indien zij geen enkele significante kleuringsreactie vertonen.

Aangezien de specifieke intranucleaire lokalisatie specifiek is voor het orthomyxovirus-nucleoproteïne tijdens een virusreplicatiefase, maar de parallele cytoplasmatische kleuring vaak dominant is, worden cytoplasmatische en andere kleuringspatronen zonder intranucleaire lokalisatie als niet-specifiek of niet doorslaggevend aangemerkt.

De sterkste positieve kleuringsreacties worden meestal verkregen in endotheelcellen van hart en nier. Bij zeer omvangrijke hemorragische lesies kunnen de endotheliale kleuringsreacties gering of geheel afwezig zijn, mogelijkerwijs als gevolg van lyse van besmette endotheelcellen.

DEEL 4

GEDETAILLEERDE DIAGNOSEMETHODEN EN -PROCEDURES VOOR DE BEWAKING EN DE BEVESTIGING VAN BESMETTING MET *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de diagnose van besmetting met *Marteilia refringens***

Bij het uitvoeren van bemonstering en laboratoriumonderzoek met het oog op het verkrijgen of behouden van een bepaalde gezondheidsstatus ten aanzien van besmetting met *Marteilia refringens* overeenkomstig bijlage I, deel 4, punt I, of om de aanwezigheid van die in de lijst opgenomen ziekte te bevestigen of te weerleggen overeenkomstig artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG aan de hand van de diagnosemethoden van bijlage I, deel 4, punt II, zijn de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van de punten I.1, I.2 en I.3 van dit deel van toepassing.

I.1. Bemonsteringsprocedure

Bij voorkeur worden openstaande of pas gestorven weekdieren bemonsterd, ter vergroting van de kansen op het vinden van besmette dieren.

Na bemonstering worden oesters of mosselen bij een temperatuur van 4 °C of op gekoeld ijs gehouden, gedurende maximaal 24 uur indien de monsters ook openstaande weekdieren bevatten en maximaal 72 uur indien dat niet het geval is, in een plastic zak voorzien van een etiket met gegevens met betrekking tot de aard en de oorsprong van de oesters of mosselen. Openstaande of pas gestorven worden gescheiden gehouden van andere weekdieren.

Voor de diagnose van *Marteilia refringens* met behulp van histologie wordt een coupe met een dikte van 3 tot 5 mm van weefsels, waaronder kieuwen en hartweefsel, gebruikt. Voor een aantal tests, waaronder imprints (afdrukken) en polymerasekettingreactie (PCR), wordt een stukje spijsverteringsklier gebruikt.

I.2. Microscopische technieken

I.2.1. Cytologie (imprintcytologie)

Nadat spijsverteringsklierweefsel op absorberend papier is gedroogd, worden enkele imprints (afdrukken) op een objectglaasje gemaakt. De objectglaasjes worden aan de lucht gedroogd, in methanol of absolute ethanol gefixeerd en met behulp van een in de handel verkrijgbare bloedkleuringskit, zoals Diff-Quik®/Hemacolor®, overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant gekleurd. Na spoelen met kraanwater en drogen worden de objectglaasjes afgedekt met een dekglaasje, met behulp van een geschikte kunsthars. De objectglaasjes worden eerst bij vergroting 200 × en vervolgens onder olie-immersie bij vergroting 1 000 × bekeken.

Indien cellen met een grootte van maximaal 30-40 µm worden waargenomen, wordt dit als positief resultaat aangemerkt. Het cytoplasma is basofiel, de kern eosinofiel. Er worden bleke aureoles rond sterk gekleurde (lichtbrekende) korrels en, in grotere cellen, cel-in-cel-configuraties waargenomen.

De techniek is niet specifiek voor afzonderlijke parasietensoorten.

I.2.2. Histologie

Coupes van weefsel, waaronder kieuwen, spijsverteringsklier, mantel en gonade worden gedurende ten minste 24 uur in Davidson-oplossing gefixeerd, en daarna op gebruikelijke wijze verder verwerkt voor paraffinehistologie en kleuring, bijvoorbeeld met hematoxyline en eosine. Er worden waarnemingen gedaan bij tot × 1 000 oplopende vergrotingen.

Indien cellen met een grootte van 4-40 µm worden waargenomen, wordt dit als positief resultaat aangemerkt. In de beginstadia worden multinucleaire, bolvormige tot langwerpige cellen waargenomen. Deze zijn voornamelijk te vinden in het epitheel van de slokdarm en de maag en soms van de labiale palp. Bij de sporulaties vindt in de kanaaltjes en gangen van de spijsverteringsklier deling van cellen binnen cellen plaats. In de loop van de sporulatie verschijnen lichtbrekende korrels, maar in de beginstadia worden deze niet waargenomen. In de late stadia van de infectie worden in het lumen van het spijsverteringskanaal vrije sporangia waargenomen. Het cytoplasma is basofiel, de kern eosinofiel. De kleur van de korrels loopt uiteen van dieporanje tot dieprood.

De techniek is niet specifiek voor afzonderlijke parasietensoorten.

I.3. Moleculaire technieken

I.3.1. DNA-extractie

DNA wordt geëxtraheerd overeenkomstig de standaardprocedures.

Er mag gebruik worden gemaakt van DNA-extractiekits, die in de handel verkrijgbaar zijn en gewoonlijk hoogwaardig DNA produceren dat geschikt is voor gebruik met de PCR-protocollen zoals omschreven in punt I.3.2.

I.3.2. Polymerasekettingreactie (PCR)

Er zijn verscheidene PCR-protocollen ontwikkeld en gepubliceerd.

Er wordt gebruikgemaakt van PCR-primers die gericht zijn op de ITS-1 regio (interne getranscribeerde spacer) aangezien deze in staat zijn alleen *M. refringens* te amplificeren.

PCR wordt uitgevoerd in een volume van 50 µl. PCR-mengsels bevatten buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 bij 25 °C] en 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP-mengsel, 1 µM forward en reverse primers, 0,02 eenheden μl^{-1} Taq DNA polymerase, en 10 tot 100 ng geëxtraheerd DNA. Na denaturatie van het DNA gedurende 5 minuten bij 94 °C, worden 30 cycli uitgevoerd volgens het volgende schema: denaturatie bij 94 °C gedurende één minute, hybridisatie bij 55 °C gedurende één minuut, en elongatie bij 72 °C gedurende één minuut per kilo-basenpaar. Dit wordt gevolgd door een afsluitende elongatiestap van 10 minuten bij 72 °C. Voor het aantonen van *M. refringens* wordt PCR uitgevoerd met primers die gericht zijn op de ITS1-regio (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ en 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Positieve controles bestaan uit genomisch DNA van een sterk besmette gastheer of uit plasmide-DNA met inbegrip van de doelregio.

Negatieve controles bestaan uit genomisch DNA van niet-besmette gastheren en PCR-reagentia zonder doel-DNA.

Positieve PCR-amplificatie bij de verwachte grootte (412 bp), waarbij alle negatieve controles negatief en alle positieve controles positief zijn, wordt als positief resultaat aangemerkt.

I.3.3. In-situhybridisatie (ISH)

Er zijn verscheidene ISH-protocollen ontwikkeld en gepubliceerd.

Er wordt een probe gebruikt die gericht is op de kleine subeenheid (small subunit, SSU) van het rRNA-gencomplex, omdat deze ten opzichte van histologie is gevalideerd.

Coupes van weefsel, waaronder kieuwen en spijsverteringsklier, worden gedurende ten minste 24 uur in Davidson-oplossing gefixeerd, en daarna op gebruikelijke wijze verder verwerkt voor paraffinehistologie. Er worden coupes van 5 µm gemaakt die op met aminoalkylsilaan gecoate objectglaasjes worden aangebracht; deze worden vervolgens een hele nacht bij 40 °C in een oven gebakken. De coupes worden van was ontdaan door ze gedurende 10 minuten in xyleen onder te dompelen. Deze stap wordt eenmaal herhaald en vervolgens wordt het oplosmiddel verwijderd door onderdompeling in twee opeenvolgende baden met absolute ethanol van 10 minuten elk. De coupes worden vervolgens gedehydreerd door onderdompeling in een ethanolreeks. De coupes worden behandeld met proteinase-K (100 µg ml^{-1}) in TE-buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), bij 37 °C gedurende 30 minuten. De preparaten worden gedehydreerd door onderdompeling in een ethanolreeks en vervolgens aan de lucht gedroogd. De coupes worden geïncubeerd met 100 µl of hybridisatiebuffer (4 × SSC [standaard zout-citraat], 50 % formamide, 1 × Denhardt-oplossing, 250 µg ml^{-1} gist-tRNA, 10 % dextraansulfaat) dat 10 ng (1 µl van de PCR-reagentia, bereid zoals beschreven in punt I.3.2 met gebruikmaking van de primers CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG en TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) van de met digoxigenin gelabelde probe bevat. De coupes worden met in-situdekglaasjes afgedekt en gedurende 5 minuten bij 95 °C op een verwarmingsblok geplaatst. De preparaten worden vervolgens gedurende één minuut met ijs gekoeld en dan een hele nacht bij 42 °C in een vochtkamer gehybridiseerd. De coupes worden tweemaal gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur in 2 × SSC gewassen, en eenmaal gedurende 10 minuten bij 42 °C in 0,4 × SSC. De detectiestappen worden overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant uitgevoerd. De objectglaasjes worden vervolgens in steriel gedestilleerd water (dH_2O) gespoeld. De coupes worden met Bismarck bruin Y tegengekleurd en gespoeld in dH_2O, waarna dekglaasjes worden aangebracht met behulp van een waterig insluitmiddel.

Positieve en negatieve controles bestaan respectievelijk uit coupes van bekende besmette en niet-besmette gastheren.

Paars-zwart gelabelde cellen van *M. refringens* in bekende doelweefsels, waarbij alle negatieve controles negatief en alle positieve controles positief zijn, worden als positief resultaat aangemerkt.

I.3.4. Sequencing

Sequencing wordt uitgevoerd als een van de laatste stappen voor bevestiging van de diagnose. De doelregio's zijn de SSU van rDNA en ITS1.

II. **Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de bewaking en de bevestiging van besmetting met *Marteilia refringens***

In het kader van bewakingsprogramma's en om de aanwezigheid van een besmetting met *Marteilia refringens* te bevestigen of een verdenking van die in de lijst opgenomen ziekte te weerleggen overeenkomstig bijlage I, deel 4, punt II, moeten de te gebruiken diagnosemethoden en overeenkomstige procedures in overeenstemming zijn met de richtsnoeren die zijn vastgesteld in de onderstaande tabel 4.1:

Tabel 4.1

Richtsnoeren voor het gebruik van diagnosemethoden voor de bewakingsprogramma's en om besmetting met *Marteilia refringens* te bevestigen of te weerleggen

Methode	Gerichte bewaking	Voorlopige diagnose	Bevestiging van de diagnose
Imprints (afdrukken) van spijsverteringsklier	X	X	X, of
Histopathologie	X		X, of
In-situhybridisatie			X, en
PCR	X	X	X, en
Sequencing			X

DEEL 5

GEDETAILLEERDE DIAGNOSEMETHODEN EN -PROCEDURES VOOR DE BEWAKING EN DE BEVESTIGING VAN BESMETTING MET *BONAMIA OSTREAE*

I. **Procedures voor de diagnose van besmetting met *Bonamia ostreae***

Bij het uitvoeren van bemonstering en laboratoriumonderzoek met het oog op het verkrijgen of behouden van een bepaalde gezondheidsstatus ten aanzien van *Bonamia ostreae* overeenkomstig bijlage I, deel 5, punt I, of om de aanwezigheid van die in de lijst opgenomen ziekte te bevestigen of te weerleggen overeenkomstig artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG aan de hand van de diagnosemethoden van bijlage I, deel 5, punt II, zijn de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van de volgende punten I.1, I.2 en I.3 van toepassing.

I.1. Bemonsteringsprocedure

Bij voorkeur worden openstaande of pas gestorven weekdieren bemonsterd, ter vergroting van de kansen op het vinden van besmette dieren.

Na bemonstering worden oesters bij een temperatuur van 4 °C of op gekoeld ijs gehouden, gedurende maximaal 24 uur indien de monsters ook openstaande weekdieren bevatten en maximaal 72 uur indien dat niet het geval is, in een plastic zak voorzien van een etiket met gegevens met betrekking tot de aard en de oorsprong van de oesters. Openstaande of pas gestorven worden gescheiden gehouden van andere weekdieren.

Voor de diagnose van *Bonamia ostreae* met behulp van histologie wordt een coupe met een dikte van 3 tot 5 mm van weefsels, waaronder kieuwen en hartweefsel, gebruikt. Voor een aantal tests, waaronder imprints (afdrukken) en polymerasekettingreactie (PCR), wordt een stukje spijsverteringsklier gebruikt.

I.2. Microscopische technieken

I.2.1. Cytologie (imprintcytologie)

Nadat kieuw- of hartweefsel op absorberend papier is gedroogd, worden enkele imprints (afdrukken) op een objectglaasje gemaakt. De objectglaasjes worden aan de lucht gedroogd, in methanol of absolute ethanol gefixeerd en met behulp van een in de handel verkrijgbare bloedkleuringskit (zoals Diff-Quik®/Hemacolor®) overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant gekleurd. Na spoelen met kraanwater en drogen worden de objectglaasjes afgedekt met een dekglaasje, met behulp van een geschikte kunsthars. De objectglaasjes worden eerst bij vergroting 200 × en vervolgens onder olie-immersie bij vergroting 1 000 × bekeken.

De aanwezigheid van kleine bol- of eivormige organismen (2 tot 5 µm breed) binnen hemocyten wordt als positief resultaat aangemerkt. De parasiet kan echter ook extracellulair voorkomen. Deze organismen hebben een basofiel cytoplasma en een eosinofiele kern (de kleur kan variëren naargelang de gebruikte vloeistof) en doordat zij zich over het glaasje uitspreiden, kunnen zij op imprints breder lijken dan bij histologisch onderzoek. Er kunnen multinucleaire cellen worden waargenomen. De techniek is niet specifiek voor afzonderlijke parasietensoorten.

I.2.2. Histologie

Coupes van weefsel, waaronder kieuwen en spijsverteringsklier, worden gedurende ten minste 24 uur in Davidson-oplossing gefixeerd, en daarna op gebruikelijke wijze verder verwerkt voor paraffinehistologie en kleuring, bijvoorbeeld met hematoxyline en eosine. Er worden waarnemingen gedaan bij tot × 1 000 oplopende vergrotingen.

De aanwezigheid van parasieten als zeer kleine cellen van 2 tot 5 µm in de hemocyten of vrij in het bindweefsel of de sinussen van epitheel van kieuw, darm en mantel, dikwijls gepaard gaande met een felle ontstekingsreactie, wordt als positief resultaat aangemerkt. Om elke twijfel te vermijden, moet de parasiet binnen de hemocyt worden waargenomen voor een positieve diagnose. De techniek is niet specifiek voor afzonderlijke parasietensoorten.

I.3. Moleculaire technieken

I.3.1. DNA-extractie

DNA wordt geëxtraheerd overeenkomstig de standaardprocedures.

Er mag gebruik worden gemaakt van DNA-extractiekits, die in de handel verkrijgbaar zijn en gewoonlijk hoogwaardig DNA produceren dat geschikt is voor gebruik met de PCR-protocollen zoals hieronder omschreven.

I.3.2. Polymerasekettingreactie (PCR)

Er zijn verscheidene PCR-protocollen ontwikkeld en gepubliceerd.

Er mag gebruik worden gemaakt van twee PCR-protocollen die zijn gericht op de kleine subeenheid (SSU) van het rDNA:

a) de eerste is een conventionele PCR die meerdere leden van de *Haplosporidia* amplificeert, waaronder *Bonamia spp*. De als Bo, respectievelijk Boas aangeduide primers zijn 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′, respectievelijk 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′, die een product van 300 bp amplificeren. PCR-mengels bevatten buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 bij 25 °C] en 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP-mengsel, 1 µM forward en reverse primer, 0,02 eenheden μl^{-1} Taq DNA-polymerase, en 0,2 ng μl^{-1} van het DNA-template in een totaal volume van 50 µl. De monsters worden gedurende 5 minuten bij 94 °C in een thermocycler gedanuteerd, waarna zij 30 cycli ondergaan (94 °C gedurende één minuut, 55 °C gedurende één minuut, 72 °C gedurende één minuut), gevolgd door een afsluitende elongatie van 10 minuten bij 72 °C.

Positieve controles bestaan uit genomisch DNA van een sterk besmette gastheer of uit plasmide-DNA met inbegrip van de doelregio.

Negatieve controles bestaan uit genomisch DNA van niet-besmette gastheren en PCR/reagentia zonder doel-DNA.

Positieve PCR-amplificatie bij de verwachte grootte (dat wil zeggen 300 bp), waarbij alle negatieve controles negatief en alle positieve controles positief zijn, wordt als positief resultaat aangemerkt;

b) het tweede PCR-protocol is een SYBR® Green-realtime-PCR-test. Met deze test is het mogelijk om *B. ostreae* specifiek aan te tonen (zoals hieronder beschreven); hij kan worden gecombineerd met een SYBR® Green-realtime-PCR-test waarmee *B. exitiosa* specifiek kan worden aangetoond (Ramilo et al. 2013).

De primers BOSTRE-F (5′-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) and BOSTRE-R (5′-TCGCGGTTGAATTT-TATCGT-3′) amplificeren een product van 208 bp. PCR-mengsels bevatten SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM forward en reverse primers, en 200 ng geëxtraheerd DNA. De monsters worden gedurende 10 minuten bij 95 °C gedenatureerd in een realtime-detectiesysteem, waarna zij 35 cycli ondergan (95 °C gedurende 30 seconden, 55 °C gedurende 45 seconden en 72 °C gedurende één minuut). Er wordt een analyse uitgevoerd van de smelttemperatuurcurve, met temperatuurstappen van 0,5 °C/s, oplopend van 55 tot 95 °C, waarbij de fluorescentie bij elke temperatuursverandering wordt geregistreerd.

Positieve controles bestaan uit genomisch DNA van een sterk besmette gastheer of uit plasmide-DNA met inbegrip van de doelregio.

Negatieve controles bestaan uit genomisch DNA van niet-besmette gastheren en PCR/reagentia zonder doel-DNA.

Positieve PCR-amplificatie met een enkelvoudige smelttemperatuurpiek (78,25 ± 0,25 °C onder de omstandigheden zoals gepubliceerd door Ramilo et al. 2013), waarbij alle negatieve controles negatief en alle positieve controles positief zijn, wordt als positief resultaat aangemerkt.

I.3.3. In-situhybridisatie (ISH)

Er zijn verscheidene ISH-protocollen ontwikkeld en gepubliceerd.

Er wordt een probe gebruikt die gericht is op de kleine subeenheid (small subunit, SSU) van het rDNA-gencomplex, hoewel is aangetoond dat deze kruisreacties met enkele andere leden van de familie *Haplosporidia* veroorzaakt.

Coupes van weefsel, waaronder kieuwen en spijsverteringsklier, worden gedurende ten minste 24 uur in Davidson-oplossing gefixeerd, en daarna op gebruikelijke wijze verder verwerkt voor paraffinehistologie. Er worden coupes van 5 µm gemaakt die op met aminoalkylsilaan gecoate objectglaasjes worden aangebracht; deze worden vervolgens een hele nacht bij 40 °C in een oven gebakken. De coupes worden van was ontdaan door ze gedurende 10 minuten in xyleen onder te dompelen. Deze stap wordt eenmaal herhaald en vervolgens wordt het oplosmiddel verwijderd door onderdompeling in twee opeenvolgende baden met absolute ethanol van 10 minuten elk. De coupes worden vervolgens gedehydreerd door onderdompeling in een ethanolreeks. De coupes worden behandeld met proteinase-K (100 µg ml^{-1}) in TE-buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), bij 37 °C gedurende 30 minuten. De preparaten worden gedehydreerd door onderdompeling in een ethanolreeks en vervolgens aan de lucht gedroogd. De coupes worden geïncubeerd met 100 µl of hybridisatiebuffer (4 × SSC [standaard zout-citraat], 50 % formamide, 1 × Denhardt-oplossing, 250 µg ml^{-1} gist-tRNA, 10 % dextraansulfaat) dat 20 ng (2 µl van de PCR-reagentia, bereid zoals beschreven in punt I.3.2 met gebruikmaking van de primers Bo en Boas) van de met digoxigenin gelabelde probe bevat. De coupes worden met in-situdekglaasjes afgedekt en gedurende 5 minuten bij 95 °C op een verwarmingsblok geplaatst. De preparaten worden vervolgens gedurende één minuut met ijs gekoeld en dan een hele nacht bij 42 °C in een vochtkamer gehybridiseerd. De coupes worden tweemaal gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur in 2 × SSC gewassen, en eenmaal gedurende 10 minuten bij 42 °C in 0,4 × SSC. De detectiestappen worden overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant uitgevoerd. De objectglaasjes worden vervolgens in steriel gedestilleerd water (dH_2O) gespoeld. De coupes worden met Bismarck bruin Y tegengekleurd en gespoeld in dH_2O, waarna dekglaasjes worden aangebracht met behulp van een waterig insluitmiddel.

Positieve en negatieve controles bestaan respectievelijk uit coupes van bekende besmette en niet-besmette gastheren.

Gelabelde parasieten binnen de hemocyten, waarbij alle negatieve controles negatief en alle positieve controles positief zijn, worden als positief resultaat aangemerkt.

I.3.4. Sequencing

Sequencing wordt uitgevoerd als een van de laatste stappen voor bevestiging van de diagnose. De doelregio's zijn de SSU van rDNA en ITS1.

II. **Procedures voor bewaking en bevestiging van besmetting met *Bonamia ostreae***

In het kader van bewakingsprogramma's en ter bevestiging van de aanwezigheid van of ter weerlegging van een verdenking van besmetting met *Bonamia ostreae* overeenkomstig bijlage I, deel 5, punt II, moeten de te gebruiken diagnosemethoden en overeenkomstige procedures in overeenstemming zijn met de richtsnoeren die zijn vastgesteld in de onderstaande tabel 5.1:

Tabel 5.1

Richtsnoeren voor het gebruik van diagnosemethoden voor de bewakingsprogramma's en om besmetting met *Bonamia ostreae* te weerleggen of te bevestigen

Methode	Gerichte bewaking	Voorlopige diagnose	Bevestiging van de diagnose
Imprints (afdrukken) van hart of kieuw	X	X	X, of
Histopathologie	X		X, of
In-situhybridisatie			X, en
PCR	X	X	X, en
Sequencing			X

DEEL 6

GEDETAILLEERDE DIAGNOSEMETHODEN EN -PROCEDURES VOOR DE BEWAKING EN DE BEVESTIGING VAN WITTEVLEKKENZIEKTE (WSD)

1. **Diagnoseprocedures voor het aantonen van WSSV**

Wanneer overeenkomstig artikel 57, onder b), van Richtlijn 2006/88/EG bemonstering en laboratoriumonderzoek wordt uitgevoerd in het kader van de bewakings- en uitroeiingsprogramma's van bijlage I, deel 6, punt I, en om de aanwezigheid van WSSV te bevestigen of een verdenking van besmetting met WSSV te weerleggen aan de hand van de in bijlage I, deel 6, punt II, bedoelde diagnosemethoden, zijn de gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures van de punten 2 tot en met 7 van dit deel van toepassing.

De in dit deel van bijlage II beschreven methoden en procedures zijn aanpassingen van de volgens ISO 17025 geaccrediteerde test die door het referentielaboratorium van de Europese Unie voor ziekten bij schaaldieren wordt toegepaste. Er mogen ook andere werkwijzen worden gehanteerd, met gebruikmaking van vergelijkbare omstandigheden of van door verschillende fabrikanten geproduceerde kits, die dan wel voor een vergelijkbare gevoeligheid en specificiteit moeten zorgen als in dit deel beschreven. In alle gevallen wordt het PCR-amplificatieproduct gesequencet om te bevestigen dat het inderdaad om het wittevlekkensyndroomvirus (WSSV) gaat.

2. **Bemonsteringsprocedure**

Weefsel (zwempoten en kieuwen) dat WSSV van schaaldieren bevat kan worden bewaard in ethanol of RNAlater, of momentaan worden ingevroren bij – 80 °C Voor het aantonen van WSSV in weefselmonsters moeten de volgende stappen worden doorlopen: homogenisering van het weefsel, DNA-extractie, specifieke amplificatie van WSSV-DNA met behulp van PCR, visualisering van het geamplificeerde product op een gel, zuivering van het DNA en sequencing om de identiteit van de ziekteverwekker te bevestigen.

3. **Homogeniseren van weefsels**

Het uiteen laten vallen van de weefsels en de bereiding van een homogenaat in een geschikte buffer wordt uitgevoerd met behulp van de FastPrep-weefseldisruptor en Lysing Matrix A-buisjes (MP Biomedicals). Het weefsel wordt gewogen, in Lysing Matrix A-buisjes overgebracht, verdund in een verhouding van 1 op 10 (w/v) of volgens de aanwijzingen van de fabrikant in een geschikte buffer (G2 en 10 µl proteïnase-K voor gebruik met de DNA Tissue kit (Qiagen)) en met de FastPrep 24-homogenisator gedurende 2 minuten gehomogeniseerd. De gehomogeniseerde monsters gedurende ten minste vier uur, of gedurende een hele nacht, bij 56 °C geïncubeerd. De monsters worden gevortext en gedurende 2 minuten bij 9 000 rpm gecentrifugeerd, waarna 50 µl van het supernatans of een volume dat overeenkomt met 5 mg weefsel (het optimale weefselgewicht voor de extractiekit) wordt toegevoegd aan een monsterbuisje voor DNA-extractie en het volume met G2-buffer wordt aangevuld tot 200 µl.

4. **DNA-extractie**

Het totale DNA wordt met behulp van een kit voor DNA-extractie uit weefsel en van de EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) geëxtraheerd overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant. Elke batch monsters gaat vergezeld van een extractiecontrole (Calf Thymus DNA) en een negatieve controle (G2-buffer). Het DNA wordt geëlueerd naar een volume van 50 µl. Om er zeker van te zijn dat de extractie succesvol is verlopen, wordt de DNA-concentratie voor alle monsters en controles bepaald met behulp van een NanoDrop-apparaat. Geëxtraheerd DNA wordt ingevroren bij – 20 °C indien het niet onmiddellijk hoeft te worden gebruikt.

5. **WSSV-polymerasekettingreactie (PCR)**

De methode die voor het aantonen van WSSV moet worden gebruikt, is het in de volgende alinea's beschreven protocol voor het aantonen van WSSV met behulp van geneste PCR, waarmee in de eerste en tweede PCR-ronde respectievelijk een amplicon van 1 447 bp en een amplicon van 848 bp van het 18s-rRNA-gen wordt geamplificeerd.

De reactie van de eerste PCR-ronde wordt op gang gebracht in een volume van 50 µl met uiteindelijke concentraties van 1 × GoTaq-buffer (Promega), 5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/µl WSSV 146 F1-primer, 1 pmol/µl WSSV 146 R1-primer (tabel 1), 0,25 mM dNTP, 1,25 U Taq-polymerase en 2,5 µl DNA. Elk monster wordt in tweevoud gebruikt en gaat vergezeld van een negatieve extractiecontrole, een negatieve PCR-controle (2,5 µl H_2O toegevoegd in plaats van DNA) en een positieve controle. Als positieve controle wordt verdunde WSSV-plasmide gebruikt, voor in-house-gebruikgemaakt en gevalideerd (verkrijgbaar bij het EURL).

De tweede ronde van de WSSV-PCR-reactie wordt op dezelfde wijze opgezet als de eerste ronde, maar met gebruikmaking van de WSSV 146 F2/R2 primerset en en tweede positieve controle om na te gaan dat deze fase van de PCR heeft gewerkt.

Primer	Sequentie
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Zowel de eerste als de tweede PCR-ronde worden overeenkomstig de onderstaande opeenvolging van cycli uitgevoerd in een DNA Engine Tetrad 2 Peltier-thermocycler (of gelijkwaardig). Een eerste denaturatiestap van 94 °C gedurende 2 minuten, gevolgd door 30 seconden bij 94 °C, 30 seconden bij 62 °C, 30 seconden bij 72 °C, gedurende 30 cycli herhaald, een elongatiestap van 72 °C gedurende 2 minuten en daarna op 4 °C houden.

6. **Gelelektroforese**

Geamplificeerde PCR-producten van zowel de eerste als de tweede PCR-ronde worden gevisualiseerd op 2 % agarosegels, gemaakt met behulp van TAE-buffer. 15 µl van elk monster wordt gedurende ongeveer 20 minuten bij 120 V behandeld en onder uv-licht bekeken. Positieve monsters produceren een band van 1 447 bp in de eerste PCR-ronde en van 848 bp in de tweede PCR-ronde. Monsters van die grootte worden uitgesneden en in een microcentrifugebuisje van 1,5 ml overgebracht. Het DNA in de gelplakken wordt gezuiverd met behulp van de Promega Wizard® SV Gel en het PCR Clean-Up System, overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant. De concentratie van het DNA wordt geraamd met behulp van een NanoDrop-apparaat. Gezuiverd DNA wordt ingevroren bij – 20 °C indien het niet onmiddellijk wordt gebruikt.

7. **Sequencen van PCR-producten**

DNA worden gesequencet met behulp van de BigDye Terminator-kit v3.1 (Applied Biosystems). Het totale volume in elke reactie is 20 µl, waarbij de uiteindelijke concentraties overeenstemmen met 1 × BigDye Terminator, 1 × sequencingbuffer, 10 pmol/µl forward of reverse primer en 10 µl gezuiverd DNA (verdund tot ongeveer 10 ng/µl) uitgevoerd; de reactie wordt uitgevoerd in een DNA Engine Tetrad 2 Peltierthermocycler (of gelijkwaardig), overeenkomstig de onderstaande opeenvolging van cycli: 94 °C gedurende 30 seconden, gevolgd door 96 °C gedurende 10 seconden. 50 °C gedurende 10 seconden en 60 °C gedurende 4 minuten, waarbij de laatste drie stappen 30 keer worden herhaald.

De PCR-producten laten neerslaan met behulp van een natriumacetaatmethode waarbij 20 µl DNA wordt toegevoegd aan 10 µl NaAc, 70 l H_2O en 250 µl ethanol; het geheel wordt gevortext en gedurende 20 minuten bij 13 000 rpm gecentrifugeerd, waarna het supernatans wordt verwijderd en de neerslag met 200 µl absolute ethanol wordt gewassen, waarbij gedurende 5 minuten bij 13 000 rpm wordt gecentrifugeerd. De neerslag wordt gedurende 5 minuten bij 37 °C gedroogd. Aan de neerslag wordt 25 µl of Hi-Di-formamide toegevoegd, waarna het geheel gedurende 2 minuten tot 95 °C wordt verhit en uitvoerig wordt gevortext. De monsters worden gesequencet met de ABI3130xl Avant Genetic-analyser overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant. De resultaten van de sequencing worden geanalyseerd met behulp van Sequencher-software en de sequenties worden met behulp van de BLAST-zoekfunctie vergeleken met sequenties in de NCBI-databank.