II

(Acte fără caracter legislativ)

DECIZII

DECIZIA DE PUNERE ÎN APLICARE (UE) 2015/1554 A COMISIEI

din 11 septembrie 2015

de stabilire a unor norme pentru aplicarea Directivei 2006/88/CE în ceea ce privește cerințele referitoare la supraveghere și la metodele de diagnostic

[notificată cu numărul C(2015) 6188]

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Directiva 2006/88/CE a Consiliului din 24 octombrie 2006 privind cerințele de sănătate animală pentru animale și produse de acvacultură și privind prevenirea și controlul anumitor boli la animalele de acvacultură ([1]), în special articolul 49 alineatul (3), articolul 50 alineatul (4), articolul 57 litera (b) și articolul 61 alineatul (3),

întrucât:

(1) Directiva 2006/88/CE stabilește măsuri preventive minime pentru supravegherea și depistarea precoce la animalele acvatice a bolilor listate menționate în anexa IV la respectiva directivă („bolile listate") și măsurile de control care trebuie aplicate în caz de suspiciune sau de focar epidemic al bolilor listate. Ea conține, de asemenea, cerințele pentru obținerea statutului de indemn de boală pentru statele membre sau pentru zone sau compartimente ale acestuia.

(2) Eradicarea bolilor listate și obținerea statutului de indemn de boală pentru un stat membru, o zonă sau un compartiment ar trebui să fie bazate pe aceleași principii și să urmeze aceeași abordare științifică în întreaga Uniune. Din acest motiv, este necesar să se stabilească la nivelul Uniunii cerințe specifice pentru programele de eradicare și de supraveghere, precum și pentru metodele de eșantionare și de diagnostic care să fie utilizate de statele membre pentru a obține statutul de indemn de boală pentru întregul teritoriu al unui stat membru sau pentru o zonă sau un compartiment al acestuia.

(3) Examenele de laborator care trebuie să fie efectuate în caz de suspiciune sau de confirmare a prezenței bolilor listate ar trebui să fie aceleași la nivelul Uniunii și ar trebui să respecte aceleași standarde și protocoale științifice. În conformitate cu Directiva 2006/88/CE, este necesar să se stabilească metode și proceduri de diagnostic specific care să fie utilizate de laboratoarele desemnate în acest scop de autoritatea competentă din statele membre.

(4) Codul sanitar pentru animale acvatice adoptat de către Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (OIE) (denumit în continuare „codul acvatic") stabilește standarde pentru ameliorarea stării de sănătate a animalelor acvatice și buna stare a peștilor de piscicultură în întreaga lume, inclusiv standarde pentru un comerț internațional sigur cu animale acvatice și produse derivate din acestea. Câteva capitole din codul acvatic conțin recomandări privind utilizarea anumitor teste de diagnostic. Astfel de teste prevăzute de OIE sunt prezentate în Manualul OIE de teste de diagnostic pentru animalele acvatice („manualul acvatic"). Pentru a se asigura că cerințele Uniunii în ceea ce privește diagnosticarea bolilor animalelor acvatice sunt în concordanță cu standardele internaționale, normele stabilite în prezenta decizie ar trebui să țină cont de standardele și de recomandările din codul acvatic.

([1]) JO L 328, 24.11.2006, p. 14.

(5) În acest sens, pentru multe dintre bolile listate, manualul acvatic conține mai multe teste și proceduri de utilizat în scopul efectuării examenelor de laborator. Pentru a uniformiza baza științifică a activității de diagnostic a bolilor listate la nivelul Uniunii, este necesar să se aleagă dintre testele și procedurile de diagnostic recomandate de OIE și să se precizeze care teste ar trebui să fie obligatorii pentru efectuarea examenelor de laborator în cadrul desfășurării programelor de supraveghere și pentru a exclude sau a confirma prezența bolilor listate. Deși va exista și necesitatea de a dispune, în anumite cazuri, de metode și proceduri alternative, ar trebui să fie furnizate descrieri și unele explicații științifice cu privire la momentul și la modul în care metodele alternative ar putea fi aplicate. Acestea sunt în mod deosebit necesare pentru procedurile de diagnostic mai detaliate.

(6) Pentru a stabili diagnostice precise și reproductibile, este important ca procedurile și protocoalele detaliate care trebuie utilizate să fie validate în conformitate cu standardele relevante privind calitatea menționate în partea I din anexa VI la Directiva 2006/88/CE. Pentru multe dintre metodele de diagnostic menționate în prezenta decizie, utilizarea seturilor comerciale de testare este o parte necesară a protocoalelor de diagnostic, iar respectivele seturi de testare au fost validate în cadrul unor teste acreditate de laboratoarele de referință ale UE (EURL) pentru respectivele boli. În interesul securității juridice, denumirile comerciale ale respectivelor truse de testare comerciale validate ar trebui să fie menționate în prezenta decizie.

(7) Ar putea fi dificil pentru anumite state membre să obțină statutul de indemn de boală pentru întregul lor teritoriu sau pentru o zonă sau un compartiment al acestora în ceea ce privește una sau mai multe dintre bolile listate. În astfel de situații, este posibil ca statul membru să dorească să nu obțină sau să nu redobândească statutul de indemn de boală pentru respectivele boli listate. Măsurile minime de control care trebuie aplicate în cazurile în care statul membru în cauză nu dorește să obțină sau să redobândească statutul de indemn de boală ar trebui să fie aceleași la nivelul Uniunii și ar trebui să respecte aceleași criterii. Prin urmare este necesar, în conformitate cu Directiva 2006/88/CE, să se stabilească norme detaliate pentru limitarea răspândirii respectivelor boli listate și cerințe minime pentru înlăturarea respectivelor măsuri de limitare a răspândirii.

(8) Decizia 2001/183/CE a Comisiei ([1]) stabilește cerințele privind planurile de eșantionare și metodele de diagnostic pentru depistarea și confirmarea bolilor listate necroza hematopoietică infecțioasă și septicemia hemoragică virală. Decizia 2003/466/CE a Comisiei ([2]) stabilește cerințe privind planurile de eșantionare și metodele de diagnostic pentru depistarea anemiei infecțioase a somonului, precum și criterii de zonare și de supraveghere oficială în urma suspicionării și a confirmărilor prezenței respectivei boli. Decizia 2002/878/CE a Comisiei ([3]) stabilește cerințele privind planurile de eșantionare și metodele de diagnostic pentru depistarea și confirmarea bolilor moluștelor bonamioza și marteilioza. Pentru a actualiza cerințele, cele trei decizii ar trebui să fie înlocuite cu prezenta decizie. Prin urmare, Decizia 2001/183/CE, Decizia 2002/878/CE și Decizia 2003/466/CE ar trebui să fie abrogate.

(9) Deoarece anumite state membre au nevoie de timp pentru a-și actualiza laboratoarele naționale de referință în scopul respectării cerințelor prevăzute în prezenta decizie, aceasta ar trebui să se aplice de la 1 aprilie 2016.

(10) Măsurile prevăzute în prezenta decizie sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru plante, animale, produse alimentare și hrană pentru animale,

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

Articolul 1

Obiect

Prezenta decizie stabilește norme privind următoarele:

(a) supravegherea epidemiologică, zonele-tampon, metodele de eșantionare și de diagnostic care trebuie utilizate de statele membre în relație cu statutul statelor membre sau al zonelor sau al compartimentelor din punctul de vedere al prezenței sau absenței bolilor animalelor acvatice neexotice menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE („bolile listate”);

([1]) Decizia 2001/183/CE a Comisiei din 22 februarie 2001 de stabilire a planurilor de prelevare de probe și a metodelor de diagnostic pentru depistarea și confirmarea unor boli ale peștilor și de abrogare a Deciziei 92/532/CEE (JO L 67, 9.3.2001, p. 65).

([2]) Decizia 2003/466/CE a Comisiei din 13 iunie 2003 de stabilire a criteriilor de zonare și a măsurilor de monitorizare oficială care trebuie să fie adoptate ca urmare a suspectării sau confirmării prezenței anemiei infecțioase a somonului (AIS) (JO L 156, 25.6.2003, p. 61).

([3]) Decizia 2002/878/CE a Comisiei din 6 noiembrie 2002 de stabilire a planurilor de prelevare a probelor și a metodelor de diagnosticare pentru depistarea și confirmarea prezenței celor două boli ale moluștelor, respectiv bonamioza (*Bonamia ostreae*) și marteilioza (*Marteilia refringens*) (JO L 305, 7.11.2002, p. 57).

(b) metodele de diagnostic care trebuie utilizate pentru examenele de laborator în caz de suspiciune sau de confirmare a prezenței unor boli listate; și

(c) măsurile de control minime care trebuie aplicate în caz de suspiciune sau de confirmare a unei boli listate într-un stat membru, o zonă sau un compartiment care nu sunt declarate indemne de boala listată respectivă.

Articolul 2

Definiții

În sensul prezentei decizii, se aplică următoarele definiții:

(a) „septicemia hemoragică virală" („SHV") înseamnă o boală cauzată de virusul septicemiei hemoragice virale (VSHV), cunoscut și sub denumirea de virusul Egtved, un virus aparținând genului *Novirhabdovirus* din familia *Rhabdoviridae*;

(b) „necroza hematopoietică infecțioasă" („NHI") înseamnă o boală cauzată de virusul necrozei hematopoietice infecțioase (VNHI), virus care aparține genului *Novirhabdovirus*, din familia *Rhabdoviridae*;

(c) „boala herpetică a crapului koi" (*koi herpesvirus disease* – „KHVD") înseamnă o boală cauzată de virusul herpetic al crapului koi (*koi herpesvirus* – KHV), care aparține familiei *Alloherpesviridae*. Denumirea științifică este herpesvirusul 3 al ciprinidelor (*cyprinid herpesvirus 3* – CyHV-3);

(d) „anemia infecțioasă a somonului" („AIS") înseamnă o boală cauzată de virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare (VAIS), virus care aparține genului *Isavirus*, din familia *Orthomyxoviridae*;

(e) „infecția cu *Marteilia refringens*" înseamnă o boală cauzată de protozoarul *Marteilia refringens*;

(f) „infecția cu *Bonamia ostreae*" înseamnă o boală cauzată de protozoarul *Bonamia ostreae*;

(g) „boala petelor albe" (*white spot disease* – „WSD") înseamnă o boală cauzată de virusul sindromului petelor albe (*white spot syndrome virus* – WSSV), care este un virus ADN dublu catenar aparținând genului *Whispovirus* din familia *Nimaviridae*.

Articolul 3

Cerințe minime pentru programele de eradicare și de supraveghere

Statele membre se asigură că normele privind programele de supraveghere și de eradicare, zonele-tampon, metodele de eșantionare și de diagnostic prezentate în anexa I, precum și metodele specifice și procedurile detaliate prezentate în anexa II sunt respectate atunci când statutul „indemn de boală" trebuie să fie acordat, retras sau restabilit pentru un stat membru sau o zonă sau un compartiment al acestuia, pentru una sau mai multe dintre bolile listate.

Articolul 4

Cerințe minime pentru metodele de diagnostic și procedurile specifice

Statele membre se asigură că metodele de control prezentate în anexa I, precum și metodele de diagnostic specific și procedurile detaliate prezentate în anexa II sunt respectate în cursul efectuării examenelor de laborator pentru a confirma sau a exclude prezența unei boli listate.

Articolul 5

Măsuri minime de control pentru limitarea răspândirii bolilor listate și cerințe minime pentru înlăturarea măsurilor de limitare a răspândirii bolilor în statele membre, zonele sau compartimentele care nu sunt declarate ca fiind indemne de bolile listate

Statele membre se asigură că măsurile minime de control și cerințele minime pentru înlăturarea măsurilor de limitare a răspândirii bolilor, prezentate în anexa I, sunt respectate atunci când se aplică măsuri de control și când se înlătură măsurile de limitare a răspândirii uneia sau mai multora dintre bolile listate, într-un stat membru sau într-o zonă sau un compartiment al acestuia, care nu sunt declarate ca fiind indemne de respectivele boli listate.

Articolul 6

Abrogări

Deciziile 2001/183/CE, 2002/878/CE și 2003/466/CE se abrogă.

Articolul 7

Data aplicării

Prezenta decizie se aplică de la 1 aprilie 2016.

Articolul 8

Destinatari

Prezenta decizie se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 11 septembrie 2015.

Pentru Comisie
Vytenis ANDRIUKAITIS
Membru al Comisiei

ANEXA I

METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE CONTROL

I. **Introducere**

Prezenta anexă stabilește:

(a) cerințele pentru programele de eradicare și de supraveghere, astfel cum sunt prevăzute la articolul 44 din Directiva 2006/88/CE, precum și metodele de eșantionare și de diagnostic care trebuie utilizate pentru a declara statele membre, zonele sau compartimentele acestora „indemne de boală", astfel cum sunt prevăzute în capitolul VII din respectiva directivă;

(b) metodele de eșantionare și de diagnostic care trebuie folosite la examenele de laborator în caz de suspiciune privind o boală neexotică enumerată în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE („boli listate") și pentru a confirma prezența acestei boli, prevăzute la articolul 28 litera (a) și la articolul 57 litera (b) din directiva respectivă;

(c) măsurile de prevenire a răspândirii care trebuie luate în cazul confirmării prezenței unei boli listate, prevăzute la articolul 39 din Directiva 2006/88/CE, precum și măsurile care trebuie luate pentru a obține statutul sanitar de categoria III pentru un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V.

Cerințele stabilite în prezenta anexă se referă la următoarele boli listate:

1.	septicemia hemoragică virală (SHV)	Partea 1
2.	necroza hematopoietică infecțioasă (NHI)	Partea 1
3.	boala herpetică a crapului koi (*Koi herpesvirus disease* – KHVD)	Partea 2
4.	anemia infecțioasă a somonului (AIS)	Partea 3
5.	infecția cu *Marteilia refringens*	Partea 4
6.	infecția cu *Bonamia ostreae*	Partea 5
7.	boala petelor albe (*white spot disease* – WSD)	Partea 6

II. **Definiții**

În sensul anexelor I și II, se aplică următoarele definiții:

(a) „compartiment continental" înseamnă una sau mai multe ferme situate în partea continentală a unuia sau a mai multor state membre, care se află sub un sistem comun de biosecuritate și în care există o populație de animale acvatice cu o stare de sănătate distinctă în raport cu o anumită boală;

(b) „fermă continentală" înseamnă o fermă în care sunt ținute animale de acvacultură, situată în partea continentală a teritoriului unui stat membru;

(c) „zonă continentală" înseamnă o arie geografică delimitată, situată în partea continentală a unui stat membru sau a mai multor state membre, caracterizată printr-un sistem hidrografic omogen care cuprinde părți dintr-un bazin hidrografic (de la izvor sau izvoare până la o barieră naturală sau artificială care împiedică migrarea în amonte a animalelor acvatice din aval), un bazin hidrografic întreg (de la izvor sau izvoare până la estuar) sau mai multe bazine hidrografice, inclusiv estuarele corespunzătoare, dată fiind legătura epidemiologică dintre bazinele hidrografice prin estuar;

(d) „fermă declarată în mod oficial ca fiind infectată" înseamnă o fermă în care sunt ținute animale acvatice și în care a fost confirmată (au fost confirmate), de către autoritatea competentă, una sau mai multe dintre bolile listate, în conformitate cu articolul 28 litera (a), articolul 29 și articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE.

(e) „fermă cu care se intră în contact" înseamnă o fermă în care sunt ținute animale acvatice, pentru care s-a demonstrat, în orice fel, că a fost contaminată cu material infecțios provenind de la o fermă declarată în mod oficial ca fiind infectată, sau pentru care există suspiciuni puternice referitoare la o astfel de contaminare.

PARTEA 1

METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE CONTROL ÎN CEEA CE PRIVEȘTE SEPTICEMIA HEMORAGICĂ VIRALĂ (SHV) ȘI NECROZA HEMATOPOIETICĂ INFECȚIOASĂ (NHI)

I. **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare a SHV și a NHI în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală" și cerințe referitoare la măsurile de prevenire a răspândirii respectivelor boli listate**

I.1. Cerințe generale privind inspecțiile sanitare și eșantionarea pentru SHV și NHI:

(a) inspecțiile sanitare și, dacă este cazul, eșantionarea se efectuează în perioada din an în care temperatura apei este mai mică de 14 °C sau atunci când este probabil ca temperatura apei să atingă valorile minime anuale;

(b) în cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice în conformitate cu partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la Directiva 2006/88/CE, numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a statului membru, a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare trebuie să fie reprezentative pentru diferitele ecosisteme în care se găsesc populații sălbatice aparținând speciilor sensibile;

(c) atunci când fermele sau populațiile sălbatice trebuie să facă obiectul inspecțiilor sanitare sau al eșantionării mai des decât o dată pe an, intervalul dintre inspecțiile sanitare și dintre fiecare colectare a eșantioanelor trebuie să fie de cel puțin patru luni și trebuie să fie cât mai lung posibil, ținând seama de cerințele privind temperatura prevăzute la litera (a);

(d) toate unitățile de producție, cum ar fi iazurile, bazinele, și cuștile din plasă, trebuie să fie supuse inspecțiilor sanitare în vederea stabilirii prezenței peștilor morți, debilitați sau cu comportament anormal. Trebuie să se acorde o atenție deosebită punctelor de evacuare a apei, unde peștii debilitați au tendința de a se acumula din cauza curentului;

(e) peștii din speciile sensibile care urmează să fie incluși în eșantioane sunt selecționați după cum urmează:

(i) dacă sunt prezenți păstrăvi-curcubeu, sunt selecționați pentru eșantionare numai peștii din această specie, cu excepția cazului în care sunt prezente alte specii sensibile care prezintă semnele tipice de SHV sau de NHI; dacă păstrăvii-curcubeu nu sunt prezenți, eșantionul trebuie să fie reprezentativ pentru toate celelalte specii sensibile care sunt prezente;

(ii) dacă sunt prezenți pești debilitați, cu comportament anormal sau care au murit recent, dar care nu sunt descompuși, acești pești trebuie să fie selecționați; dacă se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de pește, trebuie incluși în eșantion pești care reprezintă toate sursele de apă;

(iii) peștii selectați trebuie să includă pești colectați în așa fel încât toate părțile fermei și toate clasele de vârstă grupate pe ani să fie reprezentate proporțional în eșantion.

I.2. Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar „indemn de boală" (categoria I) în ceea ce privește SHV și NHI

I.2.1. Programe de supraveghere:

(a) un stat membru, o zonă sau un compartiment cu un statut sanitar de categoria III în conformitate cu partea B din anexa III la Directiva 2006/88/CE în ceea ce privește SHV sau NHI sau ambele boli poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește aceste boli listate, cu condiția ca toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la respectiva directivă din statul membru, zona sau compartimentul în cauză să respecte cerințele stabilite în anexa V la directiva menționată și ca toate aceste ferme și, atunci când acest lucru este prevăzut în partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V, punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatice selecționate în conformitate cu partea respectivă să fi fost supuse unuia dintre următoarele programe de supraveghere:

(i) modelul A – program de supraveghere cu durata de doi ani:

Fermele sau punctele de prelevare trebuie să fi făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 1.A. din secțiunea II.

În această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. trebuie să fi avut rezultate negative în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele, și trebuie să fi fost exclusă orice suspiciune privind fie SHV, fie NHI, fie ambele, în conformitate cu metodele de eșantionare și de diagnostic care figurează la punctul II.3;

(ii) modelul B – program de supraveghere cu durata de patru ani, cu eșantion de dimensiuni reduse:

Fermele sau punctele de prelevare trebuie să fi făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de patru ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 1.B. din secțiunea II.

În această perioadă de patru ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. trebuie să fi avut rezultate negative în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele, și trebuie să fi fost exclusă orice suspiciune privind fie SHV, fie NHI, fie ambele, în conformitate cu metodele de eșantionare și de diagnostic care figurează la punctul II.3;

(b) dacă, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere menționat la litera (a), este confirmată o infecție fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele într-o fermă inclusă în programul de supraveghere respectiv și, prin urmare, a fost retras statutul sanitar de categoria II al fermei, ferma respectivă poate să își recâștige imediat statutul sanitar de categoria II și să continue punerea în aplicare a programului de supraveghere pentru a obține statutul „indemn de boală" fără să pună în aplicare un program de eradicare, astfel cum este prevăzut la punctul I.2.2., cu condiția ca ferma să îndeplinească următoarele condiții:

(i) să fie o fermă continentală al cărei statut sanitar în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele este independent de starea de sănătate a populațiilor de animale acvatice din apele naturale din vecinătate în ceea ce privește aceste boli listate, în conformitate cu partea II punctul 3 din anexa V la Directiva 2006/88/CE;

(ii) să fie golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni;

(iii) a fost repopulată cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele.

I.2.2. Programe de eradicare

I.2.2.1. Cerințe generale

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește aceste boli listate, cu condiția ca toate fermele care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE în statul membru, zona sau compartimentul în cauză să fi făcut obiectul unui program de eradicare în conformitate cu prevederile de la literele (a)-(e):

(a) măsurile minime de control stabilite în capitolul V secțiunea 4 din Directiva 2006/88/CE trebuie să fi fost aplicate în mod efectiv și o zonă de izolare, astfel cum se menționează la articolul 32 litera (b) din directiva respectivă, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, trebuie să fi fost instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial ca fiind infectată (infectate) fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele boli listate menționate.

Zona de izolare trebuie să fi fost definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a bolii listate la peștii de crescătorie și la cei sălbatici, cum ar fi: numărul, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a peștilor în cadrul fermei infectate cu fie SHV, fie cu NHI, fie cu ambele; distanța la care se găsesc fermele învecinate și densitatea acestora; apropierea de abatoare; fermele cu care se intră în contact; speciile prezente la ferme; practicile de acvacultură aplicate în fermele afectate și în fermele învecinate acestora; condițiile hidrodinamice și alți factori pertinenți din punct de vedere epidemiologic care au fost identificați.

Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime în ceea ce privește delimitarea geografică a acestor perimetre:

(i) trebuie să fie stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele boli listate menționate, și acest perimetru trebuie să corespundă:

1. în zonele de coastă: unei zone înscrise într-un cerc cu raza cel puțin egală cu o deplasare a mareei sau de cel puțin 5 km, reținându-se valoarea cea mai mare dintre cele două, având ca centru ferma declarată în mod oficial ca fiind infectată fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele, sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare;

2. în zonele interioare: întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele; autoritatea competentă poate limita extinderea perimetrului la anumite părți ale bazinului hidrografic sau ale suprafeței fermei, cu condiția să nu se compromită prevenirea răspândirii fie a SHV, fie a NHI, fie a ambelor;

(ii) autoritatea competentă stabilește un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă:

1. în zonele de coastă: unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, a cărei zonă de deplasare a mareei se suprapune cu zona de deplasare a mareei corespunzătoare perimetrului de protecție; sau unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, înscrisă într-un cerc cu raza de 10 km, calculată din centrul perimetrului de protecție; sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare;

2. în zonele interioare: unei zone situate în exteriorul perimetrului de protecție stabilit;

(b) toate fermele în care sunt ținute specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial ca fiind infectate fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele, trebuie să facă obiectul unei anchete oficiale care include cel puțin următoarele elemente:

(i) prelevarea de eșantioane pentru testarea a 10 pești, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu SHV, cu NHI, sau cu ambele, sau pentru testarea a cel puțin 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*;

(ii) o inspecție sanitară: în fermele în care testele menționate la subpunctul (i) au avut rezultate negative; inspecțiile sanitare continuă o dată pe lună pe parcursul perioadei în care temperatura apei este mai mică de 14 °C, cu excepția cazului în care iazurile sau cuștile din plasă sunt acoperite cu gheață, până când se renunță la perimetrul de protecție în conformitate cu punctul I.2.2.1. litera (c);

(c) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele trebuie să fie golite, curățate, dezinfectate și supuse unei perioade de vid sanitar. Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni. După golirea tuturor fermelor declarate în mod oficial ca fiind infectate care se găsesc în același perimetru de protecție, trebuie să se respecte o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin trei săptămâni. Prezentul paragraf se aplică, de asemenea, noilor ferme declarate în mod oficial ca fiind infectate în timpul punerii în aplicare a programului de eradicare.

Atunci când intervine o perioadă de vid sanitar pentru fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate, perimetrele de protecție sunt transformate în perimetre de supraveghere.

Autoritatea competentă poate decide să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme care se află în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. În cazul acestor ferme, durata perioadei de vid sanitar este stabilită de autoritatea competentă pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz;

(d) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele boli listate și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, conform prevederilor de la litera (c), trebuie să fie repopulate cu pești care provin din state membre, din zone sau din compartimente cu statutul sanitar „indemn de boală” (categoria I) în ceea ce privește SHV sau NHI sau ambele.

Repopularea trebuie să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul I.2.2.1 litera (c);

(e) toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare selectate în conformitate cu punctul I.1, fac apoi obiectul programului de supraveghere prevăzut la punctul I.2.1.

I.2.2.2. Cerințe privind restabilirea statutului „indemn de boală" pentru compartimentele continentale care cuprind o singură fermă, declarate anterior ca fiind indemne fie de SHV, fie de NHI, fie de ambele

Un compartiment continental care cuprinde o singură fermă, care a fost declarat anterior indemn fie de SHV, fie de NHI, fie de ambele boli listate menționate, al cărui statut sanitar în ceea ce privește aceste boli listate este independent de cel al apelor naturale din vecinătate în conformitate cu partea II punctul 3 din anexa V la Directiva 2006/88/CE și al cărui statut sanitar de categoria I a fost retras în conformitate cu articolul 53 alineatul (3) din directiva respectivă, poate redobândi statutul sanitar de categoria I imediat ce autoritatea competentă a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

(a) ferma pentru care s-a confirmat în mod oficial infectarea fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele a fost golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar trebuie să fie de cel puțin șase săptămâni;

(b) ferma pentru care s-a confirmat în mod oficial infectarea fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele a fost repopulată cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele.

I.3. Cerințe specifice pentru menținerea statutului sanitar „indemn de boală" (categoria I) în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele

În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, astfel cum se prevede la articolul 52 din Directiva 2006/88/CE, toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la respectiva directivă din statul membru, zona sau compartimentul în cauză sunt supuse inspecției sanitare, iar peștii fac obiectul eșantionării, în conformitate cu tabelul 1.C prevăzut în secțiunea II din prezenta parte, ținând seama de nivelul riscului de contaminare a fermei fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele boli listate menționate.

La determinarea frecvenței inspecțiilor sanitare pentru compartimentele care au statut sanitar de categoria I în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele, care se găsesc în regiuni continentale și al căror statut sanitar în ceea ce privește SHV sau NHI depinde de starea de sănătate a populațiilor de animale acvatice din apele naturale din vecinătate în conformitate cu punctul 2 din partea II a anexei V la Directiva 2006/88/CE, riscul de contaminare fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele trebuie să fie considerat ridicat.

Statutul „indemn de boală" se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.2. au rezultate negative fie pentru SHV, fie pentru NHI, fie pentru ambele boli listate menționate și atât timp cât a fost exclusă orice suspiciune privind fie SHV, fie NHI, fie ambele, în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.3.

I.4. Cerințe privind eliminarea măsurilor de prevenire a răspândirii bolilor prevăzute la articolul 39 din Directiva 2006/88/CE, și anume trecerea de la statutul sanitar de categoria V la statutul sanitar de categoria III

Un stat membru, o zonă sau un compartiment care are statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele poate obține statutul sanitar de categoria III în ceea ce privește aceste boli listate, cu condiția ca:

(a) cerințele prevăzute la punctul I.2.2.1 literele (a), (b) și (c) să fi fost îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză trebuie să facă obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea fie a virusului VNHI, fie a virusului VSHV, fie a ambelor virusuri din mediul fermei;

(b) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, să fi fost repopulate cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele;

(c) repopularea să fi avut loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a).

II. **Metode de diagnostic și de eșantionare**

II.1. Organe care urmează a fi prelevate:

Țesuturile care trebuie examinate sunt splina, rinichiul anterior și fie inima, fie encefalul. În cazul în care prelevarea se face de la genitori, poate fi de asemenea examinat lichidul ovarian sau seminal.

În cazul alevinilor, peștii întregi având sub 4 cm lungime pot fi fragmentați cu ajutorul unui foarfece steril sau al unui scalpel după eliminarea părții corpului care se găsește în spatele orificiului anal. În cazul în care un eșantion este constituit din pești întregi cu lungimea cuprinsă între 4 cm și 6 cm, se vor colecta viscerele, inclusiv rinichii.

Este posibilă comasarea fragmentelor de organe care provin de la cel mult 10 pești.

II.2. Metodele de diagnostic pentru obținerea și menținerea statutului „indemn de boală" fie pentru SHV, fie pentru NHI, fie pentru ambele

Metoda de diagnostic, conformă cu metodele și cu procedurile de diagnostic aprobate prevăzute în partea 1 punctul I din anexa II, pentru obținerea sau menținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește SHV sau NHI sau ambele trebuie să fie una din următoarele metode:

(a) izolarea virusului în culturi celulare, urmată de identificare prin utilizarea testului de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), testul de imunofluorescență indirectă (IFAT), testul de neutralizare a virusului sau testul RT-PCR în timp real (*real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction* – RT-qPCR); sau

(b) RT-qPCR.

II.3. Metode de eșantionare și de diagnostic pentru excluderea sau confirmarea prezenței SHV sau a NHI

În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă suspiciunea privind fie SHV, fie NHI, fie ambele, în conformitate cu articolul 28 din Directiva 2006/88/CE, trebuie respectate următoarele proceduri în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

(a) ferma în legătură cu care există suspiciuni trebuie să facă obiectul cel puțin al unei inspecții sanitare și al unei prelevări de eșantioane de la 10 pești, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu SHV, cu NHI, sau cu ambele, sau de la cel puțin 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*. Eșantioanele se testează folosind una sau mai multe dintre metodele de diagnostic stabilite la subpunctele (i) și (ii) în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în partea 1 secțiunea II din anexa II:

  (i) izolarea convențională a virusului în cultură celulară, urmată de identificarea virusului prin metodă imunochimică sau moleculară;

  (ii) detectarea virusului prin RT-qPCR;

  (iii) alte tehnici de diagnostic cu eficacitate similară dovedită, cum ar fi testul de imunofluorescență indirectă (IFAT), testul de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), RT-PCR și imunohistochimia (IHC).

(b) Prezența SHV se consideră ca fiind confirmată dacă una sau mai multe dintre aceste metode de diagnostic au avut rezultate pozitive pentru virusul SHV (VSHV). Prezența NHI se consideră ca fiind confirmată dacă una sau mai multe dintre aceste metode de diagnostic au avut rezultate pozitive pentru virusul NHI (VNHI). Confirmarea primului caz de SHV sau NHI în state membre, în zone sau în compartimente care nu au fost infectate anterior trebuie să se bazeze pe izolarea convențională a virusului în cultură celulară sau pe testul RT-qPCR;

(c) poate fi exclusă suspiciunea privind SHV, NHI sau ambele, în cazul în care rezultatele culturilor celulare sau ale testului RT-qPCR nu furnizează nicio altă dovadă referitoare la prezența SHV, a NHI sau a ambelor.

Tabelul 1.A

Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul perioadei de control de doi ani menționate la punctul I.2.1 litera (a) subpunctul (i) care precede obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește SHV sau NHI

Tipul de fermă	Numărul de inspecții sanitare pe an (doi ani)	Numărul de prelevări pe an (doi ani)	Numărul de pești per eșantion [1]	
			Numărul de pești în dezvoltare	Numărul de genitori [2]
(a) Ferme care dețin genitori	2	2	50 (prima inspecție) 75 (a doua inspecție)	30 (prima sau a doua inspecție) 0 (prima sau a doua inspecție)
(b) Ferme care dețin numai genitori	2	1	0	75 (prima sau a doua inspecție)
(c) Ferme care nu dețin genitori	2	2	75 [3] (prima și a doua inspecție)	0

Numărul maxim de pești per eșantion global: 10

[1] Eșantioanele trebuie să fie prelevate cel mai devreme la trei săptămâni după transferul peștilor din apă dulce în apă sărată.
[2] Lichidul ovarian sau seminal de la genitori trebuie să fie colectat în timpul maturării, cu ocazia pontei artificiale (*stripping*).
[3] Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de pești care să garanteze detectarea VSHV sau a VNHI cu un nivel de încredere de 95 % dacă prevalența estimată este de 5 %.

Tabelul 1.B

Programul de supraveghere, cu eșantion de dimensiuni reduse, pe parcursul perioadei de control de patru ani menționate la punctul I.2.1 litera (a) subpunctul (ii) care precede obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește SHV sau NHI

Tipul de fermă	Numărul de inspecții sanitare pe an	Numărul de prelevări pe an	Numărul de pești per eșantion [1]	
			Numărul de pești în dezvoltare	Numărul de genitori [2]
Primii doi ani ai perioadei de supraveghere				
(a) Ferme care dețin genitori	2	1	0 (prima inspecție) 30 (a doua inspecție)	0 (prima inspecție) 0 (a doua inspecție)
(b) Ferme care dețin numai genitori	2	1	0	30 (prima sau a doua inspecție)
(c) Ferme care nu dețin genitori	2	1	30 [3] (prima sau a doua inspecție)	0
Ultimii doi ani ai perioadei de supraveghere				
(a) Ferme care dețin genitori	2	2	30 (prima inspecție) 0 (a doua inspecție)	0 (prima inspecție) 30 (a doua inspecție)

Tipul de fermă	Numărul de inspecții sanitare pe an	Numărul de prelevări pe an	Numărul de pești per eșantion (1)	
			Numărul de pești în dezvoltare	Numărul de genitori (2)
(b) Ferme care dețin numai genitori	2	2		30 (prima și a doua inspecție)
(c) Ferme care nu dețin genitori	2	2	30 (3) (prima și a doua inspecție)	

Numărul maxim de pești per eșantion global: 10

(1) Eșantioanele trebuie să fie prelevate cel mai devreme la trei săptămâni după transferul peștilor din apă dulce în apă sărată.
(2) Lichidul ovarian sau seminal de la genitori trebuie să fie colectat în timpul maturării, cu ocazia pontei artificiale (*stripping*).
(3) Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de pești care să garanteze detectarea VSHV sau a VNHI cu un nivel de încredere de 95 % dacă prevalența estimată este de 10 %.

Tabelul 1.C

Programe de supraveghere a zonelor sau a compartimentelor în vederea menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește SHV sau NHI, astfel cum se menționează la punctul I.3

Nivelul de risc	Numărul de inspecții sanitare	Numărul de pești per eșantion (3)
Ridicat	2 pe an	30 (1) (2)
Mediu	1 pe an	30 (1)
Scăzut	1 la 2 ani	30 (1)

Numărul maxim de pești per eșantion global: 10

(1) Eșantioanele trebuie să fie prelevate cel mai devreme la trei săptămâni după transferul peștilor din apă dulce în apă sărată.
(2) Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de pești care să garanteze detectarea VSHV sau a VNHI cu un nivel de încredere de 95 % dacă prevalența estimată este de 10 %.
(3) Pentru fiecare inspecție sanitară trebuie să fie prelevat cel puțin un eșantion.

PARTEA 2

METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE CONTROL ÎN CEEA CE PRIVEȘTE BOALA HERPETICĂ A CRAPULUI KOI (*KOI HERPESVIRUS DISEASE* – KHVD)

I. **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală" în ceea ce privește KHVD, precum și a prevenirii răspândirii infecției cu virusul herpetic al crapului koi (KHV)**

I.1. Cerințe generale

În cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice în conformitate cu partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la Directiva 2006/88/CE, numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a statului membru, a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare trebuie să fie de asemenea reprezentative pentru diferitele ecosisteme în care se găsesc populațiile sălbatice sensibile, și anume râuri și lacuri.

Supravegherea individualizată se bazează pe monitorizarea regulată a siturilor care dețin specii sensibile. Siturile trebuie să fie monitorizate când temperatura apei a atins niveluri propice apariției bolii (> 15 °C) și cel mai devreme la două săptămâni după data la care au fost atinse aceste temperaturi. Toți peștii bolnavi sau care prezintă un comportament anormal găsiți în cadrul sitului trebuie să facă obiectul eșantionării și al testelor.

Ori de câte ori este posibil, trebuie să fie incluși în eșantion pești care au fost ținuți o perioadă de timp îndelungată la temperaturi propice dezvoltării virusului, și anume o perioadă de două până la trei săptămâni la temperaturi cuprinse între 15 °C și 26 °C. Cu toate acestea, poate fi acceptată metoda descrisă în continuare:

(a) colectarea unei sub-populații în momentul transferului din iazul de iarnă în iazul de vară și menținerea peștilor în aceeași apă ca cea a iazului de vară până la obținerea temperaturii minime cerute; sau

(b) colectarea eșantioanelor în timpul recoltării sau în timpul altor operațiuni de manipulare a peștilor care fac parte din practicile de gestionare normale. Dacă este posibil, eșantioanele se colectează între 24 și 72 de ore după astfel de practici de gestionare, pentru a spori șansele de detectare a KHV.

Atunci când fermele sau populațiile sălbatice trebuie să facă obiectul inspecției sanitare sau al eșantionării de mai multe ori pe an, intervalul dintre inspecțiile sanitare sau dintre prelevări trebuie să fie cât mai lung posibil în sezonul în care este probabil ca temperatura apei să atingă valorile maxime anuale, fără a depăși limita de 28 °C.

Toate unitățile de producție, cum ar fi iazurile și bazinele, trebuie să fie supuse inspecțiilor sanitare în vederea stabilirii prezenței peștilor morți, debilitați sau cu comportament anormal.

Specia *Cyprinus carpio* și încrucișările acesteia, cum ar fi *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, trebuie să fie prelevate atunci când sunt prezente în fermă.

Peștii care urmează să fie colectați drept eșantioane sunt selecționați după cum urmează:

(i) dacă sunt prezenți pești debilitați, cu comportament anormal sau care au murit recent, dar care nu sunt descompuși, acești pești trebuie să fie selecționați;

(ii) dacă se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de pește, trebuie incluși în eșantion pești care reprezintă toate sursele de apă;

(iii) peștii selectați trebuie să includă pești colectați în așa fel încât toate părțile fermei și toate clasele de vârstă grupate pe ani să fie reprezentate proporțional în eșantion.

I.2. Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar „indemn de boală” (categoria I) în ceea ce privește KHVD

I.2.1. Programe de supraveghere

(a) un stat membru, o zonă sau un compartiment cu un statut sanitar de categoria III în ceea ce privește KHVD poate obține statutul sanitar de categoria I atunci când toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/EC din statul membru, zona sau compartimentul în cauză respectă cerințele referitoare la statutul „indemn de boală” stabilite în anexa V la directiva menționată și atunci când toate aceste ferme și, când acest lucru este prevăzut la punctul 2 al doilea paragraf din partea I a anexei respective, punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatice selecționate în conformitate cu partea respectivă au fost supuse unuia dintre următoarele programe de supraveghere:

(i) modelul A – program de supraveghere cu durata de doi ani:

Fermele sau punctele de prelevare trebuie să fi făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 2.A. din secțiunea III.

În această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. trebuie să fi avut rezultate negative în ceea ce privește KHV și trebuie să fi fost exclusă orice suspiciune privind KHVD, în conformitate cu metodele de diagnostic care figurează la punctul III.2;

(ii) modelul B – program de supraveghere cu durata de patru ani, cu eșantion de dimensiuni reduse:

Fermele sau punctele de prelevare trebuie să fi făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de patru ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 2.B. din secțiunea III.

În această perioadă de patru ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. trebuie să fi avut rezultate negative în ceea ce privește KHV și trebuie să fi fost exclusă orice suspiciune privind KHVD, în conformitate cu metodele de diagnostic care figurează la punctul III.2;

(b) în cazul în care, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere de patru ani menționat la litera (a), este confirmată o infecție cu KHV într-o fermă inclusă în programul de supraveghere respectiv și, prin urmare, a fost retras statutul sanitar de categoria II al fermei, ferma respectivă poate să își recâștige imediat statutul sanitar de categoria II și să continue punerea în aplicare a programului de supraveghere pentru a obține statutul „indemn de boală" fără să pună în aplicare un program de eradicare, astfel cum este descris la punctul I.2.2, cu condiția ca ferma să îndeplinească următoarele condiții:

(i) să fie o fermă continentală al cărei statut sanitar în ceea ce privește KHVD este independent de starea de sănătate a populațiilor de animale acvatice din apele naturale din vecinătate în ceea ce privește această boală listată, în conformitate cu partea II punctul 3 din anexa V la Directiva 2006/88/CE;

(ii) să fi fost golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni;

(iii) să fi fost repopulată cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD.

I.2.2. Programe de eradicare

I.2.2.1. Cerințe generale

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește KHVD poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată atunci când toate fermele care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul cel puțin al programului de eradicare următor:

(a) măsurile minime de control stabilite în capitolul V secțiunea 4 din Directiva 2006/88/CE au fost aplicate în mod efectiv și o zonă de izolare, astfel cum se menționează la articolul 32 litera (b) din directiva respectivă, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, a fost instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial ca fiind infectată (infectate) cu KHV.

Zona de izolare trebuie să fi fost definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a KHVD la peștii de crescătorie și la cei sălbatici, cum ar fi: numărul, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a peștilor în cadrul fermei infectate cu KHV; distanța la care se găsesc fermele învecinate și densitatea acestora; apropierea de abatoare; fermele cu care se intră în contact; speciile prezente la ferme; practicile de acvacultură aplicate în fermele afectate și în fermele învecinate acestora; condițiile hidrodinamice și alți factori pertinenți din punct de vedere epidemiologic care au fost identificați.

Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime în ceea ce privește delimitarea geografică a acestor perimetre:

(i) trebuie să fie stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată cu KHV și acest perimetru trebuie să corespundă întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată cu KHV; autoritatea competentă poate limita extinderea perimetrului la anumite părți ale bazinului hidrografic, cu condiția să nu se compromită prevenirea răspândirii KHVD;

(ii) trebuie să fie stabilit un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă unei zone situate în jurul perimetrului de protecție stabilit;

(b) toate fermele în care sunt ținute specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial ca fiind infectate cu KHV trebuie să facă obiectul unei anchete oficiale care include cel puțin următoarele elemente:

(i) prelevarea de eșantioane pentru testarea a 10 pești, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu KHVD, sau pentru testarea a 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*;

(ii) o inspecție sanitară; în fermele în care testele menționate la punctul III.2 au avut rezultate negative; inspecțiile sanitare continuă o dată pe lună pe parcursul sezonului în care este probabil ca temperatura apei să depășească 15 °C, până când se renunță la perimetrul de protecție în conformitate cu punctul I.2.2.1 litera (c);

(c) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu KHV trebuie să fie golite, curățate, dezinfectate și supuse unei perioade de vid sanitar. Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni. După golirea tuturor fermelor declarate în mod oficial ca fiind infectate care se găsesc în același perimetru de protecție, trebuie să se respecte o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin trei săptămâni. Prezentul paragraf se aplică, de asemenea, noilor ferme declarate în mod oficial ca fiind infectate în timpul punerii în aplicare a programului de eradicare.

Atunci când intervine o perioadă de vid sanitar pentru fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate, perimetrele de protecție sunt transformate în perimetre de supraveghere.

Autoritatea competentă poate decide să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme care se află în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. Durata perioadei de vid sanitar este stabilită de autoritatea competentă pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz;

(d) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu KHV și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, trebuie să fie repopulate:

(i) cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD; sau

(ii) pentru o perioadă de tranziție până la 31 decembrie 2020, cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente cu un program de supraveghere a KHVD aprobat.

Repopularea trebuie să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu KHV au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul I.2.2.1 litera (c);

(e) toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare selectate în conformitate cu punctul I.1, au făcut apoi obiectul cel puțin al programului de supraveghere prevăzut la punctul I.2.1.

I.2.2.2. Cerințe privind restabilirea statutului „indemn de boală" pentru compartimentele continentale care cuprind o singură fermă, declarate anterior ca fiind indemne de KHVD

Un compartiment continental care cuprinde o singură fermă, care are statut sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD, al cărui statut sanitar în ceea ce privește KHVD este independent de cel al apelor naturale din vecinătate în conformitate cu partea II punctul 3 din anexa V la Directiva 2006/88/CE și al cărui statut sanitar de categoria I a fost retras în conformitate cu articolul 53 alineatul (3) din directiva respectivă poate redobândi statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD imediat ce autoritatea competentă a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

(a) ferma a fost golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar trebuie să fi fost de cel puțin șase săptămâni;

(b) ferma a fost repopulată cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I sau din compartimente cu un program de supraveghere a KHVD aprobat (statut sanitar de categoria II).

I.3. Cerințe specifice pentru menținerea statutului de categoria I în ceea ce privește KHVD

În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, astfel cum se prevede la articolul 52 din Directiva 2006/88/CE, toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la respectiva directivă din statul membru, zona sau compartimentul în cauză sunt supuse inspecției sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 2.B prevăzut în secțiunea III din prezenta parte, ținând seama de nivelul riscului de contaminare a fermei cu KHV.

În compartimentele cu statut sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD care se găsesc în regiuni continentale și care includ una sau mai multe ferme al căror statut sanitar în ceea ce privește KHVD este dependent de statutul sanitar al apelor naturale din vecinătate privind această boală listată, în conformitate cu partea II punctul 2 din anexa V la Directiva 2006/88/CE, frecvența inspecțiilor sanitare trebuie să corespundă numărului prevăzut în tabelul 2.C pentru risc ridicat.

În statele membre, în zonele sau în compartimentele în care există un număr limitat de ferme, iar supravegherea individualizată a acestor ferme nu furnizează date epidemiologice suficiente, programele de supraveghere în vederea menținerii statutului „indemn de boală” includ puncte de prelevare selecționate în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul I.1.

50 % dintre aceste puncte de prelevare trebuie să facă obiectul inspecției și prelevării de eșantioane în fiecare an, prin rotație. Eșantionarea trebuie să se realizeze în conformitate cu tabelul 2.C. prevăzut în secțiunea III. Eșantioanele trebuie să fie selectate, pregătite și examinate astfel cum este descris în secțiunea II, iar examenele de laborator trebuie să aibă rezultate negative în ceea ce privește prezența agentului KHVD.

Statutul „indemn de boală” se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.2 au rezultate negative pentru KHVD și orice suspiciune privind KHVD trebuie să fie exclusă, în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la punctul III.2.

I.4. Cerințe specifice pentru eliminarea măsurilor de prevenire a răspândirii bolilor prevăzute la articolul 39 din Directiva 2006/88/CE în vederea obținerii statutului sanitar de categoria III în ceea ce privește KHVD în statele membre, în zonele sau în compartimentele cu statut sanitar de categoria V

Un stat membru, o zonă sau un compartiment care are statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește KHVD poate obține statutul sanitar de categoria III în ceea ce privește această boală listată, cu condiția ca:

(a) cerințele prevăzute la punctul I.2.2.1 literele (a), (b) și (c) să fi fost îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză trebuie să facă obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea virusului KHV din mediul fermei;

(b) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, să fi fost repopulate cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește KHVD;

(c) repopularea să fi avut loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a).

II. **Metode de diagnostic și de eșantionare pentru supravegherea în vederea obținerii și menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD**

II.1. Eșantioane

Țesuturile care trebuie examinate sunt părți din branhii și rinichi. Este posibilă comasarea fragmentelor de organe care provin de la cel mult doi pești.

II.2. Metode de diagnostic pentru supravegherea în vederea obținerii și a menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD

Metoda de diagnostic pentru a obține sau pentru a menține statutul „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD este PCR în timp real (qPCR) în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în partea 2 punctul II din anexa II.

III. **Metode de diagnostic și de eșantionare pentru anchetele oficiale care au drept scop confirmarea sau excluderea suspiciunii privind KHVD**

III.1. Eșantioane

Țesuturile care trebuie examinate sunt părți din branhii și rinichi. Este posibilă comasarea fragmentelor de organe care provin de la cel mult doi pești.

III.2. Ancheta oficială și metodele de diagnostic pentru excluderea sau confirmarea prezenței infecției cu KHV

În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă o suspiciune privind KHVD, în conformitate cu articolul 28 din Directiva 2006/88/CE, trebuie respectată următoarea procedură în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

(a) ancheta oficială trebuie să includă cel puțin o inspecție sanitară și o prelevare de eșantioane de la 10 pești, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu KHV, sau de la 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*. Eșantioanele se testează folosind metoda de diagnostic stabilită la litera (b) în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în partea 2 punctul II din anexa II;

(b) prezența infecției cu KHV se consideră ca fiind confirmată în cazul în care KHV este detectat cu ajutorul PCR.

Suspiciunea privind KHVD poate fi exclusă în cazul în care acest test nu furnizează nicio altă dovadă referitoare la prezența KHV.

Tabelul 2.A

Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul perioadei de control de doi ani menționate la punctul I.2.1, care precede obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD

		Numărul de inspecții clinice pe an (doi ani)	Numărul de examene de laborator pe an (doi ani)	Numărul de pești per eșantion
Ferme/situri de prelevare	Primii doi ani ai perioadei de supraveghere	2	2	75 [1]
	Numărul maxim de pești per eșantion global: 2			

[1] Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de pești care să garanteze detectarea KHV cu un nivel de încredere de 95 % dacă prevalența estimată este de 5 %.

Tabelul 2.B

Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul perioadei de control de patru ani menționate la punctul I.2.1, care precede obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD

		Numărul de inspecții clinice pe an	Numărul de examene de laborator pe an	Numărul de pești per eșantion
Ferme/situri de prelevare	Primii doi ani ai perioadei de supraveghere	1	1	30
Ferme/situri de prelevare	Ultimii doi ani ai perioadei de supraveghere	2	2	30
	Numărul maxim de pești per eșantion global: 2.			

Tabelul 2.C

Programe de supraveghere a zonelor sau a compartimentelor în vederea menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește KHVD, astfel cum se menționează la punctul I.3

Nivelul de risc	Numărul de inspecții sanitare	Numărul de pești per eșantion
Ridicat	2 pe an	30
Mediu	1 pe an	30
Scăzut	1 la 2 ani	30

Numărul maxim de pești per eșantion global: 2.

Tabelul 2.D

Program de supraveghere pentru menținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește KHVD în statele membre, în zonele sau în compartimentele în care există un număr limitat de ferme, iar supravegherea individualizată a acestor ferme nu furnizează date epidemiologice suficiente, astfel cum se menționează la punctul I.3

	Numărul de inspecții clinice pe an	Numărul de examene de laborator pe an	Numărul de pești per eșantion
Puncte de prelevare	1 la 2 ani	1 la 2 ani	30

Numărul maxim de pești per eșantion global: 2.

PARTEA 3

METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE CONTROL ÎN CEEA CE PRIVEȘTE ANEMIA INFECȚIOASĂ A SOMONULUI (AIS)

I. **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală" în ceea ce privește AIS, precum și a prevenirii răspândirii infecției cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare**

I.1. Cerințe generale

În cazul în care fermele trebuie să facă obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării în conformitate cu partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la Directiva 2006/88/CE de mai multe ori pe an, intervalul dintre inspecțiile sanitare sau dintre prelevări trebuie să fie cât mai lung posibil.

În cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice în conformitate cu partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la Directiva 2006/88/CE, numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a statului membru, a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare trebuie să fie de asemenea reprezentative pentru diferitele ecosisteme în care se găsesc populațiile sălbatice sensibile.

Trebuie efectuate inspecții sanitare în toate unitățile de producție, cum ar fi iazurile, bazinele și cuștile din plasă, pentru a depista prezența peștilor morți, debilitați sau cu un comportament anormal. Trebuie să se acorde o atenție deosebită punctelor de evacuare a apei, unde peștii debilitați au tendința de a se acumula din cauza curentului.

Peștii care urmează să fie colectați drept eșantioane sunt selecționați după cum urmează:

(a) trebuie să fie selecționați numai pești muribunzi sau care au murit recent, dar care nu sunt descompuși; în mod special, în procesul de colectare se acordă prioritate peștilor care prezintă semne de anemie, sângerări sau alte semne clinice care sugerează tulburări circulatorii;

(b) dacă somonul de Atlantic este una dintre speciile sensibile prezente în cadrul sitului, trebuie prelevate cu prioritate eșantioane din somonul de Atlantic. dacă nu există somon de Atlantic în ferma piscicolă, trebuie prelevate eșantioane de la alte specii sensibile;

(c) dacă se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de pește, trebuie incluși în eșantion pești care reprezintă toate sursele de apă;

(d) peștii selectați trebuie să includă pești colectați în așa fel încât toate unitățile de producție, cum ar fi cuștile din plasă, bazinele și iazurile fermei, precum și toate clasele de vârstă grupate pe ani să fie reprezentate proporțional în eșantion.

I.2. Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS

I.2.1. Programe de supraveghere

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește AIS în conformitate cu partea B din anexa III la Directiva 2006/88/CE poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză respectă cerințele relevante stabilite în anexa V la directiva menționată și atunci când toate aceste ferme și, când acest lucru este prevăzut în partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la directivă, punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatice selecționate în conformitate cu punctul respectiv au fost supuse următorului program de supraveghere:

(a) fermele sau punctele de prelevare au făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 3.A din secțiunea II;

(b) în această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. trebuie să fi avut rezultate negative în ceea ce privește virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare și trebuie să fi fost exclusă orice suspiciune privind AIS, în conformitate cu metodele de diagnostic care figurează la punctul II.3;

(c) în cazul în care, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere, este confirmată AIS la o fermă inclusă în programul de supraveghere respectiv și, prin urmare, statutul sanitar de categoria II a fost retras, trebuie să fi fost efectuat un program de eradicare în conformitate cu punctul I.2.2.

I.2.2. Programe de eradicare

I.2.2.1. Cerințe generale

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește AIS poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul unui program de eradicare conform literelor (a)-(e) următoare:

(a) măsurile minime de control stabilite în capitolul V secțiunea 3 din Directiva 2006/88/CE au fost aplicate în mod efectiv și, în special, o zonă de izolare, astfel cum se menționează la articolul 32 litera (b) din directiva respectivă, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, a fost instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial ca fiind infectată (infectate) cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS.

Zona de izolare trebuie să fi fost definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a AIS la peștii de crescătorie sau la cei sălbatici, cum ar fi: numărul, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a peștilor în cadrul fermei infectate cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS; distanța la care se găsesc fermele învecinate și densitatea acestora; apropierea de abatoare; fermele cu care se intră în contact; speciile prezente la ferme; practicile de acvacultură aplicate în fermele afectate și în fermele învecinate acestora; condițiile hidrodinamice și alți factori pertinenți din punct de vedere epidemiologic care au fost identificați.

Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime în ceea ce privește delimitarea geografică a acestor perimetre:

(i) trebuie să fie stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată cu AIS și acest perimetru trebuie să corespundă:

1. în zonele de coastă: unei zone înscrise într-un cerc cu raza cel puțin egală cu o deplasare a mareei sau de cel puțin 5 km, reținându-se valoarea cea mai mare dintre cele două, având ca centru ferma declarată în mod oficial ca fiind infectată cu AIS, sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare;

2. în zonele interioare: întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată cu AIS; autoritatea competentă poate limita extinderea perimetrului la anumite părți ale bazinului hidrografic, cu condiția să nu se compromită prevenirea răspândirii AIS;

(ii) trebuie să fie stabilit un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă:

1. în zonele de coastă: unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, a cărei zonă de deplasare a mareei se suprapune cu zona de deplasare a mareei corespunzătoare perimetrului de protecție; sau unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, înscrisă într-un cerc cu raza de 10 km, calculată din centrul perimetrului de protecție; sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare; sau

2. în zonele interioare: unei zone situate în exteriorul perimetrului de protecție stabilit;

(b) toate fermele în care sunt ținute specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial ca fiind infectate cu AIS trebuie să facă obiectul unei anchete oficiale care include cel puțin următoarele elemente:

(i) prelevarea de eșantioane pentru testarea a minimum 10 pești muribunzi, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu AIS, sau pentru testarea a minimum 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*;

(ii) o inspecție sanitară; în fermele pentru care testele menționate la subpunctul (i) au avut rezultate negative, inspecțiile sanitare trebuie să continue o dată pe lună până când se renunță la perimetrul de protecție în conformitate cu punctul I.2.2.1. litera (c);

(c) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS trebuie să fie golite, curățate, dezinfectate și supuse unei perioade de vid sanitar timp de cel puțin trei luni. Se poate renunța la perimetrele de protecție și de supraveghere atunci când toate fermele situate în perimetrul de protecție au fost golite, curățate, dezinfectate și ulterior a fost respectată o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin șase săptămâni.

Atunci când intervine o perioadă de vid sanitar pentru fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate, perimetrele de protecție sunt transformate în perimetre de supraveghere.

Autoritatea competentă poate decide să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme care se află în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. În cazul acestor ferme, durata perioadei de vid sanitar este stabilită de autoritatea competentă pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz;

(d) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, trebuie să fie repopulate cu pești care provin din state membre, din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS.

Repopularea trebuie să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul I.2.2.1 litera (c);

(e) toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare selectate în conformitate cu punctul I.1, fac apoi obiectul programului de supraveghere prevăzut la punctul I.2.1.

I.2.2.2. Cerințe privind restabilirea statutului „indemn de boală” pentru compartimentele continentale care cuprind o singură fermă, care au avut anterior statut sanitar de categoria I

Un compartiment continental care cuprinde o singură fermă care are statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS, al cărui statut sanitar este independent de cel al apelor naturale din vecinătate în conformitate cu partea II punctul 3 din anexa V la Directiva 2006/88/CE și al cărui statut sanitar de categoria I a fost retras în conformitate cu articolul 53 alineatul (3) din directiva respectivă, poate redobândi statutul imediat ce autoritatea competentă a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

(a) ferma a fost golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni;

(b) ferma a fost repopulată cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS.

I.3. Măsuri minime de control în vederea menținerii statutului de categoria I în ceea ce privește AIS

În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, astfel cum se prevede la articolul 52 din Directiva 2006/88/CE, toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la respectiva directivă din statul membru, zona sau compartimentul în cauză sunt supuse inspecțiilor sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 3.B ([1]) prevăzut în secțiunea II din prezenta parte, ținând seama de nivelul riscului de contaminare a fermei cu AIS.

La determinarea frecvenței inspecțiilor sanitare pentru compartimentele care au statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS, care se găsesc în regiuni continentale și al căror statut sanitar în ceea ce privește AIS depinde de statutul sanitar al apele naturale din vecinătate în care există somon de Atlantic (*Salmo salar*), riscul de contaminare cu AIS trebuie să fie considerat ridicat.

Statutul „indemn de boală” în ceea ce privește AIS se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.2. au rezultate negative pentru virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare și a fost exclusă orice suspiciune privind AIS, în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.3.

I.4. Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar de categoria III în ceea ce privește virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare în state membre, zone sau compartimente care au avut anterior statutul sanitar de categoria V

Un stat membru, o zonă sau un compartiment care are statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare poate obține statutul de categoria III cu condiția ca:

(a) cerințele prevăzute la punctul I.2.2.1 literele (a), (b) și (c) să fi fost îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză trebuie să facă obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea VAIS din mediul fermei;

(b) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, să fi fost repopulate cu pești provenind din state membre, din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește AIS;

(c) repopularea să fi avut loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a);

(d) să nu fi fost confirmată infecția cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare în cursul perioadei de doi ani care urmează punerii în aplicare a măsurilor menționate la literele (a), (b) și (c) și să fi fost excluse suspiciunile în cursul acestei perioade, în conformitate cu procedurile stabilite la punctul II.3.

([1]) Nu se aplică fermelor în care sunt crescuți doar păstrăvi-curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) sau păstrăvi comuni (*Salmo trutta*) sau ambele specii și a căror aprovizionare cu apă se bazează exclusiv pe surse de apă dulce în care nu există somon de Atlantic (*Salmo salar*).

II. **Metodele de diagnostic și anchetele oficiale**

II.1. Eșantioane

Țesuturile care trebuie examinate sunt:

(a) histologie: rinichi anterior, ficat, inimă, pancreas, intestin, splină și branhii;

(b) imunohistochimie: rinichi median și inimă, inclusiv valvele și *bulbus arteriosus*;

(c) analiza RT-qPCR: rinichi median și inimă;

(d) cultura virusurilor: rinichi median, inimă, ficat și splină.

Este posibilă comasarea fragmentelor de organe care provin de la cel mult cinci pești.

II.2. Metode de diagnostic în vederea obținerii sau a menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește AIS

Metoda de diagnostic care trebuie utilizată pentru a obține sau a menține statutul „indemn de boală" în ceea ce privește AIS în conformitate cu punctele I.2 și I.3 este RT-qPCR, urmată de secvențierea eșantioanelor pozitive în conformitate cu metodele și cu procedurile detaliate stabilite în partea 3 din anexa II.

În cazul în care rezultatul RT-qPCR este pozitiv, trebuie testate eșantioane suplimentare înainte de punerea în aplicare a primelor măsuri de combatere, prevăzute la articolul 28 din Directiva 2006/88/CE.

Aceste eșantioane trebuie să fie testate după cum urmează, în conformitate cu metodele și cu procedurile detaliate stabilite în partea 3 din anexa II:

(a) examinarea eșantioanelor prin RT-qPCR, inclusiv secvențierea genei HE pentru a verifica deleția în regiunea cu polimorfism mare;

și

(b) examinarea în preparate tisulare, cu ajutorul unor anticorpi specifici împotriva VAIS (și anume IHC pe secțiuni fixate sau IFAT pe amprente tisulare); sau

(c) izolarea și identificarea VAIS într-o cultură celulară de la cel puțin un eșantion prelevat de la orice pește care provine din fermă.

II.3. Ancheta oficială și metodele de diagnostic pentru excluderea sau confirmarea prezenței infecției cu AIS

În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă suspiciunea privind AIS, în conformitate cu articolul 28 din Directiva 2006/88/CE, trebuie respectată următoarea procedură în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

(a) ancheta oficială include cel puțin o inspecție sanitară și o prelevare de eșantioane de la 10 pești muribunzi, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu AIS. În cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu AIS, inspecția sanitară trebuie să fie urmată de prelevarea de eșantioane specifice de la cel puțin 30 de pești muribunzi sau pești care au murit recent, cu constituție normală, în conformitate cu punctul I.1. Eșantioanele trebuie să fie testate în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la litera (b);

(b) în cazul în care rezultatul RT-qPCR este pozitiv pentru virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare, trebuie testate eșantioane suplimentare înainte de punerea în aplicare a primelor măsuri de combatere, prevăzute la articolul 28 din Directiva 2006/88/CE. Suspiciunea privind infecția cu VAIS trebuie să fie confirmată în conformitate cu următoarele criterii, utilizând metodele și procedurile detaliate stabilite în partea 3 din anexa II:

(i) depistarea VAIS prin RT-qPCR, inclusiv secvențierea genei HE pentru a verifica deleția în regiunea cu polimorfism mare, precum și depistarea VAIS în preparate tisulare, cu ajutorul unor anticorpi specifici împotriva VAIS (și anume IHC pe secțiuni fixate sau IFAT pe amprente tisulare);

sau

(ii) depistarea VAIS prin RT-qPCR, inclusiv secvențierea genei HE pentru a verifica deleția în regiunea cu polimorfism mare; și

izolarea și identificarea VAIS într-o cultură celulară de la cel puțin un eșantion prelevat de la orice pește care provine din fermă;

(c) în cazul în care sunt prezente semne clinice, modificări patologice macroscopice sau există rezultate histopatologice compatibile cu AIS, rezultatele trebuie să fie coroborate în vederea depistării virusului utilizând două metode de diagnostic care au principii de detectare independente, precum RT-qPCR și IHC, în conformitate cu partea 3 din anexa II.

Suspiciunea privind AIS poate fi exclusă în cazul în care testele și inspecțiile realizate într-o perioadă de 12 luni de la data la care apare suspiciunea nu furnizează nicio altă dovadă referitoare la prezența AIS.

Tabelul 3.A

Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul perioadei de control de doi ani menționate la punctul I.2.1, care precede obținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește AIS

An de supraveghere	Numărul de inspecții sanitare pe an (doi ani)	Numărul de examene de laborator pe an (doi ani)	Numărul de pești de la care trebuie să se colecteze eșantioane, pe an
Anul 1	6	2 (1)	2 * 75 (2)
Anul 2	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Eșantioanele trebuie să fie prelevate, depozitate și examinate în decursul a două perioade de testare per an, fiecare perioadă având durata de o lună (primăvara și toamna), sau atunci când este cazul, în funcție de considerațiile de ordin practic.
(2) Numărul maxim de pești per eșantion global: 5.

Tabelul 3.B

Programe de supraveghere a zonelor sau a compartimentelor în vederea menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește AIS, astfel cum se menționează la punctul I.3 (2)

Nivelul de risc	Numărul de inspecții sanitare pe an	Numărul de examene de laborator pe an	Numărul de pești de la care trebuie să se colecteze eșantioane, pe an
Ridicat	2	2 (1)	2 * 30
Mediu	1	1 (1)	30
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 2 ani	30 la 2 ani

(1) Eșantioanele trebuie să fie prelevate și examinate în decursul a două perioade de testare per an, fiecare perioadă având durata de o lună (primăvara și toamna), sau atunci când este cazul, în funcție de considerațiile de ordin practic.
(2) Nu se aplică fermelor în care sunt crescuți doar păstrăvi-curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) sau păstrăvi comuni (*Salmo trutta*) sau ambele specii și a căror aprovizionare cu apă se bazează exclusiv pe surse de apă dulce în care nu există somon de Atlantic (*Salmo salar*).

PARTEA 4

METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE CONTROL ÎN CEEA CE PRIVEȘTE INFECȚIA CU *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală" în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens***

I.1. Cerințe generale

Inspecțiile sanitare și, după caz, prelevarea de eșantioane pentru examenele de laborator se efectuează în perioada din an în care se știe că prevalența parazitului este maximă în statul membru, în zonă sau în compartiment. Atunci când astfel de date nu sunt disponibile, prelevarea de eșantioane se efectuează imediat după ce temperatura apei a depășit 17 °C.

În cazul în care se prelevează eșantioane de la moluște în conformitate cu cerințele stabilite în partea 4, se aplică următoarele criterii:

(a) dacă *Ostrea* spp. și *Mytilus* spp. sunt prezente în unitățile de producție sau în aria de producție, ambele genuri trebuie să fie reprezentate în mod egal în eșantioane. În cazul în care este prezent doar unul dintre genuri, genul respectiv trebuie să fie inclus în eșantion. În cazul în care nu este prezent nici genul *Ostrea*, nici genul *Mytilus*, eșantionul trebuie să fie reprezentativ pentru toate celelalte specii sensibile prezente;

(b) dacă în unitățile de producție sunt prezente moluște slăbite, cu cochilia deschisă sau care au murit recent, dar care nu sunt încă descompuse, sunt selectate în principal acestea. În absența unor astfel de moluște, moluștele selectate includ moluștele sănătoase cu vârsta cea mai mare;

(c) atunci când se efectuează eșantionarea în cadrul fermelor de moluște în care se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de moluște, trebuie incluse în eșantion moluște reprezentând toate sursele de apă, în așa fel încât toate părțile fermei să fie reprezentate proporțional în eșantion;

(d) atunci când se efectuează eșantionarea în zone de cultură a moluștelor, trebuie incluse în eșantion moluște dintr-un număr suficient de puncte de prelevare, în așa fel încât toate părțile zonei de cultură a moluștelor să fie reprezentate proporțional în eșantion. Principalii factori care trebuie avuți în vedere pentru selectarea acestor puncte de prelevare sunt punctele de prelevare anterioare în care a fost detectat *Marteilia refringens*, densitatea stocurilor, curenții, prezența speciilor sensibile, prezența speciilor-vector, batimetria și practicile de gestionare. Bancurile naturale trebuie incluse în eșantionare.

I.2. Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar de categoria I în ceea ce privește *Marteilia refringens*

I.2.1. Programe de supraveghere

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul cel puțin al programului de supraveghere următor, care include inspecții sanitare și colectarea de eșantioane în vederea testării.

Program de supraveghere de doi ani:

(a) fermele sau zonele de cultură a moluștelor au făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 4.A. din secțiunea II;

(b) în această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. a avut rezultate negative în ceea ce privește *Marteilia refringens* și a fost exclusă orice suspiciune privind *Marteilia refringens*, în conformitate cu metodele de diagnostic care figurează la punctul II.3;

(c) atunci când *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* sau *Mytilus galloprovincialis* provenind dintr-un stat membru, dintr-o zonă sau dintr-un compartiment cu statut sanitar de categoria I trebuie să fie incluse în eșantion, acestea trebuie să fi fost introduse în fermă sau în zona de cultură a moluștelor cel puțin în primăvara imediat precedentă perioadei în care se desfășoară programul de supraveghere.

I.2.2. Programe de eradicare

Eradicarea *Marteilia refringens* este considerată imposibilă în cea mai mare parte a cazurilor, însă, atunci când statul membru consideră că acest lucru este fezabil, se aplică următorul model de program de eradicare.

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul cel puțin al programului de eradicare următor:

(a) măsurile stabilite în capitolul V secțiunea 3 din Directiva 2006/88/CE au fost aplicate în mod efectiv și, în special, a fost instaurată o zonă de izolare, astfel cum se menționează la articolul 32 litera (b) din directiva respectivă, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, în vecinătatea fermei (fermelor) sau a zonei (zonelor) de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectată (infectate) cu *Marteilia refringens*.

Zona de izolare este definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a *Marteilia refringens*, cum ar fi: numărul, vârsta, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a moluștelor în ferma sau în zona de cultură a moluștelor infectată cu *Marteilia refringens*, incluzând moluștele sălbatice; distanța la care se găsesc fermele învecinate sau zonele de cultură a moluștelor învecinate, precum și densitatea acestora, incluzând moluștele sălbatice; proximitatea față de unitățile de prelucrare, fermele cu care se intră în contact sau zonele de cultură a moluștelor; speciile, în special speciile sensibile și speciile-vector prezente în ferme sau în zonele de cultură a moluștelor; practicile de acvacultură aplicate în fermele și în zonele de cultură a moluștelor afectate, precum și în cele aflate în vecinătate; condițiile hidrodinamice și alți factori pertinenți din punct de vedere epidemiologic care au fost identificați.

Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime:

(i) trebuie să fie stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei sau a zonei de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectată cu *Marteilia refringens* și acest perimetru trebuie să corespundă unei zone stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare;

(ii) trebuie să fie stabilit un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, stabilită pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare;

(b) toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin speciile sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE din perimetrul de protecție și care nu sunt în mod oficial declarate ca infectate cu *Marteilia refringens* trebuie să fie supuse unei anchete oficiale care cuprinde cel puțin colectarea de eșantioane pentru testarea a 150 de moluște după începutul perioadei de transmitere a *Marteilia refringens*. În cazul în care nu se cunoaște perioada de transmitere, eșantionarea trebuie să înceapă după ce temperatura apei depășește 17 °C;

(c) toate fermele și zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate cu *Marteilia refringens* trebuie să fie golite, să facă obiectul unui vid sanitar și, dacă este posibil, să fie curățate și dezinfectate.

Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin:

(i) două luni în cazul fermelor și al zonelor de cultură a moluștelor cu legături limitate cu apele înconjurătoare, precum cele ale incubatoarelor și pepinierelor;

(ii) două luni în cazul fermelor și al zonelor de cultură a moluștelor care au legături nelimitate cu apele înconjurătoare, cu condiția ca moluștele infectate care aparțin speciilor sensibile și moluștele din speciile sensibile care au legături epidemiologice cu ferma infectată sau cu zona de cultură a moluștelor infectată să fi fost recoltate sau eliminate înainte de perioada din an în care se știe că prevalența *Marteilia refringens* este maximă, sau, în cazul în care nu se cunoaște această perioadă, înainte de perioada în care temperatura apei depășește 17 °C;

(iii) paisprezece luni în cazul fermelor și al zonelor de cultură a moluștelor care au legături nelimitate cu apele înconjurătoare, cu condiția ca moluștele infectate care aparțin speciilor sensibile și moluștele din speciile sensibile care au legături epidemiologice cu ferma infectată sau cu zona de cultură a moluștelor infectată să nu fi fost recoltate sau eliminate înainte de perioada din an în care se știe că prevalența *Marteilia refringens* este maximă, sau, în cazul în care nu se cunoaște această perioadă, atunci când moluștele din speciile sensibile nu au fost recoltate sau eliminate înainte de perioada în care temperatura apei depășește 17 °C.

După golirea tuturor fermelor și a zonelor de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate, trebuie să se respecte o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin patru săptămâni.

După caz, autoritatea competentă poate decide să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme sau zone de cultură a moluștelor, care se află în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. Durata perioadei de vid sanitar este stabilită de autoritatea competentă pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz;

(d) toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, trebuie să fie repopulate cu moluște care provin din state membre, din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*.

Repopularea trebuie să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul I.2.2 litera (c);

(e) toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile enumerate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare trebuie să facă apoi obiectul programului de supraveghere prevăzut la punctul I.2.1 din prezenta parte.

I.3. Cerințe specifice pentru menținerea statutului sanitar „indemn de boală" (categoria I) în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*

În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, astfel cum se prevede la articolul 52 din Directiva 2006/88/CE, toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză sunt supuse inspecțiilor sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 4.B prevăzut în secțiunea II, ținând seama de nivelul riscului de contaminare a fermei sau a zonei de cultură a moluștelor cu *Marteilia refringens*.

Statutul „indemn de boală" se poate menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.2 au rezultate negative pentru *Marteilia refringens* și orice suspiciune privind *Marteilia refringens* este exclusă, în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.3.

I.4. Cerințe privind eliminarea măsurilor de prevenire a răspândirii bolilor prevăzute la articolul 39 din Directiva 2006/88/CE (trecerea de la statutul sanitar de categoria V la statutul sanitar de categoria III) în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*

Un stat membru, o zonă sau un compartiment care are statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* poate obține statutul sanitar de categoria III în ceea ce privește această boală listată, cu condiția ca:

(a) cerințele prevăzute la punctul I.2.2 literele (a), (b) și (c) să fi fost îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză trebuie să facă obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea *Marteilia refringens* din mediul fermei;

(b) toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a), situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, să fi fost repopulate cu moluște care provin din state membre, din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*;

(c) repopularea să fi avut loc numai după ce toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a);

(d) să nu fi fost confirmată infecția cu *Marteilia refringens* în cursul perioadei de doi ani care urmează punerii în aplicare a măsurilor menționate la literele (a), (b) și (c) și să fi fost excluse suspiciunile în cursul acestei perioade, în conformitate cu procedurile stabilite la punctul II.3.

II. **Metodele de diagnostic și anchetele oficiale**

II.1. Eșantioane

Animalul întreg trebuie să fie trimis la laborator pentru efectuarea testelor de diagnostic prevăzute la punctele II.2 și II.3.

II.2. Metode de diagnostic în vederea obținerii sau a menținerii statutului „indemn de boală" pentru infecția cu *Marteilia refringens*

Metodele de diagnostic care trebuie utilizate pentru obținerea sau menținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în partea 4 din anexa II sunt examenul histopatologic, amprentele tisulare sau PCR.

II.3. Ancheta oficială și metodele de diagnostic pentru confirmarea prezenței infecției cu *Marteilia refringens* sau pentru excluderea suspiciunii privind această infecție

În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă suspiciunea privind infecția cu *Marteilia refringens*, în conformitate cu articolul 28 din Directiva 2006/88/CE, trebuie respectată următoarea procedură în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

(a) ancheta oficială trebuie să cuprindă cel puțin o prelevare de eșantioane de la 30 de moluște din speciile sensibile, în cazul în care suspiciunea respectivă se bazează pe un raport de mortalitate, sau, dacă nu, de la 150 de moluște din speciile sensibile, după începutul perioadei de transmitere a *Marteilia refringens*. În cazul în care nu se cunoaște perioada de transmitere, eșantionarea trebuie să înceapă după ce temperatura apei depășește 17 °C;

(b) Eșantioanele se testează folosind metodele de diagnostic stabilite la subpunctul (i) în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în partea 4 secțiunea I din anexa II:

(i) prezența *Marteilia refringens* este considerată confirmată atunci când un rezultat pozitiv obținut prin examen histopatologic, amprente tisulare sau hibridare *in situ* este asociat unui rezultat pozitiv obținut prin PCR și completat prin secvențiere;

(ii) suspiciunea de infecție cu *Marteilia refringens* poate fi exclusă în cazul în care testele menționate la subpunctul (i) nu furnizează nicio altă dovadă a prezenței *Marteilia refringens*.

Tabelul 4.A

Programul de supraveghere pentru state membre, zone sau compartimente pe parcursul perioadei de control care precede obținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*, menționat la punctul I.2.1

	Numărul de inspecții sanitare pe an	Numărul de examene de laborator pe an	Numărul de moluște per eșantion
Ferme/zone de cultură a moluștelor	1	1	150

Tabelul 4.B

Programe de supraveghere pentru state membre, zone sau compartimente în vederea menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*, astfel cum se menționează la punctul I.3

Nivelul de risc	Numărul de inspecții sanitare	Numărul examenelor de laborator	Numărul de moluște per eșantion
Ridicat	1 pe an	1 la 2 ani	150
Mediu	1 la 2 ani	1 la 2 ani	150
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 4 ani	150

PARTEA 5

METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE CONTROL ÎN CEEA CE PRIVEȘTE INFECȚIA CU *BONAMIA OSTREAE*

I. **Cerințe referitoare la programele de supraveghere sau de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală" în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae***

I.1. Cerințe generale

Inspecțiile sanitare și, după caz, eșantionarea unităților de producție se efectuează în perioada din an în care se știe că prevalența *Bonamia ostreae* este maximă în statul membru, în zonă sau în compartiment. Atunci când astfel de date nu sunt disponibile, eșantionarea se efectuează iarna sau la începutul primăverii.

În cazul în care moluștele fac obiectul eșantionării în conformitate cu cerințele stabilite în partea 5, se aplică următoarele criterii:

(a) în prezența *Ostrea edulis*, numai stridiile din această specie sunt selecționate pentru eșantionare. Dacă *Ostrea edulis* nu sunt prezente, eșantionul trebuie să fie reprezentativ pentru toate celelalte specii sensibile care sunt prezente;

(b) dacă sunt prezente moluște slăbite, cu cochilia deschisă sau care au murit recent, dar care nu sunt încă descompuse, sunt selectate în principal acestea. În absența unor astfel de moluște, moluștele selectate includ moluștele sănătoase cu vârsta cea mai mare;

(c) atunci când se efectuează eșantionarea în cadrul fermelor în care se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de moluște, trebuie incluse în eșantion moluște reprezentând toate sursele de apă, în așa fel încât toate părțile fermei să fie reprezentate proporțional în eșantion;

(d) atunci când se efectuează eșantionarea în zone de cultură a moluștelor, trebuie incluse în eșantion moluște dintr-un număr suficient de puncte de prelevare. Principalii factori care trebuie avuți în vedere pentru selectarea acestor puncte de prelevare sunt punctele în care a fost detectat *Bonamia ostreae* în trecut, densitatea stocurilor, curenții, prezența speciilor sensibile, prezența speciilor-vector, batimetria și practicile de gestionare. Trebuie incluse în eșantionare bancurile naturale care se găsesc în zonele de cultură sau care sunt adiacente acestora.

I.2. Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar de categoria I în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*

I.2.1. Programe de supraveghere

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae* poate obține din nou statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul cel puțin al programului de supraveghere următor, care include inspecții sanitare și colectarea de eșantioane în vederea testării.

Program de supraveghere de doi ani:

(a) fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE au făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 5.A. din prezenta parte;

(b) în această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. a avut rezultate negative în ceea ce privește *Bonamia ostreae* și a fost exclusă orice suspiciune privind *Bonamia ostreae*, în conformitate cu metodele de diagnostic care figurează la punctul II.3;

(c) atunci când *Ostrea edulis* provenind dintr-un stat membru, dintr-o zonă sau dintr-un compartiment cu statut sanitar de categoria I trebuie să fie incluse în eșantion, acestea trebuie să fi fost introduse în fermă sau în zona de cultură a moluștelor cel puțin în toamna imediat precedentă perioadei în care se desfășoară programul de supraveghere.

I.2.2. Programe de eradicare

Eradicarea *Bonamia ostreae* este considerată imposibilă în cea mai mare parte a cazurilor, însă, atunci când statul membru consideră că acest lucru este fezabil, se aplică următorul model de program de eradicare.

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae* poate obține din nou statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul cel puțin al programului de eradicare următor:

(a) măsurile minime de control stabilite în capitolul V secțiunea 3 din Directiva 2006/88/CE au fost aplicate în mod efectiv și, în special, a fost instaurată o zonă de izolare, astfel cum se menționează la articolul 32 litera (b) din directiva respectivă, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, în vecinătatea fermei (fermelor) sau a zonei (zonelor) de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectată (infectate) cu *Bonamia ostreae*.

Zona de izolare este definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a acestei boli listate, cum ar fi: numărul, vârsta, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a moluștelor în ferma sau în zona de cultură a moluștelor infectată cu *Bonamia ostreae*, incluzând moluștele sălbatice; distanța la care se găsesc fermele învecinate sau zonele de cultură a moluștelor învecinate, precum și densitatea acestora, incluzând moluștele sălbatice; proximitatea față de unitățile de prelucrare, fermele cu care se intră în contact sau zonele de cultură a moluștelor; speciile prezente în ferme sau în zonele de cultură a moluștelor, în special speciile sensibile și speciile-vector; practicile de acvacultură aplicate în fermele sau în zonele de cultură a moluștelor afectate, precum și în cele aflate în vecinătate; condițiile hidrodinamice și alți factori pertinenți din punct de vedere epidemiologic care au fost identificați.

Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime:

(i) trebuie să fie stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei sau a zonei de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectată cu *Bonamia ostreae* și acest perimetru trebuie să corespundă unei zone stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare;

(ii) trebuie să fie stabilit un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, stabilită pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare;

(b) toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin speciile sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE din perimetrul de protecție și care nu sunt în mod oficial declarate ca infectate cu *Bonamia ostreae* trebuie să fie supuse unei anchete oficiale care cuprinde cel puțin colectarea de eșantioane pentru testarea a 150 de moluște din speciile sensibile după începutul perioadei de transmitere a *Bonamia ostreae*. În cazul în care nu se cunoaște perioada de transmitere, eșantionarea trebuie să înceapă iarna sau la începutul primăverii;

(c) toate fermele și zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate cu *Bonamia ostreae* trebuie să fie golite, să facă obiectul unui vid sanitar și, dacă este posibil, să fie curățate și dezinfectate. Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase luni.

După golirea tuturor fermelor sau a zonelor de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate, trebuie să se respecte o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin patru săptămâni.

După caz, autoritatea competentă poate decide să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme sau zone de cultură a moluștelor, care se află în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. Durata perioadei de vid sanitar este stabilită de autoritatea competentă pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz;

(d) toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, trebuie să fie repopulate cu moluște care provin din state membre, din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*. Repopularea trebuie să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul I.2.2. litera (c);

(e) toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile enumerate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare trebuie să facă apoi obiectul programului de supraveghere prevăzut la punctul I.2.

I.3. Cerințe specifice pentru menținerea statutului sanitar „indemn de boală” (categoria I) în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*

În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, astfel cum se prevede la articolul 52 din Directiva 2006/88/CE, toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva menționată din statul membru, din zona sau din compartimentul în cauză sunt supuse inspecțiilor sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 5.B prevăzut în secțiunea II din prezenta parte, ținând seama de nivelul riscului de contaminare a fermei sau a zonei de cultură a moluștelor cu *Bonamia ostreae*.

Statutul „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu Bonamia ostreae se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.2. au rezultate negative pentru *Bonamia ostreae* și a fost exclusă orice suspiciune privind *Bonamia ostreae*, în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.3.

I.4. Cerințe privind eliminarea măsurilor de prevenire a răspândirii bolilor, prevăzute la articolul 39 din Directiva 2006/88/CE (trecerea de la statutul sanitar de categoria V la statutul sanitar de categoria III), în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*

Un stat membru, o zonă sau un compartiment care au statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae* pot obține statutul sanitar de categoria III în ceea ce privește această boală, cu condiția ca:

(a) cerințele prevăzute la punctul I.2.2 literele (a), (b) și (c) să fi fost îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză trebuie să facă obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea *Bonamia ostreae* din mediul fermei;

(b) toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a), situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, să fi fost repopulate cu moluște care provin din state membre, din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*.

(c) repopularea să fi avut loc numai după ce toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial ca fiind infectate au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a).

(d) să nu fi fost confirmată infecția cu *Bonamia ostreae* în cursul perioadei de doi ani care urmează punerii în aplicare a măsurilor menționate la literele (a), (b) și (c) și să fi fost excluse suspiciunile în cursul acestei perioade, în conformitate cu procedurile stabilite la punctul II.3.

II. **Metode și criterii de diagnostic**

II.1. Eșantioane

Animalul întreg trebuie să fie trimis la laborator pentru efectuarea testelor de diagnostic prevăzute la punctele II.2 și II.3.

II.2. Metode de diagnostic în vederea obținerii sau a menținerii statutului „indemn de boală” pentru infecția cu *Bonamia ostreae*

Metodele de diagnostic care trebuie utilizate pentru a obține sau a menține statutul „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae* sunt examenul histopatologic, amprentele tisulare sau PCR. La aplicarea acestor metode de diagnostic trebuie să se respecte metodele și procedurile detaliate corespunzătoare stabilite în partea 5 a anexei II.

II.3. Criterii de diagnostic pentru confirmarea prezenței infecției cu *Bonamia ostreae* sau pentru excluderea suspiciunii privind această infecție

În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă suspiciunea privind infecția cu *Bonamia ostreae*, în conformitate cu articolul 28 din Directiva 2006/88/CE, trebuie respectată următoarea procedură în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

Ancheta oficială trebuie să cuprindă cel puțin o prelevare de eșantioane de la 30 de moluște din speciile sensibile, în cazul în care suspiciunea respectivă se bazează pe un raport de mortalitate, sau, dacă nu, de la 150 de moluște din speciile sensibile, după începutul perioadei de transmitere a *Bonamia ostreae*. În cazul în care nu se cunoaște perioada de transmitere, eșantionarea trebuie să înceapă iarna sau la începutul primăverii. Eșantioanele se testează folosind metodele de diagnostic stabilite la subpunctul (i) în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în partea 5 secțiunea I din anexa II.

(i) prezența *Bonamia ostreae* este considerată confirmată atunci când un rezultat pozitiv obținut prin examen histopatologic, amprente tisulare sau hibridare *in situ* este asociat unui rezultat pozitiv obținut prin PCR și completat prin secvențiere în conformitate cu metodele și cu procedurile aprobate stabilite în partea 5 a anexei II;

(ii) suspiciunea de infecție cu *Bonamia ostreae* poate fi exclusă în cazul în care testele menționate nu furnizează nicio altă dovadă a prezenței *Bonamia ostreae*.

Tabelul 5.A

Programul de supraveghere pentru state membre, zone sau compartimente pe parcursul perioadei de control menționate la punctul I.2.1, care precede obținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*

	Numărul de inspecții sanitare pe an	Numărul de examene de laborator pe an	Numărul de moluște per eșantion
Ferme/zone de cultură a moluștelor	1	1	150

Tabelul 5.B

Programe de supraveghere pentru state membre, zone sau compartimente în vederea menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*, astfel cum se menționează la punctul I.3

Nivelul de risc	Numărul de inspecții sanitare	Numărul examenelor de laborator	Numărul de moluște per eșantion
Ridicat	1 pe an	1 la 2 ani	150
Mediu	1 la 2 ani	1 la 2 ani	150
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 4 ani	150

PARTEA 6

METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE CONTROL ÎN CEEA CE PRIVEȘTE BOALA PETELOR ALBE (*WHITE SPOT DISEASE* – WSD)

I. **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală" în ceea ce privește WSD, precum și a prevenirii răspândirii infecției cu virusul sindromului petelor albe (WSSV)**

I.1. Cerințe generale pentru inspecții și eșantionare

Eșantionarea crustaceelor în vederea efectuării examenelor de laborator are loc atunci când este probabil ca temperatura apei să atingă cea mai înaltă valoare anuală. Această cerință privind temperatura apei se aplică de asemenea inspecțiilor sanitare, în cazul în care acestea sunt fezabile și oportune.

În cazul în care crustaceele fac obiectul eșantionării în conformitate cu cerințele stabilite în prezenta parte, se aplică următoarele criterii:

(a) dacă în unitățile de producție sunt prezente crustacee slăbite sau muribunde, sunt selectate în principal acestea. În cazul în care astfel de crustacee nu sunt prezente, cele selectate includ crustacee din cohorte de mărime diferită, și anume exemplare tinere și adulți din speciile sensibile selectate, reprezentate proporțional în eșantion;

(b) dacă se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de crustacee, trebuie incluse în eșantion crustacee sensibile care reprezintă toate sursele de apă.

Dacă este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice în conformitate cu partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la Directiva 2006/88/CE, numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a statului membru, a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare trebuie să fie de asemenea reprezentative pentru diferitele ecosisteme în care se găsesc populațiile sălbatice din speciile sensibile, și anume zonele marine, estuarele, râurile și lacurile.

În cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice în conformitate cu partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la Directiva 2006/88/CE, crustaceele care fac obiectul eșantionării sunt selecționate după cum urmează:

(i) în zone marine și în estuare, trebuie selectate una sau mai multe dintre următoarele specii: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* sau specii de creveți din familia *Penaeidae*, și anume *Penaeus japonicus, Penaeus kerathurus, Penaeus semisulcatus*. Dacă aceste specii nu sunt prezente, eșantionul trebuie să fie reprezentativ pentru alte specii decapode sensibile care sunt prezente. Având în vedere varietatea mare a gazdelor sensibile, gazdele pot fi selectate din genuri sau familii din ordinul *Decapoda* a căror sensibilitate a fost demonstrată în mod experimental sau în natură;

(ii) în râuri și în lacuri trebuie selectate una sau mai multe dintre următoarele specii: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* sau *Orconectes limosus*. În cazul în care aceste specii nu sunt prezente, eșantionul trebuie să fie reprezentativ pentru alte specii decapode sensibile care sunt prezente. Având în vedere varietatea mare a gazdelor sensibile, gazdele pot fi selectate din genuri sau familii din ordinul *Decapoda* a căror sensibilitate a fost demonstrată în mod experimental sau în natură;

(iii) dacă sunt prezente crustacee slăbite sau muribunde, sunt selectate în principal acestea. În cazul în care astfel de crustacee nu sunt prezente, cele selectate includ crustacee din cohorte de mărime diferită, și anume exemplare tinere și adulți din speciile sensibile selectate, reprezentate proporțional în eșantion.

I.2. Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar de categoria I în ceea ce privește WSD

I.2.1. Programe de supraveghere

(a) un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește WSD în conformitate cu partea B din anexa III la Directiva 2006/88/CE poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la directiva menționată din statul membru, zona sau compartimentul în cauză respectă cerințele relevante stabilite în anexa V la directiva menționată și atunci când toate aceste ferme și, când acest lucru este prevăzut în partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la Directiva 2006/88/CE, punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatice selecționate în conformitate cu punctul respectiv au fost supuse următorului program de supraveghere cu durata de doi ani, care cuprinde inspecții sanitare și colectarea de eșantioane în vederea testării.

Fermele sau punctele de prelevare au făcut obiectul inspecțiilor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 6.A din secțiunea II.

În această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul II.2. a avut rezultate negative în ceea ce privește infecția cu WSD și a fost exclusă orice suspiciune privind WSD, în conformitate cu metodele de diagnostic care figurează la punctul II.3;

(b) în cazul în care, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere menționat la litera (a), este confirmată o infecție cu WSD într-o fermă inclusă în programul de supraveghere respectiv și, prin urmare, a fost retras statutul sanitar de categoria II al fermei, ferma respectivă poate să își recâștige imediat statutul sanitar de categoria II și să continue punerea în aplicare a programului de supraveghere pentru a obține statutul „indemn de boală" fără să pună în aplicare un program de eradicare, astfel cum este descris la punctul I.2.2., cu condiția îndeplinirii cerințelor următoare:

(i) să fie o fermă continentală al cărei statut sanitar în ceea ce privește WSD este independent de statutul sanitar al apelor naturale din vecinătate în ceea ce privește această boală listată, în conformitate cu partea II punctul 3 din anexa V la Directiva 2006/88/CE;

(ii) ferma a fost golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar trebuie să fie de cel puțin șase săptămâni;

(iii) ferma a fost repopulată cu crustacee provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește WSD.

I.2.2. Programe de eradicare

I.2.2.1. Cerințe generale

Un stat membru, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește WSD poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile menționate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul cel puțin al programului de eradicare următor:

(a) măsurile minime de control stabilite în capitolul V secțiunea 4 din Directiva 2006/88/CE au fost aplicate în mod efectiv și o zonă de izolare, astfel cum se menționează la articolul 32 litera (b) din directiva respectivă, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, a fost instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial ca fiind infectată (infectate) cu WSD.

Zona de izolare trebuie să fi fost definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a WSD la crustaceele de crescătorie și la cele sălbatice, cum ar fi: numărul, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a crustaceelor în cadrul fermei infectate cu WSD; distanța la care se găsesc fermele învecinate și densitatea acestora; fermele cu care se intră în contact; speciile prezente la ferme; practicile de acvacultură aplicate în fermele afectate și în fermele învecinate acestora; condițiile hidrodinamice și alți factori pertinenți din punct de vedere epidemiologic care au fost identificați.

Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime:

(i) trebuie să fie stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată cu WSD și acest perimetru trebuie să corespundă:

1. în zone marine și în estuare: unei zone înscrise într-un cerc cu raza cel puțin egală cu o deplasare a mareei sau de cel puțin 5 km, reținându-se valoarea cea mai mare dintre cele două, având ca centru ferma declarată în mod oficial ca fiind infectată cu WSD, sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare; sau

2. în apele dulci: întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial ca fiind infectată cu WSD; autoritatea competentă poate limita extinderea perimetrului de protecție la anumite părți ale bazinului hidrografic, cu condiția să nu se compromită prevenirea răspândirii WSD;

(ii) trebuie să fie stabilit un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă:

1. în zone marine: unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, a cărei zonă de deplasare a mareei se suprapune cu zona de deplasare a mareei corespunzătoare perimetrului de protecție; sau unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, înscrisă într-un cerc cu raza de 10 km, calculată din centrul perimetrului de protecție; sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare; sau

2. în apele dulci: unei zone situate în exteriorul perimetrului de protecție stabilit;

(b) toate fermele în care sunt ținute specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial ca fiind infectate cu WSD, trebuie să facă obiectul unei anchete oficiale care include cel puțin următoarele elemente:

(i) prelevarea de eșantioane pentru testarea a 10 crustacee, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu WSD, sau pentru testarea a 150 de crustacee, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*; și

(ii) o inspecție sanitară; în fermele pentru care testele menționate la subpunctul (i) au avut rezultate negative, inspecțiile sanitare trebuie să continue o dată pe lună în timpul sezonului în care este probabil ca temperatura apei să atingă cele mai mari valori anuale, până când se renunță la perimetrul de protecție în conformitate cu punctul I.2.2.1. litera (c);

(c) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu WSD trebuie să fie golite, curățate, dezinfectate și supuse unei perioade de vid sanitar. Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni. După golirea tuturor fermelor declarate în mod oficial ca fiind infectate, trebuie să se respecte o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin trei săptămâni. Prezentul paragraf se aplică, de asemenea, noilor ferme declarate în mod oficial ca fiind infectate în timpul punerii în aplicare a programului de eradicare.

Atunci când intervine o perioadă de vid sanitar pentru fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate, perimetrele de protecție sunt transformate în perimetre de supraveghere.

Autoritatea competentă poate decide să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme care se află în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. Durata perioadei de vid sanitar este stabilită de autoritatea competentă pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz;

(d) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, trebuie să fie repopulate cu:

(i) crustacee provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește WSD; sau

(ii) pentru o perioadă de tranziție până la 31 decembrie 2020, cu crustacee provenind din state membre, din zone sau din compartimente cu un program de supraveghere a WSD aprobat.

Repopularea trebuie să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu WSD au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul I.2.2.1 litera (c);

(e) toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II a anexei IV la Directiva 2006/88/CE din statul membru, zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare selectate în conformitate cu partea I punctul 2 al doilea paragraf din anexa V la directiva menționată, trebuie să facă apoi obiectul cel puțin al programului prevăzut la punctul I.2.1.

I.2.2.2. Cerințe privind restabilirea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește WSD pentru compartimentele continentale care cuprind o singură fermă, declarate anterior ca fiind indemne de WSD

Un compartiment continental care cuprinde o singură fermă, care are statut sanitar de categoria I în ceea ce privește WSD, al cărui statut sanitar în ceea ce privește această boală listată este independent de cel al apelor naturale din vecinătate în conformitate cu partea II punctul 3 din anexa V la Directiva 2006/88/CE și al cărui statut sanitar de categoria I a fost retras în conformitate cu articolul 53 alineatul (3) din directiva respectivă, poate redobândi statutul sanitar de categoria I imediat ce autoritatea competentă a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

(a) ferma infectată cu WSD a fost golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar trebuie să fi fost de cel puțin șase săptămâni;

(b) ferma infectată cu WSD a fost repopulată cu crustacee provenind din state membre, din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește WSD.

I.3. Cerințe specifice pentru menținerea statutului sanitar „indemn de boală" (categoria I) în ceea ce privește WSD

În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, astfel cum se prevede la articolul 52 din Directiva 2006/88/CE, toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în partea II din anexa IV la respectiva directivă din statul membru, zona sau compartimentul în cauză sunt supuse unei inspecții sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 6.B prevăzut în secțiunea II, ținând seama de nivelul riscului de contaminare a fermei cu WSD.

În statele membre, în zonele sau în compartimentele în care există un număr limitat de ferme, iar supravegherea individualizată a acestor ferme nu furnizează date epidemiologice suficiente, programele de supraveghere în vederea menținerii statutului „indemn de boală" trebuie să includă puncte de prelevare selecționate în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul I.1.

Dintre aceste puncte de prelevare, 50 % trebuie să facă obiectul inspecției și al prelevării de eșantioane în fiecare an, prin rotație. Eșantionarea trebuie să se realizeze în conformitate cu tabelul 6.B prevăzut în secțiunea II. Eșantioanele trebuie să fie selectate, pregătite și examinate în conformitate cu metodele de diagnostic și de eșantionare descrise în secțiunea II, iar examenele de laborator trebuie să aibă rezultate negative în ceea ce privește agentul WSD.

Statutul „indemn de boală" se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic și de eșantionare prevăzute la punctul II.2 au rezultate negative pentru WSD și orice suspiciune privind WSD a fost exclusă, în conformitate cu ancheta oficială și cu metodele de diagnostic prevăzute la punctul II.3.

I.4. Cerințe privind eliminarea măsurilor de prevenire a răspândirii bolilor prevăzute la articolul 39 din Directiva 2006/88/CE (trecerea de la statutul sanitar de categoria V la statutul sanitar de categoria III) în ceea ce privește WSD

Un stat membru, o zonă sau un compartiment care are statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește WSD poate obține statutul sanitar de categoria III în ceea ce privește această boală listată, cu condiția ca:

(a) cerințele prevăzute la punctul I.2.2.1 literele (a), (b) și (c) să fi fost îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză trebuie să facă obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea WSSV din mediul fermei;

(b) toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu WSD și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, să fi fost repopulate cu crustacee provenind din state membre, din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește WSD;

(c) repopularea să fi avut loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial ca fiind infectate cu WSD au fost golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu litera (a);

(d) să nu fi fost detectată WSD în cursul perioadei de doi ani care urmează finalizării măsurilor menționate la literele (a) și (b) și să fi fost excluse suspiciunile în cursul acestei perioade, în conformitate cu procedurile stabilite la punctul II.3.

II. **Metode de diagnostic și de eșantionare**

II.1. Eșantioane

Eșantioanele de epidermă tegumentară, fie disecate, fie prezente pe picioarele care servesc la deplasare, pe pleopode, pe orificiile bucale sau pe branhiile animalului supus testelor, sunt fixate în etanol 95 % înainte de pregătirea eșantioanelor pentru PCR în două etape.

Pot fi colectate alte eșantioane, fixate pentru examenul histologic și pentru microscopia electronică prin transmisie, cu scopul de a susține datele referitoare la diagnostic obținute prin PCR.

II.2. Metode de diagnostic în vederea obținerii sau a menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește WSD

Metoda de diagnostic care trebuie utilizată pentru obținerea sau menținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește WSD în conformitate cu metodele și cu procedurile detaliate stabilite în partea 6 din anexa II este PCR în două etape.

În cazul în care prin PCR în două etape se obține un rezultat pozitiv, acesta trebuie să fie coroborat prin secvențierea produsului de amplificare, înainte de punerea în aplicare a primelor măsuri de combatere prevăzute la articolul 28 din Directiva 2006/88/CE, dacă este posibil prin evidențierea semnelor patognomonice de WSD la gazdele sensibile selectate, utilizând examenul histologic și microscopia electronică prin transmisie.

II.3. Ancheta oficială și metodele de diagnostic pentru excluderea suspiciunii privind infecția cu WSD sau confirmarea prezenței acesteia

În cazul în care trebuie confirmată prezența infecției cu WSD sau exclusă suspiciunea privind această infecție, în conformitate cu articolul 28 din Directiva 2006/88/CE, trebuie respectată următoarea procedură în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

(a) ancheta oficială trebuie să includă cel puțin o inspecție sanitară și o prelevare de eșantioane de la 10 crustacee, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu WSD, sau de la 150 de crustacee, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*. Eșantioanele trebuie să fie testate utilizând metoda de diagnostic prevăzută la punctul II.2 (PCR în două etape);

(b) prezența WSD este considerată confirmată atunci când PCR în două etape urmată de secvențiere, în conformitate cu metodele și cu procedurile detaliate stabilite în partea 6 din anexa II, are rezultate pozitive pentru WSSV și atunci când sunt prezente semne patognomonice de WSD la gazdele selectate.

Suspiciunea privind WSD poate fi exclusă în cazul în care aceste teste nu furnizează nicio altă dovadă referitoare la prezența WSD.

Tabelul 6.A

Programul de supraveghere pentru state membre, zone și compartimente pe parcursul perioadei de control de doi ani menționate la punctul I.2.1, care precede obținerea statutului „indemn de boală" în ceea ce privește WSD

	Numărul de inspecții clinice pe an	Numărul de examene de laborator pe an	Numărul de crustacee per eșantion
Ferme/situri de prelevare	1	1	150

Tabelul 6.B

Programe de supraveghere pentru state membre, zone sau compartimente în vederea menținerii statutului „indemn de boală" în ceea ce privește WSD, astfel cum se menționează la punctul I.3

Nivelul de risc	Numărul de inspecții sanitare	Numărul examenelor de laborator	Numărul de crustacee per eșantion
Ridicat	1 pe an	1 la 2 ani	150
Mediu	1 la 2 ani	1 la 2 ani	150
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 4 ani	150

ANEXA II

METODE ȘI PROCEDURI DE DIAGNOSTIC DETALIATE

I. **Introducere**

Prezenta anexă stabilește procedurile detaliate privind metodele de diagnostic care trebuie utilizate pentru examenele de laborator în cadrul programelor de eradicare și de supraveghere prevăzute în anexa I la prezenta decizie și pentru a confirma sau a exclude suspiciunea cu privire la prezența următoarelor boli neexotice enumerate în partea II din anexa IV la Directiva 2006/88/CE („boli listate") în conformitate cu articolul 57 litera (b) din directiva menționată:

1.	septicemia hemoragică virală (SHV)	Partea 1
2.	necroza hematopoietică infecțioasă (NHI)	Partea 1
3.	boala herpetică a crapului koi (*Koi herpesvirus disease* – KHVD)	Partea 2
4.	anemia infecțioasă a somonului (AIS)	Partea 3
5.	infecția cu *Marteilia refringens*	Partea 4
6.	infecția cu *Bonamia ostreae*	Partea 5
7.	boala petelor albe (*white spot disease* – WSD)	Partea 6

II. **Definiții**

În sensul prezentei anexe, „mediu de transport" înseamnă un mediu de cultură celulară care conține 10 % ser fetal bovin, 200 UI de penicilină, 200 µg de streptomicină și 200 µg de kanamicină pe mililitru sau alte antibiotice cu eficacitate dovedită.

PARTEA 1

METODE ȘI PROCEDURI DE DIAGNOSTIC DETALIATE PENTRU SUPRAVEGHEREA ȘI CONFIRMAREA NHI ȘI A SHV

I. **Metode și proceduri de diagnostic pentru supravegherea SHV și a NHI**

În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii statutului sanitar „indemn de boală" în ceea ce privește NHI sau SHV, astfel cum este prevăzut în partea 1 secțiunea I din anexa I, utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctele II.1 și II.2 din partea 1 a anexei menționate, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute la punctele I.1-I.6 următoare.

I.1. Pregătirea și expedierea eșantioanelor de la pești

I.1.1. Țesuturi utilizate pentru examinarea virusologică pe cultură celulară

Înainte de a fi trimise sau transferate către laborator, fragmentele de organe care urmează să fie examinate trebuie să fie prelevate cu ajutorul unor instrumente de disecție sterile și plasate în tuburi de plastic sterile care conțin mediul de transport.

Cantitatea de țesuturi de pește necesară pentru examenul virusologic pe cultură celulară și pentru RT-qPCR depinde de dimensiunile peștilor. Astfel, țesuturile din care se prelevează eșantioane sunt alevinul întreg (dacă lungimea corpului este mai mică de 4 cm), viscerele, inclusiv rinichii (dacă lungimea corpului este mai mare de 4 cm și mai mică de 6 cm) sau, pentru peștii de dimensiuni mai mari, rinichii, splina, inima și/sau encefalul, precum și lichidul ovarian al peștilor reproducători în perioada depunerii icrelor.

Lichidul ovarian sau seminal sau fragmente de organe de la cel mult zece pești pot fi reunite într-un tub steril care conține cel puțin 4 ml de mediu de transport; acestea reprezintă un eșantion global. Țesuturile din fiecare eșantion trebuie să cântărească cel puțin 0,5 grame (g).

Examenul virusologic pe cultură celulară trebuie să înceapă cât mai curând posibil și cel târziu la 48 de ore după colectarea eșantioanelor. În cazuri excepționale, examenul virusologic poate începe cel târziu la 72 de ore după colectarea materialului de examinat, cu condiția ca acesta să fie protejat de un mediu de transport și să fi fost respectate condițiile de temperatură în timpul transportului.

I.1.2. Eșantioane pentru testul RT-PCR sau RT-qPCR (*reversed transcriptase polymerase chain reaction*)

Se prelevează eșantioane de la pești în conformitate cu procedura descrisă la punctul I.1.1, cu ajutorul unui instrument steril; eșantioanele sunt transferate într-un tub de plastic steril care conține mediul de transport. Într-un tub se pot colecta țesuturi de la zece pești; acestea constituie un eșantion global. Cu toate acestea, în cazul în care cantitatea de inocul este mică, pot fi utilizate țesuturi de la cel mult cinci pești. În mod alternativ, eșantioanele pot fi comasate în reactivi de stabilizare a ARN, de exemplu 0,2 g de țesut/ml de reactiv, în conformitate cu recomandările producătorilor, dar fiecare pește trebuie prelucrat separat și nu trebuie să fie comasat cu alți pești în eșantioane, dată fiind cantitatea redusă de material care urmează să fie folosită pentru extracție.

Peștele întreg poate fi, de asemenea, trimis la laborator.

I.2. Expedierea eșantioanelor de la pești

Tuburile care conțin țesuturi de pește într-un mediu de transport și care sunt destinate culturii celulare sau analizei RT-PCR/RT-qPCR sunt amplasate în recipiente izolate, cum ar fi cutiile de polistiren cu pereți groși, împreună cu o cantitate suficientă de gheață sau de alt agent de răcire cu efect de răcire similar, pentru a asigura refrigerarea eșantioanelor pe durata transportului către laborator. Cu toate acestea, trebuie evitată congelarea eșantioanelor. Temperatura unui eșantion pe durata transportului nu trebuie să depășească niciodată 10 °C și recipientul de transport trebuie să mai conțină încă gheață în momentul primirii sau unul sau mai multe blocuri refrigeratoare trebuie să mai fie încă parțial sau total congelate.

Se pot trimite la laborator pești întregi dacă se pot respecta, pe durata transportului, condițiile de temperatură menționate la primul paragraf. Peștele întreg este ambalat în hârtie absorbantă și, în final, trebuie să fie expediat într-un sac de plastic. Pot fi, de asemenea, expediați pești vii.

I.3. Colectarea materialului de diagnostic suplimentar

În cazul în care laboratorul de diagnostic este de acord, se pot colecta și pregăti și alte țesuturi de pești în vederea unor examinări suplimentare.

I.4. Prepararea eșantioanelor pentru examinarea culturii celulare și RT-qPCR

I.4.1. Congelarea în cazuri excepționale

În cazul în care se întâlnesc dificultăți de ordin practic care împiedică prelucrarea eșantioanelor în intervalul de 48 de ore de la colectarea țesuturilor de pește, se pot admite congelarea eșantioanelor de țesuturi într-un mediu de transport la – 20 °C sau la o temperatură inferioară și efectuarea unui examen virusologic în decurs de 14 zile. Cu toate acestea, țesuturile de pește pot fi congelate și dezghețate numai o singură dată înaintea examinării. Trebuie păstrate evidențe care să ofere detalii privind motivul fiecărei congelări a eșantioanelor de țesuturi de pește.

I.4.2. Omogenizarea organelor

La laborator, țesuturile de pește conținute în tuburi trebuie să fie complet omogenizate, cu ajutorul unui stomacher, al unui blender sau al unui mojar cu pistil și nisip steril și plasate apoi în suspensie în mediul de transport de origine.

În cazul în care un eșantion este constituit dintr-un pește întreg cu lungimea sub 4 cm, acesta trebuie fragmentat cu ajutorul unui foarfece steril sau al unui scalpel după eliminarea părții corpului care se găsește în spatele orificiului anal. În cazul în care un eșantion este constituit dintr-un pește întreg cu lungimea cuprinsă între 4 cm și 6 cm, se vor colecta viscerele, inclusiv rinichii. În cazul în care un eșantion este constituit dintr-un pește întreg cu lungimea mai mare de 6 cm, eșantioanele de țesut trebuie să fie colectate conform descrierii de la punctul I.1. Eșantioanele de țesut se fragmentează cu ajutorul unui foarfece steril sau al unui scalpel, se omogenizează în conformitate cu descrierea de la primul paragraf al prezentului punct și se plasează în suspensie în mediul de transport.

Raportul final între țesuturi și mediul de transport trebuie să fie ajustat în laborator la 1:10.

I.4.3. Centrifugarea omogenatului

Omogenatul trebuie să fie centrifugat într-o centrifugă cu răcire, la o temperatură cuprinsă între 2 și 5 °C, la 2 000-4 000 × *g*, timp de 15 minute, iar supernatantul trebuie colectat și poate fi tratat, fie timp de 4 ore la 15 °C, fie timp de o noapte la o temperatură de 4-8 °C cu antibiotice. Dacă eșantionul a fost expediat într-un mediu de transport, tratamentul supernatantului cu antibiotice nu este necesar.

În cazul în care se întâlnesc dificultăți, cum ar fi un incubator defect sau probleme cu culturile celulare, care împiedică inocularea celulelor în cele 48 de ore de la colectarea eșantioanelor de țesuturi de pește, se poate congela supernatantul la – 80 °C și se poate efectua un examen virusologic în decurs de 14 zile.

Dacă supernatantul colectat este conservat la – 80 °C în intervalul de 48 de ore de la prelevarea eșantioanelor, el poate fi reutilizat o singură dată pentru un examen virusologic.

Înainte de a inocula celulele, se amestecă supernatantul în proporție egală cu un amestec de antiseruri împotriva serotipurilor indigene ale virusului necrozei pancreatice infecțioase (NPI), diluate corespunzător, și se incubează astfel timp de cel puțin o oră la 15 °C sau timp de cel mult 18 ore la 4 °C. Titrul antiserului trebuie să fie de cel puțin 1:2 000 într-un test de neutralizare a plajelor cu 50 % reducerea plajelor.

Tratarea tuturor inoculilor cu antiser împotriva virusului NPI are drept scop prevenirea apariției efectului citopatic (ECP), datorat virusului NPI, în culturile celulare inoculate. Acest tratament permite reducerea duratei examenelor virusologice, precum și a numărului de cazuri în care apariția ECP ar trebui considerată ca un indicator potențial al virusului SHV sau NHI.

Atunci când eșantioanele provin din unități de producție considerate ca fiind indemne de NPI, tratamentul inoculilor cu antiser împotriva virusului NPI poate fi omis.

I.4.4. Prepararea eșantioanelor pentru programele de supraveghere care utilizează testul RT-PCR și RT-qPCR

Dacă eșantioanele au fost plasate într-un mediu de transport, se efectuează procedura prevăzută la punctele I.4.2 și I.4.3. După centrifugare, se colectează supernatantul și se extrage ARN-ul. Dacă nu trebuie realizată o examinare suplimentară imediat după centrifugare, eșantioanele trebuie congelate imediat la – 20 °C sau la o temperatură inferioară acesteia.

Pentru analiza țesuturilor de pește conservate în reactiv de stabilizare a ARN, se realizează alte operațiuni în termenele următoare, pe eșantioane depozitate la diferite temperaturi:

eșantioane depozitate la 37 °C: o zi;

eșantioane depozitate la 25 °C: o săptămână;

eșantioane depozitate la 4 °C: o lună;

eșantioane depozitate la – 20 °C: termen nelimitat.

Eșantioanele globale conservate în reactiv de stabilizare a ARN trebuie să fie tratate la fel ca eșantioanele individuale în reactiv de stabilizare a ARN. În cazul eșantioanelor globale conservate în reactiv de stabilizare a ARN, volumul eșantionului nu trebuie să depășească volumul recomandat de producător pentru extracția ARN cu ajutorul kiturilor, de exemplu kiturile RNeasy Mini kits (Qiagen) sau cele similare. Dacă sunt comasate eșantioane mai mari, kiturile sau metodele de extracție trebuie să fie adaptate în consecință.

Eșantioanele colectate în reactivi de stabilizare a ARN nu trebuie să fie utilizate pentru culturi celulare.

I.4.5. Comasarea eșantioanelor pentru RT-qPCR

întrucât protocoalele RT-qPCR au o sensibilitate similară sau mai mare decât cea a metodelor de cultură celulară, se poate accepta utilizarea, pentru PCR, a supernatantului obținut din țesuturi de pește omogenizate provenind din organe prelevate de la maximum zece pești și comasate în mediul de cultură celulară. Cu toate acestea, datorită cantității mult mai mici de inocul utilizate pentru PCR, comparativ cu cultura celulară, toate țesuturile de pește trebuie să fie omogenizate cu atenție înainte de gruparea materialului pentru extracție.

Același principiu se aplică și în cazul în care se prelevează eșantioane în reactivi de stabilizare a ARN. Însă în acest caz este adesea dificil să se colecteze material reprezentativ de la maximum 10 pești într-un tub, iar numărul de pești per eșantion global trebuie prin urmare să fie redus la 2-5.

I.5. Examinarea virusologică pe cultură celulară

I.5.1. Culturi celulare și medii de cultură

Se cultivă celule din linia celulară 2 de la alevini din specia *Lepomis macrochirus* (BF-2) sau din linia celulară 2 din gonade de păstrăv-curcubeu (RTG-2) și celule de *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) sau de *Pimephales promelas* (FHM) la o temperatură cuprinsă între 20 și 30 °C într-un mediu adecvat, și anume mediu Eagle (*Eagle's Minimum essential medium* – MEM) sau o variantă a acestuia, la care s-au adăugat ser fetal bovin 10 % și antibiotice în concentrații standard.

Atunci când celulele sunt cultivate în flacoane închise, se recomandă să se tamponeze mediul cu bicarbonat. Mediul folosit pentru cultura celulară în unități deschise poate fi tamponat cu tris(hidroximetil)aminometan-HCl (Tris-HCl) (23 mM) și cu bicarbonat de sodiu (6 mM). PH-ul trebuie să fie de 7,6 ± 0,2.

Culturile celulare care se folosesc pentru inoculare cu material tisular de la pești trebuie să fie tinere, de obicei culturi celulare de o zi în monostrat, dacă este posibil; cu toate acestea, pot fi acceptate culturi cu vârste situate în intervalul 4-48 de ore. Celulele trebuie să fie în faza de creștere activă în momentul inoculării.

I.5.2. Inocularea culturilor celulare

Se inoculează o suspensie de organe tratată cu antibiotice în culturile celulare în două diluții, și anume diluția inițială și, în plus, o diluție de 1:10 din aceasta, rezultând diluții finale ale materialului tisular în mediul de cultură celulară de 1:100 și de 1:1 000, pentru a se evita interferențele omologilor. Trebuie inoculate cel puțin două linii celulare, astfel cum se menționează la punctul I.5.1. Raportul dintre cantitatea de inocul și volumul mediului de cultură celulară trebuie să fie de aproximativ 1:10.

Pentru fiecare diluție și fiecare linie celulară trebuie să se utilizeze o suprafață de cel puțin 2 cm^2, ceea ce corespunde unui godeu dintr-o placă de cultură celulară cu 24 de godeuri. Trebuie să fie utilizate plăci de cultură celulară, atunci când este posibil.

I.5.3. Incubarea culturilor celulare

Culturile celulare inoculate sunt incubate la 15 °C timp de șapte până la zece zile. În cazul în care culoarea mediului de cultură celulară se modifică din roșu în galben, indicând o acidifiere a mediului, se ajustează pH-ul cu ajutorul unei soluții sterile de bicarbonat sau cu ajutorul unor substanțe echivalente, pentru a garanta sensibilitatea culturii celulare la infecția virală.

Cel puțin la fiecare șase luni sau în cazul în care se suspectează o scădere a sensibilității celulare se efectuează titrarea stocurilor de virusuri SHV și NHI congelate, pentru a se verifica sensibilitatea culturilor celulare la infecție. Se utilizează procedura stabilită în secțiunea III, dacă este posibil.

I.5.4. Microscopia

Culturile celulare inoculate trebuie să fie verificate cu regularitate, cel puțin de trei ori pe săptămână, pentru a se observa apariția ECP, cu un grosisment între 40 × și 150 ×. În cazul în care ECP este evident, se încep imediat procedurile de identificare a virusului în conformitate cu punctul I.6.

I.5.5. Subcultivarea

În cazul în care nu se produce niciun ECP după prima incubație de șapte până la zece zile, se procedează la o subcultivare pe culturi celulare proaspete, folosindu-se o suprafață celulară similară cu cea din cultura primară.

Părți alicote din mediu (supernatant) provenind de la toate culturile sau godeurile care constituie cultura primară se reunesc într-un pool pentru fiecare linie celulară, la 7-10 zile de la inoculare. Pool-urile respective sunt apoi inoculate pe culturi celulare omoloage, nediluate și diluate 1:10 (rezultând în final diluții ale supernatantului de respectiv 1:10 și 1:100), în conformitate cu descrierea de la punctul I.5.2. Se inoculează, de asemenea, părți alicote de 10 % din mediul care constituie cultura primară direct într-un godeu cu culturi celulare proaspete (subcultivare godeu la godeu). Inocularea poate fi precedată de o preincubare a diluțiilor cu antiser împotriva virusului NPI la o diluție corespunzătoare, în conformitate cu descrierea de la punctul I.4.3.

Se incubează apoi culturile inoculate timp de 7-10 zile la 15 °C și se examinează ținându-se cont de dispozițiile de la punctul I.5.4.

În cazul în care se produce un ECP toxic în cursul primelor trei zile de incubație, se realizează o subcultivare în acest stadiu, dar în acest caz celulele trebuie să fie incubate timp de șapte zile și supuse unei noi subcultivări, cu durata de incubație tot de șapte zile. În cazul în care se produce un ECP toxic după trei zile, celulele sunt pasate o dată și incubate pentru a se ajunge la numărul total de 14 zile de la prima inoculare. Nu trebuie să existe semne de toxicitate în cursul ultimelor șapte zile de incubație.

În cazul în care se produce o contaminare bacteriană în ciuda tratamentului cu antibiotice, subcultivarea trebuie să fie precedată de o centrifugare la 2 000-4 000 × g timp de 15-30 de minute, la o temperatură de 2-5 °C, sau de o filtrare a supernatantului printr-un filtru (membrană cu procent scăzut de absorbție a proteinelor) de 0,45 µm sau de ambele. În plus, subcultivarea trebuie să urmeze aceleași proceduri ca cele descrise pentru producerea ECP toxic în al patrulea paragraf de la prezentul punct.

În cazul în care nu se produce ECP, testul poate fi declarat negativ.

I.6. Identificarea virusului

Dacă se observă apariția ECP într-o cultură celulară, mediul (supernatantul) este colectat și examinat prin una sau mai multe din tehnicile următoare: testul de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), testul de imunofluorescență (IF), neutralizarea, RT-PCR sau RT-qPCR. În cazul în care aceste teste nu au permis identificarea definitivă a virusului într-o săptămână, supernatantul trebuie trimis la un laborator de referință național sau la laboratorul de referință al Uniunii Europene pentru bolile peștilor, menționat în anexa VI la Directiva 2006/88/CE, în vederea identificării imediate.

I.6.1. ELISA

Se efectuează un test ELISA sandviș dublu anticorp în vederea identificării izolatului de virus. Plăcile de microtitrare sunt umplute cu 50 µl/godeu (0,9 pg) de soluție de imunoglobuline (Ig) din antiseruri de iepure împotriva virusului NHI sau a virusului SHV, purificate cu proteina A, de calitate dovedită, diluate într-un tampon de carbonat (pH 9,6) conținând 15 mM azidă de sodiu, și sunt incubate la 4 °C de-a lungul unei perioade cuprinse între 18 ore și 2 săptămâni.

Pe o placă de diluare, fiecare eșantion conținând 1 % Triton X-100 și controalele pozitive se diluează cu o soluție tampon [și anume, tampon fosfat salin (PBS)-T-BSA, 1 % BSA] în patru raporturi de diluție, respectiv nediluat, 1:4, 1:16 și 1:64. Se spală plăcile ELISA în PBS conținând 0,05 % Tween-20 (PBS-T) și 50 µl din fiecare diluție se transferă de pe placa de diluare pe placa ELISA spălată și umplută.

Plăcile ELISA se incubează timp de 30 de minute la 37 °C, apoi se spală și se lasă la incubat timp de 30 de minute la 37 °C în prezența anticorpilor monoclonali specifici (și anume MAb IP5B11 pentru identificarea VHSV și Hyb 136-3 pentru identificarea VNHI). Se transferă pe placa ELISA 50µl anticorpi antișoarece de iepure conjugați cu peroxidază din hrean (HRP), diluați 1:1 000 în PBS-T-BSA.

În cele din urmă, după o nouă spălare, sunt declanșate reacțiile adăugând 50 µl de orto-fenilendiamină (OPD) în fiecare godeu. Plăcile ELISA se incubează timp de 20 de minute la temperatura camerei, în întuneric, iar reacția se oprește prin adăugarea a 100 µl de 0,5 M H_2SO_4 în fiecare godeu.

Absorbanța va fi monitorizată la o lungime de undă de 492 și 620 nm într-un cititor ELISA. Eșantioanele trebuie să fie declarate pozitive sau negative, după compararea rezultatelor testului cu valorile absorbanței pentru controalele pozitive și negative. În general, eșantioanele cu absorbanță totală (A) < 0,5 pentru material nediluat sunt considerate negative, eșantioanele cu valori A cuprinse între 0,5 și 1,0 sunt considerate suspecte, iar eșantioanele cu valori A > 1,0 sunt considerate pozitive.

Pot fi folosite alte variante ELISA cu eficacitate similară dovedită, în locul celor menționate la prezentul punct.

I.6.2. Imunofluorescența (IF)

Identificarea agenților patogeni listați VSHV și VNHI trebuie să fie efectuată prin infectarea celulelor în plăci cu 96 de godeuri „Black", plăci clasice cu 24 de godeuri sau pe lamele în plăci cu 24 de godeuri. La identificarea VNHI sau a VSHV sau a ambelor virusuri prin infectarea celulelor pe lamele, trebuie să se aplice următorul protocol:

(a) lamelele sunt însămânțate cu celule la o densitate care să asigure o confluență între 60 % și 90 % după 24 de ore de la cultivare. Dacă este posibil se folosesc celule EPC în acest scop, datorită aderenței lor ridicate la suprafețele de sticlă, dar se pot folosi și alte linii celulare, de exemplu BF-2, RTG-2 sau FHM. Se inoculează 150 µl de supernatant al culturii celulare în două diluții diferite (1:10 și 1:1 000) în două exemplare pe culturi monostrat cu vârsta de o zi și se incubează la 15 °C timp de 24 de ore;

(b) ulterior, se elimină mediul de cultură celulară și monostraturile de celule infectate sunt fixate cu 0,5 ml soluție apoasă de acetonă rece (80 % vol/vol). Fixarea are loc sub hota de tiraj timp de 15 minute la temperatura camerei, apoi se îndepărtează soluția de acetonă și se usucă lamelele la aer timp de cel puțin 30 de minute. În acest stadiu, plăcile trebuie să fie prelucrate imediat sau depozitate la o temperatură de – 20 °C în vederea utilizării ulterioare;

(c) anticorpii monoclonali specifici (și anume MAb IP5B11 pentru identificarea VSHV și Hyb 136-3 pentru identificarea VNHI) sunt diluați în PBST 0,01 M, cu pH 7,2, la diluția recomandată de către furnizorul de anticorpi monoclonali; aceștia sunt adăugați apoi la monostraturile fixate, utilizându-se 50-100 µl pentru fiecare godeu, și plăcile se incubează timp de o oră la 37 °C într-o etuvă umedă;

(d) lamelele trebuie să fie spălate ușor de trei ori cu PBS conținând 0,05 % Tween-20 (PBS-T), iar tamponul trebuie să fie eliminat complet după ultima clătire. Ulterior, celulele sunt incubate timp de o oră la 37 °C cu anticorpi împotriva imunoglobulinelor de șoarece conjugați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) sau cu tetrametilrodamină-5(și 6)-izotiocianat (TRITC), utilizați ca anticorpi primari, diluați în conformitate cu instrucțiunile furnizorului; se spală din nou cu PBS-T și se usucă. Culturile colorate se montează pe lame de sticlă folosindu-se o soluție de glicerol salin și se examinează la lumină ultravioletă incidentă. Se folosesc oculare de 10 × sau 12 × și obiective de × 25 sau × 40, ale căror aperturi numerice sunt > 0,7 și respectiv > 1,3.

Alternativ, se pot aplica și alte tehnici IF cu privire la culturile celulare, la fixare și la anticorpii de referință, cu o eficacitate similară dovedită.

I.6.3. Neutralizarea

Se elimină celulele din supernatantul colectat, prin centrifugare (2 000-4 000 × *g*) sau prin filtrare cu membrană (0,45 µm) cu procent scăzut de absorbție a proteinelor, apoi se diluează supernatantul 1:100 și 1:10 000 în mediul de cultură celulară.

Se amestecă părți alicote din minimum două diluții ale supernatantului și se incubează separat timp de 60 de minute la 15 °C în părți egale cu următorii reactivi:

(a) ser conținând anticorpi împotriva VSHV la o diluție de 1:50 (vol:vol);

(b) ser conținând anticorpi împotriva VNHI la o diluție de 1:50 (vol:vol);

(c) amestec de antiser împotriva serotipurilor indigene ale VNPI la o diluție de 1:50 (vol:vol);

(d) doar mediu (control pozitiv).

50 µl din fiecare amestec format din supernatantul cu virusul de identificat și ser se inoculează pe cel puțin două culturi celulare și se incubează la 15 °C. Se urmărește apariția ECP așa cum este descris la punctul I.5.4.

Tulpinile de VSHV și izolatele care nu reacționează la testele de neutralizare trebuie să fie identificate prin IF sau ELISA.

Alternativ, se pot aplica și alte teste de neutralizare, cu eficacitate similară dovedită.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Pregătirea ARN-ului viral

Toate manipulările ARN-ului se realizează pe gheață, utilizând mănuși.

Se extrage ARN-ul prin metoda fenol-cloroform sau prin cromatografie de afinitate pe coloane, în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Pot fi utilizate kituri de extracție a ARN-ului disponibile pe piață, care permit obținerea unui ARN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele RT-PCR detaliate la punctele de mai jos.

ARN-ul este resuspendat în apă distilată fără ARN-ază (și anume, apă tratată cu 0,1 % pirocarbonat de dietil) sau cu o soluție tampon de eluție adecvată.

I.6.4.2. RT-PCR

Următorii primeri se utilizează pentru detectarea VNHI:

Primer sens 5′-AGA-GAT-JRC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

Primer antisens 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

Se utilizează următoarele cicluri (RT-PCR într-o singură etapă): 1 ciclu: 50 °C timp de 30 de minute; 1 ciclu: 95 °C timp de 2 minute; 30 de cicluri: 95 °C timp de 30 de secunde, 50 °C timp de 30 de secunde, 72 °C timp de 60 de secunde; 1 ciclu: 72 °C timp de 7 minute și imersie la temperatura de 4 °C.

Următorii primeri se utilizează pentru detectarea VSHV:

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

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

Se utilizează următoarele cicluri (RT-PCR într-o singură etapă): 50 °C timp de 30 de minute, 95 °C timp de 15 minute, 35 de cicluri la 94 °C timp de 30 de secunde, 55 °C timp de 30 de secunde și 68 °C timp de 60 de secunde. Ulterior, reacția se menține la o temperatură de 68 °C timp de 7 minute.

Cantitatea și specificitatea reacțiilor RT-PCR se evaluează prin electroforeză în gel de agaroză 1,5 % cu bromură de etidiu, iar produșii de reacție trebuie să fie examinați prin transiluminare ultravioletă. Pentru VNHI se poate observa un produs de amplificare prin PCR de 693 pb. În ceea ce privește VSHV, dimensiunea produsului de amplificare este de 505 pb.

Rezultatele PCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, și anume ar putea fi necesară optimizarea protocoalelor termice, în funcție de termociclul utilizat. În plus, se pot obține rezultate fals-pozitive din cauza unor erori în ceea ce privește atașarea primerilor sau din cauza contaminării în laborator. Prin urmare, pentru a se evita orice dubiu, trebuie să fie incluse controale pozitive și negative adecvate și produse de amplificare a secvenței. În ceea ce privește primerii VSHV, utilizarea celulelor BF-2 necesită o atenție specială, deoarece primerii pot reacționa cu ADN-ul/ARN-ul liniei celulare, producând rezultate fals-pozitive de dimensiuni similare. În cazul în care testul se realizează pe supernatant provenind de la celule BF-2, toate fragmentele amplificate prin PCR trebuie să fie secvențiate.

I.6.4.3. RT-qPCR pentru VHSV

În ceea ce privește VSHV, amplificarea se efectuează utilizând următorii primeri și următoarea sondă:

Primer sens: 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′;

Primer antisens: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′;

și sondă: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

RT-qPCR într-o singură etapă:

Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Succesiunea ciclurilor: 50 °C timp de 30 de minute, 95 °C timp de 15 minute, 40 de cicluri la 94 °C timp de 15 secunde, 60 °C timp de 40 de secunde și 72 °C timp de 20 de secunde; se ajustează dacă este necesar. Alternativ, se pot aplica și alte versiuni de RT-PCR sau de RT-qPCR, cu eficacitate similară dovedită.

I.6.4.4. RT-qPCR pentru VNHI

În ceea ce privește VNHI, amplificarea se efectuează utilizând următorii primeri și următoarea sondă:

Primer sens: 5′- AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′;

Primer antisens: 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3′;

și sondă: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

RT-qPCR în două etape:

Dat fiind că analiza se bazează pe o amplificare în două etape, trebuie să se acorde mai multă atenție manipulării tuburilor între reacții, pentru a preveni contaminarea.

Succesiunea ciclurilor (după etapa în timp real): 50 °C timp de 2 minute, 95 °C timp de 10 minute, apoi 40 de cicluri la 95 °C timp de 15 secunde și 60 °C timp de 1 minut; se efectuează ajustări, dacă este necesar.

Alternativ, se pot aplica și alte versiuni de RT-PCR sau de RT-qPCR, cu eficacitate similară dovedită.

II. **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru confirmarea sau excluderea suspiciunii privind SHV sau NHI sau privind ambele boli, atunci când există suspiciuni privind existența unor focare**

În cazul în care este necesar un examen de laborator pentru confirmarea sau infirmarea prezenței NHI sau a SHV sau a ambelor boli în conformitate cu articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE, utilizând metodele de diagnostic prevăzute în partea 1 punctul II.3 din anexa I, se aplică metodele și procedurile de diagnostic detaliate descrise în continuare:

(a) izolarea convențională a virusului, urmată de identificarea acestuia prin seroneutralizare sau prin metode imunochimice sau moleculare;

(b) detectarea virusului prin RT-PCR sau RT-qPCR;

(c) alte tehnici de diagnostic, cum ar fi IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

II.1. Izolarea convențională a virusului, urmată de identificarea acestuia

II.1.1. Selectarea eșantioanelor

Trebuie selecționați pentru examinare cel puțin 10 pești care prezintă semnele tipice de NHI sau de SHV.

II.1.2. Pregătirea și expedierea eșantioanelor de la pești

Pregătirea și expedierea în vederea izolării convenționale a virusului se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.2.

II.1.3. Colectarea materialului de diagnostic suplimentar

Colectarea materialului suplimentar în vederea izolării convenționale a virusului se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.3.

II.1.4. Prepararea eșantioanelor pentru examinarea culturii celulare

Pregătirea eșantioanelor pentru examinarea culturii celulare în vederea izolării convenționale a virusului se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.4.

II.1.5. Examinarea virusologică pe cultură celulară

Examinarea virusologică în vederea izolării convenționale a virusului se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.5.

II.1.6. Identificarea virusului

Identificarea virusului în vederea izolării convenționale a acestuia se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.6.

II.2. Detectarea virusului prin RT-qPCR

II.2.1. Selectarea eșantioanelor

Selectarea eșantioanelor în vederea detectării virusului prin RT-qPCR se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.1.2.

II.2.2. Pregătirea și expedierea eșantioanelor de la pești

Pregătirea și expedierea eșantioanelor în vederea detectării virusului prin RT-qPCR se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.2.

II.2.3. Colectarea materialului de diagnostic suplimentar

Colectarea materialului de diagnostic suplimentar în vederea detectării virusului prin RT-qPCR se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.3.

II.2.4. Prepararea eșantioanelor pentru RT-qPCR

Pregătirea eșantioanelor în vederea detectării virusului prin RT-qPCR se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile menționate la punctul I.6.4.1.

II.2.5. RT-qPCR

Detectarea virusului prin RT-qPCR se efectuează în conformitate cu metodele și procedurile prevăzute la punctele I.6.4.1, I.6.4.3 și I.6.4.4.

II.3. Alte tehnici de diagnostic

Supernatantul preparat conform descrierii de la punctul I.4.3. poate fi supus testului ELISA, testului de imunofluorescență indirectă (IFAT) sau RT-PCR în conformitate cu punctele I.6.1, I.6.2 și, respectiv, I.6.4. Materialul tisular poate fi supus și altor tehnici de diagnostic, cum ar fi IFAT pe secțiuni congelate sau imunohistochimie pe material tisular fixat cu formol. Aceste tehnici rapide trebuie să fie completate cu un examen virusologic, în conformitate fie cu punctul II litera (a), fie cu punctul II litera (b), la mai puțin de 48 de ore de la prelevarea de eșantioane, dacă:

(a) s-a obținut un rezultat negativ; sau

(b) s-a obținut un rezultat pozitiv cu un material care reprezintă primul caz de NHI sau SHV.

III. **Titrarea destinată verificării sensibilității culturilor celulare la infecție**

În cazul în care se efectuează titrarea în vederea verificării sensibilității culturilor celulare la infecție, astfel cum se menționează la punctul I.5.3, trebuie respectate procedurile stabilite în următoarele paragrafe ale prezentului punct.

Trebuie să se utilizeze cel puțin două izolate de VSHV și un izolat de VNHI. Aceste izolate trebuie să fie reprezentative pentru principalele grupe de virusuri din Uniunea Europeană, de exemplu în ceea ce privește VSHV, un izolat patogen provenind de la păstrăvul curcubeu din apă dulce și un izolat patogen din mediul marin pentru calcan și, în ceea ce privește VNHI, o tulpină patogenă pentru păstrăvul curcubeu provenind din Uniunea Europeană. Trebuie să se folosească izolate bine definite provenind din statele membre. Loturile de virusuri având un număr redus de pasaje pe culturi celulare sunt cultivate în flacoane de culturi celulare pe celule BF-2 sau RTG-2 pentru VSHV și pe celule EPC sau FHM pentru VNHI. Trebuie să se folosească un mediu de cultură celulară la care se adaugă cel puțin 10 % ser. Pentru inoculare se folosește un indicator MOI cu valoare scăzută (< 1).

Atunci când ECP este total, virusul este colectat prin centrifugarea supernatantului culturii celulare la 2 000 × *g* timp de 15 minute, sterilizat prin filtrare printr-o membrană de 0,45 µm și repartizat în criotuburi etichetate. Virusul este păstrat la – 80 °C.

La o săptămână după congelare, se decongelează în apă rece trei fiole din fiecare virus și se titrează pe liniile celulare respective. Fiecare izolat de virus se decongelează și se titrează cel puțin o dată la șase luni sau în cazul în care se suspectează o scădere a sensibilității unei linii celulare.

Procedurile de titrare trebuie să fie descrise în detaliu și trebuie să se aplice aceeași procedură de fiecare dată.

Titrarea prin diluție limită trebuie să cuprindă cel puțin șase replicări din fiecare serie de diluții. Titrurile sunt comparate cu titrurile obținute anterior. În cazul în care titrul unuia dintre cele trei izolate de virus scade cu un factor de 2 log sau mai mult față de titrul inițial, linia celulară nu mai este folosită în scopuri de supraveghere.

În cazul în care se conservă în laborator linii celulare diferite, fiecare linie trebuie examinată separat.

Registrele cu evidențele de laborator se păstrează cel puțin 10 ani.

PARTEA 2

METODE ȘI PROCEDURI DE DIAGNOSTIC DETALIATE PENTRU SUPRAVEGHEREA ȘI CONFIRMAREA BOLII HERPETICE A CRAPULUI KOI (KHVD)

I. **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru confirmarea prezenței KHVD sau pentru excluderea suspiciunii privind această boală**

În cazul în care este necesar un examen de laborator pentru confirmarea prezenței KHVD sau pentru excluderea suspiciunii privind această boală în conformitate cu articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE, utilizând metodele de diagnostic prevăzute în partea 2 secțiunea III din anexa I, se aplică metodele și procedurile de diagnostic detaliate descrise la punctele I.1-I.2 din prezenta parte.

I.1. Pregătirea eșantioanelor de la pești

În scopul diagnosticării se pot utiliza pești (expediați vii sau sacrificați și ambalați separat în recipiente aseptice sigilate) sau, alternativ, organe congelate sau fragmente de organe conservate în etanol de concentrație 80 % – etanol absolut sau într-un mediu de transport viral (în vederea prelucrării în termen de 48 de ore de la colectare) pentru testare prin metode bazate pe PCR convențională sau pe qPCR.

Pentru detectarea KHV se vor colecta branhiile și rinichii; în plus, splina, encefalul și intestinul pot fi incluse într-un eșantion suplimentar separat. În cazurile de infecție acută pot fi comasate țesuturi provenind de la cel mult cinci pești.

De asemenea, în anumite cazuri pot fi utilizate eșantioane neletale, cum ar fi sângele, frotiurile din branhii, biopsia branhiilor și prelevările de mucus (pot fi utilizați pești foarte valoroși în cazul suspiciunii privind prezența KHV).

I.1.1. Extracția ADN-ului

ADN-ul trebuie să fie extras în conformitate cu procedurile standard.

Pot fi utilizate kituri de extracție a ADN-ului disponibile pe piață, care permit obținerea unui ADN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR menționate la punctul I.2.

I.2. Detectarea și identificarea agentului prin metode bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR)

I.2.1. qPCR pentru detectarea KHV

Pentru detectarea KHV se efectuează următorul test qPCR:

Primer sens (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

Primer antisens (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

și sondă (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Succesiunea ciclurilor: un ciclu la 95 °C timp de 15 minute, apoi 40 de cicluri la 94 °C timp de 15 secunde și la 60 °C timp de 60 de secunde. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Cu toate acestea, alternativ se pot aplica și alte versiuni de qPCR, cu eficacitate similară dovedită.

I.2.2. PCR convențională pentru detectarea KHV

Se utilizează testul descris la acest punct, care vizează gena timin kinaza (TK) a KHV. Cu toate acestea, în locul său pot fi folosite alte teste PCR cu sensibilitate și specificitate similare demonstrate.

Primer sens (KHV-TKf): 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′;

Primer antisens (KHV-TKr): 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Succesiunea ciclurilor: un ciclu la 95 °C timp de 5 minute, urmat de 35 de cicluri la 95 °C timp de 30 de secunde, la 52 °C timp de 30 de secunde, la 72 °C timp de un minut și un ciclu la 72 °C timp de 10 minute. Dimensiunea produsului ar trebui să fie de 409 pb.

Rezultatele PCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, și anume ar putea fi necesară optimizarea protocoalelor termice, în funcție de termociclul utilizat. În plus, se pot obține rezultate fals pozitive din cauza unor erori în ceea ce privește atașarea primerilor sau din cauza contaminării. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Cu toate acestea, alternativ se pot aplica și alte versiuni de PCR, cu eficacitate similară dovedită.

Prima detectare într-o anumită zonă trebuie să fie confirmată prin secvențiere sau trimisă la un laborator național de referință sau la un laborator de referință al Uniunii Europene pentru bolile peștilor, menționat în anexa VI la Directiva 2006/88/CE, în scopul identificării imediate a virusului.

II. **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru supravegherea KHVD**

În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește KHVD, astfel cum este prevăzut în partea 2 secțiunea I din anexa I, utilizând metodele de diagnostic prevăzute în partea 2 secțiunea II sau III din anexa menționată, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute la următoarele puncte II.1 și II.2 din prezenta parte.

II.1. Pregătirea eșantioanelor de la pești

Dacă este posibil, trebuie să fie incluși în eșantion pești care au fost ținuți o perioadă de timp îndelungată la temperaturi propice dezvoltării virusului (și anume o perioadă de două până la trei săptămâni la temperaturi cuprinse între 15 °C și 26 °C). Dacă este posibil, eșantioanele sunt colectate la minimum 24 de ore, dar nu mai târziu de 72 de ore după practicile de gestionare care pot reactiva virusul la peștii-vector, cum ar fi prinderea în plase sau transportul, în vederea sporirii șanselor de detectare a KHV.

În scopul supravegherii KHVD se pot trimite pești vii sau sacrificați și ambalați separat în recipiente aseptice sigilate sau, alternativ, organe congelate sau fragmente de organe conservate în alcool 80 %-100 % sau într-un mediu de transport viral (în vederea prelucrării în termen de 48 de ore după colectare) pentru testare prin metode bazate pe PCR. Pentru supravegherea KHVD se va colecta țesut din branhii și din rinichi.

În scopul supravegherii KHVD, trebuie să se evite comasarea țesuturilor de la mai mulți pești, dacă este posibil. Dacă această comasare este necesară, se vor comasa țesuturi care provin de la cel mult doi pești. Eșantioanele de dimensiune mai mare trebuie să fie omogenizate cu ajutorul unui mojar și pistil sau al unui stomacher și trebuie prelevate subeșantioane extrase înainte de clarificare, în vederea extracției ADN-ului În mod alternativ, pot fi colectate subeșantioane din fiecare țesut inclus în eșantion și pot fi introduse în tuburi pentru liză.

II.1.1. Extracția ADN-ului

ADN-ul trebuie să fie extras în conformitate cu procedurile standard. Pot fi utilizate kituri de extracție a ADN-ului disponibile pe piață, care permit obținerea unui ADN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR menționate la punctul II.2.

Raportul acceptabil între țesuturi și mediu este de 1:9 g/v. Testele trebuie să fie realizate pe 20-25 mg de țesut.

II.2. Supravegherea KHVD prin metode bazate pe PCR

Pentru supravegherea KHV trebuie utilizată qPCR. În cazul în care apar eșantioane pozitive într-o zonă care nu a fost anterior confirmată pozitiv, rezultatele testelor trebuie să fie confirmate:

(a) fie prin secvențierea produsului PCR sau nested PCR, obținut din eșantioane.

Secvența consens obținută trebuie să coincidă (cel puțin în proporție de 98 %) cu secvențele de referință;

(b) fie, alternativ, eșantioanele pot fi trimise la un laborator național de referință pentru confirmare.

II.2.1. qPCR pentru detectarea KHV

Trebuie aplicat protocolul de qPCR descris în cele ce urmează:

Primer sens (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

Primer antisens (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

și sondă (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Succesiunea ciclurilor: un ciclu la 95 °C timp de 15 minute, apoi 50 de cicluri la 94 °C timp de 15 secunde și la 60 °C timp de 60 de secunde.

Rezultatele qPCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, și anume ar putea fi necesară optimizarea protocoalelor termice, în funcție de termociclul utilizat. În plus, se pot obține rezultate fals-pozitive din cauza unor erori în ceea ce privește atașarea primerilor sau din cauza contaminării în laborator. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Cu toate acestea, alternativ se pot aplica și alte versiuni de qPCR, cu eficacitate similară dovedită.

II.2.2. PCR convențională pentru confirmarea detectării KHV

Pentru confirmarea prezenței infecției cu KHV se utilizează protocolul generic de nested PCR descris în tabelul 2.1 de mai jos, urmat de secvențierea produsului de amplificare.

Tabelul 2.1

Primeri și condiții pentru protocolul de nested PCR care vizează toate virusurile herpetice ale ciprinidelor (CyHV-1, CyHV-2 și CyHV-3)

Denumirea primerului	Secvența	Succesiunea ciclurilor	Dimensiunea produsului
CyHVpol-sens	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	Prima fază PCR *1 ciclu:* 95 °C timp de 2 minute *40 de cicluri:* 95 °C timp de 30 de secunde 55 °C timp de 30 de secunde 72 °C timp de 45 de secunde *1 ciclu:* 72 °C timp de 10 de minute	362 pb
CyHVpol-antisens	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Denumirea primerului	Secvența	Succesiunea ciclurilor	Dimensiunea produsului
CyHVpol-intern sens	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	A doua fază PCR *1 ciclu:* 95 °C timp de 2 minute *40 de cicluri:* 95 °C timp de 30 de secunde 55 °C timp de 30 de secunde 72 °C timp de 45 de secunde *1 ciclu:* 72 °C timp de 10 de minute	339 pb
CyHVpol-intern antisens	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

Rezultatele PCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, și anume ar putea fi necesară optimizarea protocoalelor termice, în funcție de termociclul utilizat. În plus, se pot obține rezultate fals-pozitive din cauza unor erori în ceea ce privește atașarea primerilor sau din cauza contaminării în laborator. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Alternativ, se pot aplica și alte versiuni de PCR, cu eficacitate similară dovedită.

Secvențierea poate fi efectuată de laborator sau de societăți externe specializate în secvențiere. Rezultatele secvențierii trebuie să fie analizate comparând secvențele cu secvențele de referință ale KHV cunoscute (numere de acces la GenBank AP008984, DQ657948 și DQ177346). Secvența consens obținută trebuie să coincidă cel puțin în proporție de 98 % cu aceste secvențe de referință.

PARTEA 3

METODE ȘI PROCEDURI DE DIAGNOSTIC DETALIATE PENTRU SUPRAVEGHEREA ȘI CONFIRMAREA ANEMIEI INFECȚIOASE A SOMONULUI (AIS)

I. **Proceduri de eșantionare pentru supravegherea și combaterea AIS**

În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul programelor de supraveghere și de eradicare prevăzute în partea 3 din anexa I sau pentru a confirma sau a exclude prezența AIS în conformitate cu articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE, trebuie aplicate metodele și procedurile detaliate prevăzute la punctele I.1, I.2 și I.3 din prezenta secțiune.

I.1. Pregătirea eșantioanelor de la pești

În scopul examinării de laborator pentru depistarea prezenței AIS, eșantioanele de pești nu trebuie să fie comasate, în măsura în care este posibil. Cu toate acestea, în scopul supravegherii AIS, se acceptă comasarea a 2-5 pești.

Trebuie prelevate eșantioane pentru analiza RT-PCR de la toți peștii care fac parte din eșantion. Se prelevă un fragment de rinichi median de la pești cu ajutorul unui instrument steril și acesta se transferă într-un microtub de centrifugare care conține 1 ml de soluție de conservare a ARN, cu eficacitate dovedită. Într-un tub cu soluție de transport se pot colecta țesuturi de la cel mult cinci pești; acesta constituie un eșantion global. Greutatea țesutului dintr-un eșantion trebuie să fie de 0,5 g. În cazul în care peștii sunt prea mici pentru a preleva eșantioane cu greutatea necesară, se pot preleva fragmente din rinichi, inimă, splină, ficat sau cecurile pilorice, în această ordine a preferințelor, pentru a se obține o greutate de 0,5 g.

Țesuturile destinate unei examinări histologice sunt prelevate numai de la peștii sacrificați recent, cu constituție normală, care prezintă semne clinice sau care au făcut obiectul unor constatări *post-mortem* compatibile cu prezența AIS. Se prelevă orice leziune externă sau internă și, în toate cazurile, de la fiecare pește se prelevă, cu ajutorul unui scalpel, eșantioane de rinichi median, de inimă, de ficat, de pancreas, de intestin, de branhii și de splină, care apoi sunt transferate într-o soluție salină tamponată cu formol 8-10 % (vol/vol). Raportul dintre agentul de fixare și țesuturi trebuie să fie de cel puțin 20:1, pentru a garanta o conservare satisfăcătoare a țesuturilor. Pentru imunohistochimie (IHC) trebuie prelevate eșantioane de rinichi median și de inimă.

Țesuturile utilizate pentru examinarea virusologică pe cultură celulară se prelevă de la toți peștii din eșantion. De la pești se prelevă, cu ajutorul unui instrument steril, fragmente de ficat, de rinichi anterior sau median, de inimă și de splină, care sunt transferate în tuburi de plastic ce conțin 9 ml de mediu de transport. Într-un tub care conține soluție de transport se pot colecta țesuturi prelevate de la cel mult cinci pești: acestea constituie un eșantion global. Greutatea țesutului dintr-un eșantion trebuie să fie de 1,0 ± 0,5 g.

I.2. Expedierea eșantioanelor de la pești

Se pot transporta pești întregi către laborator în cazul în care sunt îndeplinite condițiile de temperatură pe durata transportului, astfel cum sunt descrise la al treilea paragraf de la prezentul punct. Peștii întregi sunt înfășurați în hârtie absorbantă și expediați într-un sac de plastic, răcirea făcându-se în conformitate cu precizările de la paragraful menționat.

De asemenea, pot fi transportați pești vii, dar numai sub supravegherea laboratorului național de referință pentru bolile peștilor și ținând seama de aspectele suplimentare referitoare la dezinfecție și la biosecuritate aferente transportului de pești vii.

Eșantioanele de sânge și tuburile cu țesuturi de pește destinate examenului virusologic sau analizei RT-PCR sunt amplasate în recipiente izolate, cum ar fi cutiile de polistiren cu pereți groși, cu o cantitate suficientă de gheață sau de blocuri refrigeratoare pentru a asigura refrigerarea eșantioanelor pe durata transportului către laborator. Trebuie să se evite congelarea și recipientul de transport trebuie să aibă încă gheață în momentul recepției sau unul sau mai multe din blocurile refrigeratoare trebuie să fie încă parțial sau complet înghețate. În mod excepțional, eșantioanele destinate analizei RT-PCR și cele destinate examenului virusologic pot fi congelate rapid și transportate spre laborator la o temperatură de – 20 °C sau mai mică.

Pentru analiza RT-PCR a țesuturilor conservate în RNAlater, extracția ARN se realizează în următoarele termene, care variază în funcție de temperatura la care sunt depozitate eșantioanele:

eșantioane depozitate la 37 °C: o zi;

eșantioane depozitate la 25 °C: o săptămână;

eșantioane depozitate la 4 °C: o lună;

eșantioane depozitate la – 20 °C: termen nelimitat.

În cazul în care țesuturile de pești sunt transportate într-un agent de fixare, în vederea examenului histologic, expedierea se face în tuburi etanșe, amplasate în recipiente rezistente la șoc. Trebuie evitată congelarea acestor eșantioane.

Examenul virusologic pe cultură celulară trebuie să înceapă cât mai curând posibil și cel târziu la 48 de ore după colectarea eșantioanelor. În cazuri excepționale, examenul virusologic poate începe cel târziu la 72 de ore după colectarea materialului de examinat, cu condiția ca acesta să fie protejat de mediul de transport și să fi fost respectate condițiile de temperatură în timpul transportului.

I.3. Colectarea materialului de diagnostic suplimentar

Sub rezerva aprobării de către laboratorul de diagnostic, se pot colecta și pregăti alte țesuturi de pești decât cele menționate la punctul I.1, în vederea unor examinări suplimentare.

II. **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru supravegherea și pentru confirmarea prezenței AIS sau pentru excluderea suspiciunii privind această boală**

În cazul în care se efectuează examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește AIS, astfel cum se prevede în partea 3 secțiunea I din anexa I, sau în scopul confirmării prezenței AIS sau al excluderii suspiciunii privind această boală, în conformitate cu articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE, folosind metodele de diagnostic prevăzute în partea 3 secțiunea II din anexa I, trebuie aplicate metodele și procedurile detaliate prevăzute la punctele II.1-II.5 următoare.

II.1. Examinarea eșantioanelor prin RT-PCR

Metoda de diagnostic care trebuie utilizată pentru depistarea VAIS este RT-qPCR. Întrucât rezultatele RT-qPCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, trebuie să fie incluse controale și produse de amplificare pozitive și negative adecvate, pentru a se evita orice dubiu.

II.1.1. Extracția ARN-ului total

Toate manipulările ARN-ului se realizează pe gheață, utilizând mănuși.

Se extrage ARN-ul total prin metoda fenol-cloroform sau prin cromatografie de afinitate pe coloane, în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

ARN-ul purificat este resuspendat în apă distilată fără ARN-ază (și anume, apă tratată cu 0,1 % pirocarbonat de dietil).

Concentrația și puritatea ARN-ului extras trebuie să fie estimate măsurând densitatea optică la 260 nm și la 280 nm. O metodă alternativă constă în includerea de controale interne care vizează genomul virusului, astfel cum se menționează la punctul II.1.3.

II.1.2. RT-PCR pentru depistarea VAIS

Pot fi utilizate mai multe metode RT-PCR pentru amplificarea genomului VAIS. Se poate efectua RT-PCR în două etape, reacțiile de RT și de PCR desfășurându-se în două tuburi distincte. Cu toate acestea, este posibilă și o reacție într-o singură etapă, în care cele două reacții au loc într-un singur tub. Atunci când este posibil, se folosește metoda într-o singură etapă, căci utilizarea unui singur tub reduce la minimum riscul de contaminare încrucișată, dat fiind că nu trebuie transferat conținutul; se consideră că această metodă are aceeași sensibilitate ca și metoda în două etape.

Trebuie utilizați primerii și testul descrișii la acest punct, și anume perechea de primeri ILA1 sau ILA2 care vizează segmentul 8 și care au fost apreciați drept adecvați pentru depistarea VAIS în cazul focarelor și la peștii-vector. Primerul antisens ILA2 nu corespunde izolatelor care provin din America de Nord; în aceste cazuri trebuie utilizat un alt primer.

Primer sens (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′;

Primer antisens (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Succesiunea ciclurilor: un ciclu la 50 °C timp de 30 de minute, 1 ciclu la 94 °C timp de 15 minute, 40 de cicluri la 94 °C timp de 30 secunde, la 55 °C timp de 30 de secunde și la 72 °C timp de 60 de secunde; un ciclu la 72 °C timp de 5 minute. Dimensiunea produsului: 155 pb.

Rezultatele PCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, și anume ar putea fi necesară optimizarea protocoalelor termice, în funcție de termociclul utilizat. În plus, se pot obține rezultate fals-pozitive din cauza unor erori în ceea ce privește atașarea primerilor sau din cauza contaminării în laborator. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Cu toate acestea, alternativ se pot aplica și alte versiuni de RT-PCR, cu eficacitate similară dovedită.

II.1.3. RT-qPCR pentru depistarea VAIS

Utilizarea RT-qPCR poate crește specificitatea și, probabil, sensibilitatea. Metoda se desfășoară mai rapid, deoarece nu este necesară etapa electroforezei în gel, și reduce riscul de contaminare încrucișată, deoarece este posibil să se estimeze cantitatea de ARN viral genomic în tubul cu materialul de testat. Un inconvenient al RT-qPCR este faptul că adesea nu este posibilă secvențierea produselor de amplificare. Cu toate acestea, în cazul în care există îndoieli cu privire la specificitatea produsului de amplificare, trebuie efectuat un alt test specific VAIS în vederea verificării rezultatului.

Trebuie utilizat testul descris la prezentul punct, care vizează segmentul 8. Acest test trebuie să fie valabil pentru izolatele care provin din Uniunea Europeană, din Asociația Europeană a Liberului Schimb și din America de Nord. Atunci când este posibil, se folosește metoda într-o singură etapă, deoarece testul realizat într-un singur tub reduce la minimum riscul de contaminare încrucișată.

Primer sens: 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;

Primer antisens: 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;

și sondă: 5′-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – *MGBNFQ*-3′.

Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Succesiunea ciclurilor: un ciclu la 50 °C timp de 30 de minute, 1 ciclu la 95 °C timp de 15 minute, 40 de cicluri la 94 °C timp de 15 secunde, la 60 °C timp de 60 de secunde; se efectuează ajustări, dacă este necesar. Alternativ, se pot aplica și alte versiuni de RT-PCR sau de RT-qPCR, cu eficacitate similară dovedită.

II.1.4. Secvențierea produselor PCR amplificate

Primer sens (ILAs6-3F): 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;

Primer antisens (ILAs6-2R): 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.

Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Succesiunea ciclurilor (RT-PCR într-o singură etapă): un ciclu la 50 °C timp de 30 de minute, un ciclu la 94 °C timp de 15 minute, 40 de cicluri la 94 °C timp de 30 de secunde, la 55 °C timp de 30 de secunde, la 72 °C timp de 60 de secunde, un ciclu la 72 °C timp de 5 minute; se efectuează ajustări, dacă este necesar. Alternativ, se pot aplica și alte versiuni de RT-PCR sau de RT-qPCR, cu eficacitate similară dovedită.

Alternativ, poate fi folosită următoarea metodă de secvențiere a HPR în segmentul 6:

Primer sens: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′;

Primer antisens: 5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′.

Dimensiunea produsului: 304 nt dacă HPR0.

Pot fi, de asemenea, utilizate teste RT-PCR cu sensibilitate și specificitate similare celor ale testelor descrise la prezentul punct.

Puritatea produsului de amplificare obținut prin RT-PCR se verifică prin electroforeză în gel înainte de secvențiere. Dacă apare un singur fragment pur, acesta se purifică direct din reacția PCR. Dacă sunt prezente mai multe fragmente amplificate, fragmentul care interesează trebuie să fie purificat prin electroforeză în gel. Purificarea fragmentelor PCR din soluții sau gel de agaroză se efectuează cu ajutorul unor coloane de afinitate pentru fragmente de PCR, în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Secvențierea trebuie să fie efectuată cu ajutorul primerilor de amplificare, de către societăți externe specializate în secvențiere. Rezultatele trebuie să fie analizate cu ajutorul instrumentului de căutare BLAST, iar secvențele sunt comparate cu alte secvențe cunoscute din baza de date de nucleotide a Centrului Național de Informații Biotehnologice din SUA (National Centre for Biotechnical Information – NCBI).

Secvențierea trebuie să elimine orice dubiu în ceea ce privește specificitatea unui produs amplificat prin RT-PCR.

II.2. Izolarea VAIS în cultură celulară

II.2.1. Pregătirea eșantioanelor

Țesuturile pot fi păstrate la – 80 °C. Țesuturile pot fi congelate și dezghețate numai o singură dată înaintea examinării acestora. În scopul supravegherii și al controlului, examinarea trebuie se efectueze cât mai rapid posibil.

Fiecare eșantion (amestec de țesuturi într-o soluție de transport) este complet omogenizat cu un omogenizator validat, centrifugat la 2 000-4 000 × *g* timp de 15 minute la 0-6 °C, apoi supernatantul este filtrat (0,45 µm) și incubat cu un volum egal dintr-un amestec diluat corespunzător de antiseruri contra serotipurilor indigene ale VNPI. Titrul antiserului trebuie să fie de cel puțin 1:2 000 într-un test de neutralizare a plajelor cu 50 % reducerea plajelor. Amestecul este incubat timp de o oră la 15 °C. Acesta constituie inoculul.

Tratamentul tuturor inoculilor cu antiser împotriva virusului necrozei pancreatice infecțioase (virus care, în anumite regiuni ale Europei, este prezent în 50 % din eșantioanele de pește) are ca scop împiedicarea apariției ECP datorat virusului NPI în culturile celulare inoculate. Acest tratament poate fi efectuat pentru reducerea duratei examenelor virusologice, precum și a numărului de cazuri în care apariția ECP ar trebui considerată ca un indicator potențial al VAIS. Atunci când eșantioanele provin din unități de producție considerate ca fiind indemne de NPI, tratamentul inoculilor cu antiser împotriva virusului NPI poate fi omis.

II.2.2. Inocularea culturilor celulare

Pentru izolarea primară a virusului AIS trebuie folosite celule de rinichi de la somonul de Atlantic (ASK). Se pot utiliza și alte linii celulare cu o eficacitate și sensibilitate confirmate pentru izolarea VAIS, ținând seama de variabilitatea tulpinii și de capacitatea diverselor tulpini de a se reproduce în linii celulare diferite. Celulele ASK par să suporte izolarea și creșterea izolatelor de virus cunoscute până în prezent, atât timp cât numărul de pasaje este redus. În celulele ASK poate apărea un efect citopatic (ECP) mai clar decât în alte linii celulare sensibile, precum SHK-1 (celule de rinichi anterior de somon-1).

Se cultivă celule ASK (maximum 65 de pasaje) într-un mediu L-15 care conține 10 % ser fetal bovin, 2 % (vol/vol) de L-glutamină la 200 mM și 0,08 % (vol/vol) de 2-mercaptoetanol la 50 mM în plăci multigodeu. Se inoculează o suspensie de organe tratată cu antiser în culturi celulare tinere în fază de creștere activă, în scopul obținerii unei diluții finale a materialului tisular într-un mediu de cultură de 1:1 000. Pentru fiecare organ, se adaugă 40 µl din suspensia de inocul la un godeu care conține 2 ml de mediu de cultură. Pentru a reduce la minimum riscul contaminării încrucișate, se utilizează plăci separate, cu douăsprezece sau douăzeci și patru de godeuri, în cazul eșantioanelor care provin din situri de acvacultură diferite.

Se păstrează o placă neinoculată care va servi drept control negativ. Se inoculează o altă placă cu un izolat de referință al VAIS, care va servi drept control pozitiv, și se procedează în felul următor: se inoculează o sută de µl dintr-un preparat stoc de VAIS [titru minim 10^7 doza infectantă pentru 50 % din culturile celulare (TCID 50 ml^{-1})] în primul godeu și se amestecă. Se transferă un volum din această materie din primul în al doilea godeu pentru a se obține o diluție de 1:10 și se amestecă. Se repetă operațiunea pe întreaga placă pentru a se obține șase diluții de 1:10. Preparatul stoc de VAIS poate fi depozitat la – 80 °C timp de cel puțin doi ani; cu toate acestea, o dată dezghețat, el trebuie să fie utilizat în termen de trei zile. Se iau măsuri pentru prevenirea contaminării încrucișate a plăcilor de testare cu materialul controlului pozitiv. Pentru a se evita acest risc, controalele pozitive se așează separat și se manipulează separat de plăcile de testare. Ca alternativă la includerea unui control pozitiv pentru fiecare inoculare, se poate realiza la fiecare șase luni un test de sensibilitate a celulelor ASK la izolatele VAIS.

Se incubează eșantioanele la 15 ± 2 °C timp de cel mult 15 zile. Se examinează culturile celulare de două ori la microscop pentru depistarea ECP, mai întâi între a cincea și a șaptea zi, apoi între a douăsprezecea și a paisprezecea zi de la inoculare. Dacă un amestec prezintă ECP, se inițiază imediat proceduri de identificare a virusului în conformitate cu punctul II.2.4. În cazul în care nu se observă niciun ECP până în a paisprezecea zi, se efectuează un test de imunofluorescență indirectă (IFAT), un test de hemadsorbție sau RT-PCR.

II.2.3. Subcultivarea

Subcultivarea se va efectua între a treisprezecea și a cincisprezecea zi. Se adaugă supernatant de cultură în godeurile de pe plăci multigodeu care conțin celule proaspete în fază activă de creștere, la o diluție adecvată (1/10), apoi se lasă să incubeze la 14 ± 2 °C timp de cel mult 18 zile. Se examinează culturile celulare de două ori la microscop pentru depistarea ECP, mai întâi între a cincea și a șaptea zi, apoi între a paisprezecea și a optsprezecea zi de la inoculare. Dacă un amestec prezintă ECP, se inițiază imediat proceduri de identificare a virusului în conformitate cu punctul II.2.4. Dacă între a paisprezecea și a optsprezecea zi nu se observă ECP, se efectuează un test de hemadsorbție sau RT-PCR.

Dacă în decurs de șapte zile de la incubație se observă un efect citotoxic, se realizează o subcultivare în acest stadiu și se lasă celulele la incubat timp de 14 până la 18 zile, apoi celulele sunt supuse unei noi subcultivări cu durata de incubație de 14 până la 18 zile. Dacă efectul citotoxic apare după șapte zile, se realizează o singură subcultivare și celulele se lasă la incubat astfel încât să se ajungă la un număr total de 28 până la 36 de zile de incubație de la prima inoculare.

În cazul contaminării bacteriene a culturii primare, se reia testul, pe un omogenat de țesuturi depozitat la – 80 °C. Înaintea inoculării, omogenatul de țesuturi trebuie să fie centrifugat la 4 000 × *g* timp de 15-30 de minute, la o temperatură cuprinsă între 0 și 6 °C, iar supernatantul trebuie să fie filtrat la 0,22 µm. Dacă are loc contaminarea bacteriană în cursul fazei de subcultivare, supernatantul se filtrează la 0,22 µm, se inoculează unor celule proaspete și se lasă la incubat o nouă perioadă de 14 până la 18 zile.

II.2.4. Teste de identificare a virusului

În cazul depistării ECP, indiferent de stadiu, sau în cazul unui test de hemadsorbție pozitiv, se efectuează identificarea virusului. Metodele de predilecție pentru identificarea VAIS sunt RT-PCR în conformitate cu punctul II.1 și de imunofluorescența (IF) în conformitate cu punctul II.2.6. Dacă se suspectează prezenta altor virusuri trebuie să se efectueze teste suplimentare de identificare a virusului. În cazul în care testele respective nu au permis identificarea definitivă a virusului într-o săptămână, supernatantul trebuie trimis pentru identificare imediată:

(a) laboratorului de referință al Organizației Mondiale pentru Sănătatea Animalelor (OIE) în ceea ce privește AIS; sau

(b) unui laborator național de referință sau laboratorului de referință al Uniunii Europene pentru bolile peștilor, astfel cum se menționează în anexa VI la Directiva 2006/88/CE.

II.2.5. Hemadsorbție

Deoarece replicarea VAIS în culturile celulare nu are întotdeauna drept rezultat apariția ECP, fiecare godeu este supus unui test RT-PCR sau unui test de hemadsorbție în conformitate cu prezentul punct, sau unui test IF în conformitate cu punctul II.2.6.

Se efectuează o prelevare din mediul de cultură celulară din fiecare godeu, inclusiv din godeurile controalelor pozitive și negative, și se introduce în tuburi sterile etichetate. La fiecare godeu se adaugă 500 µl de suspensie 0,2 % (vol/vol) de globule roșii de iepure sau de cal spălate sau de suspensie 0,05 % (vol/vol) de globule roșii de păstrăv-curcubeu sau de somon de Atlantic spălate și se lasă să incubeze la temperatura camerei timp de 45 de minute. Se îndepărtează globulele roșii și se spală fiecare godeu de două ori cu mediul L-15. Fiecare godeu este examinat la microscop.

Prezența ciorchinelui de globule roșii aderând la suprafața celulelor ASK indică prezența probabilă a infecției cu un ortomixovirus. Dacă testul de hemadsorbție este pozitiv, se efectuează imediat un test de identificare a virusului în conformitate cu punctul II.2.4.

II.2.6. Imunofluorescența (IF)

Se cultivă celule ASK (maximum 65 de pasaje) într-un mediu L-15 care conține 10 % ser fetal bovin, 2 % (vol/vol) de L-glutamină la 200 mM și 0,08 % (vol/vol) de 2-mercaptoetanol la 50 mM în plăci multigodeu, cu o confluență mai mare de 50 %. Se pot utiliza și alte linii celulare sau un mediu de cultură cu o eficacitate dovedită. Se adaugă 225 µl de supernatant de cultură presupusă a fi infectată de virus în fiecare din cele două godeuri, se amestecă și se transferă 225 µl în alte două godeuri, la o diluție de 1:5. Alte două godeuri se lasă neinoculate, pentru a servi drept controale. Eșantioanele de la diferite ferme piscicole se tratează pe plăci separate, la fel ca și controalele. Virusul se controlează pe un izolat de referință al VAIS.

Plăcile se incubează la 14 ± 2 °C și sunt examinate la microscop timp de cel mult șapte zile. Dacă se observă ECP într-un stadiu incipient sau dacă nu se observă ECP în termen de șapte zile, etapa următoare este fixarea. Se spală godeurile cu tampon fosfat salin (PBS) și se fixează prin incubare cu acetonă 80 %, timp de 20 de minute, la temperatura camerei. Plăcile sunt lăsate să se usuce la aer și apoi se colorează imediat sau sunt depozitate la o temperatură de 0-6 °C timp de cel mult 24 de ore înainte de colorare.

Godeurile duplicate se colorează cu un amestec de anticorpi monoclonali 3H6F8 și 1OC9F5 anti-VAIS sau cu un alt anticorp monoclonal cu o eficacitate și specificitate dovedite, se diluează în PBS și se lasă la incubat la o temperatură de 37 ± 4 °C, timp de 30 de minute. Se îndepărtează anticorpii monoclonali și se spală plăcile de trei ori cu Tween 20 0,05 % în PBS. Conjugatul IgG marcat cu FITC (izotiocianat de fluoresceină) antișoarece diluat în PBS trebuie adăugat în fiecare godeu și incubat la temperatura de 37 ± 4 °C timp de 30 de minute. Diluțiile de la loturi diferite de anticorpi monoclonali și conjugatul FITC trebuie optimizate în fiecare laborator. Se îndepărtează anticorpul și se spală plăcile de trei ori cu Tween 20 0,05 % în PBS.

Se examinează imediat godeurile la un microscop inversat, echipat pentru examinarea fluorescenței cu un filtru corespunzător pentru stimularea FITC. Un test este considerat pozitiv dacă se observă celule fluorescente. Pentru ca un test să fie valabil, controalele pozitive trebuie să dea un rezultat pozitiv, iar cele negative un rezultat negativ.

II.3. Examinarea altor țesuturi

Tehnica menționată la punctul II.2.6 poate fi aplicată și altor țesuturi de pește, precum ficatul, splina și inima, cu condiția ca pe lamă să se poată depune o cantitate suficientă de celule endoteliale, de leucocite sau de limfocite. Procedura de colorare este identică pentru toate țesuturile, chiar dacă pentru unele dintre ele este preferabil să se renunțe la colorarea cu iodură de propidiu și să se utilizeze iluminarea în faze pentru identificarea tipurilor de celule prezente pe amprentă.

II.4. Histologia

Secțiunile incluse în parafină vor fi tăiate la 5 µm și colorate folosindu-se hematoxilină și eozină.

În cazul somonului de Atlantic care prezintă semne clinice ale bolii, modificările histologice sunt variabile, dar pot include următoarele elemente:

(a) numeroase eritrocite în sinusul venos central și în capilarele lamelare ale branhiilor, unde se pot forma și trombi de eritrocite;

(b) petești multifocale sau confluente sau necroza hepatocitelor, sau ambele, la o anumită distanță de vasele de sânge mai mari din ficat; acumulare multifocală de eritrocite în sinusoidele hepatice dilatate;

(c) acumulare de eritrocite în vasele de sânge din *lamina propria* intestinală și, în cele din urmă, hemoragie în *lamina propria*;

(d) distensia stromei splinei, din cauza acumulării de eritrocite;

(e) hemoragie interstițială ușoară și multifocală până la extinsă și difuză, cu necroză tubulară în zonele afectate de hemoragie, acumulare de eritrocite în glomerulii renali;

(f) eritrofagocitoză în splină și hemoragii secundare în ficat și rinichi.

II.5. Imunohistochimie (IHC)

Anticorpii policlonali împotriva nucleoproteinelor VAIS trebuie utilizați pe secțiuni de țesuturi fixate cu formol și incluse în parafină. Organele care urmează a fi examinate trebuie să fie rinichiul median și inima (inclusiv zona de tranziție, toate cele trei camere și valvele). Cazurile suspecte din cauza semnelor patologice se verifică prin intermediul unui test IHC pozitiv. Secțiunile histologice se pregătesc în conformitate cu metodele standard.

1. Pregătirea secțiunilor de țesuturi

Țesuturile trebuie fixate cu ajutorul unei soluții neutre de formol 10 % tamponate cu fosfat timp de cel puțin o zi, apoi trebuie să fie deshidratate prin băi de etanol succesive, clarificate în xilen și incluse în parafină, în conformitate cu protocoalele standard. Secțiunile de aproximativ 5 µm grosime (pentru IHC pe lame acoperite cu poli-L-lizină) trebuie să fie încălzite la 56 °C-58 °C (maximum 60 °C) timp de 20 minute, deparafinate în xilen, rehidratate prin intermediul unor băi de etanol succesive și colorate cu hematoxilină și eozină în vederea analizei patomorfologice și a imunohistochimiei în conformitate cu punctul 2

2. Procedura de colorare pentru IHC

Toate incubațiile se efectuează la temperatura camerei pe platforma de basculare, cu excepția cazului în care se prevede altfel în prezenta decizie:

(a) extragerea antigenului se face prin fierberea secțiunilor în 0,1 M de soluție tampon de citrat cu pH 6,0 timp de 2 × 6 minute, urmată de blocare cu 5 % lapte degresat uscat și 2 % ser de capră în 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) timp de 20 de minute;

(b) secțiunile se incubează peste noapte cu anticorp primar (anticorp monospecific de iepure împotriva nucleoproteinelor VAIS) diluat în TBS cu 1 % lapte degresat uscat, apoi se spală de trei ori în TBS cu Tween 20 0,1 %;

(c) pentru detectarea anticorpilor legați, secțiunile se incubează timp de 60 de minute cu anticorpi anti-IgG de iepure conjugați cu fosfatază alcalină. După o ultimă spălare, se adaugă Fast Red (1 mg ml^{-1}) și naftol AS-MX fosfat (0,2 mg ml^{-1}) cu 1 mM levamisol în 0,1 M TBS (pH 8,2) și se lasă să se dezvolte timp de 20 de minute. Secțiunile sunt apoi spălate cu apă de la robinet, înainte de contracolorarea cu hematoxilină Harris și montarea într-un mediu de montare apos. La fiecare etapă trebuie incluse secțiuni de țesuturi pozitive și negative la VAIS, drept controale.

(3) Interpretarea rezultatului IHC

Rezultatul testului IHC trebuie să fie interpretat conform prevederilor de la literele (a) și (b):

(a) secțiunile de control sunt considerate pozitive atunci când se observă că citoplasma și interiorul nucleului celulelor endoteliale din vasele de sânge ale endocardului au o culoare roșie (roșiatică) vizibilă în mod clar. O secțiune dintr-un eșantion utilizat pentru testare este considerată pozitivă numai dacă se observă în mod clar o colorare în roșu a interiorului nucleului celulelor endoteliale;

(b) secțiunile de control sunt considerate negative dacă nu au nicio reacție de colorare semnificativă.

Având în vedere că localizarea în interiorul nucleului este specifică nucleoproteinei ortomixovirusului într-o etapă de replicare a virusului, însă predomină adesea o colorare citoplasmatică concomitentă, zonele de colorare citoplasmatice și de alte tipuri care nu sunt localizate în interiorul nucleului trebuie să fie considerate nespecifice sau neconcludente.

Cele mai puternice reacții de colorare pozitive sunt obținute, în mod obișnuit, în celulele endoteliale din inimă și din rinichi. Colorarea celulelor endoteliale poate fi slabă sau inexistentă la nivelul leziunilor hemoragice foarte extinse, eventual din cauza lizei celulelor endoteliale infectate.

PARTEA 4

METODE ȘI PROCEDURI DE DIAGNOSTIC DETALIATE PENTRU SUPRAVEGHEREA ȘI CONFIRMAREA INFECȚIEI CU *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru diagnosticarea infecției cu *Marteilia refringens***

În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*, astfel cum se prevede în partea 4 secțiunea I din anexa I, sau în scopul confirmării prezenței acestei boli listate sau al excluderii suspiciunii privind această boală în conformitate cu articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE, folosind metodele de diagnostic prevăzute în partea 4 secțiunea II din anexa I, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute la punctele I.1, I.2 și I.3 din prezenta parte.

I.1. Proceduri de eșantionare

Moluștele cu cochilia deschisă sau care au murit recent sunt selectate cu prioritate, pentru a spori șansele de a găsi animale infectate.

Odată selecționate, stridiile sau midiile se păstrează la 4 °C sau refrigerate pe gheață, timp de maximum 24 de ore dacă eșantioanele includ moluște cu cochilia deschisă și timp de maximum 72 de ore în caz contrar, într-o pungă de plastic cu o etichetă cuprinzând detaliile referitoare la natura și originea stridiilor sau a midiilor. Moluștele cu cochilia deschisă sau care au murit recent sunt păstrate separat de alte moluște.

Pentru diagnosticarea *Marteilia refringens* prin histologie se utilizează o secțiune de țesuturi cu grosime de 3-5 mm, incluzând branhii și țesut cardiac. O porțiune de glandă digestivă trebuie să fie utilizată pentru anumite teste, inclusiv pentru amprente și pentru reacția în lanț a polimerazei (PCR).

I.2. Tehnici de microscopie

I.2.1. Citologia (tehnica citologică de colorare)

După uscarea țesuturilor de glandă digestivă pe o hârtie absorbantă se realizează mai multe amprente pe o lamă din sticlă. Lamele sunt lăsate să se usuce la aer, se fixează în metanol sau etanol absolut și se colorează cu ajutorul unui kit de colorare disponibil în comerț, precum Diff-Quik®/Hemacolor®, în conformitate cu instrucțiunile producătorului. După spălare cu apă de la robinet și uscare, lamele se acoperă cu o lamelă cu ajutorul unei rășini sintetice adecvate. Lamele trebuie să fie analizate mai întâi la un grosisment de × 200 și apoi în imersiune în ulei la un grosisment de × 1 000.

Un rezultat pozitiv constă în observarea unor celule ale căror dimensiuni variază între 30-40 µm. Citoplasma este bazofilă, iar nucleul este eozinofil. Se observă halouri pale în jurul granulelor mari, puternic colorate (refringente), iar în cazul celulelor de dimensiuni mai mari se observă o dispunere de tip „celulă în celulă”.

Tehnica nu este specifică acestei specii de parazit.

I.2.2. Histologia

Trebuie fixate secțiuni de țesut care includ branhii, glanda digestivă, mantaua și gonadele timp de cel puțin 24 de ore în fixator Davidson, urmând o prelucrare normală pentru examenul histologic după includerea în parafină și colorare, de exemplu cu hematoxilină și eozină. Observațiile trebuie efectuate la grosismente succesive, de maximum × 1 000.

Un rezultat pozitiv constă în observarea unor celule ale căror dimensiuni variază între 4 și 40 µm. Primele etape constau în celule multinucleate, de formă sferică până la alungită. Acestea se găsesc în special în epiteliul esofagului și al stomacului și uneori în palpii labiali. Sporulația implică diviziunea de celule în interiorul celulelor și are loc în tubulii și în conductele glandei digestive. Granulele refringente apar în cursul sporulației, dar nu se observă în stadiile incipiente. În fazele tardive ale infecției, se observă sporangi liberi în lumenul tubului digestiv. Citoplasma este bazofilă, iar nucleul este eozinofil. Culoarea granulelor poate varia de la portocaliu intens la roșu intens.

Tehnica nu este specifică acestei specii de parazit.

I.3. Tehnici moleculare

I.3.1. Extracția ADN-ului

ADN-ul trebuie să fie extras în conformitate cu procedurile standard.

Pot fi utilizate kituri de extracție a ADN-ului disponibile pe piață, care permit de obicei obținerea unui ADN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR menționate la punctul I.3.2.

I.3.2. *Reacția în lanț a polimerazei* (*PCR*)

Au fost elaborate și publicate mai multe protocoale PCR.

Trebuie utilizați primeri PCR care vizează regiunea spațierii transcrise intern (ITS1), deoarece aceștia pot amplifica numai *M. refringens*.

PCR se efectuează într-un volum de 50 µl. Amestecurile pentru PCR trebuie să conțină tampon [500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 9,0 la 25 °C) și 1 % Triton® X-100)], 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM amestec dNTP, 1 µM primer sens și antisens, 0,02 unități μl^{-1} polimerază ADN Taq și 10-100 ng de ADN extras. După denaturarea ADN-ului timp de 5 minute la 94 °C, se efectuează 30 de cicluri după cum urmează: denaturare la 94 °C timp de un minut, atașare la 55 °C timp de un minut, elongația la 72 °C timp de un minut per 1 000 de perechi de baze. Trebuie efectuată o etapă de elongație finală de 10 minute la 72 °C. Pentru detectarea *M. refringens*, PCR se efectuează cu primeri care vizează regiunea ITS1 (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ și 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Controalele pozitive constau în ADN-ul genomic al unei gazde cu o infecție pronunțată sau în ADN plasmidic incluzând regiunea vizată.

Controalele negative constau în ADN-ul genomic al unor gazde neinfectate și în reactivi PCR fără ADN țintă.

Un rezultat pozitiv constă într-un produs de amplificare pozitiv de mărimea preconizată (412 pb), toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive.

I.3.3. Hibridare in situ (IHS)

Au fost elaborate și publicate mai multe protocoale IHS.

Trebuie utilizată o sondă care vizează subunitatea mică din complexul de gene al ARNr, deoarece aceasta a fost validată în raport cu histologia.

Trebuie fixate secțiuni de țesut care includ branhii și glanda digestivă timp de cel puțin 24 de ore în fixator Davidson, urmând o prelucrare normală pentru examenul histologic după includerea în parafină. Se decupează secțiuni de 5 µm și se așează pe lame acoperite cu aminoalchilsilan, apoi se incubează în timpul nopții într-o etuvă la 40 °C. Secțiunile sunt deparafinate prin scufundarea în xilen timp de 10 minute. Această etapă va fi repetată o singură dată și apoi solventul se elimină prin scufundare în două băi succesive de etanol absolut de 10 minute fiecare. Secțiunile sunt apoi deshidratate prin imersie în băi succesive de etanol. Secțiunile sunt tratate cu proteinaza K (100 µg ml^{-1}) într-un tampon TE [Tris (50 mm), EDTA (10 mm)], la 37 °C timp de 30 de minute. Lamele trebuie să fie deshidratate prin imersie în băi succesive de etanol și apoi uscate la aer. Secțiunile trebuie să fie incubate cu 100 µl de tampon de hibridare [4 × SSC (soluție salină de citrat), formamidă 50 %, 1 × soluție Denhardt, 250 µg ml^{-1} ARNt din drojdie, sulfat de dextran 10 %] conținând 10 ng (1 µl din reactanții PCR pregătiți astfel cum se descrie la punctul I.3.2 utilizând primerii CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG și TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) din sonda marcată cu digoxigenină. Secțiunile sunt acoperite cu lamele de plastic pentru hibridare *in situ* și sunt așezate pe un bloc de încălzire la 95 °C timp de cinci minute. Lamele trebuie apoi răcite pe gheață timp de un minut înainte de hibridarea la 42 °C timp de o noapte într-o etuvă umedă. Secțiunile se spală de două ori timp de cinci minute în 2 × SSC la temperatura camerei și o dată timp de 10 minute în 0,4 × SSC la 42 °C. Etapele de detectare se efectuează în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Lamele sunt apoi clătite în apă distilată sterilă (dH2O). Secțiunile sunt contracolorate cu Bismarck Brown Yellow și clătite în dH2O; se acoperă cu lamele, utilizând un mediu de montare apos.

Controalele pozitive și negative sunt secțiuni de la gazde despre care se știe că sunt infectate și, respectiv, neinfectate.

Rezultatul pozitiv trebuie stabilit prin colorarea în violet-negru a celulelor de *M. refringens* în țesuturile-țintă cunoscute, toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive.

I.3.4. Secvențierea

Secvențierea este una dintre ultimele etape necesare pentru confirmarea diagnosticului. Regiunile vizate sunt subunitatea mică a ADNr și ITS1.

II. **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru supravegherea și pentru confirmarea infecției cu *Marteilia refringens***

În scopul programelor de supraveghere și pentru a confirma prezența unei infecții cu *Marteilia refringens* sau pentru a exclude suspiciunea privind această boală listată, în conformitate cu cerințele stabilite în partea 4 secțiunea II din anexa I, metodele de diagnosticare și procedurile aferente care trebuie utilizate trebuie să fie în conformitate cu orientările stabilite în tabelul 4.1, după cum urmează:

Tabelul 4.1

Orientări privind utilizarea metodelor de diagnostic pentru programele de supraveghere și pentru a confirma infecția cu *Marteilia refringens* sau pentru a exclude suspiciunea privind această boală

Metodă	Supraveghere individualizată	Diagnostic prezumtiv	Confirmarea diagnosticului
Amprente ale glandei digestive	X	X	X sau
Histopatologie	X		X sau
Hibridare *in situ*			X și
PCR	X	X	X și
Secvențiere			X

PARTEA 5

METODE ȘI PROCEDURI DE DIAGNOSTIC DETALIATE PENTRU SUPRAVEGHEREA ȘI CONFIRMAREA INFECȚIEI CU *BONAMIA OSTREAE*

I. **Proceduri pentru diagnosticarea infecției cu *Bonamia ostreae***

În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește *Bonamia ostreae*, astfel cum se prevede în partea 5 secțiunea I din anexa I, sau în scopul confirmării prezenței acestei boli listate sau al excluderii suspiciunii privind această boală în conformitate cu articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE, folosind metodele de diagnostic prevăzute în partea 5 secțiunea II din anexa I, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute la punctele I.1, I.2 și I.3 următoare.

I.1. Procesul de eșantionare

Moluștele cu cochilia deschisă sau care au murit recent sunt selectate cu prioritate, pentru a spori șansele de a găsi animale infectate.

Odată selecționate, stridiile se păstrează la 4 °C sau refrigerate pe gheață timp de maximum 24 de ore dacă eșantioanele includ moluște cu cochilia deschisă și 72 de ore în caz contrar, într-o pungă de plastic cu o etichetă cuprinzând detaliile referitoare la natura și originea stridiilor. Moluștele cu cochilia deschisă sau care au murit recent sunt păstrate separat de alte moluște.

Pentru diagnosticarea *Bonamia ostreae* prin histologie se utilizează o secțiune de țesuturi cu grosime de 3-5 mm, incluzând branhii și țesut cardiac. O porțiune de glandă digestivă trebuie să fie utilizată pentru anumite teste, inclusiv pentru amprente și pentru reacția în lanț a polimerazei (PCR).

I.2. Tehnici de microscopie

I.2.1. Citologia (tehnica citologică de colorare)

După uscarea țesutului branhial și a celui cardiac pe o hârtie absorbantă se realizează mai multe amprente pe o lamă din sticlă. Lamele sunt lăsate să se usuce la aer, se fixează în metanol sau etanol absolut și se colorează cu ajutorul unui kit de colorare disponibil în comerț (precum Diff-Quik®/Hemacolor®), în conformitate cu instrucțiunile producătorului. După spălare cu apă de la robinet și uscare, lamele se acoperă cu o lamelă cu ajutorul unei rășini sintetice adecvate. Lamele trebuie să fie analizate mai întâi la un grosisment de × 200 și apoi în imersiune în ulei la un grosisment de × 1 000.

Rezultatul pozitiv constă în prezența unor organisme mici, de formă sferică sau ovală (2-5 μm lățime), în interiorul hemocitelor. Cu toate acestea, parazitul ar putea fi prezent și în afara celulelor. Aceste organisme au o citoplasmă bazofilă și un nucleu eozinofil (culorile pot varia în funcție de colorantul utilizat) și, deoarece se răspândesc pe lamă, pot părea mai mari pe amprente decât la examinarea histologică. Pot fi observate celule multinucleate. Tehnica nu este specifică acestei specii de parazit.

I.2.2. Histologia

Trebuie fixate secțiuni de țesut care includ branhii și glanda digestivă timp de cel puțin 24 de ore în fixator Davidson, urmând o prelucrare normală pentru examenul histologic după includerea în parafină și colorare, de exemplu cu hematoxilină și eozină. Observațiile trebuie efectuate la grosismente succesive, de maximum × 1 000.

Rezultatul pozitiv constă în prezența unor paraziți sub formă de celule foarte mici, cu lățimea de 2-5 μm, în interiorul hemocitelor sau libere în țesutul conjunctiv sau în sinusurile epiteliului branhiilor, tubului digestiv și mantalei, deseori asociați unei reacții inflamatorii intense. Pentru a se înlătura orice îndoială, paraziții trebuie să fie observați în interiorul hemocitelor în vederea stabilirii unui diagnostic pozitiv. Tehnica nu este specifică acestei specii de parazit.

I.3. Tehnici moleculare

I.3.1. Extracția ADN-ului

ADN-ul trebuie să fie extras în conformitate cu procedurile standard.

Pot fi utilizate kituri de extracție a ADN-ului disponibile pe piață, care permit de obicei obținerea unui ADN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR după cum este detaliat mai jos.

I.3.2. Reacția în lanț a polimerazei (PCR)

Au fost elaborate și publicate mai multe protocoale PCR.

Pot fi utilizate două protocoale PCR care vizează subunitatea mică a ADNr:

(a) Primul este un protocol PCR clasic care permite amplificarea mai multor membri din taxonul *Haplosporidia*, inclusiv *Bonamia spp*. Primerii, denumiți Bo și Boas, sunt 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ și, respectiv, 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-JRC-CC-3′ și amplifică un produs de 300 pb. Amestecurile pentru PCR conțin tampon [500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 9,0 la 25 °C) și 1 % Triton® X-100)], 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM amestec dNTP, 1 μM primer sens și antisens, 0,02 unități μl^{-1} polimerază ADN Taq și 0,2 ng μl^{-1} de matrice ADN într-un volum total de 50 μl. Eșantioanele sunt denaturate într-un termociclu timp de cinci minute la 94 °C, urmând 30 de cicluri (94 °C timp de un minut, 55 °C timp de un minut, la 72 °C timp de un minut) și o elongație finală timp de 10 minute la 72 °C.

Controalele pozitive constau în ADN-ul genomic al unei gazde cu o infecție pronunțată sau în ADN plasmidic incluzând regiunea vizată.

Controalele negative constau în ADN-ul genomic al unor gazde neinfectate și în reactivi PCR fără ADN țintă.

Un rezultat pozitiv constă într-un produs de amplificare pozitiv de mărimea preconizată (și anume, 300 pb), toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive.

(b) Al doilea protocol PCR este un test PCR în timp real cu SYBR® Green. Acesta permite detectarea specifică a *B. ostreae* (descrisă în cele ce urmează) și poate fi combinat cu un test PCR în timp real cu SYBR® Green care să permită detectarea specifică a *B. exitiosa* (Ramilo et al., 2013).

Primerii BOSTRE-F (5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) și BOSTRE-R (5′- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) amplifică un produs de 208 pb. Amestecurile pentru PCR conțin SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM primeri sens și antisens și 200 ng de ADN extras. Eșantioanele sunt denaturate într-un sistem de detectare în timp real timp de 10 minute la 95 °C, urmând 35 de cicluri (95 °C timp de 30 de secunde, 55 °C timp de 45 de secunde și 72 °C timp de un minut). Analiza curbei de topire se efectuează crescând temperatura cu câte 0,5 °C/s, pornind de la o temperatură de 55 °C și ajungând la 95 °C, înregistrând intensitatea fluorescenței la fiecare schimbare de temperatură.

Controalele pozitive constau în ADN-ul genomic al unei gazde cu o infecție pronunțată sau în ADN plasmidic incluzând regiunea vizată.

Controalele negative constau în ADN-ul genomic al unor gazde neinfectate și în reactivi PCR fără ADN țintă.

Un rezultat pozitiv constă într-un produs de amplificare pozitiv cu un singur vârf al temperaturii de topire (78,25 ± 0,25 °C în condițiile publicate de Ramilo *et al.*, 2013), toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive.

I.3.3. Hibridare *in situ* (IHS)

Au fost elaborate și publicate mai multe protocoale IHS.

Trebuie utilizată o sondă care vizează subunitatea mică din complexul de gene al ADNr, cu toate că s-a demonstrat că poate apărea o reacție încrucișată cu alți membri ai familiei *Haplosporidia*.

Trebuie fixate secțiuni de țesut care includ branhii și glanda digestivă timp de cel puțin 24 de ore în fixator Davidson, urmând o prelucrare normală pentru examenul histologic după includerea în parafină. Se decupează secțiuni de 5 µm și se așează pe lame acoperite cu aminoalchilsilan, apoi se incubează în timpul nopții într-o etuvă la 40 °C. Secțiunile sunt deparafinate prin scufundarea în xilen timp de 10 minute. Această etapă se repetă o singură dată și apoi solventul se elimină prin scufundare în două băi succesive de etanol absolut de 10 minute fiecare. Secțiunile sunt apoi deshidratate prin imersie în băi succesive de etanol. Secțiunile sunt tratate cu proteinaza K (100 µg ml^{-1}) într-un tampon TE [Tris (50 mm), EDTA (10 mm)], la 37 °C timp de 30 de minute. Lamele trebuie să fie deshidratate prin imersie în băi succesive de etanol și apoi uscate la aer. Secțiunile trebuie să fie incubate cu 100 µl de tampon de hibridare [4 × SSC (soluție salină de citrat), formamidă 50 %, 1 × soluție Denhardt, 250 µg ml^{-1} ARNt din drojdie, sulfat de dextran 10 %] conținând 20 ng (2 µl din reacția PCR pregătiți astfel cum se descrie la punctul I.3.2 utilizând primerii Bo și Boas) din sonda marcată cu digoxigenină. Secțiunile sunt acoperite cu lamele de plastic pentru hibridare *in situ* și sunt așezate pe un bloc de încălzire la 95 °C timp de cinci minute. Lamele trebuie apoi răcite pe gheață timp de un minut înainte de hibridizarea la 42 °C timp de o noapte într-o etuvă umedă. Secțiunile se spală de două ori timp de cinci minute în 2 × SSC la temperatura camerei și o dată timp de 10 minute în 0,4 × SSC la 42 °C. Etapele de detectare se efectuează în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Lamele sunt apoi clătite în apă distilată sterilă (dH2O). Secțiunile sunt contracolorate cu Bismarck Brown Yellow și clătite în dH2O; se acoperă cu lamele, utilizând un mediu de montare apos.

Controalele pozitive și negative sunt secțiuni de la gazde despre care se știe că sunt infectate și, respectiv, neinfectate.

Un rezultat pozitiv constă în existența unor paraziți marcați în interiorul hemocitelor, toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive.

I.3.4. Secvențierea

Secvențierea este una dintre ultimele etape necesare pentru confirmarea diagnosticului. Regiunile vizate sunt subunitatea mică a ADNr și ITS1.

II. **Proceduri privind supravegherea și confirmarea infecției cu *Bonamia ostreae***

În scopul supravegherii și confirmării prezenței infecției cu *Bonamia ostreae* sau al excluderii suspiciunii privind această boală în conformitate cu cerințele stabilite în partea 5 secțiunea II din anexa I, metodele de diagnostic și procedurile aferente care trebuie utilizate respectă orientările stabilite în tabelul 5.1 de mai jos.

Tabelul 5.1

Orientări privind utilizarea metodelor de diagnostic pentru programele de supraveghere și pentru a confirma infecția cu *Bonamia ostreae* sau pentru a exclude suspiciunea privind această boală

Metodă	Supraveghere individualizată	Diagnostic prezumtiv	Confirmarea diagnosticului
Amprente de la inimă sau branhii	X	X	X sau
Histopatologie	X		X sau
Hibridare *in situ*			X și
PCR	X	X	X și
Secvențiere			X

PARTEA 6

METODE ȘI PROCEDURI DE DIAGNOSTIC DETALIATE PENTRU SUPRAVEGHEREA ȘI CONFIRMAREA BOLII PETELOR ALBE (*WHITE SPOT DISEASE* – WSD)

1. **Proceduri de diagnostic pentru detectarea WSSV**

În cazul în care se efectuează prelevări de eșantioane și examene de laborator în scopul programelor de supraveghere și de eradicare prevăzute în partea 6 secțiunea I din anexa I și în scopul confirmării prezenței infecției cu WSSV sau al excluderii suspiciunii privind această boală, în conformitate cu articolul 57 litera (b) din Directiva 2006/88/CE, folosind metodele de diagnostic prevăzute în partea 6 secțiunea II din anexa I, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute la punctele 2-7 din prezenta parte.

Metodele și procedurile descrise în prezenta parte din anexa II sunt adaptate după testul acreditat conform ISO 17025, aplicat în laboratorul de referință al Uniunii Europene pentru bolile crustaceelor. Pot fi folosite abordări alternative, utilizând condiții echivalente sau kituri fabricate de producători diferiți, dar care au o sensibilitate și o specificitate echivalente celor descrise în prezenta parte. În toate cazurile, produsul PCR de amplificare trebuie să fie secvențiat, pentru a confirma că este vorba despre virusul sindromului petelor albe (WSSV).

2. **Procesul de eșantionare**

Țesuturile (pleopode și branhii) de la crustacee infectate cu WSSV pot fi păstrate în etanol, în RNAlater sau pot fi congelate rapid la – 80 °C. Etapele necesare pentru identificarea WSSV utilizând eșantioane de țesuturi sunt următoarele: omogenizarea țesuturilor, extracția ADN-ului, amplificarea specifică a ADN-ului WSSV utilizând PCR, vizualizarea produsului amplificat pe un gel, purificarea ADN-ului și secvențierea pentru confirmarea identității agentului patogen.

3. **Omogenizarea țesuturilor**

Mărunțirea țesuturilor și pregătirea unui omogenat într-un tampon adecvat se efectuează utilizând un mixer Fast Prep și tuburi Lysing Matrix A (MP Biomedicals). Țesuturile sunt cântărite, plasate în tuburi Lysing Matrix A, diluate într-o proporție de 1 la 10 g/v sau în conformitate cu instrucțiunile producătorului, într-un tampon adecvat [G2 și 10 µl de proteinază K de utilizat cu kitul de extracție a ADN-ului din țesuturi DNA Tissue kit (QIAGEN)] și omogenizate cu un omogenizator Fast Prep 24 timp de două minute. Eșantioanele omogenizate se incubează la 56 °C timp de minimum patru ore sau timp de o noapte. Eșantioanele se agită, se centrifughează la 9 000 rpm timp de două minute, iar 50 µl de supernatant sau un volum echivalent cu 5 mg de țesut (greutatea țesutului optimă pentru kitul de extracție) se adaugă într-un tub-eșantion pentru extracția ADN-ului, completându-se volumul până la 200 µl cu ajutorul unui tampon G2.

4. **Extracția ADN-ului**

ADN-ul total este extras utilizând un set pentru extracția ADN-ului din țesuturi și EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen), conform instrucțiunilor producătorului. Fiecare lot de eșantioane trebuie să fie însoțit de un control al extracției (ADN din timus de vițel) și de un control negativ (tampon G2). ADN-ul este eluat într-un volum de 50 µl. Pentru a se asigura că extracția s-a finalizat cu succes, se determină concentrația ADN-ului pentru toate eșantioanele și controalele, folosind un Nano Drop. ADN-ul extras trebuie să fie congelat la – 20 °C în cazul în care nu este necesar imediat.

5. **Amplificarea WSSV prin reacția în lanț a polimerazei (PCR)**

Metoda care trebuie să fie folosită pentru detectarea WSSV este protocolul pentru detectarea WSSV prin nested PCR, prevăzut în paragrafele următoare, care permite obținerea, în prima și în a doua etapă a PCR, a unui produs de amplificare de 1 447 pb și, respectiv, de 848 pb al genei ARNr 18S.

Prima etapă a PCR se realizează într-un volum de 50 µl care conține concentrații finale de 1 × GoTaq Buffer (Promega), 5mM $MgCl_2$, 1pmol/µl primer WSSV 146 F1, 1pmol/µl primer WSSV 146 R1 (tabelul 1), 0,25mM dNTP, 1,25U polimerază Taq și 2,5µl ADN. Fiecare eșantion este duplicat și asociat unui control de extracție negativ, unui control PCR negativ (se adaugă 2,5µl H_2O în loc de ADN) și unui control pozitiv. Controlul pozitiv constă în plasmidă de WSSV diluată, pregătită și validată pentru utilizare în laborator (pusă la dispoziție de laboratorul de referință al UE).

Reacția din cea de-a doua etapă a PCR are loc în același mod ca și prima etapă, dar utilizând setul de primeri WSSV 146 F2/R2 și un al doilea control pozitiv, pentru a verifica dacă această etapă a PCR a funcționat.

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

Atât prima, cât și a doua etapă a PCR se realizează folosind următoarea succesiune a ciclurilor, utilizând un termociclu DNA Engine Tetrad 2 Peltier (sau echivalent): o etapă inițială de denaturare la 94 °C timp de două minute, apoi o etapă la 94 °C timp de 30 de secunde, la 62 °C timp de 30 de secunde, la 72 °C timp de 30 de secunde, repetată pe parcursul a 30 de cicluri, o etapă de elongație la 72 °C timp de două minute și menținere la 4 °C.

6. **Electroforeză în gel**

Produsele amplificate care rezultă atât din prima etapă, cât și din cea de a doua etapă a PCR se vizualizează pe gel de agaroză 2 % preparat cu ajutorul unui tampon TAE. 15 µl din fiecare eșantion sunt supuși unei tensiuni de 120 de volți timp de aproximativ 20 de minute și sunt apoi examinați în lumină ultravioletă. Eșantioanele pozitive vor produce o bandă de 1 447 pb în prima etapă a PCR și de 848 pb în a doua etapă a PCR. Eșantioanele de această mărime trebuie decupate și plasate într-un microtub de centrifugare de 1,5 ml. ADN-ul conținut în blocurile de gel se purifică cu ajutorul kitului Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la Promega, în conformitate cu instrucțiunile producătorilor. Concentrația ADN-ului se estimează folosind un Nano Drop. ADN-ul purificat trebuie să fie congelat la – 20 °C dacă nu este utilizat imediat.

7. **Secvențierea produselor PCR**

ADN-ul este secvențiat utilizând kitul Big Dye Terminator v3,1 (Applied Biosystems). Volumul total al fiecărei reacții este de 20 µl, concentrațiile finale fiind 1 × Big Dye Terminator, 1 × tampon de secvențiere, 10pmol/µl primer sens sau antisens și 10µl de ADN purificat (diluat la aproximativ 10ng/µl), aplicându-se următoarea succesiune a ciclurilor cu ajutorul unui termociclu DNA Engine Tetrad 2 Peltier (sau echivalent): 94 °C timp de 30 de secunde, apoi 96 °C timp de 10 secunde, 50 °C timp de 10 secunde și 60 °C timp de patru minute, ultimele trei etape producându-se de 30 de ori.

Produsele PCR se precipită utilizând o metodă pe bază de acetat de sodiu, în cadrul căreia adăugăm 20 µl ADN la 10 µl NaAc, 70 µl H_2O și 250 µl etanol; se agită și se centrifughează la 13 000 rpm timp de 20 de minute, se îndepărtează supernatantul și se spală precipitatul cu 200 µl de etanol absolut, centrifugat la 13 000 rpm timp de cinci minute. Precipitatul se usucă timp de cinci minute la 37 °C. Se adaugă la precipitat 25 µl de formamidă înalt deionizată, se încălzește la 95 °C timp de două minute și se agită bine. Eșantioanele trebuie să fie secvențiate cu analizorul ABI3130xl Avant Genetic, conform instrucțiunilor producătorului. Rezultatele secvențierii se analizează cu ajutorul software-ului Sequencher, iar secvențele se aliniază cu secvențele care se găsesc în baza de date NCBI folosind funcția BLAST.