II

(Icke-lagstiftningsakter)

BESLUT

KOMMISSIONENS GENOMFÖRANDEBESLUT (EU) 2015/1554

av den 11 september 2015

om tillämpningsföreskrifter för direktiv 2006/88/EG vad gäller krav för övervakning och diagnostiska metoder

[delgivet med nr C(2015) 6188]

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DETTA BESLUT

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av rådets direktiv 2006/88/EG av den 24 oktober 2006 om djurhälsokrav för djur och produkter från vattenbruk och om förebyggande och bekämpning av vissa sjukdomar hos vattenlevande djur ([1]), särskilt artiklarna 49.3, 50.4, 57 b och 61.3, och

av följande skäl:

(1) I direktiv 2006/88/EG fastställs förebyggande minimiåtgärder för övervakning och tidig upptäckt av de sjukdomar som förtecknas i bilaga IV till det direktivet (nedan kallade *de förtecknade sjukdomarna*) i vattenlevande djur och de bekämpningsåtgärder som ska vidtas vid misstanke om förekomst eller vid utbrott av de förtecknade sjukdomarna. I direktivet fastställs även kraven för att uppnå sjukdomsfri status i medlemsstater eller i zoner eller delområden i medlemsstater.

(2) Utrotningen av de förtecknade sjukdomarna och uppnåendet av sjukdomsfri status i en medlemsstat, en zon eller ett delområde bör grundas på samma principer och följa samma vetenskapliga tillvägagångssätt i hela unionen. Det är därför nödvändigt att fastställa särskilda krav på unionsnivå för utrotnings- och övervakningsprogram samt för de provtagningsmetoder och diagnostiska metoder som medlemsstaterna ska använda för att erhålla sjukdomsfri status i hela medlemsstaten eller i en zon eller ett delområde i medlemsstaten.

(3) De laboratorieanalyser som ska genomföras vid misstanke om eller bekräftelse av förekomst av de förtecknade sjukdomarna bör vara samma på unionsnivå och följa samma vetenskapliga standarder och protokoll. Enligt direktiv 2006/88/EG måste det fastställas särskilda diagnostiska metoder och förfaranden som ska används av de laboratorier som medlemsstaternas behöriga myndighet utsett för detta ändamål.

(4) Världsorganisationen för djurhälsa (OIE) har antagit *Aquatic Animal Health Code* (nedan kallad *OIE:s Aquatic Code*) där det fastställs standarder för att förbättra hälsan hos vattenlevande djur och välbefinnandet hos odlad fisk i hela världen, inklusive standarder för säker internationell handel med vattenlevande djur och produkter av dessa. Några kapitel i OIE:s *Aquatic Code* innehåller rekommendationer vad gäller användningen av vissa diagnostiska tester. Dessa tester fastställs i OIE:s *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (nedan kallad *OIE:s manual*). För att säkerställa att unionens krav när det gäller diagnostik av sjukdom hos vattenlevande djur överensstämmer med internationella standarder bör de regler som fastställs i detta beslut beakta standarderna och rekommendationerna i OIE:s *Aquatic Code*.

([1]) EUT L 328, 24.11.2006, s. 14.

(5) När det gäller många av de förtecknade sjukdomarna anges det i OIE:s manual ett flertal tester och förfaranden som ska användas vid laboratorieanalyser. För att det diagnostiska arbetet när det gäller de förtecknade sjukdomarna på unionsnivå ska ha en enhetlig vetenskaplig grund, måste man göra ett urval bland de diagnostiska tester och förfaranden som OIE rekommenderar samt ange vilka tester som bör vara obligatoriska vid laboratorieanalyser i samband med övervakningsprogram och för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av de förtecknade sjukdomarna. Eftersom det i vissa fall också kommer att behövas alternativa metoder och förfaranden bör det finnas beskrivningar av och vissa vetenskapliga förklaringar till när och hur de alternativa metoderna skulle kunna användas. Detta är i synnerhet nödvändigt för de mer detaljerade diagnostiska förfarandena.

(6) För att få fram exakta och reproducerbara diagnoser är det viktigt att de detaljerade förfaranden och protokoll som ska användas är validerade i enlighet med de relevanta kvalitetsstandarder som anges i del I i bilaga VI till direktiv 2006/88/EG. När det gäller många av de diagnostiska metoder som föreskrivs i detta beslut är det nödvändigt att i de diagnostiska protokollen använda kommersiella testkit som har validerats i ackrediterade tester av EU:s referenslaboratorier (EURL) för respektive sjukdom. För rättssäkerhetens skull bör de kommersiella namnen på dessa validerade kommersiella testkit anges i detta beslut.

(7) Det kan vara svårt för vissa medlemsstater att uppnå sjukdomsfri status i hela medlemsstaten eller i en zon eller ett delområde i medlemsstaten med avseende på en eller flera förtecknade sjukdomar. I sådana situationer kanske inte medlemsstaten vill erhålla eller återfå sjukdomsfri status för dessa förtecknade sjukdomar. De minimibekämpningsåtgärder som ska vidtas när den berörda medlemsstaten inte vill erhålla eller återfå sjukdomsfri status bör vara desamma på unionsnivå och följa samma kriterier. Enligt direktiv 2006/88/EG måste det därför fastställas detaljerade bestämmelser för att motverka spridning av de förtecknade sjukdomarna och minimikrav för att upphäva dessa åtgärder för att motverka sjukdomsspridning.

(8) I kommissionens beslut 2001/183/EG ([1]) fastställs krav vad gäller provtagningsplaner och diagnostiska metoder för att påvisa och bekräfta förekomst av de förtecknade sjukdomarna infektiös hematopoietisk nekros och viral hemorragisk septikemi. I kommissionens beslut 2003/466/EG ([2]) fastställs krav vad gäller provtagningsplaner och diagnostiska metoder för att påvisa infektiös laxanemi samt kriterier för zonindelning och officiell övervakning vid misstanke om eller bekräftad förekomst av sjukdomen. I kommissionens beslut 2002/878/EG ([3]) fastställs krav vad gäller provtagningsplaner och diagnostiska metoder för att påvisa och bekräfta förekomst av musselsjukdomarna bonamios and marteilios. För att uppdatera kraven bör dessa tre beslut ersättas med det här beslutet. Besluten 2001/183/EG, 2002/878/EG och 2003/466/EG bör därför upphöra att gälla.

(9) Eftersom vissa medlemsstater behöver tid för att uppdatera sina nationella referenslaboratorier så att de uppfyller de krav som fastställs i detta beslut bör det tillämpas från och med den 1 april 2016.

(10) De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för växter, djur, livsmedel och foder.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Syfte

I detta beslut fastställs bestämmelser vad gäller följande:

a) Övervakning, buffertzoner, provtagningsmetoder och diagnostiska metoder som medlemsstaterna ska använda i samband med sjukdomsstatusen i medlemsstaten eller i zoner eller delområden i medlemsstaten med avseende på de sjukdomar hos vattenlevande djur som inte är exotiska och som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG (nedan kallade *de förtecknade sjukdomarna*).

([1]) Kommissionens beslut 2001/183/EG av den 22 februari 2001 om fastställande av provtagningsplaner och diagnostiska metoder för påvisande och bekräftelse av vissa fisksjukdomar och om upphävande av beslut 92/532/EEG (EGT L 67, 9.3.2001, s. 65).

([2]) Kommissionens beslut 2003/466/EG av den 13 juni 2003 om kriterier för zonindelning och officiell övervakning vid misstanke om eller bekräftelse av förekomst av infektiös laxanemi (ISA) (EUT L 156, 25.6.2003, s. 61).

([3]) Kommissionens beslut 2002/878/EG av den 6 november 2002 om provtagningsplaner och de diagnostiseringsmetoder som skall tillämpas för påvisande och konstaterande av musselsjukdomarna Bonamiosis (*Bonamia ostreae*) och Marteiliosis (*Marteilia refringens*) (EGT L 305, 7.11.2002, s. 57).

b) De diagnostiska metoder som ska användas vid laboratorieanalyser vid misstanke om eller bekräftelse av förekomst av de förtecknade sjukdomarna.

c) De minimibekämpningsåtgärder som ska vidtas vid misstanke om eller bekräftelse av förekomst av en förtecknad sjukdom i en medlemsstat, en zon eller ett delområde som inte förklarats fri/fritt från de förtecknade sjukdomarna.

Artikel 2

Definitioner

I detta beslut avses med

a) *viral hemorragisk septikemi (VHS)*: en sjukdom som orsakas av viruset för viral hemorragisk septikemi (VHS-virus) som är ett virus av släktet *Novirhabdovirus* i familjen Rhabdoviridae,

b) *infektiös hematopoietisk nekros (IHN)*: en sjukdom som orsakas av viruset för infektiös hematopoietisk nekros (IHN-virus) som är ett virus av släktet *Novirhabdovirus* i familjen Rhabdoviridae,

c) *koiherpesvirus (KHV)*: en sjukdom som orsakas av koiherpesvirus (KHV) som tillhör familjen Alloherpesviridae; det vetenskapliga namnet är cyprinidherpesvirus 3 (CyHV-3),

d) *infektiös laxanemi (ILA/ISA)*: en sjukdom som orsakas av en infektion med HPR-deleted (*highly polymorphic region-deleted*) laxanemivirus (ISA-virus) som är ett virus av släktet *Isavirus* i familjen Orthomyxoviridae,

e) *infektion orsakad av* Marteilia refringens: en sjukdom som orsakas av en infektion med *Marteilia refringens*, en protozo tillhörande stammen Paramyxea,

f) *infektion orsakad av* Bonamia ostreae: en sjukdom som orsakas av en infektion med *Bonamia ostreae*, en protozo tillhörande stammen haplosporidier,

g) *vitprickig kräftdjurssjuka (WSD)*: en sjukdom som orsakas av *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) som är ett dubbelsträngat DNA-virus av släktet *Whispovirus* i familjen Nimaviridae.

Artikel 3

Minimikrav för utrotnings- och övervakningsprogram

Medlemsstaterna ska se till att de bestämmelser vad gäller övervaknings- och utrotningsprogram, buffertzoner, provtagningsmetoder och diagnostiska metoder som fastställs i bilaga I samt de särskilda metoder och detaljerade förfaranden som fastställs i bilaga II följs när en sjukdomsfri status ska beviljas, återkallas eller återutfärdas för en medlemsstat eller för en zon eller ett delområde i en medlemsstat med avseende på en eller flera av de förtecknade sjukdomarna.

Artikel 4

Minimikrav för diagnostiska metoder och särskilda förfaranden

Medlemsstaterna ska se till att de bekämpningsmetoder som fastställs i bilaga I och de särskilda diagnostiska metoder och detaljerade förfaranden som fastställs i bilaga II följs när laboratorieanalyser genomförs för att bekräfta eller utesluta förekomst av en förtecknad sjukdom.

Artikel 5

Minimibekämpningsåtgärder för att motverka spridning av förtecknade sjukdomar och minimikrav för att upphäva dessa åtgärder i medlemsstater, zoner eller delområden som inte förklarats fria från de förtecknade sjukdomarna

Medlemsstaterna ska se till att de minimibekämpningsåtgärder och de minimikrav för att upphäva dessa åtgärder som fastställs i bilaga I följs när bekämpningsåtgärder vidtas och dessa åtgärder för att motverka spridning av en eller flera av de förtecknade sjukdomarna upphävs i en medlemsstat eller i en zon eller ett delområde i en medlemsstat som inte förklarats fri/fritt från de förtecknade sjukdomarna.

Artikel 6

Upphävande

Besluten 2001/183/EG, 2002/878/EG och 2003/466/EG ska upphöra att gälla.

Artikel 7

Tillämpningsdatum

Detta beslut ska tillämpas från och med den 1 april 2016.

Artikel 8

Adressater

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 11 september 2015.

På kommissionens vägnar
Vytenis ANDRIUKAITIS
Ledamot av kommissionen

BILAGA I

ÖVERVAKNINGS- OCH BEKÄMPNINGSMETODER

I. **Inledning**

I denna bilaga fastställs följande:

a) Krav för de utrotnings- och övervakningsprogram som föreskrivs i artikel 44 i direktiv 2006/88/EG och de provtagningsmetoder och diagnostiska metoder som ska användas för att medlemsstater eller zoner eller delområden i medlemsstater ska förklaras sjukdomsfria enligt kapitel VII i det direktivet.

b) Provtagningsmetoder och diagnostiska metoder som ska användas vid laboratorieanalyser vid misstanke om och för bekräftelse av förekomst av sjukdomar som inte är exotiska och som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG (nedan kallade *de förtecknade sjukdomarna*) i enlighet med artiklarna 28 a och 57 b i det direktivet.

c) De åtgärder för att motverka sjukdomsspridning som i enlighet med artikel 39 i direktiv 2006/88/EG ska vidtas vid bekräftad förekomst av en förtecknad sjukdom och de åtgärder som ska vidtas för att en medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V ska erhålla hälsostatus av kategori III.

Kraven i denna bilaga omfattar följande förtecknade sjukdomar:

1.	Viral hemorragisk septikemi (VHS)	Del 1
2.	Infektiös hematopoietisk nekros (IHN)	Del 1
3.	Koiherpesvirus (KHV)	Del 2
4.	Infektiös laxanemi (ILA/ISA)	Del 3
5.	Infektion orsakad av *Marteilia refringens*	Del 4
6.	Infektion orsakad av *Bonamia ostreae*	Del 5
7.	Vitprickig kräftdjurssjuka (WSD)	Del 6

II. **Definitioner**

I bilagorna I och II avses med

a) *inlandsdelområde*: en eller fler anläggningar belägna i inlandet i en eller flera medlemsstater med ett gemensamt system för biosäkerhet och med en vattenlevande djurpopulation som har en bestämd hälsostatus i fråga om en viss sjukdom,

b) *inlandsbaserad anläggning*: en anläggning som håller vattenbruksdjur belägen i inlandet i en medlemsstat,

c) *inlandszon*: ett exakt avgränsat geografiskt område som är beläget i inlandet i en eller flera medlemsstater med ett enhetligt hydrologiskt system och som omfattar delar av ett avrinningsområde från källan till en naturlig eller konstgjord barriär som hindrar vattenlevande djur från att ta sig uppströms från de nedre delarna av avrinningsområdet, ett helt avrinningsområde från källan till mynningen, eller fler än ett avrinningsområde, inklusive mynningar, på grund av den epidemiologiska kontakten mellan avrinningsområdena genom mynningen,

d) *anläggning som officiellt förklarats smittad*: en anläggning som håller vattenlevande djur där en eller flera av de förtecknade sjukdomarna har bekräftats i enlighet med artiklarna 28 a, 29 och 57 b i direktiv 2006/88/EG av den behöriga myndigheten,

e) *kontaktanläggning*: en anläggning som håller vattenlevande djur och som på något sätt har visats ha eller är starkt misstänkt för att ha blivit kontaminerad med infektiöst material från en anläggning som officiellt förklarats smittad.

DEL 1

ÖVERVAKNINGS- OCH BEKÄMPNINGSMETODER FÖR VIRAL HEMORRAGISK SEPTIKEMI (VHS) OCH INFEKTIÖS HEMATOPOIETISK NEKROS (IHN)

I. **Krav för övervaknings- och utrotningsprogram för att erhålla och få behålla sjukdomsfri hälsostatus med avseende på VHS och IHN samt åtgärder för att motverka spridning av dessa förtecknade sjukdomar**

I.1 Allmänna krav för hälsoinspektioner och provtagning med avseende på VHS och IHN

a) Hälsoinspektioner och, i förekommande fall, provtagning ska genomföras under den tid på året då vattentemperaturen understiger 14 °C eller närhelst under året då vattentemperaturen sannolikt är som lägst.

b) När riktad övervakning av vilda populationer krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till direktiv 2006/88/EG ska provtagningsplatsernas antal och geografiska spridning fastställas så att en rimlig täckning av medlemsstaten, zonen eller delområdet uppnås. Provtagningsplatserna ska vara representativa för de olika ekosystem där vilda populationer av mottagliga arter finns.

c) När anläggningar eller vilda populationer ska genomgå hälsoinspektioner eller provtas mer än en gång per år ska intervallerna mellan hälsoinspektionerna och mellan provinsamlingarna vara så långa som möjligt men minst fyra månader, med beaktande av temperaturkraven i led a.

d) Alla produktionsenheter (t.ex. dammar, tankar och nätkassar) ska genomgå hälsoinspektioner med avseende på förekomst av fisk som är död, svag eller beter sig onormalt. Särskild uppmärksamhet ska ägnas området kring vattenutsläpp, där svag fisk brukar samlas på grund av det strömmande vattnet.

e) Fisk av mottagliga arter för provinsamling ska väljas på följande sätt:

i) Om det förekommer regnbåge ska endast fisk av den arten väljas för provtagning, utom när andra mottagliga arter förekommer som visar typiska tecken på VHS eller IHN. Om regnbåge inte förekommer ska provet vara representativt för alla andra mottagliga arter som förekommer.

ii) Om det förekommer svag fisk som beter sig onormalt eller nydöd fisk (ej sönderfallande/rutten) ska denna fisk väljas. Om mer än en vattentäkt används för fiskproduktion ska fisk från samtliga vattentäkter ingå i provet.

iii) Den utvalda fisken ska omfatta fisk som samlats in på sådant sätt att såväl samtliga delar av anläggningen som alla årsklasser är proportionellt representerade i provet.

I.2 Särskilda krav för att erhålla sjukdomsfri hälsostatus (kategori I) med avseende på VHS och IHN

I.2.1 Övervakningsprogram

a) En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori III i enlighet med del B i bilaga III till direktiv 2006/88/EG med avseende på VHS eller IHN, eller båda, kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på dessa förtecknade sjukdomar, förutsatt att alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet uppfyller kraven i bilaga V till det direktivet samt att alla anläggningarna och, när så krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till det direktivet, de provtagningsplatser i vilda populationer som valts i enlighet med den delen har omfattats av ett av följande övervakningsprogram:

i) Modell A – tvåårigt övervakningsprogram

Anläggningarna eller provtagningsplatserna ska ha genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst två på varandra följande år enligt tabell 1.A i avsnitt II.

Under denna tvåårsperiod ska alla prover ha testats med negativt resultat med avseende på VHS eller IHN, eller båda, med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av antingen VHS eller IHN, eller båda, ska ha uteslutits i enlighet med provtagningsmetoderna och de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

ii) Modell B – fyraårigt övervakningsprogram med minskad provstorlek

Anläggningarna eller provtagningsplatserna ska ha genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst fyra på varandra följande år enligt tabell 1.B i avsnitt II.

Under denna fyraårsperiod ska alla prover ha testats med negativt resultat med avseende på VHS eller IHN, eller båda, med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av antingen VHS eller IHN, eller båda, ska ha uteslutits i enlighet med provtagningsmetoderna och de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

b) Om under genomförandet av det övervakningsprogram som avses i led a en infektion orsakad av VHS eller IHN, eller båda, bekräftas på en anläggning som ingår i övervakningsprogrammet och anläggningens hälsostatus av kategori II därför återkallas, kan anläggningen omedelbart återfå sin hälsostatus av kategori II och fortsätta genomförandet av övervakningsprogrammet för att erhålla sjukdomsfri status utan att genomföra ett utrotningsprogram enligt punkt I.2.2, förutsatt att anläggningen uppfyller följande villkor:

i) Det är en inlandsbaserad anläggning vars hälsostatus med avseende på VHS eller IHN, eller båda, i enlighet med del II punkt 3 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG inte är beroende av hälsostatusen med avseende på dessa förtecknade sjukdomar hos de vattenlevande djurpopulationerna i omgivande naturliga vatten.

ii) Anläggningen har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor.

iii) Där har skett utsättning med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda.

I.2.2 Utrotningsprogram

I.2.2.1 Allmänna krav

En medlemsstat, en zon eller ett delområde med en hälsostatus av kategori V med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda, kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på dessa förtecknade sjukdomar, förutsatt att alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats av ett utrotningsprogram som uppfyller följande krav i leden a–e:

a) De minimibekämpningsåtgärder som fastställs i kapitel V avsnitt 4 i direktiv 2006/88/EG ska ha vidtagits på ett effektivt sätt och ett kontrollområde som avses i artikel 32 b i det direktivet, inklusive en skyddszon och övervakningszon, ska ha fastställts i närheten av den eller de anläggningar som officiellt förklarats smittade med antingen VHS eller IHN, eller båda dessa förtecknade sjukdomar.

Kontrollområdet ska ha fastställts utifrån varje enskilt fall med beaktande av de faktorer som påverkar risken för att den förtecknade sjukdomen sprids till odlad och vild fisk, såsom antal, andel och fördelning av fiskdödlighet på den anläggning som är smittad med antingen VHS eller IHN, eller båda, avstånd till närliggande anläggningar och deras täthet, närhet till fiskslakterier, kontaktanläggningar, arter på anläggningarna, odlingsmetoder på de drabbade anläggningarna och på närliggande anläggningar till de drabbade anläggningarna samt hydrodynamiska förhållanden och andra faktorer av epidemiologisk betydelse som identifierats.

Vid fastställandet av skydds- och övervakningszoner ska följande minimikrav gälla beträffande zonernas geografiska avgränsning:

i) En skyddszon ska fastställas i den omedelbara närheten av en anläggning som officiellt förklarats smittad med antingen VHS eller IHN, eller båda dessa förtecknade sjukdomar, och den ska motsvara följande:

1. I kustområden: Ett område inom en cirkel med en radie som minst motsvarar förflyttningen under en tidvattencykel eller på minst 5 km, beroende på vilket område som är störst, med centrum på den anläggning som officiellt förklarats smittad med antingen VHS eller IHN, eller båda, eller ett motsvarande område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

2. I inlandsområden: Hela avrinningsområdet runt den anläggning som officiellt förklarats smittad med VHS eller IHN, eller båda. Den behöriga myndigheten får begränsa zonens omfattning till delar av avrinningsområdet eller anläggningens areal, förutsatt att antingen VHS eller IHN, eller båda, inte riskerar att spridas.

ii) En övervakningszon ska fastställas utanför skyddszonen av den behöriga myndigheten och den ska motsvara följande:

1. I kustområden: Ett område som omger skyddszonen där de båda zonerna för tidvattencykelns förflyttning överlappar varandra, eller ett område som omger skyddszonen inom en cirkel med en radie på 10 km från skyddszonens centrum, eller ett motsvarande område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

2. I inlandsområden: Ett utvidgat område utanför den fastställda skyddszonen.

b) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den skyddszon som inte officiellt förklarats smittad med VHS eller IHN, eller båda, ska bli föremål för en officiell undersökning som omfattar åtminstone följande:

i) Insamling av prover för testning av 10 fiskar när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på infektion orsakad av antingen VHS eller IHN, eller båda, eller av minst 30 fiskar när inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt iakttas.

ii) En hälsoinspektion i de anläggningar där de tester som avses i led i har gett negativa resultat. Hälsoinspektionerna ska fortsätta en gång per månad under den period då vattentemperaturen understiger 14 °C, utom när dammar eller nätkassar är täckta av is, fram till dess att skyddszonen har återkallats i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

c) Alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med antingen VHS eller IHN, eller båda, ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor. När alla anläggningar som officiellt förklarats smittade inom samma skyddszon har tömts ska de vara ur drift samtidigt i minst tre veckor. Detta stycke gäller även nya anläggningar som officiellt förklarats smittade under utrotningsprogrammets genomförande.

När driftuppehållet genomförs på anläggningar som officiellt förklarats smittade ska skyddszonerna övergå till övervakningszoner.

Den behöriga myndigheten får kräva att andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Den behöriga myndigheten ska efter en riskbedömning i varje enskilt fall avgöra hur länge de andra anläggningarna ska vara ur drift.

d) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med VHS eller IHN, eller båda dessa förtecknade sjukdomar, och i alla andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll och som avses i led c ska utsättning ske med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en sjukdomsfri hälsostatus (kategori I) med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda.

Utsättningen ska inte ske förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

e) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den medlemsstat, den zon eller det delområde som omfattas av utrotningsprogrammet och, när det krävs övervakning av vilda populationer, de provtagningsplatser som valts i enlighet med punkt I.1 ska därefter omfattas av den övervakning som fastställs i punkt I.2.1.

I.2.2.2 Krav för att återfå sjukdomsfri status för inlandsdelområden som omfattar en enda anläggning och som tidigare har förklarats fri från antingen VHS eller IHN, eller båda

Ett inlandsdelområde som omfattar en enda anläggning som tidigare har förklarats fri från antingen VHS eller IHN, eller båda dessa förtecknade sjukdomar, vars hälsostatus med avseende på dessa förtecknade sjukdomar i enlighet med del II punkt 3 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG inte är beroende av omgivande naturliga vatten och vars hälsostatus av kategori I har återkallats i enlighet med artikel 53.3 i det direktivet, kan återfå sin hälsostatus av kategori I omedelbart efter det att den behöriga myndigheten har bekräftat att följande villkor har uppfyllts:

a) Alla anläggningar som officiellt bekräftats smittade med antingen VHS eller IHN, eller båda, ska ha tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor.

b) I den anläggning som officiellt bekräftats smittad med antingen VHS eller IHN, eller båda, har utsättning skett med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda.

I.3 Särskilda krav för att få behålla sjukdomsfri hälsostatus (kategori I) med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda

Om det enligt artikel 52 i direktiv 2006/88/EG krävs riktad övervakning för att få behålla hälsostatus av kategori I ska alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet i fråga genomgå hälsoinspektion och fisk ska provtas i enlighet med tabell 1.C i avsnitt II i denna del, med beaktande av anläggningens risknivå för att smittas med antingen VHS eller IHN, eller båda av dessa förtecknade sjukdomar.

Risken för att smittas med antingen VHS eller IHN, eller båda, ska betraktas som hög när man fastställer frekvensen på hälsoinspektioner i delområden med hälsostatus av kategori I med avseende på VHS eller IHN, eller båda, vilka är belägna i inlandsområden och där hälsostatusen med avseende på VHS eller IHN är beroende av hälsostatusen hos de vattenlevande djurpopulationerna i omgivande naturliga vatten i enlighet med del II punkt 2 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG.

Den sjukdomsfria statusen får endast behållas så länge som alla prover testas med negativt resultat med avseende på VHS eller IHN, eller båda dessa förtecknade sjukdomar, med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av antingen VHS eller IHN, eller båda, har uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

I.4 Krav för upphävande av de åtgärder för att motverka sjukdomsspridning som fastställs i artikel 39 i direktiv 2006/88/EG, dvs. övergång från hälsostatus av kategori V till kategori III

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda, kan uppnå hälsostatus av kategori III med avseende på dessa förtecknade sjukdomar, förutsatt att följande gäller:

a) Kraven i punkt I.2.2.1 a, b och c är uppfyllda. Om driftuppehåll inte är tekniskt möjligt ska de berörda anläggningarna bli föremål för en alternativ åtgärd som ger nästan samma garantier för att antingen IHN-virus eller VHS-virus, eller både, utrotas från anläggningens omgivning.

b) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade och alla andra anläggningar som gjort driftuppehåll/varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a i de fastställda skydds- och övervakningszonerna har utsättning skett med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I, II eller III med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda.

c) Utsättningen skedde inte förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade hade tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a.

II. **Diagnostiska metoder och provtagningsmetoder**

II.1 Organ som ska provtas

De vävnader som ska undersökas är mjälte, njurens främre del och antingen hjärta eller encephalon. När stamfisk provtas kan även ovarie- eller sädesvätska undersökas.

När det gäller småyngel kan hela fiskar som är mindre än 4 cm sönderdelas med steril sax eller skalpell efter det att kroppen bakom analöppningen har avlägsnats. Om ett prov består av hela fiskar som är 4–6 cm ska inälvorna inklusive njure samlas in.

Organdelar från högst tio fiskar får slås samman.

II.2 Diagnostiska metoder för att erhålla och få behålla sjukdomsfri status med avseende på antingen VHS eller IHN, eller båda

De diagnostiska metoderna, i enlighet med de godkända diagnostiska metoderna och förfarandena i del I avsnitt I i bilaga II, för att uppnå eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på VHS eller IHN, eller båda, ska vara antingen

a) virusisolering i cellkulturer, följt av identifiering med ELISA (enzymkopplad immunadsorberande analys), indirekt fluorescerande antikroppstest (IFAT), virusneutralisationstest eller realtids-PCR med omvänd transkription (RT-qPCR), eller

b) RT-qPCR.

II.3 Provtagningsmetoder och diagnostiska metoder för att utesluta eller bekräfta förekomst av VHS eller IHN

När det i enlighet med artikel 28 i direktiv 2006/88/EG krävs att en misstanke om förekomst av antingen VHS eller IHN, eller båda, ska bekräftas eller uteslutas ska följande förfaranden för inspektion, provtagning och testning följas:

a) Den anläggning där misstanke föreligger ska genomgå minst en hälsoinspektion och en provtagning av 10 fiskar när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på infektion orsakad av antingen VHS eller IHN, eller båda, eller av minst 30 fiskar när inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt iakttas. Proverna ska testas med en eller flera av de diagnostiska metoderna i leden i och ii i enlighet med de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i del 1 avsnitt II i bilaga II:

   i) Konventionell virusisolering i cellkultur med efterföljande immunokemisk eller molekylär identifiering av virus.

   ii) Påvisande av virus med RT-qPCR.

   iii) Andra diagnostiska metoder med liknande dokumenterad effektivitet, t.ex. indirekt fluorescerande antikroppstest (IFAT), ELISA (enzymkopplad immunadsorberande analys), RT-PCR och immunhistokemi (IHK).

b) Förekomsten av VHS ska anses bekräftad om en eller flera av dessa diagnostiska metoder är positiva för VHS-virus. Förekomsten av IHN ska anses bekräftad om en eller flera av dessa diagnostiska metoder är positiva för IHN-virus. Bekräftelsen av det första fallet av VHS eller IHN i medlemsstater, zoner eller delområden som inte tidigare varit smittade ska baseras på konventionell virusisolering i cellkultur eller RT-qPCR.

c) Misstanke om förekomst av antingen VHS-virus eller IHNV-virus, eller båda, kan uteslutas om cellodlingstester eller RT-qPCR inte visar på några ytterligare tecken på förekomst av antingen VHS-virus eller IHN-virus, eller båda.

Tabell 1.A

Övervakning av zoner och delområden för den tvååriga kontrollperiod som avses i punkt I.2.1 a i och som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på VHS eller IHN

Typ av anläggning	Antal hälsoinspektioner per år (två år)	Antal provtagningar per år (två år)	Antal fiskar i provet (1)	
			Antal växande fiskar	Antal stamfiskar (2)
a) Anläggningar med stamfisk	2	2	50 (första inspektionen) 75 (andra inspektionen)	30 (första eller andra inspektionen) 0 (första eller andra inspektionen)
b) Anläggningar med endast stamfisk	2	1	0	75 (första eller andra inspektionen)
c) Anläggningar utan stamfisk	2	2	75 (3) (första och andra inspektionen)	0

Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 10

(1) Proverna får inte samlas in tidigare än tre veckor efter överföringen av fisken från söt- till saltvatten.
(2) Ovarie- eller sädesvätska ska samlas in från stamfisk när den är lekmogen genom strykning.
(3) Det antal fiskar som provtas ska garantera att VHS-virus eller IHN-virus påvisas med 95 % konfidens om den hypotetiska prevalensen är 5 %.

Tabell 1.B

Övervakning med minskad provstorlek för den fyraåriga kontrollperiod som avses i punkt I.2.1 a ii och som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på VHS eller IHN

Typ av anläggning	Antal hälsoinspektioner per år	Antal provtagningar per år	Antal fiskar i provet (1)	
			Antal växande fiskar	Antal stamfiskar (2)
Övervakningsperiodens första två år				
a) Anläggningar med stamfisk	2	1	0 (första inspektionen) 30 (andra inspektionen)	0 (första inspektionen) 0 (andra inspektionen)
b) Anläggningar med endast stamfisk	2	1	0	30 (första eller andra inspektionen)
c) Anläggningar utan stamfisk	2	1	30 (3) (första eller andra inspektionen)	0
Övervakningsperiodens sista två år				
a) Anläggningar med stamfisk	2	2	30 (första inspektionen) 0 (andra inspektionen)	0 (första inspektionen) 30 (andra inspektionen)

Typ av anläggning	Antal hälsoinspektioner per år	Antal provtagningar per år	Antal fiskar i provet (1)	
			Antal växande fiskar	Antal stamfiskar (2)
b) Anläggningar med endast stamfisk	2	2		30 (första och andra inspektionen)
c) Anläggningar utan stamfisk	2	2	30 (3) (första och andra inspektionen)	

Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 10

(1) Proverna får inte samlas in tidigare än tre veckor efter överföringen av fisken från söt- till saltvatten.
(2) Ovarie- eller sädesvätska ska samlas in från stamfisk när den är lekmogen genom strykning.
(3) Det antal fiskar som provtas ska garantera att VHS-virus eller IHN-virus påvisas med 95 % konfidens om den hypotetiska prevalensen är 10 %.

Tabell 1.C

Övervakning av zoner eller delområden för att få behålla sjukdomsfri status med avseende på VHS eller IHN enligt punkt I.3

Risknivå	Antal hälsoinspektioner	Antal fiskar i provet (3)
Hög	2 per år	30 (1) (2)
Medelhög	1 per år	30 (1)
Låg	1 vartannat år	30 (1)

Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 10

(1) Proverna får inte samlas in tidigare än tre veckor efter överföringen av fisken från söt- till saltvatten.
(2) Det antal fiskar som provtas ska garantera att VHS-virus eller IHN-virus påvisas med 95 % konfidens om den hypotetiska prevalensen är 10 %.
(3) Det ska finnas minst ett prov för varje hälsoinspektion.

DEL 2

ÖVERVAKNINGS- OCH BEKÄMPNINGSMETODER FÖR KOIHERPESVIRUS (KHV)

I. **Krav för övervaknings- och utrotningsprogram för att erhålla och få behålla sjukdomsfri hälsostatus med avseende på KHV och för att motverka infektion orsakad av koiherpesvirus (KHV)**

I.1 Allmänna krav

När riktad övervakning av vilda populationer krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till direktiv 2006/88/EG ska provtagningsplatsernas antal och geografiska spridning fastställas så att en rimlig täckning av medlemsstaten, zonen eller delområdet uppnås. Provtagningsplatserna ska också vara representativa för de olika ekosystem där vilda mottagliga populationer finns, t.ex. flodsystem och sjöar.

Riktad övervakning ska grundas på regelbunden övervakning av platser med mottagliga arter. Dessa platser ska övervakas då vattentemperaturen är tillräckligt hög för att sjukdomen ska kunna utvecklas (> 15 °C) och tidigast två veckor från den dag då denna temperatur uppnåddes. Varje sjuk fisk eller fisk med onormalt beteende som finns på platsen ska provtas och testas.

När så är möjligt ska fisk som har hållits under en längre period i temperaturer där viruset förökar sig (dvs. vid 15–26 °C i 2–3 veckor) provtas. Ett av följande tillvägagångssätt kan dock godtas:

a) Vid överföringen från vinter- till sommardammar samlas en delpopulation in och den fisken hålls i samma vattenförekomst som sommardammen tills den minimitemperatur som krävs har uppnåtts.

b) Vid upptagning och annan hantering av fisken samlas prover in som en del av normal hantering. Proverna ska om möjligt samlas in 24–72 timmar efter denna hantering för att förbättra chanserna för att påvisa KHV.

När anläggningar eller vilda populationer ska genomgå hälsoinspektioner eller provtas mer än en gång per år ska intervallerna mellan hälsoinspektionerna eller mellan provinsamlingarna vara så långa som möjligt under den årstid då vattentemperaturen sannolikt är som högst utan att överskrida gränsen på 28 °C.

Alla produktionsenheter (t.ex. dammar och tankar) ska genomgå hälsoinspektioner med avseende på förekomst av fisk som är död, svag eller beter sig onormalt.

Cyprinus carpio och dess hybrider (t.ex. *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*) ska samlas in när de förekommer på anläggningen.

Fisk för provinsamling ska väljas på följande sätt:

i) Om det förekommer svag fisk som beter sig onormalt eller nydöd fisk (ej sönderfallande/rutten) ska denna fisk väljas.

ii) Om mer än en vattentäkt används för fiskproduktion ska fisk från samtliga vattentäkter ingå i provet.

iii) Den utvalda fisken ska omfatta fisk som samlats in på sådant sätt att såväl samtliga delar av anläggningen som alla årsklasser är proportionellt representerade i provet.

I.2 Särskilda krav för att uppnå sjukdomsfri hälsostatus (kategori I) med avseende på KHV

I.2.1 Övervakningsprogram

a) En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori III med avseende på KHV kan uppnå hälsostatus av kategori I när alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet uppfyller kraven för sjukdomsfri status i bilaga V till det direktivet samt när alla anläggningarna och, när så krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i den bilagan, de provtagningsplatser i vilda populationer som valts i enlighet med den delen har omfattats av ett av följande övervakningsprogram:

i) Modell A – tvåårigt övervakningsprogram

Anläggningarna eller provtagningsplatserna ska ha genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst två på varandra följande år enligt tabell 2.A i avsnitt III.

Under denna tvåårsperiod ska alla prover ha testats med negativt resultat med avseende på KHV med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av KHV ska ha uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt III.2.

ii) Modell B – fyraårigt övervakningsprogram med minskad provstorlek

Anläggningarna eller provtagningsplatserna ska ha genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst fyra på varandra följande år enligt tabell 2.B i avsnitt III.

Under denna fyraårsperiod ska alla prover ha testats med negativt resultat med avseende på KHV med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av KHV ska ha uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt III.2.

b) Om under genomförandet av det fyraåriga övervakningsprogrammet som avses i led a en infektion orsakad av KHV bekräftas på en anläggning som ingår i övervakningsprogrammet och anläggningens hälsostatus av kategori II därför återkallas, kan anläggningen omedelbart återfå sin hälsostatus av kategori II och fortsätta genomförandet av övervakningsprogrammet för att erhålla sjukdomsfri status utan att genomföra ett utrotningsprogram enligt punkt I.2.2, förutsatt att anläggningen uppfyller följande villkor:

i) Det är en inlandsbaserad anläggning vars hälsostatus med avseende på KHV i enlighet med del II punkt 3 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG inte är beroende av hälsostatusen med avseende på denna förtecknade sjukdom hos de vattenlevande djurpopulationerna i omgivande naturliga vatten.

ii) Anläggningen har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor.

iii) Där har skett utsättning med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på KHV.

I.2.2 Utrotningsprogram

I.2.2.1 Allmänna krav

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på KHV kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats för åtminstone följande utrotningsprogram:

a) De minimibekämpningsåtgärder som fastställs i kapitel V avsnitt 4 i direktiv 2006/88/EG har vidtagits på ett effektivt sätt och ett kontrollområde som avses i artikel 32 b i det direktivet, inklusive en skyddszon och övervakningszon, har fastställts i närheten av den eller de anläggningar som officiellt förklarats smittade med KHV.

Kontrollområdet ska ha fastställts utifrån varje enskilt fall med beaktande av de faktorer som påverkar risken för att KHV sprids till odlad och vild fisk, såsom antal, andel och fördelning av fiskdödlighet på den anläggning som är smittad med KHV, avstånd till närliggande anläggningar och deras täthet, närhet till fiskslakterier, kontaktanläggningar, arter på anläggningarna, odlingsmetoder på de drabbade anläggningarna och närliggande anläggningar samt hydrodynamiska förhållanden och andra faktorer av epidemiologisk betydelse som identifierats.

Vid fastställandet av skydds- och övervakningszoner ska följande minimikrav gälla beträffande zonernas geografiska avgränsning:

i) En skyddszon ska fastställas i den omedelbara närheten av en anläggning som officiellt förklarats smittad med KHV och den ska motsvara hela avrinningsområdet runt den anläggning som officiellt förklarats smittad med KHV. Den behöriga myndigheten får begränsa zonens omfattning till delar av avrinningsområdet, förutsatt att KHV inte riskerar att spridas.

ii) En övervakningszon ska fastställas utanför skyddszonen och den ska motsvara ett utvidgat område som omger den fastställda skyddszonen.

b) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den skyddszon som inte officiellt förklarats smittad med KHV ska bli föremål för en officiell undersökning som omfattar åtminstone följande:

i) Insamling av prover för testning av 10 fiskar när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på KHV, eller av 30 fiskar när inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt iakttas.

ii) En hälsoinspektion i de anläggningar där de tester som avses i punkt III.2 har gett negativa resultat. Hälsoinspektionerna ska fortsätta en gång per månad under den årstid då vattentemperaturen sannolikt överstiger 15 °C fram till dess att skyddszonen har återkallats i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

c) Alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med KHV ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor. När alla anläggningar som officiellt förklarats smittade inom samma skyddszon har tömts ska de vara ur drift samtidigt i minst tre veckor. Detta stycke gäller även nya anläggningar som officiellt förklarats smittade under utrotningsprogrammets genomförande.

När driftuppehållet genomförs på anläggningar som officiellt förklarats smittade ska skyddszonerna övergå till övervakningszoner.

Den behöriga myndigheten får kräva att andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Den behöriga myndigheten ska efter en riskbedömning i varje enskilt fall avgöra hur länge driftuppehållet ska vara.

d) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med KHV och i alla andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll ska utsättning

i) ske med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på KHV, eller

ii) under en övergångsperiod till och med den 31 december 2020 ske med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med ett godkänt program för övervakning av KHV.

Utsättningen ska inte ske förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med KHV har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

e) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den medlemsstat, den zon eller det delområde som omfattas av utrotningsprogrammet och, när det krävs övervakning av vilda populationer, de provtagningsplatser som valts i enlighet med punkt I.1 ska därefter ha varit föremål för åtminstone det övervakningsprogram som fastställs i punkt I.2.1.

I.2.2.2 Krav för att återfå sjukdomsfri status för inlandsdelområden som omfattar en enda anläggning och som tidigare har förklarats fria från KHV

Ett inlandsdelområde som omfattar en enda anläggning som har hälsostatus av kategori I med avseende på KHV, vars hälsostatus med avseende på KHV i enlighet med del II punkt 3 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG inte är beroende av omgivande naturliga vatten och vars hälsostatus av kategori I har återkallats i enlighet med artikel 53.3 i det direktivet, kan återfå sin hälsostatus av kategori I med avseende på KHV omedelbart efter det att den behöriga myndigheten har bekräftat att följande villkor har uppfyllts:

a) Anläggningen har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor.

b) Där har skett utsättning med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I eller delområden med ett godkänt program för övervakning av KHV (hälsostatus av kategori II).

I.3 Särskilda krav för att få behålla hälsostatus av kategori I med avseende på KHV

Om det enligt artikel 52 i direktiv 2006/88/EG krävs riktad övervakning för att få behålla hälsostatus av kategori I ska alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet i fråga genomgå hälsoinspektion och provtas i enlighet med tabell 2.B i avsnitt III i denna del, med beaktande av anläggningens risknivå för att smittas med KHV.

Risknivån hög i tabell 2.C ska användas när man fastställer frekvensen på hälsoinspektioner i delområden med hälsostatus av kategori I med avseende på KHV, vilka är belägna i inlandsområden och omfattar en eller fler anläggningar vars hälsostatus med avseende på KHV är beroende av hälsostatusen för denna förtecknade sjukdom i omgivande naturliga vatten i enlighet med del II punkt 2 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG.

I medlemsstater, zoner eller delområden där antalet anläggningar är begränsat och riktad övervakning av dessa anläggningar inte ger tillräckliga epidemiologiska uppgifter ska övervakning för att få behålla sjukdomsfri status omfatta provtagningsplatser som valts i enlighet med kraven i punkt I.1.

Dessa provtagningsplatser ska inspekteras och provtas enligt rotationsprincipen (50 % av provtagningsplatserna per år). Provtagningen ska genomföras i enlighet med tabell 2.C i avsnitt III. Proverna ska väljas, beredas och undersökas enligt beskrivningen i avsnitt II och laboratorieanalyserna ska ge negativt resultat med avseende på förekomsten av KHV-agens.

Den sjukdomsfria statusen får endast behållas så länge som alla prover testas med negativt resultat med avseende på KHV med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av KHV ska uteslutas i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt III.2.

I.4 Särskilda krav för upphävande av de åtgärder för att motverka sjukdomsspridning som fastställs i artikel 39 i direktiv 2006/88/EG för att erhålla hälsostatus av kategori III med avseende på KHV i medlemsstater, delområden eller zoner som har hälsostatus av kategori V

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på KHV kan uppnå hälsostatus av kategori III med avseende på denna förtecknade sjukdom, förutsatt att följande gäller:

a) Kraven i punkt I.2.2.1 a, b och c är uppfyllda. Om driftuppehåll inte är tekniskt möjligt ska de berörda anläggningarna bli föremål för en alternativ åtgärd som ger nästan samma garantier för att KHV utrotas från anläggningens omgivning.

b) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade och alla andra anläggningar som gjort driftuppehåll/varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a i de fastställda skydds- och övervakningszonerna har utsättning skett med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I, II eller III med avseende på KHV.

c) Utsättningen skedde inte förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade hade tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a.

II. **Diagnostiska metoder och provtagningsmetoder för övervakning för att erhålla och få behålla sjukdomsfri status med avseende på KHV**

II.1 Prover

De vävnader som ska undersökas är delar av gäle och njure. Organdelar från högst två fiskar får slås samman.

II.2 Diagnostiska metoder för övervakning för att erhålla och få behålla sjukdomsfri status med avseende på KHV

Den diagnostiska metoden för att uppnå eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på KHV ska vara realtids-PCR (qPCR) i enlighet med de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i del 2 avsnitt II i bilaga II.

III. **Diagnostiska metoder och provtagningsmetoder för officiell undersökning för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av KHV**

III.1 Prover

De vävnader som ska undersökas är delar av gäle och njure. Organdelar från högst två fiskar får slås samman.

III.2 Officiell undersökning och diagnostiska metoder för att utesluta eller bekräfta förekomst av infektion orsakad av KHV

När det i enlighet med artikel 28 i direktiv 2006/88/EG krävs att en misstanke om förekomst av KHV ska bekräftas eller uteslutas ska följande förfarande för inspektion, provtagning och testning följas:

a) Den officiella undersökningen ska omfatta minst en hälsoinspektion och en provtagning av 10 fiskar när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på infektion orsakad av KHV, eller av 30 fiskar när inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt iakttas. Proverna ska testas med den diagnostiska metoden i led b i enlighet med de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i del 2 avsnitt II i bilaga II.

b) Förekomsten av en infektion orsakad av KHV ska anses bekräftad om KHV påvisas genom PCR.

Misstanke om förekomst av KHV kan uteslutas om detta test inte visar på några ytterligare tecken på förekomst av KHV.

Tabell 2.A

Övervakning av zoner och delområden för den tvååriga kontrollperiod som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på KHV enligt punkt I.2.1

		Antal kliniska inspektioner per år (två år)	Antal laboratorieanalyser per år (två år)	Antal fiskar i provet
Anläggningar/provtagningsplatser	Övervakningsperiodens första två år	2	2	75 [1]
	Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 2			

[1] Det antal fiskar som provtas ska garantera att KHV påvisas med 95 % konfidens om den hypotetiska prevalensen är 5 %.

Tabell 2.B

Övervakning av zoner och delområden för den fyraåriga kontrollperiod som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på KHV enligt punkt I.2.1

		Antal kliniska inspektioner per år	Antal laboratorieanalyser per år	Antal fiskar i provet
Anläggningar/provtagningsplatser	Övervakningsperiodens första två år	1	1	30
Anläggningar/provtagningsplatser	Övervakningsperiodens sista två år	2	2	30
	Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 2			

Tabell 2.C

Övervakning av zoner eller delområden för att få behålla sjukdomsfri status med avseende på KHV enligt punkt I.3

Risknivå	Antal hälsoinspektioner	Antal fiskar i provet
Hög	2 per år	30
Medelhög	1 per år	30
Låg	1 vartannat år	30

Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 2

Tabell 2.D

Övervakning för att få behålla sjukdomsfri status med avseende på KHV i medlemsstater, zoner eller delområden där antalet anläggningar är begränsat och riktad övervakning av dessa anläggningar inte ger tillräckliga epidemiologiska uppgifter enligt punkt I.3

	Antal kliniska inspektioner per år	Antal laboratorieanalyser per år	Antal fiskar i provet
Provtagningsplatser	1 vartannat år	1 vartannat år	30

Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 2

DEL 3

ÖVERVAKNINGS- OCH BEKÄMPNINGSMETODER FÖR INFEKTIÖS LAXANEMI (ILA/ISA)

I. **Krav för övervaknings- och utrotningsprogram för att erhålla och få behålla sjukdomsfri hälsostatus med avseende på ILA/ISA samt för att motverka infektion orsakad av HPR-deleted ISA-virus**

I.1 Allmänna krav

När det enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till direktiv 2006/88/EG krävs att hälsoinspektioner och provtagning på anläggningar genomförs mer än en gång per år ska intervallerna mellan hälsoinspektionerna eller mellan provinsamlingarna vara så långa som möjligt.

När riktad övervakning av vilda populationer krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till direktiv 2006/88/EG ska provtagningsplatsernas antal och geografiska spridning fastställas så att en rimlig täckning av medlemsstaten, zonen eller delområdet uppnås. Provtagningsplatserna ska också vara representativa för de olika ekosystem där vilda mottagliga populationer finns.

Alla produktionsenheter (t.ex. dammar, tankar och nätkassar) ska genomgå hälsoinspektioner med avseende på förekomst av fisk som är död, svag eller beter sig onormalt. Särskild uppmärksamhet ska ägnas området kring vattenutsläpp, där svag fisk brukar samlas på grund av det strömmande vattnet.

Fisk för provinsamling ska väljas på följande sätt:

a) Endast döende eller nydöd fisk, men ej sönderfallande/rutten, ska väljas. Vid insamlingen ska särskilt fisk med anemi, blödningar eller andra kliniska tecken på cirkulationsrubbningar prioriteras.

b) Om atlantlax är bland de mottagliga arterna på platsen ska prover från atlantlax prioriteras. Om det inte finns någon atlantlax i fiskodlingsanläggningen ska andra mottagliga arter provtas.

c) Om mer än en vattentäkt används för fiskproduktion ska fisk från samtliga vattentäkter ingå i provet.

d) Den utvalda fisken ska omfatta fisk som samlats in på sådant sätt att såväl samtliga produktionsenheter i anläggningen (t.ex. nätkassar, tankar och dammar) som alla årsklasser är proportionellt representerade i provet.

I.2 Särskilda krav för att uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på ILA/ISA

I.2.1 Övervakningsprogram

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori III i enlighet med del B i bilaga III till direktiv 2006/88/EG med avseende på ILA/ISA kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet uppfyller de relevanta kraven i bilaga V till det direktivet samt när alla anläggningarna och, när så krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till det direktivet, de provtagningsplatser i vilda populationer som valts i enlighet med den punkten har omfattats av följande övervakningsprogram:

a) Anläggningarna eller provtagningsplatserna har genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst två på varandra följande år enligt tabell 3.A i avsnitt II.

b) Under denna tvåårsperiod ska alla prover ha testats med negativt resultat med avseende på HPR-deleted ISA-virus med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av ILA/ISA ska ha uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

c) Om ILA/ISA under genomförandet av övervakningsprogrammet bekräftas på en anläggning som ingår i övervakningsprogrammet och anläggningens hälsostatus av kategori II därför återkallas, ska ett utrotningsprogram i enlighet med punkt I.2.2 genomföras.

I.2.2 Utrotningsprogram

I.2.2.1 Allmänna krav

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på ILA/ISA kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats av ett utrotningsprogram som uppfyller de följande kraven i leden a–e:

a) De minimibekämpningsåtgärder som fastställs i kapitel V avsnitt 3 i direktiv 2006/88/EG har vidtagits på ett effektivt sätt och i synnerhet har ett kontrollområde som avses i artikel 32 b i det direktivet, inklusive en skyddszon och övervakningszon, fastställts i närheten av den eller de anläggningar som officiellt förklarats smittade med HPR-deleted ISA-virus eller bekräftad ILA/ISA.

Kontrollområdet ska ha fastställts utifrån varje enskilt fall med beaktande av de faktorer som påverkar risken för att ILA/ISA sprids till odlad och vild fisk, såsom antal, andel och fördelning av fiskdödlighet på den anläggning som är smittad med HPR-deleted ISA-virus eller bekräftad ILA/ISA, avstånd till närliggande anläggningar och deras täthet, närhet till fiskslakterier, kontaktanläggningar, arter på anläggningarna, odlingsmetoder på de drabbade anläggningarna och närliggande anläggningar samt hydrodynamiska förhållanden och andra faktorer av epidemiologisk betydelse som identifierats.

Vid fastställandet av skydds- och övervakningszoner ska följande minimikrav gälla beträffande zonernas geografiska avgränsning:

i) En skyddszon ska fastställas i den omedelbara närheten av en anläggning som officiellt förklarats smittad med ILA/ISA och den ska motsvara följande:

1. I kustområden: Ett område inom en cirkel med en radie som minst motsvarar förflyttningen under en tidvattencykel eller på minst 5 km, beroende på vilket område som är störst, med centrum på den anläggning som officiellt förklarats smittad med ILA/ISA, eller ett motsvarande område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

2. I inlandsområden: Hela avrinningsområdet runt den anläggning som officiellt förklarats smittad med ILA/ISA. Den behöriga myndigheten får begränsa zonens omfattning till delar av avrinningsområdet, förutsatt att ILA/ISA inte riskerar att spridas.

ii) En övervakningszon ska fastställas utanför skyddszonen och den ska motsvara följande:

1. I kustområden: Ett område som omger skyddszonen där de båda zonerna för tidvattencykelns förflyttning överlappar varandra, eller ett område som omger skyddszonen inom en cirkel med en radie på 10 km från skyddszonens centrum, eller ett motsvarande område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

2. I inlandsområden: Ett utvidgat område utanför den fastställda skyddszonen.

b) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den skyddszon som inte officiellt förklarats smittad med ILA/ISA ska bli föremål för en officiell undersökning som omfattar åtminstone följande:

i) Insamling av prover för testning av minst 10 döende fiskar när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på ILA/ISA, eller av minst 30 fiskar när inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt iakttas.

ii) En hälsoinspektion: I de anläggningar där de tester som avses i led i har gett negativa resultat ska hälsoinspektionerna fortsätta en gång per månad fram till dess att skyddszonen har återkallats i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

c) Alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med HPR-deleted ISA-virus eller bekräftad ILA/ISA ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll i minst tre månader. Skydds- och övervakningszonerna får upphävas när alla anläggningar inom skyddszonen har tömts, rengjorts och desinficerats och därefter varit ur drift samtidigt i minst sex veckor

När driftuppehållet genomförs på anläggningar som officiellt förklarats smittade ska skyddszonerna övergå till övervakningszoner.

Den behöriga myndigheten får kräva att andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Den behöriga myndigheten ska efter en riskbedömning i varje enskilt fall avgöra hur länge de andra anläggningarna ska vara ur drift.

d) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med HPR-deleted ISA-virus eller bekräftad ILA/ISA och i alla andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll ska utsättning ske med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på ILA/ISA.

Utsättningen ska inte ske förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

e) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den medlemsstat, den zon eller det delområde som omfattas av utrotningsprogrammet och, när det krävs övervakning av vilda populationer, de provtagningsplatser som valts i enlighet med punkt I.1 ska därefter omfattas av den övervakning som fastställs i punkt I.2.1.

I.2.2.2 Krav för att återfå sjukdomsfri status för inlandsdelområden som omfattar en enda anläggning och som tidigare har förklarats ha hälsostatus av kategori I

Ett inlandsdelområde som omfattar en enda anläggning som har hälsostatus av kategori I med avseende på ILA/ISA, vars hälsostatus i enlighet med del II punkt 3 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG inte är beroende av omgivande naturliga vatten och vars hälsostatus av kategori I har återkallats i enlighet med artikel 53.3 i det direktivet, kan återfå sin hälsostatus omedelbart efter det att den behöriga myndigheten har bekräftat att följande villkor har uppfyllts:

a) Anläggningen har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor.

b) Där har skett utsättning med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på ILA/ISA.

I.3 Minimibekämpningsåtgärder för att få behålla hälsostatus av kategori I med avseende på ILA/ISA

Om det enligt artikel 52 i direktiv 2006/88/EG krävs riktad övervakning för att få behålla hälsostatus av kategori I ska alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet i fråga genomgå hälsoinspektion och provtas i enlighet med tabell 3.B [1] i avsnitt II i denna del, med beaktande av anläggningens risknivå för att smittas med ILA/ISA.

Risken för att smittas med ILA/ISA ska betraktas som hög när man fastställer frekvensen på hälsoinspektioner i delområden med hälsostatus av kategori I med avseende på ILA/ISA, vilka är belägna i inlandsområden och där hälsostatusen med avseende på ILA/ISA är beroende av hälsostatusen i omgivande naturliga vatten med atlantlax (*Salmo salar*).

Den sjukdomsfria statusen med avseende på ILA/ISA får endast behållas så länge som alla prover testas med negativt resultat med avseende på HPR-deleted ISA-virus med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av ILA/ISA har uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

I.4 Särskilda krav för att uppnå hälsostatus av kategori III med avseende på HPR-deleted ISA-virus i medlemsstater, zoner eller delområden som tidigare hade hälsostatus av kategori V

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på ILA/ISA kan uppnå hälsostatus av kategori III, förutsatt att följande gäller:

a) Kraven i punkt I.2.2.1 a, b och c är uppfyllda. Om driftuppehåll inte är tekniskt möjligt ska anläggningarna bli föremål för en alternativ åtgärd som ger nästan samma garantier för att ISA-virus utrotas från anläggningens omgivning.

b) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade och i alla andra anläggningar som gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a i de fastställda skydds- och övervakningszonerna har utsättning skett med fisk som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I, II eller III med avseende på ILA/ISA.

c) Utsättningen skedde inte förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade hade tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a.

d) Förekomst av HPR-deleted ISA-virus har inte bekräftats under den tvåårsperiod som följer på slutförandet av de åtgärder som avses i leden a, b och c, och under denna period har misstankar om förekomst uteslutits i enlighet med förfarandena i punkt II.3.

[1] Ska inte tillämpas på anläggningar som endast odlar regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) eller öring (*Salmo trutta*), eller båda, och där vattentillförseln uteslutande kommer från sötvattentäkter utan atlantlax (*Salmo salar*).

II. **Diagnostiska metoder och officiella undersökningar**

II.1 Prover

De vävnader som ska undersökas är följande:

a) Histologi: njurens främre del, lever, hjärta, bukspottskörtel, tarm, mjälte och gäle.

b) Immunhistokemi: njurens mellersta del och hjärta, inklusive valv och *bulbus arteriosus*.

c) RT-qPCR: njurens mellersta del och hjärta.

d) Viruskultur: njurens mellersta del, hjärta, lever och mjälte.

Organdelar från högst fem fiskar får slås samman.

II.2 Diagnostiska metoder för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på ILA/ISA

Den diagnostiska metoden för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på ILA/ISA i enlighet med punkterna I.2 och I.3 ska vara RT-qPCR, följt av sekvensering av positiva prover i enlighet med de detaljerade metoderna och förfarandena i del 3 i bilaga II.

Om RT-qPCR ger ett positivt resultat ska ytterligare prover testas innan de inledande bekämpningsåtgärder som föreskrivs i artikel 28 i direktiv 2006/88/EG vidtas.

Dessa prover ska testas enligt följande, i enlighet med de detaljerade metoderna och förfarandena i del 3 i bilaga II:

a) Screening av prover med RT-qPCR, inbegripet sekvensering av HE-genen för att bekräfta HPR-deletion,

och

b) undersökning av vävnadsberedningar med särskilda antikroppar mot ISA-virus (dvs. IHK på fixerade preparat eller IFAT på imprint av vävnad), eller

c) isolering och identifiering av ISA-virus i cellkultur från minst ett prov från någon fisk som provtagits på anläggningen.

II.3 Officiell undersökning och diagnostiska metoder för att utesluta eller bekräfta förekomst av ILA/ISA

När det i enlighet med artikel 28 i direktiv 2006/88/EG krävs att en misstanke om förekomst av ILA/ISA ska bekräftas eller uteslutas ska följande förfarande för inspektion, provtagning och testning följas:

a) Den officiella undersökningen ska omfatta minst en hälsoinspektion och en provtagning av 10 döende fiskar när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på ILA/ISA. Om inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på ILA/ISA iakttas ska hälsoinspektionen följas av riktad provtagning av minst 30 döende fiskar eller nydöda fiskar med normal konstitution i enlighet med punkt I.1. Prover ska testas i enlighet med de diagnostiska metoderna i led b.

b) Om RT-qPCR ger ett positivt resultat för HPR-deleted ISA-virus ska ytterligare prover testas innan de inledande bekämpningsåtgärder som föreskrivs i artikel 28 i direktiv 2006/88/EG vidtas. Ett misstänkt fall av infektion orsakad av ILA/ISA ska bekräftas i enlighet med ett av följande kriterier och med de detaljerade metoderna och förfarandena i del 3 i bilaga II.

   i) Påvisande av ISA-virus med RT-qPCR, inbegripet sekvensering av HE-genen för att bekräfta HPR-deletion, och påvisande av ISA-virus i vävnadsberedningar med särskilda antikroppar mot ISA-virus (dvs. IHK på fixerade preparat eller IFAT på imprint av vävnad).

ii) Påvisande av ISA-virus genom RT-qPCR, inbegripet sekvensering av HE-genen för att bekräfta HPR-deletion, och

isolering och identifiering av ISA-virus i cellkultur från minst ett prov från någon fisk på anläggningen.

c) När förekomsten av kliniska, betydande patologiska förändringar eller histopatologiska fynd som överensstämmer med symtomen på ILA/ISA iakttas, ska resultaten bekräftas med två diagnostiska metoder för påvisande av virus med oberoende detektionsprinciper, t.ex. RT-qPCR och IHK, i enlighet med del 3 i bilaga II.

Misstanke om förekomst av ILA/ISA kan uteslutas om tester och inspektioner under en tolvmånadersperiod från och med dagen för misstanken inte visar på några ytterligare tecken på förekomst av ILA/ISA.

Tabell 3.A

Övervakning av zoner och delområden för den tvååriga kontrollperiod som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på ILA/ISA enligt punkt I.2.1

Övervakningsår	Antal hälsoinspektioner per år (två år)	Antal laboratorieanalyser per år (två år)	Antal fiskar som ska provtas per år
År 1	6	2 (1)	2 * 75 (2)
År 2	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Proverna ska varje år samlas in, förvaras och undersökas under två testperioder på en månad (på våren och hösten) eller när så är lämpligt efter praktiska överväganden.
(2) Högsta antal fiskar per sammanslaget prov: 5.

Tabell 3.B

Övervakning av zoner eller delområden för att få behålla sjukdomsfri status med avseende på ILA/ISA enligt punkt I.3 (2)

Risknivå	Antal hälsoinspektioner per år	Antal laboratorieanalyser per år	Antal fiskar som ska provtas per år
Hög	2	2 (1)	2* 30
Medelhög	1	1 (1)	30
Låg	1 vartannat år	1 vartannat år	30 vartannat år

(1) Proverna ska varje år samlas in och undersökas under två testperioder på en månad (på våren och hösten) eller när så är lämpligt efter praktiska överväganden.
(2) Ska inte tillämpas på anläggningar som endast odlar regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) eller öring (*Salmo trutta*), eller båda, och där vattentillförseln uteslutande kommer från sötvattentäkter utan atlantlax (*Salmo salar*).

DEL 4

ÖVERVAKNINGS- OCH BEKÄMPNINGSMETODER FÖR INFEKTION ORSAKAD AV *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Krav för övervaknings- och utrotningsprogram för att erhålla och få behålla sjukdomsfri hälsostatus med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens***

I.1 Allmänna krav

Hälsoinspektioner och, i förekommande fall, provtagning för laboratorieanalys ska genomföras under den period av året då man vet att prevalensen av parasiten är som högst i medlemsstaten, zonen eller delområdet. När det inte finns några sådana data ska provtagningen ske precis efter den tidpunkt då vattentemperaturen överskrider 17 °C.

När blötdjur ska provtas i enlighet med kraven i del 4 ska följande kriterier gälla:

a) Om *Ostrea* spp. och *Mytilus* spp. förekommer i produktionsenheterna eller produktionsområdet ska lika stor provstorlek tas från båda släktena. Om endast ett av dessa släkten förekommer ska det släktet provtas. Om varken släktena *Ostrea* eller *Mytilus* förekommer ska provet vara representativt för alla andra mottagliga arter som förekommer.

b) Om det förekommer svaga blötdjur, blötdjur med öppna skal eller nydöda blötdjur (ej sönderfallande/ruttna) i produktionsenheterna ska i första hand dessa väljas. Om sådana blötdjur inte förekommer ska de utvalda blötdjuren omfatta de äldsta friska blötdjuren.

c) Vid provtagning på anläggningar för blötdjur där mer än en vattentäkt används för blötdjursproduktion, ska blötdjur från samtliga vattentäkter ingå i provtagningen på sådant sätt att samtliga delar av anläggningen är proportionellt representerade i provet.

d) Vid provtagning i områden för blötdjursodling ska blötdjur från ett tillräckligt antal provtagningsplatser ingå i provet på sådant sätt att samtliga delar av området för blötdjursodling är proportionellt representerade i provet. Huvudfaktorerna som ska beaktas vid urvalet av dessa provtagningsplatser är tidigare provtagningsplatser där *Marteilia refringens* påvisats, beståndstäthet, vattenflöden, förekomst av mottagliga arter, förekomst av smittbärande arter, vattendjup och hantering. Naturliga fyndplatser ska provtas.

I.2 Särskilda krav för att uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på *Marteilia refringens*

I.2.1 Övervakningsprogram

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori III med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens* kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats av åtminstone följande övervakningsprogram som omfattar hälsoinspektioner och insamling av prover för testning:

Tvåårigt övervakningsprogram

a) Anläggningarna eller områdena för blötdjursodling har genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst två på varandra följande år enligt tabell 4.A i avsnitt II.

b) Under denna tvåårsperiod har alla prover testats med negativt resultat med avseende på *Marteilia refringens* med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av *Marteilia refringens* har uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

c) När *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* eller *Mytilus galloprovincialis* som kommer från en medlemsstat, en zon eller ett delområde med hälsostatus av kategori I ska ingå i provet, ska de ha förts in på anläggningen eller området för blötdjursodling senast under den vår som föregår den period då övervakningsprogrammet genomförs.

I.2.2 Utrotningsprogram

I de flesta fall anses det vara omöjligt att utrota *Marteilia refringens*, men när medlemsstaten bedömer att det är möjligt ska följande modell för ett utrotningsprogram tillämpas.

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens* kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats av åtminstone följande utrotningsprogram:

a) De åtgärder som fastställs i kapitel V avsnitt 3 i direktiv 2006/88/EG har vidtagits på ett effektivt sätt och i synnerhet har ett kontrollområde som avses i artikel 32 b i det direktivet, inklusive en skyddszon och övervakningszon, fastställts i närheten av den eller de anläggningar eller det eller de områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade med *Marteilia refringens*.

Kontrollområdet ska fastställas utifrån varje enskilt fall med beaktande av de faktorer som påverkar risken för att *Marteilia refringens* sprids, såsom antal, ålder, andel och fördelning av blötdjursdödlighet på den anläggning eller det område för blötdjursodling som är smittad/smittat med *Marteilia refringens* (inklusive vilda blötdjur), avstånd till närliggande anläggningar eller områden för blötdjursodling (inklusive vilda blötdjur) och deras täthet, närhet till bearbetningsanläggningar, kontaktanläggningar eller områden för blötdjursodling, de arter, särskilt mottagliga arter och smittbärande arter, som förekommer på anläggningarna eller i områdena för blötdjursodling, odlingsmetoder på de drabbade anläggningarna, på närliggande anläggningar och i områden för blötdjursodling samt hydrodynamiska förhållanden och andra faktorer av epidemiologisk betydelse som identifierats.

Vid fastställandet av skydds- och övervakningszoner ska följande minimikrav gälla:

i) En skyddszon ska fastställas i den omedelbara närheten av en anläggning eller ett område för blötdjursodling som officiellt förklarats smittad/smittat med *Marteilia refringens* och den ska motsvara ett område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

ii) En övervakningszon ska fastställas utanför skyddszonen och den ska motsvara ett område som omger den skyddszon som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

b) Alla anläggningar och områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den skyddszon som inte officiellt förklarats smittad med *Marteilia refringens* ska bli föremål för en officiell undersökning som omfattar åtminstone insamling av prover för testning av 150 blötdjur efter början av överföringsperioden för *Marteilia refringens*. När överföringsperioden inte är känd ska provtagningen påbörjas efter den tidpunkt då vattentemperaturen överskrider 17 °C.

c) Alla anläggningar och områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade med *Marteilia refringens* ska tömmas och göra driftuppehåll samt om möjligt rengöras och desinficeras.

Driftuppehållet ska vara minst

i) två månader för anläggningar och områden för blötdjursodling med begränsad kontakt med omgivande vatten, såsom kläckerier och yngelanläggningar,

ii) två månader för anläggningar och områden för blötdjursodling med obegränsad kontakt med omgivande vatten, förutsatt att smittade blötdjur av mottagliga arter och blötdjur av mottagliga arter med epidemiologiska kopplingar till den smittade anläggningen eller det smittade området för blötdjursodling har tagits upp eller avlägsnats före den period av året då man vet att prevalensen av *Marteilia refringens* är som högst eller, när perioden inte är känd, före den period då vattentemperaturen överskrider 17 °C,

iii) fjorton månader för anläggningar och områden för blötdjursodling med obegränsad kontakt med omgivande vatten, förutsatt att smittade blötdjur av mottagliga arter och blötdjur av mottagliga arter med epidemiologiska kopplingar till den smittade anläggningen eller det smittade området för blötdjursodling inte har tagits upp eller avlägsnats före den period av året då man vet att prevalensen av *Marteilia refringens* är som högst eller, när perioden inte är känd, när blötdjur av mottagliga arter inte har tagits upp eller avlägsnats före den period då vattentemperaturen överskrider 17 °C.

När alla anläggningar och områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade har tömts ska de vara ur drift samtidigt i minst fyra veckor.

Den behöriga myndigheten får i förekommande fall kräva att andra anläggningar eller områden för blötdjursodling i de fastställda skydds- och övervakningszonerna ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Den behöriga myndigheten ska efter en riskbedömning i varje enskilt fall avgöra hur länge driftuppehållet ska vara.

d) I alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade och i alla andra anläggningar eller områden för blötdjursodling i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll ska utsättning ske med blötdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens*.

Utsättningen ska inte ske förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll i enlighet med punkt I.2.2 c.

e) Alla anläggningar och områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den medlemsstat, den zon eller det delområde som omfattas av utrotningsprogrammet ska därefter omfattas av den övervakning som fastställs i punkt I.2.1.

I.3 Särskilda krav för att få behålla sjukdomsfri hälsostatus (kategori I) med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens*

Om det enligt artikel 52 i direktiv 2006/88/EG krävs riktad övervakning för att få behålla hälsostatus av kategori I ska alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet i fråga genomgå hälsoinspektioner och provtas i enlighet med tabell 4.B i avsnitt II, med beaktande av anläggningens eller området för blötdjursodlings risknivå för att smittas med *Marteilia refringens*.

Den sjukdomsfria statusen får endast behållas så länge som alla prover testas med negativt resultat med avseende på *Marteilia refringens* med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av *Marteilia refringens* har uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

I.4 Krav för upphävande av de åtgärder för att motverka sjukdomsspridning som fastställs i artikel 39 i direktiv 2006/88/EG (övergång från hälsostatus av kategori V till kategori III) med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens*

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens* kan uppnå hälsostatus av kategori III med avseende på denna förtecknade sjukdom, förutsatt att följande gäller:

a) Kraven i punkt I.2.2.1 a, b och c är uppfyllda. Om driftuppehåll inte är tekniskt möjligt ska anläggningarna bli föremål för en alternativ åtgärd som ger nästan samma garantier för att *Marteilia refringens* utrotas från anläggningens omgivning.

b) I alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade och i alla andra anläggningar eller områden för blötdjursodling i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a har utsättning skett med blötdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I, II eller III med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens*.

c) Utsättningen skedde inte förrän alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade hade tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a.

d) Infektion orsakad av *Marteilia refringens* har inte bekräftats under den tvåårsperiod som följer på slutförandet av de åtgärder som avses i leden a, b och c, och under denna period har misstankar om förekomst uteslutits i enlighet med förfarandena i punkt II.3.

II. **Diagnostiska metoder och officiella undersökningar**

II.1 Prover

Hela djur ska lämnas till laboratoriet för de diagnostiska tester som anges i punkterna II.2 och II.3.

II.2 Diagnostiska metoder för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens*

De diagnostiska metoder som ska användas för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens* i enlighet med de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i del 4 i bilaga II ska vara histopatologi, imprint av vävnad eller PCR.

II.3 Officiell undersökning och diagnostiska metoder för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av infektion orsakad av *Marteilia refringens*

När det i enlighet med artikel 28 i direktiv 2006/88/EG krävs att en misstanke om förekomst av infektion orsakad av *Marteilia refringens* ska bekräftas eller uteslutas ska följande förfarande för inspektion, provtagning och testning följas:

a) Den officiella undersökningen ska omfatta minst en provtagning av 30 blötdjur av mottagliga arter om misstanken bygger på en rapport om dödlighet eller, om så inte är fallet, av 150 blötdjur av mottagliga arter efter början av överföringsperioden för *Marteilia refringens*. När överföringsperioden inte är känd ska provtagningen påbörjas efter den tidpunkt då vattentemperaturen överskrider 17 °C.

b) Proverna ska testas med de diagnostiska metoderna i led i i enlighet med de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i del 4 avsnitt I i bilaga II.

i) Förekomsten av *Marteilia refringens* ska anses bekräftad när ett positivt resultat från histopatologi, imprint av vävnad eller *in situ*-hybridisering kombineras med ett positivt resultat från PCR, inklusive sekvensering.

ii) Misstanke om förekomst av infektion orsakad av *Marteilia refringens* kan uteslutas om testerna i led i inte visar på några ytterligare tecken på förekomst av *Marteilia refringens*.

Tabell 4.A

Övervakning av medlemsstater, zoner eller delområden för den kontrollperiod som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på *Marteilia refringens* enligt punkt I.2.1

	Antal hälsoinspektioner per år	Antal laboratorieanalyser per år	Antal blötdjur i provet
Anläggningar/områden för blötdjursodling	1	1	150

Tabell 4.B

Övervakning av medlemsstater, zoner eller delområden för att få behålla sjukdomsfri status med avseende på *Marteilia refringens* enligt punkt I.3

Risknivå	Antal hälsoinspektioner	Antal laboratorieanalyser	Antal blötdjur i provet
Hög	1 per år	1 vartannat år	150
Medelhög	1 vartannat år	1 vartannat år	150
Låg	1 vartannat år	1 vart fjärde år	150

DEL 5

ÖVERVAKNINGS- OCH BEKÄMPNINGSMETODER FÖR INFEKTION ORSAKAD AV *BONAMIA OSTREAE*

I. **Krav för övervaknings- och utrotningsprogram för att erhålla och få behålla sjukdomsfri hälsostatus med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae***

I.1 Allmänna krav

Hälsoinspektioner och, i förekommande fall, provtagning av produktionsenheter ska genomföras under den period av året då man vet att prevalensen av *Bonamia ostreae* är som högst i medlemsstaten, zonen eller delområdet. När det inte finns några sådana data ska provtagning ske på vintern eller i början av våren.

När blötdjur ska provtas i enlighet med kraven i del 5 ska följande kriterier gälla:

a) Om det förekommer *Ostrea edulis* ska endast ostron av den arten väljas för provtagning. Om *Ostrea edulis* inte förekommer ska provet vara representativt för alla andra mottagliga arter som förekommer.

b) Om det förekommer svaga blötdjur, blötdjur med öppna skal eller nydöda blötdjur (ej sönderfallande/ruttna) ska i första hand dessa väljas. Om sådana blötdjur inte förekommer ska de utvalda blötdjuren omfatta de äldsta friska blötdjuren.

c) Vid provtagning på anläggningar där mer än en vattentäkt används för blötdjursproduktion, ska blötdjur från samtliga vattentäkter ingå i provtagningen på sådant sätt att samtliga delar av anläggningen är proportionellt representerade i provet.

d) Vid provtagning i områden för blötdjursodling ska blötdjur från ett tillräckligt antal provtagningsplatser ingå i provet. Huvudfaktorerna som ska beaktas vid urvalet av dessa provtagningsplatser är tidigare provtagningsplatser där *Bonamia ostreae* påvisats, beståndstäthet, vattenflöden, förekomst av mottagliga arter, förekomst av smittbärande arter, vattendjup och hantering. Naturliga fyndplatser i eller intill odlingsområden ska provtas.

I.2 Särskilda krav för att uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på *Bonamia ostreae*

I.2.1 Övervakningsprogram

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori III med avseende på *Bonamia ostreae* kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats av åtminstone följande övervakningsprogram som omfattar hälsoinspektioner och insamling av prover för testning:

Tvåårigt övervakningsprogram

a) Anläggningarna eller områdena för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG har genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst två på varandra följande år enligt tabell 5.A i denna del.

b) Under denna tvåårsperiod har alla prover testats med negativt resultat med avseende på *Bonamia ostreae* med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av *Bonamia ostreae* har uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

c) När *Ostrea edulis* som kommer från en medlemsstat, en zon eller ett delområde med hälsostatus av kategori I ska ingå i provet, ska de ha förts in på anläggningen eller området för blötdjursodling senast under den höst som föregår den period då övervakningsprogrammet genomförs.

I.2.2 Utrotningsprogram

I de flesta fall anses det vara omöjligt att utrota *Bonamia ostreae*, men när medlemsstaten bedömer att det är möjligt ska följande modell för ett utrotningsprogram tillämpas.

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på *Bonamia ostreae* kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats åtminstone följande utrotningsprogram:

a) De minimibekämpningsåtgärder som fastställs i kapitel V avsnitt 3 i direktiv 2006/88/EG har vidtagits på ett effektivt sätt och i synnerhet har ett kontrollområde som avses i artikel 32 b i det direktivet, inklusive en skyddszon och övervakningszon, fastställts i närheten av den eller de anläggningar eller det eller de områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade med *Bonamia ostreae*.

Kontrollområdet ska fastställas utifrån varje enskilt fall med beaktande av de faktorer som påverkar risken för att den förtecknade sjukdomen sprids, såsom antal, andel, ålder och fördelning av blötdjursdödlighet på den anläggning eller det område för blötdjursodling som är smittad/smittat med *Bonamia ostreae* (inklusive vilda blötdjur), avstånd till närliggande anläggningar eller områden för blötdjursodling (inklusive vilda blötdjur) och deras täthet, närhet till bearbetningsanläggningar, kontaktanläggningar eller områden för blötdjursodling, de arter som förekommer på anläggningar eller i områden för blötdjursodling, särskilt mottagliga arter och smittbärande arter, odlingsmetoder på de drabbade anläggningarna, på närliggande anläggningar eller i områden för blötdjursodling, samt hydrodynamiska förhållanden och andra faktorer av epidemiologisk betydelse som identifierats.

Vid fastställandet av skydds- och övervakningszoner ska följande minimikrav gälla:

i) En skyddszon ska fastställas i den omedelbara närheten av en anläggning eller ett område för blötdjursodling som officiellt förklarats smittad/smittat med *Bonamia ostreae* och den ska motsvara ett område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

ii) En övervakningszon ska fastställas utanför skyddszonen och den ska motsvara ett område som omger den skyddszon som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

b) Alla anläggningar och områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den skyddszon som inte officiellt förklarats smittad med *Bonamia ostreae* ska bli föremål för en officiell undersökning som omfattar åtminstone insamling av prover för testning av 150 blötdjur av mottagliga arter efter början av överföringsperioden för Bonamia ostreae. När överföringsperioden inte är känd ska provtagningen påbörjas på vintern eller i början av våren.

c) Alla anläggningar och områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade med *Bonamia ostreae* ska tömmas och göra driftuppehåll samt om möjligt rengöras och desinficeras. Driftuppehållet ska vara minst sex månader.

När alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade har tömts ska de vara ur drift samtidigt i minst fyra veckor.

Den behöriga myndigheten får i förekommande fall kräva att andra anläggningar eller områden för blötdjursodling i de fastställda skydds- och övervakningszonerna ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Den behöriga myndigheten ska efter en riskbedömning i varje enskilt fall avgöra hur länge driftuppehållet ska vara.

d) I alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade och i alla andra anläggningar eller områden för blötdjursodling i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll ska utsättning ske med blötdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae*. Utsättningen ska inte ske förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll i enlighet med punkt I.2.2 c.

e) Alla anläggningar och områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den medlemsstat, den zon eller det delområde som omfattas av utrotningsprogrammet ska därefter omfattas av det övervakningsprogram som fastställs i punkt I.2.

I.3 Särskilda krav för att få behålla sjukdomsfri hälsostatus (kategori I) med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae*

Om det enligt artikel 52 i direktiv 2006/88/EG krävs riktad övervakning för att få behålla hälsostatus av kategori I ska alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet i fråga genomgå hälsoinspektioner och provtas i enlighet med tabell 5.B i avsnitt II i denna del, med beaktande av anläggningens eller området för blötdjursodlings risknivå för att smittas med *Bonamia ostreae*.

Den sjukdomsfria statusen med avseende på infektion med *Bonamia ostreae* får endast behållas så länge som alla prover testas med negativt resultat med avseende på *Bonamia ostreae* med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av *Bonamia ostreae* har uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

I.4 Krav för upphävande av de åtgärder för att motverka sjukdomsspridning som fastställs i artikel 39 i direktiv 2006/88/EG (övergång från hälsostatus av kategori V till kategori III) med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae*

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae* kan uppnå hälsostatus av kategori III med avseende på denna sjukdom, förutsatt att följande gäller:

a) Kraven i punkt I.2.2.1 a, b och c är uppfyllda. Om driftuppehåll inte är tekniskt möjligt ska anläggningarna bli föremål för en alternativ åtgärd som ger nästan samma garantier för att *Bonamia ostreae* utrotas från anläggningens omgivning.

b) I alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade och i alla andra anläggningar eller områden för blötdjursodling i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a har utsättning skett med blötdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I, II eller III med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae*.

c) Utsättningen skedde inte förrän alla anläggningar eller områden för blötdjursodling som officiellt förklarats smittade hade tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a.

d) Infektion orsakad av *Bonamia ostreae* har inte bekräftats under den tvåårsperiod som följer på slutförandet av de åtgärder som avses i leden a, b och c, och under denna period har misstankar om förekomst uteslutits i enlighet med förfarandena i punkt II.3.

II. **Diagnostiska metoder och kriterier**

II.1 Prover

Hela djur ska lämnas till laboratoriet för de diagnostiska tester som anges i punkterna II.2 och II.3.

II.2 Diagnostiska metoder för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae*

De diagnostiska metoder som ska användas för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på infektion orsakad av *Bonamia ostreae* ska vara histopatologi, imprint av vävnad eller PCR. När dessa diagnostiska metoder används ska de motsvarande detaljerade metoderna och förfarandena i del 5 i bilaga II följas.

II.3 Diagnostiska kriterier för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av infektion orsakad av *Bonamia ostreae*

När det i enlighet med artikel 28 i direktiv 2006/88/EG krävs att en misstanke om förekomst av infektion orsakad av *Bonamia ostreae* ska bekräftas eller uteslutas ska följande förfarande för inspektion, provtagning och testning följas:

Den officiella undersökningen ska omfatta minst en provtagning av 30 blötdjur av mottagliga arter om misstanken bygger på en rapport om dödlighet eller, om så inte är fallet, av 150 blötdjur av mottagliga arter efter början av överföringsperioden för *Bonamia ostreae*. När överföringsperioden inte är känd ska provtagningen påbörjas på vintern eller i början av våren. Proverna ska testas med de diagnostiska metoderna i led i i enlighet med de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i del 5 avsnitt I i bilaga II.

i) Förekomsten av *Bonamia ostreae* ska anses bekräftad när ett positivt resultat från histopatologi, imprint av vävnad eller *in situ*-hybridisering kombineras med ett positivt resultat från PCR, inklusive sekvensering, i enlighet med de godkända metoderna och förfarandena i del 5 i bilaga II.

ii) Misstanke om förekomst av infektion orsakad av *Bonamia ostreae* ska uteslutas om dessa tester inte visar på några ytterligare tecken på förekomst av *Bonamia ostreae*.

Tabell 5.A

Övervakning av medlemsstater, zoner eller delområden för den kontrollperiod som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på *Bonamia ostreae* enligt punkt I.2.1

	Antal hälsoinspektioner per år	Antal laboratorieanalyser per år	Antal blötdjur i provet
Anläggningar/områden för blötdjursodling	1	1	150

Tabell 5.B

Övervakning av medlemsstater, zoner eller delområden för att få behålla sjukdomsfri status med avseende på *Bonamia ostreae* enligt punkt I.3

Risknivå	Antal hälsoinspektioner	Antal laboratorieanalyser	Antal blötdjur i provet
Hög	1 per år	1 vartannat år	150
Medelhög	1 vartannat år	1 vartannat år	150
Låg	1 vartannat år	1 vart fjärde år	150

DEL 6

ÖVERVAKNINGS- OCH BEKÄMPNINGSMETODER FÖR VITPRICKIG KRÄFTDJURSSJUKA (WSD)

I. **Krav för övervaknings- och utrotningsprogram för att erhålla och få behålla sjukdomsfri hälsostatus med avseende på WSD samt för att motverka infektion orsakad av WSSV**

I.1 Allmänna krav för inspektioner och provtagning

Provtagning av kräftdjur för laboratorieanalys ska utföras då vattentemperaturen sannolikt är som högst under året. Kravet beträffande vattentemperatur ska också gälla för hälsoinspektioner när dessa är möjliga och lämpliga.

När odlade kräftdjur ska provtas i enlighet med kraven i denna del ska följande kriterier gälla:

a) Om det förekommer svaga eller döende kräftdjur i produktionsenheterna ska i första hand dessa väljas. Om sådana kräftdjur inte förekommer ska de utvalda kräftdjuren vara av olika storlekar, dvs. juveniler och vuxna, av de utvalda mottagliga arterna, proportionellt representerade i provet.

b) Om mer än en vattentäkt används för kräftdjursproduktion ska kräftdjur från samtliga vattentäkter ingå i provet.

När riktad övervakning av vilda populationer krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till direktiv 2006/88/EG ska provtagningsplatsernas antal och geografiska spridning fastställas så att en rimlig täckning av medlemsstaten, zonen eller delområdet uppnås. Provtagningsplatserna ska också vara representativa för de olika ekosystem där vilda populationer av mottagliga arter finns, t.ex. marina system, flodmynningar, flod- och sjösystem.

När riktad övervakning av vilda populationer krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till direktiv 2006/88/EG ska kräftdjur för provtagning väljas på följande sätt:

i) I områden med marina system och flodmynningar ska en eller flera av följande arter väljas: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* eller räkarter av familjen Panaeidae dvs. *Penaeus japonicus, Penaeus kerathurus* och *Penaeus semisulcatus*. Om dessa arter inte förekommer ska provet vara representativt för alla andra mottagliga arter av ordningen Decapoda (tiofotade kräftdjur) som förekommer. Med tanke på det stora antalet olika mottagliga värdarter får värdarten väljas från släkter eller familjer av Decapoda där mottaglighet har visats genom experiment eller naturligt.

ii) I flod- och sjösystem ska en eller flera av följande arter väljas: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* eller *Orconectes limosus*. Om dessa arter inte förekommer ska provet vara representativt för alla andra mottagliga arter av ordningen Decapoda (tiofotade kräftdjur) som förekommer. Med tanke på det stora antalet olika mottagliga värdarter får värdarten väljas från släkter eller familjer av Decapoda där mottaglighet har visats genom experiment eller naturligt.

iii) Om det förekommer svaga eller döende kräftdjur ska i första hand dessa väljas. Om sådana kräftdjur inte förekommer ska de utvalda kräftdjuren vara av olika storlekar, dvs. juveniler och vuxna, av de utvalda mottagliga arterna, proportionellt representerade i provet.

I.2 Särskilda krav för att erhålla hälsostatus av kategori I med avseende på WSD

I.2.1 Övervakningsprogram

a) En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori III i enlighet med del B i bilaga III till direktiv 2006/88/EG med avseende på WSD kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet uppfyller de relevanta kraven i bilaga V till det direktivet samt när alla anläggningarna och, när så krävs enligt del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till direktiv 2006/88/EG, de provtagningsplatser i vilda populationer som valts i enlighet med den punkten har omfattats av följande tvååriga övervakningsprogram som omfattar hälsoinspektioner och insamling av prover för testning:

Anläggningarna eller provtagningsplatserna har genomgått hälsoinspektioner och provtagits under minst två på varandra följande år enligt tabell 6.A i avsnitt II.

Under denna tvåårsperiod har alla prover testats med negativt resultat med avseende på infektion orsakad av WSD med de diagnostiska metoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av WSD har uteslutits i enlighet med de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

b) Om under genomförandet av det övervakningsprogram som avses i led a en infektion orsakad av WSSV bekräftas på en anläggning som ingår i övervakningsprogrammet och anläggningens hälsostatus av kategori II därför återkallas, kan anläggningen omedelbart återfå sin hälsostatus av kategori II och fortsätta genomförandet av övervakningsprogrammet för att erhålla sjukdomsfri status utan att genomföra ett utrotningsprogram enligt punkt I.2.2, förutsatt att följande gäller:

i) Det är en inlandsbaserad anläggning vars hälsostatus med avseende på WSD i enlighet med del II punkt 3 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG inte är beroende av hälsostatusen med avseende på denna förtecknade sjukdom i omgivande naturliga vatten.

ii) Anläggningen har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor.

iii) Där har skett utsättning med kräftdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på WSD.

I.2.2 Utrotningsprogram

I.2.2.1 Allmänna krav

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på WSD kan uppnå hälsostatus av kategori I med avseende på denna förtecknade sjukdom när alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i medlemsstaten, zonen eller delområdet har omfattats av åtminstone följande utrotningsprogram:

a) De minimibekämpningsåtgärder som fastställs i kapitel V avsnitt 4 i direktiv 2006/88/EG har vidtagits på ett effektivt sätt och ett kontrollområde som avses i artikel 32 b i det direktivet, inklusive en skyddszon och övervakningszon, har fastställts i närheten av den eller de anläggningar som officiellt förklarats smittade med WSD.

Kontrollområdet ska ha fastställts utifrån varje enskilt fall med beaktande av de faktorer som påverkar risken för att WSD sprids till odlade och vilda kräftdjur, såsom antal, andel och fördelning av kräftdjursdödlighet på den anläggning som är smittad med WSD, avstånd till närliggande anläggningar och deras täthet, kontaktanläggningar, arter på anläggningarna, odlingsmetoder på de drabbade anläggningarna och närliggande anläggningar samt hydrodynamiska förhållanden och andra faktorer av epidemiologisk betydelse som identifierats.

Vid fastställandet av skydds- och övervakningszoner ska följande minimikrav gälla:

i) En skyddszon ska fastställas i den omedelbara närheten av en anläggning som officiellt förklarats smittad med WSD och den ska motsvara följande:

1. I marina områden och flodmynningar: Ett område inom en cirkel med en radie som minst motsvarar förflyttningen under en tidvattencykel eller på minst 5 km, beroende på vilket område som är störst, med centrum på den anläggning som officiellt förklarats smittad med WSD, eller ett motsvarande område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

2. I sötvatten: Hela avrinningsområdet runt den anläggning som officiellt förklarats smittad med WSD. Den behöriga myndigheten får begränsa skyddszonens omfattning till delar av avrinningsområdet, förutsatt att WSD inte riskerar att spridas.

ii) En övervakningszon ska fastställas utanför skyddszonen och den ska motsvara följande:

1. I marina områden: Ett område som omger skyddszonen där de båda zonerna för tidvattencykelns förflyttning överlappar varandra, eller ett område som omger skyddszonen inom en cirkel med en radie på 10 km från skyddszonens centrum, eller ett motsvarande område som fastställs enligt lämpliga hydrodynamiska eller epidemiologiska uppgifter.

2. I sötvatten: Ett utvidgat område utanför den fastställda skyddszonen.

b) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den skyddszon som inte officiellt förklarats smittad med WSD ska bli föremål för en officiell undersökning som omfattar åtminstone följande:

i) Insamling av prover för testning av 10 kräftdjur när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på infektion orsakad av WSD, eller av 150 kräftdjur när inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt iakttas.

ii) En hälsoinspektion: I de anläggningar där de tester som avses i led i har gett negativa resultat ska hälsoinspektionerna fortsätta en gång per månad under den årstid då vattentemperaturen sannolikt är som högst, fram till dess att skyddszonen har återkallats i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

c) Alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med WSD ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Driftuppehållet ska vara minst sex veckor. När alla anläggningar som officiellt förklarats smittade har tömts ska de vara ur drift samtidigt i minst tre veckor. Detta stycke gäller även nya anläggningar som officiellt förklarats smittade under utrotningsprogrammets genomförande.

När driftuppehållet genomförs på anläggningar som officiellt förklarats smittade ska skyddszonerna övergå till övervakningszoner.

Den behöriga myndigheten får kräva att andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna ska tömmas, rengöras och desinficeras samt göra driftuppehåll. Den behöriga myndigheten ska efter en riskbedömning i varje enskilt fall avgöra hur länge driftuppehållet ska vara.

d) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade och i alla andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll ska utsättning

i) ske med kräftdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på WSD, eller

ii) under en övergångsperiod till och med den 31 december 2020 ske med kräftdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med ett godkänt program för övervakning av WSD.

Utsättningen ska inte ske förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med WSD har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll i enlighet med punkt I.2.2.1 c.

e) Alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG i den medlemsstat, den zon eller det delområde som omfattas av utrotningsprogrammet och, när det krävs övervakning av vilda populationer, de provtagningsplatser som valts i enlighet med del I punkt 2 andra stycket i bilaga V till det direktivet ska därefter omfattas av åtminstone det program som fastställs i punkt I.2.1.

I.2.2.2 Krav för att återfå sjukdomsfri status med avseende på WSD för inlandsdelområden som omfattar en enda anläggning som tidigare har förklarats fri från WSD

Ett inlandsdelområde som omfattar en enda anläggning som har hälsostatus av kategori I med avseende på WSD, vars hälsostatus med avseende på denna förtecknade sjukdom i enlighet med del II punkt 3 i bilaga V till direktiv 2006/88/EG inte är beroende av omgivande naturliga vatten och vars hälsostatus av kategori I har återkallats i enlighet med artikel 53.3 i det direktivet, kan återfå sin hälsostatus av kategori I omedelbart efter det att den behöriga myndigheten har bekräftat att följande villkor har uppfyllts:

a) Anläggningen med WSD har tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll. Driftuppehållet ska ha varit minst sex veckor.

b) I anläggningen med WSD har utsättning skett med kräftdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I med avseende på WSD.

I.3 Särskilda krav för att få behålla sjukdomsfri hälsostatus (kategori I) med avseende på WSD

Om det enligt artikel 52 i direktiv 2006/88/EG krävs riktad övervakning för att få behålla hälsostatus av kategori I ska alla anläggningar som håller sådana mottagliga arter som förtecknas i del II i bilaga IV till det direktivet i medlemsstaten, zonen eller delområdet i fråga genomgå hälsoinspektion och provtas i enlighet med tabell 6.B i avsnitt II, med beaktande av anläggningens risknivå för att smittas med WSD.

I medlemsstater, zoner eller delområden där antalet anläggningar är begränsat och riktad övervakning av dessa anläggningar inte ger tillräckliga epidemiologiska uppgifter ska övervakningsprogrammen för att få behålla sjukdomsfri status omfatta provtagningsplatser som valts i enlighet med kraven i punkt I.1.

Dessa provtagningsplatser ska inspekteras och provtas enligt rotationsprincipen (50 % av provtagningsplatserna per år). Provtagningen ska utföras i enlighet med tabell 6.B i avsnitt II. Proverna ska väljas, beredas och undersökas i enlighet med de diagnostiska metoderna och provtagningsmetoderna i avsnitt II och laboratorieanalyserna ska ha gett negativt resultat med avseende på WSD-agens.

Den sjukdomsfria statusen får endast behållas så länge som alla prover testas med negativt resultat med avseende på WSD med de diagnostiska metoderna och provtagningsmetoderna i punkt II.2, och varje misstanke om förekomst av WSD har uteslutits i enlighet med den officiella undersökningen och de diagnostiska metoderna i punkt II.3.

I.4 Krav för upphävande av de åtgärder för att motverka sjukdomsspridning som fastställs i artikel 39 i direktiv 2006/88/EG (övergång från hälsostatus av kategori V till kategori III) med avseende på WSD

En medlemsstat, en zon eller ett delområde som har hälsostatus av kategori V med avseende på WSD kan uppnå hälsostatus av kategori III med avseende på denna förtecknade sjukdom, förutsatt att följande gäller:

a) Kraven i punkt I.2.2.1 a, b och c är uppfyllda. Om driftuppehåll inte är tekniskt möjligt ska anläggningarna bli föremål för en alternativ åtgärd som ger nästan samma garantier för att WSSV utrotas från anläggningens omgivning.

b) I alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med WSD och i alla andra anläggningar i de fastställda skydds- och övervakningszonerna som gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a har utsättning skett med kräftdjur som kommer från medlemsstater, zoner eller delområden med en hälsostatus av kategori I, II eller III med avseende på WSD.

c) Utsättningen skedde inte förrän alla anläggningar som officiellt förklarats smittade med WSD hade tömts, rengjorts och desinficerats samt gjort driftuppehåll eller varit föremål för alternativa åtgärder i enlighet med led a.

d) Förekomsten av WSD har inte bekräftats under den tvåårsperiod som följer på slutförandet av de åtgärder som avses i leden a och b, och under denna period har misstankar om förekomst uteslutits i enlighet med förfarandena i punkt II.3.

II. **Diagnostiska metoder och provtagningsmetoder**

II.1 Prover

Prover av integument epidermis, antingen dissekerade eller kvar i försöksdjurets gångben, bakkroppsben, mundelar eller gälar, ska fixeras i 95 % etanol innan proverna bereds för tvåstegs-PCR.

Andra prover, fixerade för histologi och transmissionselektronmikroskopi, får samlas in till stöd för diagnostiska data från PCR.

II.2 Diagnostiska metoder för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på WSD

Den diagnostiska metod som ska användas för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri status med avseende på WSD i enlighet med de detaljerade metoderna och förfarandena i del 6 i bilaga II ska vara tvåstegs-PCR.

Om tvåstegs-PCR ger ett positivt resultat ska resultaten bekräftas genom sekvensering av amplikon innan de inledande bekämpningsåtgärder som föreskrivs i artikel 28 i direktiv 2006/88/EG vidtas, om så är praktiskt möjligt genom påvisande av patognomoniska tecken på WSD hos de utvalda mottagliga värdarna via histologi och transmissionselektronmikroskopi.

II.3 Officiell undersökning och diagnostiska metoder för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av infektion orsakad av WSD

När det i enlighet med artikel 28 i direktiv 2006/88/EG krävs att förekomsten av en infektion orsakad av WSD bekräftas eller att en misstanke om förekomst av en sådan infektion utesluts ska följande förfarande för inspektion, provtagning och testning följas:

a) Den officiella undersökningen ska omfatta minst en hälsoinspektion och en provtagning av 10 kräftdjur när det iakttas kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med symtomen på infektion orsakad av WSD, eller av 150 kräftdjur när inga kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt iakttas. Proverna ska testas med den diagnostiska metoden i punkt II.2 (tvåstegs-PCR).

b) Förekomsten av WSD ska anses bekräftad när tvåstegs-PCR följt av sekvensering, i enlighet med de detaljerade metoderna och förfarandena i del 6 i bilaga II, är positiv för WSSV och när patognomoniska tecken på WSD förekommer i de utvalda värdarna.

Misstanke om förekomst av WSD kan uteslutas om dessa tester inte visar på några ytterligare tecken på förekomst av WSD.

Tabell 6.A

Övervakning av medlemsstater, zoner och delområden för den tvååriga kontrollperiod som föregår uppnåendet av sjukdomsfri status med avseende på WSD enligt punkt I.2.1

	Antal kliniska inspektioner per år	Antal laboratorieanalyser per år	Antal kräftdjur i provet
Anläggningar/provtagningsplatser	1	1	150

Tabell 6.B

Övervakning av medlemsstater, zoner eller delområden för att få behålla sjukdomsfri status med avseende på WSD enligt punkt I.3

Risknivå	Antal hälsoinspektioner	Antal laboratorieanalyser	Antal kräftdjur i provet
Hög	1 per år	1 vartannat år	150
Medelhög	1 vartannat år	1 vartannat år	150
Låg	1 vartannat år	1 vart fjärde år	150

BILAGA II

DETALJERADE DIAGNOSTISKA METODER OCH FÖRFARANDEN

I. **Inledning**

I denna bilaga fastställs de detaljerade förfarandena för de diagnostiska metoder som ska användas vid laboratorieanalyserna i de utrotnings- och övervakningsprogram som fastställs i bilaga I till detta beslut för att i enlighet med artikel 57 b i det direktivet utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av följande sjukdomar som inte är exotiska och som förtecknas i del II i bilaga IV till direktiv 2006/88/EG (nedan kallade *de förtecknade sjukdomarna*):

1.	Viral hemorragisk septikemi (VHS)	Del 1
2.	Infektiös hematopoietisk nekros (IHN)	Del 1
3.	Koiherpesvirus (KHV)	Del 2
4.	Infektiös laxanemi (ILA/ISA)	Del 3
5.	Infektion orsakad av *Marteilia refringens*	Del 4
6.	Infektion orsakad av *Bonamia ostreae*	Del 5
7.	Vitprickig kräftdjurssjuka (WSD)	Del 6

II. **Definitioner**

I denna bilaga avses med transportmedium ett cellodlingsmedium med 10 % kalvserum samt med 200 IE penicillin, 200 µg streptomycin och 200 µg kanamycin per milliliter eller med annan antibiotika med dokumenterad effektivitet.

DEL 1

DETALJERADE DIAGNOSTISKA METODER OCH FÖRFARANDEN FÖR ÖVERVAKNING OCH BEKRÄFTELSE AV FÖREKOMST AV VHS OCH IHN

I. **Diagnostiska metoder och förfaranden för övervakning av VHS och IHN**

Vid genomförandet av provtagning och laboratorieanalys för att erhålla eller få behålla sjukdomsfri hälsostatus med avseende på VHS eller IHN i enlighet med del 1 avsnitt I i bilaga I med de diagnostiska metoderna i del 1 punkterna II.1 och II.2 i den bilagan ska de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i de följande punkterna I.1–I.6 tillämpas.

I.1 Beredning och transport av fiskprover

I.1.1 Vävnader för virologisk undersökning i cellkultur

Före transport eller överföring till laboratoriet ska delar av de organ som ska undersökas avlägsnas från fisken med sterila dissektionsinstrument och överföras till sterila plaströr med transportmedium.

Vilken mängd fiskmaterial som lämpar sig för virologisk undersökning i cellkultur och RT-qPCR beror på fiskens storlek. De vävnader som ska provtas ska därför vara hela gulesäcksyngel (längd < 4 cm), inälvor inklusive njure (längd 4–6 cm) eller, för större fiskar, njure, mjälte, hjärta och/eller encephalon samt ovarievätska från stamfisk vid lektiden.

Ovarievätska, sädesvätska eller organdelar från högst 10 fiskar får samlas in i ett sterilt rör med minst 4 ml transportmedium och ska utgöra ett samlingsprov. Vävnaderna i varje prov ska väga minst 0,5 g.

Den virologiska undersökningen i cellkultur ska påbörjas så snart som möjligt och senast 48 timmar efter provinsamlingen. I undantagsfall får den virologiska undersökningen påbörjas senast 72 timmar efter materialinsamlingen, förutsatt att det material som ska undersökas skyddas av ett transportmedium och att temperaturkraven under transport kan uppfyllas.

I.1.2 Prover för analys med PCR med omvänd transkription (RT-PCR eller RT-qPCR)

Prover ska tas från fisken med ett sterilt instrument och överföras till sterila plaströr med transportmedium i enlighet med förfarandet i punkt I.1.1. Vävnad från 10 fiskar får samlas in i ett rör och ska utgöra ett samlingsprov. Om mängden inokulat är liten får dock vävnad från upp till 5 fiskar användas. Alternativt får prover slås samman i RNA-stabiliserande lösning, t.ex. 0,2 g vävnad/ml reagens enligt tillverkarnas rekommendationer, även om varje fisk ska bearbetas separat och inte får slås samman i prov på grund av att mängden material för extraktion är liten.

Även hel fisk får skickas till laboratoriet.

I.2 Transport av fiskprover

Rör med fiskvävnader i transportmedium för cellodling eller analys med RT-PCR/RT-qPCR ska placeras i isolerade behållare (t.ex. tjockväggiga polystyrenlådor) tillsammans med så mycket is eller ett alternativt kylmedel med liknande avkylande effekt så att proverna hålls kylda under transporten till laboratoriet. Frysning av proverna ska dock förhindras. Provernas temperatur under transporten får aldrig överstiga 10 °C och när proverna tas emot ska det finnas is kvar i transportlådan eller också ska ett eller flera av frysblocken fortfarande vara helt eller delvis frysta.

Hel fisk får skickas till laboratoriet om de temperaturkrav som anges i första stycket kan uppfyllas under transporten. Hel fisk ska slås in i absorberande papper och transporteras i plastpåse. Även levande fisk får transporteras.

I.3 Insamling av kompletterande diagnostiskt material

När diagnostiklaboratoriet godkänt det får även andra fiskvävnader samlas in och beredas för kompletterande undersökningar.

I.4 Provberedning för undersökning i cellkultur och RT-qPCR

I.4.1 Frysning i undantagsfall

Om det uppstår praktiska svårigheter som gör det omöjligt att bearbeta proverna inom 48 timmar efter insamlingen av fiskvävnaderna får man frysa vävnaderna i transportmedium vid högst – 20 °C och genomföra den virologiska undersökningen inom 14 dagar. Fiskvävnaden får dock endast frysas och tinas upp en gång före undersökningen. Skälen till infrysning av fiskvävnadsprover ska registreras varje gång.

I.4.2 Homogenisering av organ

På laboratoriet ska fiskvävnaden i rören homogeniseras fullständigt (antingen med stomacher homogenisator, mixer eller med mortel och stöt med steril sand) och därefter blandas med det ursprungliga transportmediet.

Om ett prov består av en hel fisk som är mindre än 4 cm ska denna sönderdelas med steril sax eller skalpell efter det att kroppen bakom analöppningen har avlägsnats. Om ett prov består av en hel fisk som är 4–6 cm ska inälvorna inklusive njure samlas in. Om ett prov består av en hel fisk som är längre än 6 cm ska vävnadsprover samlas in enligt punkt I.1. Vävnadsproverna ska sönderdelas med steril sax eller skalpell, homogeniseras enligt första stycket och blandas med transportmedium.

Det slutliga förhållandet mellan vävnadsmaterial och transportmedium ska på laboratoriet justeras till 1:10.

I.4.3 Centrifugering av homogenat

Homogenatet ska centrifugeras i en kylcentrifug vid 2 000–4 000 × g vid 2–5 °C i 15 minuter, varefter supernatanten ska samlas in och får behandlas med antibiotika antingen vid 15 °C i 4 timmar eller vid 4–8 °C över natten. Om provet har transporterats i ett transportmedium får man utelämna behandlingen av supernatanten med antibiotika.

Om det uppstår praktiska svårigheter (t.ex. om inkubatorn inte fungerar eller om man får problem med cellkulturerna) som gör det omöjligt att inokulera cellerna inom 48 timmar efter insamlingen av fiskvävnadsproverna får man frysa supernatanten vid – 80 °C och genomföra den virologiska undersökningen inom 14 dagar.

Om den insamlade supernatanten förvaras vid – 80 °C inom 48 timmar efter provtagningen får den återanvändas endast en gång för virologisk undersökning.

Före inokuleringen av cellerna ska supernatanten blandas med lika delar av lämpligt utspätt, sammanslaget antiserum mot de inhemska serotyperna av virus för infektiös pankreasnekros (IPN-virus) och inkuberas vid 15 °C i minst en timme eller vid 4 °C i högst 18 timmar. Antiserumets titer ska vara minst 1:2 000 i ett 50 % plackneutralisationstest.

Alla inokulat behandlas med antiserum mot IPN-virus för att förhindra att en cytopatisk effekt (CPE) orsakad av IPN-virus utvecklas i inokulerade cellkulturer. Detta gör de virologiska undersökningarna snabbare och ger färre fall där förekomsten av CPE skulle uppfattas som en potentiell indikation på VHS-virus eller IHN-virus.

När prover kommer från produktionsenheter som anses fria från IPN behöver inokulat inte behandlas med antiserum mot IPN-virus.

I.4.4 Provberedning för RT-PCR- och RT-qPCR-baserade övervakningsprogram

Om prover har samlats in i transportmedium ska förfarandet i punkterna I.4.2 och I.4.3 genomföras. Efter centrifugering ska supernatanten samlas in och RNA extraheras. Om ingen ytterligare undersökning ska genomföras direkt efter centrifugeringen ska proverna omedelbart frysas vid högst – 20 °C.

Vid analys av fiskvävnader som bevarats i RNA-stabiliserande lösning ska efterföljande steg utföras inom följande tidsramar beroende på den temperatur som proverna förvarats vid:

Prover förvarade vid 37 °C: en dag.

Prover förvarade vid 25 °C: en vecka.

Prover förvarade vid 4 °C: en månad.

Prover förvarade vid – 20 °C: på obestämd tid.

Samlingsprover i RNA-stabiliserande lösning ska behandlas som enskilda prover i RNA-stabiliserande lösning. För prover som slås samman i RNA-stabiliserande lösning får provmängden inte överstiga den som rekommenderas av tillverkaren vid extraktion med RNA-kit, såsom RNeasy Mini kits (Qiagen) eller liknande. Om större prover slås samman ska extraktionskiten eller extraktionsmetoderna återspegla denna sammanslagning.

Prover som samlas in i RNA-stabiliserande lösning får inte användas för cellodling.

I.4.5 Sammanslagning av prover för RT-qPCR

Eftersom protokollen för RT-qPCR har liknande eller högre sensitivitet än cellodlingsmetoderna, får man vid PCR använda supernatanten från homogeniserat fiskvävnadsmaterial bestående av organ från upp till 10 fiskar som slagits samman i cellodlingsmedium. På grund av den lilla mängd inokulat som används vid PCR jämfört med vid cellodling ska alla fiskvävnader noggrant homogeniserade innan materialet slås samman för extraktion.

Samma princip ska också tillämpas om prover samlas in i RNA-stabiliserande lösning. I dessa fall är det emellertid ofta svårt att samla in representativt material från upp till 10 fiskar i ett rör och antalet fiskar per sammanslaget prov ska därför minskas till 2–5 stycken.

I.5 Virologisk undersökning i cellkultur

I.5.1 Cellkulturer och medier

Antingen cellinjen Bluegill fry (BF-2) eller Rainbow trout gonad (RTG-2) och antingen cellinjen *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) eller *Fathead minnow* (FHM) ska odlas vid 20–30 °C i lämpligt medium, dvs. *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) eller modifieringar därav, med tillsats av 10 % fetalt bovinserum och antibiotika i standardkoncentrationer.

När cellerna odlas i stängda flaskor ska mediet buffras med bikarbonat. Vid odling i öppna kärl kan cellodlingsmediet buffras med Tris-HCl (tris(hydroximetyl)aminometan-HCl) (23 mM) och natriumbikarbonat (6 mM). pH-värdet ska vara 7,6 ± 0,2.

De cellkulturer som ska användas för inokulering med fiskvävnadsmaterial ska vara unga, om möjligt ska vanligtvis en dag gamla cellkulturer i monolager användas. Emellertid kan cellkulturer som är 4–48 timmar godtas. Cellerna ska vara aktivt växande vid inokuleringen.

I.5.2 Inokulering av cellkulturer

Antibiotikabehandlade organsuspensioner ska inokuleras i cellkulturer i två spädningar för att förhindra homolog interferens, dvs. primärspädningen plus en spädning på 1:10 av denna, vilket resulterar i slutliga spädningar av vävnadsmaterial i cellodlingsmedium på 1:100 respektive 1:1 000. Minst två cellinjer ska inokuleras enligt punkt I.5.1. Förhållandet mellan inokulatets storlek och cellodlingsmediets volym ska vara cirka 1:10.

För varje spädning och varje cellinje ska minst cirka 2 cm^2 cellyta användas, motsvarande en brunn i en cellodlingsplatta med 24 brunnar. Cellodlingsplattor ska användas när så är möjligt.

I.5.3 Inkubering av cellkulturer

De inokulerade cellkulturerna ska inkuberas vid 15 °C i 7–10 dagar. Om färgen på cellodlingsmediet ändras från rött till gult, vilket är ett tecken på att mediet blivit surt, ska pH-värdet justeras med steril bikarbonatlösning eller likvärdiga ämnen för att säkerställa cellernas mottaglighet för virusinfektion.

Minst var sjätte månad eller så snart man misstänker att cellernas mottaglighet för infektion har minskat ska frusna lager av VHS-virus och IHN-virus titreras för att kontrollera cellkulturernas mottaglighet för infektion. Förfarandet i avsnitt III ska användas när så är möjligt.

I.5.4 Mikroskopi

Inokulerade cellkulturer ska regelbundet (minst tre gånger per vecka) undersökas vid 40–150 × förstoring för förekomst av CPE. Om tydlig CPE iakttas ska förfaranden för identifiering av virus enligt punkt I.6 påbörjas omedelbart.

I.5.5 Subkultivering

Om CPE inte har utvecklats efter 7–10 dagars primärinkubering ska subkultivering till friska cellkulturer göras och en ungefär lika stor cellyta som i primärkulturen ska användas.

Från samtliga kulturer eller brunnar i primärkulturen ska alikvoter av medium (supernatant) slås samman enligt cellinje 7–10 dagar efter inokuleringen. Det sammanslagna mediet ska sedan inokuleras i homologa cellkulturer både outspätt och i spädning 1:10 (vilket resulterar i slutliga spädningar av supernatanten på 1:10 respektive 1:100) enligt punkt I.5.2. Alternativt inokuleras alikvoter om 10 % av primärkulturens medium direkt i brunnar med frisk cellkultur (dvs. subkultivering från brunn till brunn). Inokuleringen får föregås av preinkubering av de utspädda lösningarna med antiserum mot IPN-virus i lämplig spädning enligt punkt I.4.3.

De inokulerade kulturerna ska därefter inkuberas vid 15 °C i 7–10 dagar och undersökas i enlighet med punkt I.5.4.

Om toxisk CPE förekommer under inkuberingens 3 första dagar ska subkultivering göras i detta skede och cellerna ska inkuberas i 7 dagar och därefter återigen subkultiveras med ytterligare 7 dagars inkubering. Om toxisk CPE utvecklas efter 3 dagar ska cellerna subkultiveras en gång och inkuberas så att det totalt fortlöper 14 dagar från primärinokuleringen. Det får inte finnas några tecken på toxicitet under de sista 7 dagarna av inkuberingen.

Om bakteriell kontaminering förekommer trots antibiotikabehandling ska subkultiveringen föregås av centrifugering vid 2 000–4 000 × g vid 2–5 °C i 15–30 minuter eller av filtrering av supernatanten genom ett 0,45 µm filter, eller av båda (membran med låg proteinbindningsgrad). Subkultiveringen ska dessutom följa samma förfaranden som det som gäller vid toxisk CPE i fjärde stycket i denna punkt.

Om ingen CPE förekommer kan testet förklaras vara negativt.

I.6 Identifiering av virus

Om tecken på CPE har iakttagits i en cellkultur ska mediet (supernatanten) samlas in och undersökas med en eller flera av följande metoder: ELISA (enzymkopplad immunadsorberande analys), immunofluorescens (IF), neutralisationstest, RT-PCR eller RT-qPCR. Om dessa tester inte leder till en säker identifiering av viruset inom en vecka ska supernatanten skickas för omedelbar identifiering till det nationella referenslaboratoriet eller till EU:s referenslaboratorium för fisksjukdomar som avses i bilaga VI till direktiv 2006/88/EG.

I.6.1 ELISA

En antigen-ELISA med dubbla antikroppar ska utföras för att identifiera virusisolatet. Mikrotiterplattorna ska vara belagda med 50 µl/brunn (0,9 pg) av protein-A renade immunoglobuliner (Ig) av dokumenterad kvalitet från kaninantiserum mot VSH-virus eller IHN-virus vilka spätts i karbonatbuffert (pH 9,6) innehållande 15 mM natriumazid och plattorna ska inkuberas vid 4 °C i 18 timmar–2 veckor.

I en spädningsplatta ska varje prov innehållande 1 % Triton X-100 och de positiva kontrollerna spädas med buffertlösning (dvs. fosfatbuffrad koksaltlösning med 1 % BSA (PBS-T-BSA)) i en fyrfaldig spädning: outspätt, 1:4, 1:16 och 1:64. ELISA-plattorna ska tvättas med PBS innehållande 0,05 % Tween-20 (PBS-T) och 50 µl av varje spädning ska överföras från spädningsplattan till den tvättade och belagda ELISA-plattan.

I nästa steg ska ELISA-plattorna inkuberas vid 37 °C i 30 minuter. Därefter ska plattorna tvättas och inkuberas vid 37 °C i 30 minuter med specifika monoklonala antikroppar (dvs. MAb IP5B11 för identifiering av VHS-virus respektive Hyb 136–3 för IHN-virus). 50 µl HRP-konjugerade (HRP = pepparrotperoxidas) kanin-antikroppar mot mus utspädda i PBS-T-BSA (1:1 000) ska överföras till ELISA-plattan.

Efter ytterligare en tvättning ska reaktionerna startas genom tillsats av 50 µl orto-fenylendiamin (OPD)/brunn. ELISA-plattorna ska inkuberas mörkt vid rumstemperatur i 20 minuter och reaktionen ska stoppas genom tillsats av 100 µl 0,5 M H_2SO_4/brunn.

Absorbansen ska mätas vid 492 och 620 nm i en ELISA-spektrofotometer. Genom att jämföra testresultaten med absorbansvärdena för de positiva och negativa kontrollerna ska proverna bedömas som positiva eller negativa. I allmänhet ska prover med kombinerade absorbansvärden (A-värden) under 0,5 för outspätt material anses vara negativa, prover med A-värden på 0,5–1,0 ska anses vara misstänkta och prover med A-värden över 1,0 ska anses vara positiva.

Även andra varianter av ELISA med liknande dokumenterad effektivitet får användas i stället för den som anges i denna punkt.

I.6.2 Immunofluorescens (IF)

De förtecknade patogenerna VHS-virus och IHN-virus ska identifieras genom att celler i svarta 96-hålsplattor, i konventionella 24-hålsplattor eller på täckglas i 24-hålsplattor smittas. När VHS-virus eller IHN-virus, eller båda, identifieras genom att celler på täckglas smittas ska följande protokoll tillämpas:

a) Cellerna ska sås ut på täckglas med en densitet som ger 60–90 % konfluens efter 24 timmars odling. Om möjligt ska EPC-celler användas för detta ändamål eftersom de fäster bra på glasytor, men även andra cellinjer får användas, t.ex. BF-2, RTG-2 eller FHM. 150 µl av cellkulturens supernatant i två olika spädningar (1:10 och 1:1 000) ska inokuleras i duplikat på endagsgamla monolager och inkuberas vid 15 °C i 24 timmar.

b) Därefter ska cellodlingsmediet avlägsnas och de smittade monolagren fixeras med 0,5 ml iskall, vattenlösning av aceton (80 % v/v). Fixeringen ska göras i dragskåp vid rumstemperatur i 15 minuter, sedan ska acetonlösningen avlägsnas och täckglasen ska lufttorka i minst 30 minuter. I detta skede ska plattorna antingen bearbetas omedelbart eller förvaras vid – 20 °C för vidare användning.

c) Specifika monoklonala antikroppar (dvs. MAb IP5B11 för identifiering av VHS-virus respektive Hyb 136–3 för IHN-virus) ska spädas i 0,01 M PBS-T (pH 7,2) vid den spädning som leverantören av MAb rekommenderar. 50–100 µl/brunn ska tillsättas till det fixerade monolagret och plattorna ska inkuberas vid 37 °C i 1 timme i en fuktkammare.

d) Täckglasen ska tvättas försiktigt tre gånger med PBS innehållande 0,05 % Tween-20 (PBS-T) och bufferten ska avlägsnas helt efter den sista sköljningen. Cellerna ska därefter inkuberas vid 37 °C i 1 timme med fluoresceinisotiocyanat (FITC)- eller tetrametylrodamin-5-(och -6-)isotiocyanat (TRITC)-konjugerade antikroppar mot musimmunglobulin (dvs. den primära antikroppen) utspädda enligt leverantörens anvisningar, och återigen tvättas med PBS-T samt torkas. Färgade kulturer ska monteras på objektglas med glycerolsaltlösning och undersökas under infallande UV-ljus. Använd okular med förstoringsgrad 10 × eller 12 × och objektiv × 25 eller × 40 med bländare > 0,7 respektive > 1,3.

Även andra IF-metoder (med cellkulturer, fixering och antikroppar av referenskvalitet) med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

I.6.3 Neutralisationstest

Cellerna ska avlägsnas från den insamlade supernatanten genom centrifugering (2 000–4 000 × g) eller membranfiltrering (0,45 µm) med ett membran med låg proteinbindningsgrad och supernatanten ska spädas 1:100 och 1:10 000 i cellodlingsmedium.

Alikvoter av minst två supernatantspädningar ska blandas separat med lika delar av vart och ett av följande reagens och inkuberas vid 15 °C i 60 minuter:

a) Serum innehållande gruppspecifika antikroppar mot VHS-virus i spädning 1:50 (v/v).

b) Serum innehållande gruppspecifika antikroppar mot IHN-virus i spädning 1:50 (v/v).

c) Sammanslagna antiserum mot inhemska serotyper av IPN-virus i spädning 1:50 (v/v).

d) Endast medium (positiv kontroll).

Minst två cellkulturer ska inokuleras med 50 µl av varje supernatant-serumblandning och sedan inkuberas vid 15 °C. Utveckling av CPE ska kontrolleras enligt punkt I.5.4.

VHS-virusstammar och -virusisolat som inte reagerar i neutralisationstestet ska identifieras med IF eller ELISA.

Även andra neutralisationstest med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

I.6.4 RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1 Beredning av virus-RNA

Allt arbete med RNA ska utföras på is och handskar ska användas.

RNA ska extraheras med fenol/kloroform-metoden eller med spinnkolonner med affinitet för RNA enligt tillverkarens anvisningar. Kommersiellt tillgängliga RNA-extraktionskit som ger högkvalitativt RNA som lämpar sig för användning med de protokoll för RT-PCR som beskrivs nedan får användas.

RNA ska återsuspenderas i destillerat, RNase-fritt vatten (dvs. vatten som behandlats med 0,1 % dietylpyrokarbonat) eller en lämplig elueringsbuffert.

I.6.4.2 RT-PCR

Följande primrar ska användas för påvisande av IHN-virus:

Framåtriktad primer: 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′.

Bakåtriktad primer: 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

Följande cykler ska användas (ettstegs-RT-PCR): 1 cykel: 50 °C i 30 minuter, 1 cykel: 95 °C i 2 minuter, 30 cykler: 95 °C i 30 sekunder, 50 °C i 30 sekunder och 72 °C i 60 sekunder, 1 cykel: 72 °C i 7 minuter och blötläggning vid 4 °C.

Följande primrar ska användas för påvisande av VHS-virus:

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

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

Följande cykler ska användas (ettstegs-RT-PCR): 50 °C i 30 minuter, 95 °C i 15 minuter, 35 cykler vid 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder och 68 °C i 60 sekunder. Reaktionen ska därefter hållas vid 68 °C i 7 minuter.

RT-PCR-reaktionernas kvantitet och specificitet ska utvärderas med elektrofores i 1,5 % agarosgel med etidiumbromid och observeras med UV-genomlysning. Ett PCR-amplikon på 693 baspar kan iakttas för IHN-virus. För VHS-virus ska storleken vara 505 baspar.

Resultaten från PCR kan variera beroende på under vilka förhållanden den genomförs, dvs. temperaturprotokollen kan behöva optimeras beroende på den termocykler som används. Falskt positiva resultat kan dessutom uppkomma på grund av felaktig hybridisering av primrar eller kontaminering i laboratoriet. Lämpliga positiva och negativa kontroller samt sekvenserade amplikon ska därför användas för att undvika eventuella oklarheter. När det gäller primrar för VHS-virus ska man vara särskilt försiktig vid användning av BF-2-celler, eftersom primrarna kan reagera med cellinjens DNA/RNA och ge falskt positiva resultat av liknande storlek. När supernatanten från BF-2-celler testas ska alla amplifierade PCR-fragment sekvenseras.

I.6.4.3 RT-qPCR för VHS-virus

När det gäller VHS-virus ska amplifieringen utföras med följande primrar och prob:

Framåtriktad primer: 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′.

Bakåtriktad primer: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′.

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

Ettstegs-RT-qPCR:

Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Cykelförhållanden: 50 °C i 30 minuter, 95 °C i 15 minuter, 40 cykler vid 94 °C i 15 sekunder, 60 °C i 40 sekunder och 72 °C i 20 sekunder (justera vid behov). Även andra varianter av RT-PCR eller RT-qPCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

I.6.4.4 RT-qPCR för IHN-virus

När det gäller IHN-virus ska amplifieringen utföras med följande primrar och prob:

Framåtriktad primer: 5′-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′.

Bakåtriktad primer: 5′-TTCTTTGCGGCTTGGTTGA-3′.

Prob: 5′-6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Tvåstegs-RT-qPCR:

Eftersom följande test bygger på en tvåstegsamplifiering ska man vara extra försiktig vid hanteringen av rören mellan det första och andra steget för att förhindra kontaminering.

Cykelförhållanden (efter RT-steget): 50 °C i 2 minuter, 95 °C i 10 minuter, följt av 40 cykler vid 95 °C i 15 sekunder och 60 °C i 1 minut (justera vid behov).

Även andra varianter av RT-PCR eller RT-qPCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

II. **Detaljerade diagnostiska metoder och förfaranden för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av VHS eller IHN, eller båda, vid misstänkta sjukdomsutbrott**

När det i enlighet med artikel 57 b i direktiv 2006/88/EG krävs en laboratorieanalys för att bekräfta eller utesluta förekomst av VHS eller IHN, eller båda, med de diagnostiska metoderna i del 1 punkt II.3 i bilaga I ska följande detaljerade diagnostiska metoder och förfaranden tillämpas:

a) Konventionell virusisolering med efterföljande serumneutralisationstest, immunokemisk eller molekylär identifiering av virus.

b) Påvisande av virus med RT-PCR eller RT-qPCR.

c) Andra diagnostiska metoder, t.ex. IFAT, ELISA, RT-PCR eller IHK.

II.1 Konventionell virusisolering med efterföljande identifiering av virus

II.1.1 Urval av prover

Minst tio fiskar med typiska tecken på VHS eller IHN ska väljas ut för undersökning.

II.1.2 Beredning och transport av fiskprover

Beredningen och transporten för konventionell virusisolering ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.2.

II.1.3 Insamling av kompletterande diagnostiskt material

Insamlingen av kompletterande material för konventionell virusisolering ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.3.

II.1.4 Provberedning för undersökning med cellkultur

Provberedningen för undersökning med cellkultur för konventionell virusisolering ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.4.

II.1.5 Virologisk undersökning i cellkultur

Den virologiska undersökningen för konventionell virusisolering ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.5.

II.1.6 Identifiering av virus

Identifieringen av virus för konventionell virusisolering ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.6.

II.2 Påvisande av virus med RT-qPCR

II.2.1 Urval av prover

Urvalet av prover för påvisande av virus med RT-qPCR ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.1.2.

II.2.2 Beredning och transport av fiskprover

Beredningen och transporten för påvisande av virus med RT-qPCR ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.2.

II.2.3 Insamling av kompletterande diagnostiskt material

Insamlingen av kompletterande diagnostiskt material för påvisande av virus med RT-qPCR ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.3.

II.2.4 Provberedning för RT-qPCR

Provberedningen för påvisande av virus med RT-qPCR ska följa metoderna och förfarandena i punkt I.6.4.1.

II.2.5 RT-qPCR

Påvisandet av virus med RT-qPCR ska följa metoderna och förfarandena i punkterna I.6.4.1, I.6.4.3 och I.6.4.4.

II.3 Andra diagnostiska metoder

Supernatant som beretts enligt punkt I.4.3 får analyseras med ELISA, indirekt fluorescerande antikroppstest (IFAT) eller RT-PCR i enlighet med punkt I.6.1, I.6.2 respektive I.6.4. Vävnadsmaterial får undersökas med andra diagnostiska metoder, t.ex. IFAT för fryssnitt eller immunhistokemi för formalinfixerat vävnadsmaterial. Dessa snabba metoder ska senast 48 timmar efter provtagningen kompletteras med en virologisk undersökning i enlighet med antingen punkt II a eller II b

a) om resultatet är negativt, eller

b) om resultatet är positivt med material som utgör första fallet av VHS eller IHN.

III. **Förfarande för titrering för att kontrollera cellkulturernas mottaglighet för infektion**

När den titrering för att kontrollera cellkulturernas mottaglighet för infektion som avses i punkt I.5.3 utförs ska förfarandena i följande stycken följas:

Minst två VHS-virusisolat och ett IHN-virusisolat ska användas. Isolaten ska representera huvudgruppen av virus inom Europeiska unionen, dvs. ett patogent isolat från regnbåge i sötvatten och ett marint isolat som är patogent hos piggvar för VHS-virus och en EU-stam som är patogen hos regnbåge för IHN-virus. Väldefinierade isolat från medlemsstaterna ska användas. Batcher av virus i cellkulturer med lågt passagenummer ska odlas i cellodlingsflaskor på BF-2- eller RTG-2-celler för VHS-virus och på EPC- eller FHM-celler för IHN-virus. Cellodlingsmedium med minst 10 % serum ska användas. Vid inokulering ska en låg MOI (< 1) användas.

Vid full CPE ska viruset skördas genom centrifugering av cellkulturens supernatant vid 2 000 × g i 15 minuter, sterilfiltreras genom 0,45 µm membranfilter och fördelas i märkta kryorör. Viruset ska förvaras vid – 80 °C.

En vecka efter infrysningen ska tre replikat för varje virus tinas upp i kallt vatten och titreras på respektive cellinje. Minst var sjätte månad eller så snart man misstänker att en cellinjes mottaglighet har minskat ska varje virusisolat tinas upp och titreras.

Titreringsförfarandet ska beskrivas i detalj och utföras på samma sätt varje gång.

Slutpunktstitrering ska inbegripa minst 6 replikat för varje spädningssteg. Titervärdena ska jämföras med tidigare titervärden. Om titern för något av de tre virusisolaten har sjunkit med en faktor av minst 2 logaritmer jämfört med den ursprungliga titern, ska cellinjen inte längre användas för övervakningsändamål.

Om olika cellinjer förvaras på laboratoriet ska varje linje undersökas för sig.

Dokumentationen ska sparas i minst tio år.

DEL 2

DETALJERADE DIAGNOSTISKA METODER OCH FÖRFARANDEN FÖR ÖVERVAKNING OCH BEKRÄFTELSE AV FÖREKOMST AV KHV

I. **Detaljerade diagnostiska metoder och förfaranden för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av KHV**

När det i enlighet med artikel 57 b i direktiv 2006/88/EG krävs en laboratorieanalys för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av KHV med de diagnostiska metoderna i del 2 avsnitt III i bilaga I ska de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i punkterna I.1–I.2 tillämpas.

I.1 Beredning av fiskprover

För diagnostiska ändamål får fisk (skickad levande eller död och förpackad separat i förseglade aseptiska behållare) eller alternativt frysta organ eller organdelar bevarade i 80–100 % alkohol eller i transportmedium för virus (för bearbetning inom 48 timmar efter insamling) användas vid testning med konventionell PCR eller qPCR-baserade metoder.

För påvisande av KHV ska gäle och njure samlas in. Dessutom får mjälte, encephalon och tarm ingå i ett ytterligare separat prov. I akuta fall får vävnadsmaterial från upp till fem fiskar slås samman.

Vid misstanke om förekomst av KHV hos mycket värdefull fisk får dessutom icke-letal provtagning användas, t.ex. blodprover, svabbprover från gälar, biopsi från gälar och skrapprover från slemskikt.

I.1.1 DNA-extraktion

DNA ska extraheras i enlighet med standardförfaranden.

Kommersiellt tillgängliga DNA-extraktionskit som ger högkvalitativt DNA som lämpar sig för användning med de protokoll för PCR som anges i punkt I.2 får användas.

I.2 Påvisande och identifiering av agens med PCR-baserade metoder

I.2.1 qPCR för påvisande av KHV

För påvisande av KHV med qPCR ska följande metod användas:

Framåtriktad primer (KHV-86f): 5′-GACGCCGGAGACCTTGTG-3′.

Bakåtriktad primer (KHV-163r): 5′-CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3′.

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

Cykelförhållanden: 1 cykel vid 95 °C i 15 minuter, följt av 40 cykler vid 94 °C i 15 sekunder och 60 °C i 60 sekunder. Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Även andra varianter av qPCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

I.2.2 Konventionell PCR för påvisande av KHV

Den metod som beskrivs i denna punkt och som riktar in sig på genen för tymidinkinas (TK) hos KHV ska användas. Även andra PCR-metoder som visat liknande sensitivitet och specificitet som den beskrivna metoden får användas.

Framåtriktad primer (KHV-TKf): 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′.

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

Cykelförhållanden: 1 cykel vid 95 °C i 5 minuter, följt av 35 cykler vid 95 °C i 30 sekunder, 52 °C i 30 sekunder och 72 °C i 1 minut samt 1 cykel vid 72 °C i 10 minuter. Produktstorleken bör vara 409 baspar.

Resultaten från PCR kan variera beroende på under vilka förhållanden den genomförs, dvs. temperaturprotokollen kan behöva optimeras beroende på den termocykler som används. Falskt positiva resultat kan dessutom uppkomma på grund av felaktig hybridisering av primrar eller kontaminering. Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Även andra varianter av PCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

Det första påvisandet i ett område ska bekräftas genom sekvensering eller skickas för omedelbar identifiering till ett nationellt referenslaboratorium eller till EU:s referenslaboratorium för fisksjukdomar som avses i bilaga VI till direktiv 2006/88/EG.

II. **Detaljerade diagnostiska metoder och förfaranden för övervakning av KHV**

När provtagning och laboratorieanalys för att erhålla eller få behålla en viss hälsostatus med avseende på KHV i enlighet med del 2 avsnitt I i bilaga I genomförs med de diagnostiska metoderna i del 2 avsnitt II eller III i den bilagan, ska de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i de följande punkterna II.1 och II.2 tillämpas.

II.1 Beredning av fiskprover

Om möjligt ska fisk som har hållits under en längre period i temperaturer där viruset förökar sig (dvs. vid 15–26 °C i 2–3 veckor) provtas. Prover ska om möjligt samlas in 24 timmar, men senast 72 timmar, efter hantering som kan reaktivera virus hos fisk med bärarstatus, t.ex. håvning eller transport, för att förbättra chanserna att påvisa KHV.

För övervakning av KHV får fisk (skickad levande eller död och förpackad separat i förseglade aseptiska behållare) eller alternativt frysta organ eller organdelar bevarade i 80–100 % alkohol eller i transportmedium för virus (för bearbetning inom 48 timmar efter insamling) användas vid testning med PCR-baserade metoder. För övervakning av KHV ska gäle och njurvävnad samlas in.

För övervakning av KHV ska sammanslagning av material om möjligt förhindras. Om det är nödvändigt att slå samman material får vävnadsmaterial från högst två fiskar slås samman. Större prover ska homogeniseras med mortel och stöt eller med stomacher homogenisator och delprover ska tas för DNA-extraktion före klarifiering. Alternativt får delprover samlas in från varje vävnad som ingår i provet och läggas i lyseringsrör.

II.1.1 DNA-extraktion

DNA ska extraheras i enlighet med standardförfaranden. Kommersiellt tillgängliga DNA-extraktionskit som ger högkvalitativt DNA som lämpar sig för användning med de protokoll för PCR som anges i punkt II.2 får användas.

Det godtagbara förhållandet mellan vävnad och medium ska vara 1:9 (w/v). Testen ska omfatta 20–25 mg vävnadsmaterial.

II.2 Övervakning av KHV med PCR-baserade metoder

Vid övervakning av KHV ska qPCR användas. Om positiva prover påvisas i ett område som inte tidigare bekräftats vara positivt ska testresultaten antingen

a) bekräftas med sekvensering av en PCR- eller nästad PCR-produkt från proverna;

den erhållna rena konsensus-sekvensen ska överensstämma med referenssekvenserna till minst 98 %,

b) eller alternativt får prover skickas till ett nationellt referenslaboratorium för bekräftelse.

II.2.1 qPCR för påvisande av KHV

Följande qPCR-metod ska användas:

Framåtriktad primer (KHV-86f): 5′-GACGCCGGAGACCTTGTG-3′.

Bakåtriktad primer (KHV-163r): 5′-CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3′.

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

Cykelförhållanden: 1 cykel vid 95 °C i 15 minuter, följt av 50 cykler vid 94 °C i 15 sekunder och 60 °C i 60 sekunder.

Resultaten från qPCR kan variera beroende på under vilka förhållanden den genomförs, dvs. temperaturprotokollen kan behöva optimeras beroende på den termocykler som används. Falskt positiva resultat kan dessutom uppkomma på grund av felaktig hybridisering av primrar eller kontaminering i laboratoriet. Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Även andra varianter av qPCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

II.2.2 Konventionell PCR för bekräftelse av påvisande av KHV

För att bekräfta förekomsten av infektion orsakad av KHV ska den generiska nästade PCR-metod som beskrivs i tabell 2.1 användas, följt av sekvensering av den amplifierade produkten.

Tabell 2.1

Primrar och förhållanden för den nästade PCR-metod som riktar in sig på alla cyprinidherpesvirus (CyHV-1, CyHV-2 och CyHV-3)

Primer	Sekvens	Cykelförhållanden	Produktstorlek
CyHVpol-forward	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	Första omgången PCR *1 cykel:* 95 °C i 2 minuter *40 cykler:* 95 °C i 30 sekunder 55 °C i 30 sekunder 72 °C i 45 sekunder *1 cykel:* 72 °C i 10 minuter	362 baspar
CyHVpol-reverse	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Primer	Sekvens	Cykelförhållanden	Produktstorlek
CyHVpol-internal forward	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	Andra omgången PCR *1 cykel:* 95 °C i 2 minuter *40 cykler:* 95 °C i 30 sekunder 55 °C i 30 sekunder 72 °C i 45 sekunder *1 cykel:* 72 °C i 10 minuter	339 baspar
CyHVpol-internal reverse	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

Resultaten från PCR kan variera beroende på under vilka förhållanden den genomförs, dvs. temperaturprotokollen kan behöva optimeras beroende på den termocykler som används. Falskt positiva resultat kan dessutom uppkomma på grund av felaktig hybridisering av primrar eller kontaminering i laboratoriet. Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Även andra varianter av PCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

Sekvensering får utföras av laboratoriet eller vid externa specialiserade sekvenseringsföretag. Sekvenseringsresultat ska analyseras genom att jämföra sekvenserna med kända referenssekvenser för KHV (GenBank nummer AP008984, DQ657948 och DQ177346). Den erhållna rena konsensus-sekvensen ska överensstämma med referenssekvenserna till minst 98 %.

DEL 3

DETALJERADE DIAGNOSTISKA METODER OCH FÖRFARANDEN FÖR ÖVERVAKNING OCH BEKRÄFTELSE AV FÖREKOMST AV INFEKTIÖS LAXANEMI (ILA/ISA)

I. Provtagningsförfaranden för övervakning och kontroll av ILA/ISA

När provtagning och laboratorieanalys genomförs för övervaknings- eller utrotningsprogram enligt del 3 i bilaga I eller för att bekräfta eller utesluta förekomst av ILA/ISA i enlighet med artikel 57 b i direktiv 2006/88/EG, ska de detaljerade metoderna och förfarandena i punkterna I.1, I.2 och I.3 tillämpas.

I.1 Beredning av fiskprover

Vid laboratorieanalys för att undersöka förekomst av ILA/ISA ska fiskprover om möjligt inte slås samman. Vid övervakning av ILA/ISA får dock 2–5 fiskar slås samman.

Prover för PCR med omvänd transkription (RT-PCR) ska tas från alla fiskar som provtas. En bit av njurens mellersta del ska avlägsnas från fisken med ett sterilt instrument och överföras till ett mikrofugrör med 1 ml RNA-stabiliserande lösning med dokumenterad effektivitet. Vävnad från upp till 5 fiskar får samlas in i ett rör med transportlösning och ska utgöra ett samlingsprov. Vikten på vävnaden i ett prov ska vara 0,5 g. När fisken är för liten för att man ska kunna ta ett prov som väger så mycket får även delar av njure, hjärta, mjälte, lever eller pylorusbihang, i den ordningen, användas så att provet kommer upp i 0,5 g.

Vävnad för histologisk undersökning ska endast tas från nyligen dödad fisk med normal konstitution som visar kliniska tecken eller tecken vid inspektion efter slakt som överensstämmer med förekomst av ILA/ISA. Eventuella yttre eller inre skador ska provtas och under alla omständigheter ska prover tas från njurens mellersta del, hjärta, lever, bukspottskörtel, tarm, gäle och mjälte från enskilda fiskar med skalpell och överföras till 8–10 % (v/v) buffrad formalinlösning. Förhållandet mellan fixativ och vävnad ska vara minst 20:1 för att säkerställa att vävnaderna bevaras på ett tillfredsställande sätt. För immunhistokemi (IHK) ska prover tas från njurens mellersta del och hjärta.

Vävnader för virologisk undersökning i cellkultur ska tas från alla fiskar som provtas. Delar av lever, njurens främre eller mellersta del, hjärta och mjälte ska avlägsnas från fisken med ett sterilt instrument och överföras till plaströr med 9 ml transportlösning. Vävnad från upp till 5 fiskar får samlas in i ett rör med transportlösning och ska utgöra ett samlingsprov. Vikten på vävnaden i ett prov ska vara 1,0 ± 0,5 g.

I.2 Transport av fiskprover

Hel fisk får transporteras till laboratoriet om de temperaturkrav som anges i tredje stycket kan uppfyllas under transporten. Hel fisk ska slås in i absorberande papper, transporteras i plastpåse och kylas enligt tredje stycket.

Även levande fisk får transporteras, men endast under överinseende av det nationella referenslaboratoriet för fisksjukdomar och med beaktande av de ytterligare desinficerings- och biosäkerhetfrågor som gäller vid transport av levande fisk.

Blodprover och rör med fiskvävnad för virologisk undersökning eller analys med RT-PCR ska placeras i isolerade behållare (t.ex. tjockväggiga polystyrenlådor) tillsammans med så mycket is eller frysblock så att proverna hålls kylda under transporten till laboratoriet. Frysning av proverna ska förhindras och när de tas emot ska det finnas is kvar i transportlådan eller också ska ett eller flera av frysblocken fortfarande vara helt eller delvis frysta. I undantagsfall får RT-PCR-prover och prover för virologisk undersökning snabbfrysas och transporteras till laboratoriet vid minst – 20 °C.

Vid RT-PCR-analys av vävnader som bevarats i RNAlater ska RNA-extraktion utföras inom följande tidsramar beroende på den temperatur som proverna förvarats vid:

Prover förvarade vid 37 °C: en dag.

Prover förvarade vid 25 °C: en vecka.

Prover förvarade vid 4 °C: en månad.

Prover förvarade vid – 20 °C: på obestämd tid.

Om fiskvävnader transporteras i fixativ för histologisk undersökning ska de transporteras i läckagesäkra rör i stöttåliga behållare. Frysning av proverna ska förhindras.

Den virologiska undersökningen i cellkultur ska påbörjas så snart som möjligt och senast 48 timmar efter provinsamlingen. I undantagsfall får den virologiska undersökningen påbörjas senast 72 timmar efter materialinsamlingen, förutsatt att det material som ska undersökas skyddas av ett transportmedium och att temperaturkraven under transport kan uppfyllas.

I.3 Insamling av kompletterande diagnostiskt material

När diagnostiklaboratoriet godkänt det får även andra fiskvävnader än de som avses i punkt I.2 samlas in och beredas för kompletterande undersökningar.

II. **Detaljerade diagnostiska metoder och förfaranden för övervakning av och för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av ISA**

När laboratorieanalys för att erhålla eller få behålla en viss hälsostatus med avseende på ILA/ISA i enlighet med del 3 avsnitt I i bilaga I eller för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av ILA/ISA i enlighet med artikel 57 b i direktiv 2006/88/EG genomförs med de diagnostiska metoderna i del 3 avsnitt II i bilaga I, ska de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i de följande punkterna II.1–II.5 tillämpas.

II.1 Undersökning av prover med RT-PCR

Den diagnostiska metod som ska användas för screening med avseende på ISA-virus ska vara RT-qPCR. Eftersom resultaten från RT-qPCR kan variera beroende på under vilka förhållanden den genomförs ska lämpliga positiva och negativa kontroller samt amplikon användas för att undvika eventuella oklarheter.

II.1.1 Total RNA-extraktion

Allt arbete med RNA ska utföras på is och handskar ska användas.

Totalt RNA ska extraheras med fenol/kloroform-metoden eller med spinnkolonner med affinitet för RNA enligt tillverkarens anvisningar.

Renat RNA ska återsuspenderas i destillerat, RNase-fritt vatten (dvs. vatten som behandlats med 0,1 % dietylpyrokarbonat).

Koncentrationen och renheten hos extraherat RNA ska uppskattas genom att mäta den optiska densiteten vid 260 och 280 nm. Ett annat tillvägagångssätt kan vara att inkludera interna kontroller som riktar in sig på det virusgenom som avses i punkt II.1.3.

II.1.2 RT-PCR för påvisande av ISA-virus

Flera RT-PCR-metoder får användas för amplifiering av ISA-virusets genom. En tvåstegs-RT-PCR får utföras där RT-steget och PCR-reaktionssteget genomförs i två separata rör. Emellertid får även en enstegs-RT-PCR utföras där de två reaktionerna genomförs i ett rör. Om möjligt ska enstegsmetoden användas eftersom risken för korskontaminering minimeras när innehållet inte behöver överföras och den metoden anses ha samma sensitivitet som tvåstegsmetoden.

De primrar och metoder som beskrivs i denna punkt, dvs. primerparet ILA1 eller ILA2 som riktar in sig på segmentet 8 och som har funnits lämpligt för påvisande av ISA-virus vid utbrott och i fisk med bärarstatus, ska användas. Eftersom den bakåtriktade ILA2-primern inte överensstämmer med isolat från Nordamerika ska ett alternativt primerpar användas i dessa fall.

Framåtriktad primer (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′.

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

Cykelförhållanden: 1 cykel vid 50 °C i 30 minuter, 1 cykel vid 94 °C i 15 minuter, 40 cykler vid 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder och 72 °C i 60 sekunder samt 1 cykel vid 72 °C i 5 minuter. Produktstorlek 155 baspar.

Resultaten från PCR kan variera beroende på under vilka förhållanden den genomförs, dvs. temperaturprotokollen kan behöva optimeras beroende på den termocykler som används. Falskt positiva resultat kan dessutom uppkomma på grund av felaktig hybridisering av primrar eller kontaminering i laboratoriet. Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Även andra varianter av RT-PCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

II.1.3 RT-qPCR för påvisande av ISA-virus

Användningen av RT-qPCR kan öka specificiteten och förmodligen även sensitiviteten. Metoden kan utföras snabbare eftersom det inte krävs någon gelelektrofores och risken för korskontaminering minskar eftersom det är möjligt att uppskatta mängden genomiska virus-RNA i provröret. En nackdel med RT-qPCR-metoden är att det ofta inte är möjligt att sekvensera amplifierade produkter. Om den amplifierade produktens specificitet är oklar ska dock en annan metod som är specifik för ISA-virus användas för att bekräfta resultatet.

Den metod som beskrivs i denna punkt (dvs. en metod som riktar in sig på segmentet 8) ska användas. Metoden ska omfatta isolat från Europeiska unionen, Europeiska frihandelssammanslutningen (Efta) och Nordamerika. Om möjligt ska enstegsmetoden användas eftersom den metoden minimerar risken för korskontaminering.

Framåtriktad primer: 5′-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3′.

Bakåtriktad primer: 5′-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3′.

Prob: 5′-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC – *MGBNFQ*-3′.

Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Cykelförhållanden: 1 cykel vid 50 °C i 30 minuter, 1 cykel vid 95 °C i 15 minuter samt 40 cykler vid 94 °C i 15 sekunder och 60 °C i 60 sekunder (justera vid behov). Även andra varianter av RT-PCR eller RT-qPCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

II.1.4 Sekvensering av amplifierade PCR-produkter

Framåtriktad primer (ILAs6-3F): 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA-3′.

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

Negativa reagenskontroller utan templat och positiva reagenskontroller ska ingå i varje PCR-körning. Cykelförhållanden (ettstegs-RT-PCR): 1 cykel vid 50 °C i 30 minuter, 1 cykel vid 94 °C i 15 minuter, 40 cykler vid 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder och 72 °C i 60 sekunder samt 1 cykel vid 72 °C i 5 minuter (justera vid behov). Även andra varianter av RT-PCR eller RT-qPCR med liknande dokumenterad effektivitet får användas.

Alternativt får följande metod för sekvensering av HPR i segment 6 användas:

Framåtriktad primer: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′.

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

Produktstorlek: 304 nukleotider om HPR0.

Även andra RT-PCR-metoder som visat liknande sensitivitet och specificitet som den metod som beskrivs i denna punkt får användas.

Den amplifierade RT-PCR-produktens renhet ska kontrolleras med gelelektrofores före sekvensering. Om endast ett rent fragment förekommer ska det renas direkt från PCR-reaktionen. Om flera amplifierade fragment förekommer ska det relevanta fragmentet renas med gelelektrofores. PCR-fragment ska renas från lösningar eller agarosgel med spinnkolonner med affinitet för PCR-fragment enligt tillverkarens anvisningar.

Sekvensering ska utföras med primrar för amplifiering vid externa specialiserade sekvenseringsföretag. Resultaten ska analyseras med sökverktyget BLAST och sekvenserna ska jämföras med andra kända sekvenser i NCBI:s databas över nukleotider (NCBI = *National Centre for Biotechnical Information* i Förenta staterna).

Sekvenseringen ska undanröja eventuella oklarheter om en amplifierad RT-PCR-produkts specificitet.

II.2 Isolering av ISA-virus i cellkulturer

II.2.1 Beredning av prover

Vävnaden får förvaras vid – 80 °C. Vävnaden får endast frysas och tinas upp en gång före undersökningen. För övervakning och kontroll ska undersökningen genomföras så snabbt som möjligt.

Varje prov (sammanslaget vävnadsprov i transportlösning) ska vara fullständigt homogeniserat med en validerad homogenisator och centrifugeras vid 2 000–4 000 × g vid 0–6 °C i 15 minuter; därefter ska supernatanten filtreras (0,45 µm) och inkuberas med en lika stor volym av ett på lämpligt sätt utspätt sammanslaget antiserum mot inhemska serotyper av IPN-virus. Antiserumets titer ska vara minst 1:2 000 i ett 50 % plackneutralisationstest. Blandningen ska inkuberas vid 15 °C i 1 timme. Detta utgör inokulatet.

Alla inokulat behandlas med antiserum mot IPN-virus (ett virus som i vissa delar av Europa finns i 50 % av alla fiskprover) för att förhindra att en cytopatisk effekt (CPE) orsakad av IPN-virus utvecklas i inokulerade cellkulturer. Sådan behandling får utföras för att göra de virologiska undersökningarna snabbare och ge färre fall där förekomsten av CPE skulle uppfattas som en potentiell indikation på ISA-virus. När prover kommer från produktionsenheter som anses fria från IPN behöver inokulat inte behandlas med antiserum mot IPN-virus.

II.2.2 Inokulering i cellkulturer

Celler från atlantlaxens njure (ASK-celler) ska användas för primär isolering av ISA-virus. Även andra cellinjer med dokumenterad effektivitet och sensitivitet vad gäller isolering av ISA-virus får användas, med beaktande av stamvariationer och olika stammars förmåga att replikera sig i olika cellinjer. ASK-celler verkar stödja isolering och odling av de hittills kända virusisolaten, så länge som celler med ett lågt passagenummer används. En tydligare cytopatisk effekt (CPE) kan uppträda i ASK-celler än i andra mottagliga cellinjer såsom SHK-1 (Salmon head kidney-1).

ASK-celler (passage 65 eller lägre) ska odlas i L-15-medium med 10 % fetalt bovinserum, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin och 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptoetanol i mikrotiterplattor. Organsuspension som behandlats med antiserum ska inokuleras i unga, aktivt växande cellkulturer så att den slutliga spädningen av vävnadsmaterial i odlingsmedium blir 1:1 000. För varje organ ska en suspension av 40 µl inokulat tillsättas en brunn med 2 ml odlingsmedium. För att minimera risken för korskontaminering ska separata 12- eller 24-hålsplattor används för prover från olika platser på fiskodlingsanläggningen.

En platta ska användas som negativ kontroll och lämnas oinokulerad. En separat platta ska användas som positiv kontroll och inokuleras med ett referensisolat av ISA-virus enligt följande. Den första brunnen ska inokuleras med 100 µl av en stamberedning av ISA-virus (minst titer 10^7 $TCID_{50}$/ml (*50 % Tissue Culture Infective Dose*) och blandas. En volym av detta material ska överföras från den första brunnen till den andra för en utspädning på 1:10 och blandas. Detta ska upprepas över hela plattan för att göra sex tiofaldiga spädningar. Stamberedningar av ISA-virus kan förvaras vid – 80 °C i minst två år, men om de tinas upp måste de användas inom tre dagar. Korskontaminering av testplattorna med positivt kontrollmaterial ska förhindras. För att förhindra detta ska positiva kontroller beredas och hanteras separat från testplattorna. Om ASK-cellerna genomgår ett sensitivitetstest mot ISA-virusisolat var sjätte månad kan detta ersätta användningen av en positiv kontroll vid varje inokulering.

Prover ska inkuberas vid 15 ± 2 °C i upp till 15 dagar. Cellkulturerna ska undersökas med mikroskop avseende CPE dag 5–7 och 12–14 efter inokulering. Om ett sammanslaget prov uppvisar CPE ska förfaranden för identifiering av virus enligt punkt II.2.4 påbörjas omedelbart. Om ingen CPE iakttas senast dag 14 ska ett indirekt fluorescerande antikroppstest (IFAT), ett hemadsorptionstest eller en RT-PCR utföras.

II.2.3 Subkultivering

Subkultivering ska göras dag 13–15. Cellkulturernas supernatant ska tillsättas brunnar med färska aktivt växande celler i lämplig spädning (1:10) i mikrotiterplattor och inkuberas vid 14 ± 2 °C i upp till 18 dagar. Cellkulturerna ska undersökas med mikroskop avseende CPE dag 5–7 och 14–18 efter inokulering. Om ett sammanslaget prov uppvisar CPE ska förfaranden för identifiering av virus enligt punkt II.2.4 påbörjas omedelbart. Om ingen CPE iakttas senast dag 14–18 ska ett hemadsorptionstest eller en RT-PCR utföras.

Om cytotoxicitet förekommer under inkuberingens 7 första dagar ska subkultivering göras i detta skede och cellerna ska inkuberas i 14–18 dagar och därefter återigen subkultiveras med ytterligare 14–18 dagars inkubering. Om cytotoxicitet förekommer efter 7 dagar ska cellerna subkultiveras en gång och inkuberas så att de inkuberas i totalt 28–36 dagar från primärinokuleringen.

Om bakteriell kontaminering förekommer i primärkulturen ska testet genomföras på nytt med det vävnadshomogenat som förvarats vid – 80 °C. Före inokulering ska vävnadshomogenatet centrifugeras vid 4 000 × g vid 0–6 °C i 15–30 minuter och supernatanten ska filtreras genom 0,22 µm. Om bakteriell kontaminering förekommer vid subkultiveringen ska supernatanten filtreras genom 0,22 µm, inokuleras i färska celler och inkuberas i ytterligare 14–18 dagar.

II.2.4 Tester för identifiering av virus

Om tecken på CPE iakttas i något skede eller om ett hemadsorptionstest är positivt ska identifiering av virus genomföras. Den rekommenderade metoden för identifiering av ISA-virus ska vara RT-PCR enligt punkt II.1 eller immunofluorescens (IF) enligt punkt II.2.6. Om det bedöms att andra virus kan förekomma ska kompletterande tester för identifiering av virus genomföras. Om dessa tester inte leder till en säker identifiering av viruset inom en vecka ska supernatanten skickas för omedelbar identifiering till

a) OIE:s (Världsorganisationen för djurhälsa) referenslaboratorium för ILA/ISA, eller

b) ett nationellt referenslaboratorium eller EU:s referenslaboratorium för fisksjukdomar som avses i bilaga VI till direktiv 2006/88/EG.

II.2.5 Hemadsorptionstest

Eftersom replikation av ISA-virus i cellkulturer inte alltid resulterar i CPE ska varje brunn genomgå en RT-PCR, ett hemadsorptionstest enligt denna punkt eller ett IF-test enligt punkt II.2.6.

Cellodlingsmediet ska avlägsnas från varje brunn, även från brunnarna för de positiva och negativa kontrollerna, och placeras i märkta sterila rör. 500 µl av en 0,2 % (v/v) suspension av tvättade röda blodkroppar från kanin eller häst eller en 0,05 % (v/v) suspension av tvättade röda blodkroppar från regnbåge eller atlantlax ska tillsättas varje brunn och inkuberas i rumstemperatur i 45 minuter. De röda blodkropparna ska avlägsnas och varje brunn ska tvättas två gånger med L-15-medium. Varje brunn ska undersökas med mikroskop.

Förekomsten av kluster med röda blodkroppar som är fästa vid ASK-cellernas yta visar på trolig infektion orsakad av ortomyxovirus. Om ett hemadsorptionstest är positivt ska ett test för identifiering av virus enligt punkt II.2.4 genomföras omedelbart.

II.2.6 Immunofluorescens (IF)

ASK-celler (passage 65 eller lägre) ska odlas i L-15-medium med 10 % fetalt bovinserum, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin och 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptoetanol i mikrotiterplattor och användas vid konfluens över 50 %. Även andra cellinjer eller odlingsmedier med dokumenterad effektivitet får användas. 225 µl supernatant från odling som är smittad med det förmodade viruset ska tillsättas två brunnar, blandas och därefter ska 225 µl överföras till två ytterligare brunnar, dvs. en spädning på 1:5. Två ytterligare brunnar ska används som kontroller och lämnas oinokulerade. Prover från varje plats på fiskodlingsanläggningen ska hanteras på separata plattor, liksom viruskontrollen. Som viruskontroll ska ett referensisolat av ISA-virus användas.

Plattorna ska inkuberas vid 14 ± 2 °C och undersökas med mikroskop i upp till 7 dagar. När en tidig CPE iakttas, eller om ingen CPE iakttas inom 7 dagar, ska plattorna fixeras. Brunnarna ska tvättas med PBS och fixeras genom inkubering med 80 % aceton vid rumstemperatur i 20 minuter. Plattorna ska lufttorkas och färgas omedelbart eller förvaras vid 0–6 °C i högst 24 timmar före färgning.

Replikatbrunnar ska färgas med en blandning av de monoklonala antikropparna (MAb) 3H6F8 och 1OC9F5 mot ISA-virus, eller med andra MAb med dokumenterad effektivitet och specificitet, utspädda i PBS och inkuberas vid 37 ± 4 °C i 30 minuter. MAb ska avlägsnas och plattorna ska tvättas tre gånger med PBS med 0,05 % Tween 20. FITC-konjugerade antikroppar mot mus IgG utspädda i PBS ska tillsättas varje brunn och inkuberas vid 37 ± 4 °C i 30 minuter. Varje laboratorium ska optimera spädningen av olika batcher av MAb och FITC-konjugat. Antikropparna ska avlägsnas och plattorna ska tvättas tre gånger med PBS med 0,05 % Tween 20.

Brunnarna ska omedelbart undersökas med ett inverterat fluorescensmikroskop med lämpligt filter för excitation av FITC. Ett test ska anses positivt om fluorescerande celler kan iakttas. För att ett test ska vara giltigt ska de positiva kontrollerna ge positiva resultat och de negativa kontrollerna ge negativa resultat.

II.3 Undersökning av andra vävnader

Den metod som avses i punkt II.2.6 får användas på andra fiskvävnader, t.ex. lever, mjälte och hjärta, förutsatt att en rimlig mängd endotelceller, leukocyter eller lymfocyter kan placeras på objektglaset. Färgningsförfarandet ska vara detsamma för varje vävnad, även om det för vissa vävnader kan vara lämpligare att utelämna färgningen med propidiumjodid och i stället använda faskontrastbelysning för att identifiera de celltyper som förekommer i imprintet.

II.4 Histologi

Paraffininbäddade preparat ska snittas i 5 µm tunna skivor och färgas med hematoxylin och eosin.

De histologiska förändringarna i kliniskt sjuk atlantlax varierar men de kan omfatta följande:

a) Ansamling av erytrocyter i primärlamellens centralvenösa sinus och sekundärlamellernas kapillärer i gälarna, där erytrocyttromber också kan bildas.

b) Multifokala till sammanflytande petekier eller nekros av hepatocyter, eller båda, en bit från de större kärlen i levern. Multifokal ackumulering av erytrocyter i dilaterade sinusoider i levern.

c) Ackumulering av erytrocyter i blodkärlen i tarmens lamina propria och så småningom blödningar i lamina propria.

d) Mjältens stroma utspänt på grund av ackumulering av erytrocyter.

e) Lindrig multifokal till utbredd interstitiell blödning med tubulär nekros i de blödande områden samt ackumulering av erytrocyter i glomeruli i njuren.

f) Erytrofagocytos i mjälten och sekundära blödningar i lever och njure.

II.5 Immunhistokemi (IHK)

Polyklonala antikroppar mot ISA-virusets nukleoprotein ska användas på paraffinpreparat av formalinfixerad vävnad. De organ som ska undersökas ska vara njurens mellersta del, hjärta (övergångsområden inklusive alla tre kamrarna och klaffar). Misstänkta fall baserade på patologiska tecken ska bekräftas med en positiv IHK. Histologiska preparat ska beredas i enlighet med standardmetoder.

1. Beredning av vävnadspreparat

Vävnaderna ska fixeras i neutral fosfatbuffrad 10 % formalinlösning i minst 1 dag och dehydreras med etanol i stigande koncentration, därefter ska etanolen avlägsnas i xylen och vävnaderna ska inbäddas i paraffin enligt standardprotokoll. Cirka 5 µm tunna preparat (för IHK placerade på poly-L-lysinbelagda objektglas) ska upphettas vid 56–58 °C (högst 60 °C) i 20 minuter och paraffinet ska avlägsnas med xylen, därefter rehydreras preparaten med etanol i sjunkande koncentration och färgas med hematoxylin och eosin för patomorfologi och IHK i enlighet med punkt 2.

2. Färgningsförfarande för IHK

Alla inkuberingar ska utföras vid rumstemperatur på vippbord, såvida inte annat föreskrivs i detta beslut.

a) Antigen retrieval ska utföras genom att preparaten kokas i 0,1 M citratbuffert (pH 6,0) i 2 × 6 minuter, följt av blockering med 5 % fettfri torrmjölk och 2 % getserum i 50 mM TBS (*Tris Buffered Saline*: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6) i 20 minuter.

b) Preparaten ska sedan inkuberas över natten med primära antikroppar (monoklonala kanin-antikroppar mot ISA-virusets nukleoprotein) utspädda i TBS med 1 % fettfri torrmjölk, följt av tre tvättar med TBS med 0,1 % Tween 20.

c) För påvisande av bundna antikroppar ska preparaten inkuberas med alkaliska fosfatas-konjugerade antikroppar mot kanin IgG i 60 minuter. Efter en slutlig tvätt ska Fast Red (1 mg/ml) och naftol-AS-MX fosfat (0,2 mg/ml) med 1 mM levamisol i 0,1 M TBS (pH 8,2) tillsättas för infärgning i 20 minuter. Preparaten ska därefter tvättas i kranvatten före motfärgning med Harris hematoxylin och monteras med vattenbaserat monteringsmedel. Vävnadspreparat som är positiva och negativa för ISA-virus ska ingå som kontroller i varje provomgång.

3. Tolkning av resultatet av IHK

Resultatet av IHK-testet ska tolkas enligt de följande leden a och b:

a) Kontrollpreparat ska anses vara positiva när det konstateras att i kontrollpreparaten har blodkärlens endotelceller i endokardium en klart synlig röd/rödaktig cytoplasmatisk och intranukleär infärgning. Ett provpreparat ska endast anses som positivt om endotelcellerna har en sådan tydlig intranukleär röd infärgning.

b) Kontrollpreparaten ska anses vara negativa om de inte har någon betydande infärgning.

Eftersom den intranukleära placeringen av ortomyxovirusets nukleoprotein är specifik för ett visst skede av virusreplikationen och den samtidiga cytoplasmatiska infärgningen oftast är dominerande, ska cytoplasmatisk infärgning och andra infärgningsmönster som inte är intranukleära anses vara icke-specifika eller ofullständiga.

De starkaste positiva infärgningarna observeras oftast i endotelceller från hjärta och njure. Infärgningen av endotelceller med mycket omfattande hemorragiska lesioner kan vara liten eller obefintlig, eventuellt på grund av att smittade endotelceller har lyserat.

DEL 4

DETALJERADE DIAGNOSTISKA METODER OCH FÖRFARANDEN FÖR ÖVERVAKNING OCH BEKRÄFTELSE AV FÖREKOMST AV INFEKTION ORSAKAD AV *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Detaljerade diagnostiska metoder och förfaranden för diagnos av infektion orsakad av *Marteilia refringens***

När provtagning och laboratorieanalys för att erhålla eller få behålla en hälsostatus med avseende på infektion orsakad av *Marteilia refringens* i enlighet med del 4 avsnitt I i bilaga I eller för att bekräfta eller utesluta förekomst av den förtecknade sjukdomen i enlighet med artikel 57 b i direktiv 2006/88/EG med de diagnostiska metoderna i del 4 avsnitt II i bilaga I, ska de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i punkterna I.1, I.2 och I.3 tillämpas.

I.1 Provtagningsförfarande

Provtagning av enskilda blötdjur med öppna skal eller nydöda blötdjur ska prioriteras för att förbättra chanserna att hitta smittade djur.

Provtagna ostron eller musslor ska förvaras vid 4 °C eller på kyld is i högst 24 timmar om proverna innehåller blötdjur med öppna skal och i högst 72 timmar om de inte innehåller sådana; de ska förvaras i en plastpåse med en etikett med uppgifter om ostronens eller musslornas typ och ursprung. Blötdjur med öppna skal eller nydöda blötdjur ska förvaras separat från andra blötdjur.

Ett 3–5 mm tunt vävnadspreparat, inklusive gälar och hjärtvävnad, ska användas för diagnos av *Marteilia refringens* genom histologi. En bit av digestionskörteln ska användas för vissa tester, bl.a. imprint och PCR.

I.2 Mikroskopiska metoder

I.2.1 Cytologi (imprintcytologi)

Efter det att digestionskörtelvävnader torkats med absorberande papper ska flera imprint göras på ett objektglas. Objektglasen ska lufttorkas, fixeras i metanol eller absolut etanol och färgas med ett kommersiellt tillgängligt kit för infärgning av blod (t.ex. Diff-Quick® eller Hemacolor®) enligt tillverkarens anvisningar. Efter sköljning med kranvatten och torkning ska objektglasen monteras med täckglas och med ett lämpligt syntetiskt monteringsmedel. Objektglasen ska först undersökas vid 200 × förstoring och därefter med immersionsolja vid 1 000 × förstoring.

Ett positivt resultat ska vara observation av celler i storlekar upp till 30–40 µm. Cytoplasman färgas basofilt, medan cellkärnan färgas eosinofilt. Ljusa halor runt stora, starkt färgade (refraktila) granula och i större celler kan primär-, sekundär- och tertiärstadier observeras.

Metoden är inte artspecifik för parasiter.

I.2.2 Histologi

Vävnadspreparat som omfattar gälar, digestionskörtel, mantel och gonad ska fixeras i minst 24 timmar i Davidsons fixeringsmedel, följt av normal bearbetning för histologi med paraffininbäddning och färgning, t.ex. med hematoxylin och eosin. Undersökningar ska göras i allt större förstoring upp till 1 000 ×.

Ett positivt resultat ska vara observation av celler i storlekarna 4–40 µm. De tidiga stadierna består av multinukleära celler som är sfäriska till avlånga. Dessa återfinns främst i matstrupens och magsäckens epitel och ibland i labiala palperna. Sporbildning omfattar celldelning inom celler och äger rum i digestionskörtels tubuli och kanaler. Refraktila granula syns vid sporbildningen men inte i de tidiga stadierna. I de sena infektionsstadierna observeras fria sporangier i lumen i mag-tarmkanalen. Cytoplasman färgas basofilt, medan cellkärnan färgas eosinofilt. Granula kan variera från intensivt orange till intensivt röd.

Metoden är inte artspecifik för parasiter.

I.3 Molekylära metoder

I.3.1 DNA-extraktion

DNA ska extraheras i enlighet med standardförfaranden.

Kommersiellt tillgängliga DNA-extraktionskit som ger högkvalitativt DNA som lämpar sig för användning med de protokoll för PCR som anges i punkt I.3.2 får användas.

I.3.2 PCR

Flera PCR-protokoll har utarbetats och publicerats.

PCR-primrar som riktar in sig på ITS1-regionen (*internal transcribed spacer*) ska användas eftersom de kan amplifiera endast *Marteilia refringens*.

PCR ska utföras i volymen 50 µl. PCR-blandningar ska innehålla buffert (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 vid 25 °C] och 1 % Triton® X-100), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP-mix, 1 µM framåtriktade och bakåtriktade primrar, 0,02 enheter/µl Taq DNA-polymeras och 10–100 ng extraherat DNA. Efter att DNA har denaturerats vid 94 °C i 5 minuter ska 30 cykler köras enligt följande: denaturering vid 94 °C i 1 minut, hybridisering vid 55 °C i 1 minut och elongering vid 72 °C i 1 minut per kilobaspar. En slutlig elongering vid 72 °C i 10 minuter ska utföras. För påvisande av *Marteilia refringens* ska PCR genomföras med primrar som riktar in sig på ITS1-regionen (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ och 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Positiva kontroller ska bestå av genomiskt DNA från ett ytterst smittat värd-DNA eller plasmid-DNA, inklusive målregionen.

Negativa kontroller ska bestå av genomiskt DNA från icke-smittade värdar och PCR-reagens utan mål-DNA.

Ett positivt resultat ska vara positiv PCR-amplifiering vid den förväntade storleken (412 baspar) och alla negativa kontroller ska vara negativa och alla positiva kontroller positiva.

I.3.3 In situ-hybridisering (ISH)

Flera ISH-protokoll har utarbetats och publicerats.

Den prob som riktar in sig på SSU rRNA ska användas eftersom den har validerats mot histologi.

Vävnadspreparat som omfattar gälar och digestionskörtel ska fixeras i minst 24 timmar i Davidsons fixeringsmedel, följt av normal bearbetning för histologi med paraffininbäddning. Preparatet ska snittas i 5 µm tunna skivor som placeras på aminoalkylsilanbelagda objektglas som sedan ska värmas vid 40 °C över natten. Paraffinet ska avlägsnas ur preparaten genom nedsänkning i xylen i 10 minuter. Detta steg ska upprepas en gång och sedan ska lösningsmedlet avlägsnas genom nedsänkning i två successiva bad med absolut etanol på 10 minuter vardera. Preparaten ska därefter dehydreras genom nedsänkning i etanol i stigande koncentration. Preparaten ska behandlas med proteinas K (100 µg/ml) i TE-buffert (50 mM Tris, 10 mM EDTA) vid 37 °C i 30 minuter. Objektglasen ska dehydreras genom nedsänkning i etanol i stigande koncentration och sedan lufttorkas. Preparaten ska inkuberas med 100 µl hybridiseringsbuffert (4 × SSC [Standard Saline Citrate], 50 % formamid, 1 × Denhardts lösning, 250 µg/ml jäst tRNA, 10 % dextransulfat) innehållande 10 ng (1 µl av de PCR-reaktanter som bereds enligt punkt I.3.2 med primrarna CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG och TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) av den digoxigeninmärkta proben. Preparaten ska täckas med *in situ*-täckglas i plast och placeras på ett värmeblock vid 95 °C i 5 minuter. Objektglasen ska därefter kylas på is i 1 minut innan de hybridiseras vid 42 °C över natten i en fuktkammare. Preparaten ska tvättas 2 × 5 minuter med 2 × SSC vid rumstemperatur och 1 × 10 minuter med 0,4 × SSC vid 42 °C. Påvisandet ska utföras enligt tillverkarens anvisningar. Objektglasen ska sedan sköljas med sterilt destillerat vatten (dH_2O). Preparaten ska motfärgas med Bismarck Brown Yellow, sköljas i dH_2O och monteras med täckglas och med ett vattenbaserat monteringsmedel.

Positiva och negativa kontroller ska vara preparat från kända smittade respektive icke-smittade värdar.

Ett positivt resultat ska visas genom lila-svart märkning av *Marteilia refringens*-celler i kända målvävnader och alla negativa kontroller ska vara negativa och alla positiva kontroller positiva.

I.3.4 Sekvensering

Sekvensering ska genomföras som ett av de sista stegen för bekräftande diagnos. Målregioner är SSU rDNA och ITS1.

II. **Detaljerade diagnostiska metoder och förfaranden för övervakning och bekräftelse av förekomst av infektion orsakad av *Marteilia refringens***

För övervakningsprogram och för att bekräfta förekomst av infektion orsakad av *Marteilia refringens* eller för att utesluta misstanke om förekomst av den förtecknade sjukdomen i enlighet med kraven i del 4 avsnitt II i bilaga I, ska de diagnostiska metoder och motsvarande förfaranden som används följa riktlinjerna i tabell 4.1.

Tabell 4.1

Riktlinjer för användning av diagnostiska metoder för övervakningsprogram och för att bekräfta eller utesluta förekomst av infektion orsakad av *Marteilia refringens*

Metod	Riktad övervakning	Presumtiv diagnos	Bekräftande diagnos
Imprint av digestionskörtel	X	X	X, eller
Histopatologi	X		X, eller
In situ-hybridisering			X, och
PCR	X	X	X, och
Sekvensering			X

DEL 5

DETALJERADE DIAGNOSTISKA METODER OCH FÖRFARANDEN FÖR ÖVERVAKNING OCH BEKRÄFTELSE AV FÖREKOMST AV INFEKTION ORSAKAD AV *BONAMIA OSTREAE*

I. **Förfaranden för diagnos av infektion orsakad av *Bonamia ostreae***

När provtagning och laboratorieanalys för att erhålla eller få behålla en viss hälsostatus med avseende på *Bonamia ostreae* i enlighet med del 5 avsnitt I i bilaga I eller för att bekräfta eller utesluta förekomst av den förtecknade sjukdomen i enlighet med artikel 57 b i direktiv 2006/88/EG med de diagnostiska metoderna i del 5 avsnitt II i bilaga I, ska de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i de följande punkterna I.1, I.2 och I.3 tillämpas.

I.1 Provbearbetning

Provtagning av enskilda blötdjur med öppna skal eller nydöda blötdjur ska prioriteras för att förbättra chanserna att hitta smittade djur.

Provtagna ostron ska förvaras vid 4 °C eller på kyld is i högst 24 timmar om proverna innehåller blötdjur med öppna skal och i högst 72 timmar om de inte innehåller sådana; de ska förvaras i en plastpåse med en etikett med uppgifter om ostronens typ och ursprung. Blötdjur med öppna skal eller nydöda blötdjur ska förvaras separat från andra blötdjur.

Ett 3–5 mm tunt vävnadspreparat, inklusive gälar och hjärtvävnad, ska användas för diagnostik av *Bonamia ostreae* genom histologi. En bit av digestionskörteln ska användas för vissa tester, bl.a. imprint och PCR.

I.2 Mikroskopiska metoder

I.2.1 Cytologi (imprintcytologi)

Efter det att gälarna eller hjärtvävnaden torkats med absorberande papper ska flera imprint göras på ett objektglas. Objektglasen ska lufttorkas, fixeras i metanol eller absolut etanol och färgas med ett kommersiellt tillgängligt kit för infärgning av blod (dvs. Diff-Quick® eller Hemacolor®) enligt tillverkarens anvisningar. Efter sköljning med kranvatten och torkning ska objektglasen monteras med täckglas och med ett lämpligt syntetiskt monteringsmedel. Objektglasen ska först undersökas vid 200 × förstoring och därefter med immersionsolja vid 1 000 × förstoring.

Ett positivt resultat ska vara förekomst av små sfäriska eller äggformade organismer (diameter 2–5 μm) i hemocyter. Parasiten kan dock även förekomma extracellulärt. Dessa organismer har en basofil cytoplasma och en eosinofil cellkärna (färgerna kan variera beroende på vilken färg som används) och eftersom de sprids på objektglas kan de verka bredare på imprint än vid histologisk undersökning. Multinukleära celler kan observeras. Metoden är inte artspecifik för parasiter.

I.2.2 Histologi

Vävnadspreparat som omfattar gälar, digestionskörtel, mantel och gonad ska fixeras i minst 24 timmar i Davidsons fixeringsmedel, följt av normal bearbetning för histologi med paraffininbäddning och färgning, t.ex. med hematoxylin och eosin. Undersökningar ska göras i allt större förstoring upp till 1 000 ×.

Ett positivt resultat ska vara förekomst av parasiter, som mycket små celler med en diameter på 2–5 μm, i hemocyterna eller fria i bindväv eller sinus i gäle, tarm och mantelepitel, vilket ofta är förbunden med en intensiv inflammatorisk reaktion. För att undvika eventuella oklarheter ska parasiten observeras inne i hemocyten för en positiv diagnos. Metoden är inte artspecifik för parasiter.

I.3 Molekylära metoder

I.3.1 DNA-extraktion

DNA ska extraheras i enlighet med standardförfaranden.

Kommersiellt tillgängliga DNA-extraktionskit som ger högkvalitativt DNA som lämpar sig för användning med de protokoll för PCR som anges nedan får användas.

I.3.2 PCR

Flera PCR-protokoll har utarbetats och publicerats.

Två PCR-protokoll som riktar in sig på SSU rDNA får användas:

a) Det första protokollet är en konventionell PCR som amplifierar flera medlemmar av Haplosporidia, inklusive *Bonamia* spp. Primrarna som betecknas Bo och Boas är 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ respektive 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′ och amplifierar en produkt på 300 baspar. PCR-blandningar innehåller buffert (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 vid 25 °C] och 1 % Triton® X-100), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP-mix, 1 μM framåtriktade och bakåtriktade primrar, 0,02 enheter/μl Taq DNA-polymeras och 0,2 ng/μl av DNA-templatet och har en total volym på 50 μl. Proverna ska denatureras i en termocykler vid 94 °C i 5 minuter, följt av 35 cykler (94 °C i 1 minut, 55 °C i 1 minut och 72 °C i 1 minut) och en slutlig elongering vid 72 °C i 10 minuter.

   Positiva kontroller ska bestå av genomiskt DNA från ett ytterst smittat värd-DNA eller plasmid-DNA, inklusive målregionen.

   Negativa kontroller ska bestå av genomiskt DNA från icke-smittade värdar och PCR-reagens utan mål-DNA.

   Ett positivt resultat ska vara positiv PCR-amplifiering vid den förväntade storleken (300 baspar) och alla negativa kontroller ska vara negativa och alla positiva kontroller positiva.

b) Det andra PCR-protokollet är en SYBR® Green realtids-PCR-metod. Protokollet gör det möjligt att specifikt påvisa *B. ostreae* och kan kombineras med en SYBR® Green realtids-PCR-metod som möjliggör att specifikt påvisa *B. exitiosa* (Ramilo et al., 2013).

Primrarna BOSTRE-F (5′-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) och BOSTRE-R (5′-TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) amplifierar en produkt på 208 baspar. PCR-blandningar innehåller SYBR® Green Master Mix (1 ×), 0,3 µM framåtriktade och bakåtriktade primrar och 200 ng extraherat DNA. Proverna ska denatureras i ett PCR-instrument med realtidsdetektion vid 95 °C i 10 minuter, följt av 35 cykler (95 °C i 30 sekunder, 55 °C i 45 sekunder och 72 °C i 1 minut). Smältkurvan ska analyseras med temperaturökningar på 0,5 °C/s från 55 °C till 95 °C och fluorescens ska registreras vid varje temperaturändring.

Positiva kontroller ska bestå av genomiskt DNA från ett ytterst smittat värd-DNA eller plasmid-DNA, inklusive målregionen.

Negativa kontroller ska bestå av genomiskt DNA från icke-smittade värdar och PCR-reagens utan mål-DNA.

Ett positivt resultat ska vara positiv PCR-amplifiering med en unik smälttemperaturtopp (78,25 ± 0,25 °C vid de förhållanden som publicerats av Ramilo et al., 2013) och alla negativa kontroller ska vara negativa och alla positiva kontroller positiva.

I.3.3 *In situ*-hybridisering (ISH)

Flera ISH-protokoll har utarbetats och publicerats.

En prob som riktar in sig på SSU rDNA ska användas, även om det har visats att den korsreagerar med vissa andra medlemmar i familjen Haplosporidia.

Vävnadspreparat som omfattar gälar och digestionskörtel ska fixeras i minst 24 timmar i Davidsons fixeringsmedel, följt av normal bearbetning för histologi med paraffininbäddning. Preparatet ska snittas i 5 µm tunna skivor som placeras på aminoalkylsilanbelagda objektglas som sedan ska värmas vid 40 °C över natten. Paraffinet ska avlägsnas ur preparaten genom nedsänkning i xylen i 10 minuter. Detta steg ska upprepas en gång och sedan ska lösningsmedlet avlägsnas genom nedsänkning i två successiva bad med absolut etanol på 10 minuter vardera. Preparaten ska därefter dehydreras genom nedsänkning i etanol i stigande koncentration. Preparaten ska behandlas med proteinas K (100 µg/ml) i TE-buffert (50 mM Tris, 10 mM EDTA) vid 37 °C i 30 minuter. Objektglasen ska dehydreras genom nedsänkning i etanol i stigande koncentration och sedan lufttorkas. Preparaten ska inkuberas med 100 µl hybridiseringsbuffert (4 × SSC [Standard Saline Citrate], 50 % formamid, 1 × Denhardts lösning, 250 µg/ml jäst tRNA, 10 % dextransulfat) innehållande 20 ng (2 µl av den PCR-reaktion som bereds enligt punkt I.3.2 med primrarna Bo och Boas) av den digoxigeninmärkta proben. Preparaten ska täckas med *in situ*-täckglas i plast och placeras på ett värmeblock vid 95 °C i 5 minuter. Objektglasen ska därefter kylas på is i 1 minut innan de hybridiseras vid 42 °C över natten i en fuktkammare. Preparaten ska tvättas 2 × 5 minuter med 2 × SSC vid rumstemperatur och 1 × 10 minuter med 0,4 × SSC vid 42 °C. Påvisandet ska utföras enligt tillverkarens anvisningar. Objektglasen ska sedan sköljas med sterilt destillerat vatten (dH_2O). Preparaten ska motfärgas med Bismarck Brown Yellow, sköljas i dH_2O och monteras med täckglas och med ett vattenbaserat monteringsmedel.

Positiva och negativa kontroller ska vara preparat från kända smittade respektive icke-smittade värdar.

Ett positivt resultat ska motsvara de märkta parasiterna inne i hemocyterna och alla negativa kontroller ska vara negativa och alla positiva kontroller positiva.

I.3.4 Sekvensering

Sekvensering ska genomföras som ett av de sista stegen för bekräftande diagnos. Målregioner ska vara SSU rDNA och ITS1.

II. **Förfaranden för övervakning och bekräftelse av förekomst av infektion orsakad av *Bonamia ostreae***

För övervakning och för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av infektion orsakad av *Bonamia ostreae* i enlighet med kraven i i del 5 avsnitt II i bilaga I, ska de diagnostiska metoder och motsvarande förfaranden som används följa riktlinjerna i tabell 5.1.

Tabell 5.1.

Riktlinjer för användning av diagnostiska metoder för övervakningsprogram och för att utesluta eller bekräfta förekomst av infektion orsakad av *Bonamia ostreae*

Metod	Riktad övervakning	Presumtiv diagnos	Bekräftande diagnos
Imprint av hjärta eller gäl	X	X	X, eller
Histopatologi	X		X, eller
In situ-hybridisering			X, och
PCR	X	X	X, och
Sekvensering			X

DEL 6

DETALJERADE DIAGNOSTISKA METODER OCH FÖRFARANDEN FÖR ÖVERVAKNING OCH BEKRÄFTELSE AV FÖREKOMST AV VITPRICKIG KRÄFTDJURSSJUKA (WSD)

1. **Diagnostiska förfaranden för påvisande av White spot syndrome virus (WSSV)**

När provtagning och laboratorieanalys genomförs för de övervaknings- och utrotningsprogram som anges i del 6 avsnitt I i bilaga I och för att utesluta misstanke om eller bekräfta förekomst av infektion orsakad av WSSV i enlighet med artikel 57 b i direktiv 2006/88/EG med de diagnostiska metoderna i del 6 avsnitt II i bilaga I, ska de detaljerade diagnostiska metoderna och förfarandena i punkterna 2–7 tillämpas.

De metoder och förfaranden som beskrivs i denna del av bilaga II har anpassats efter det ISO 17025-ackrediterade test som tillämpas vid EU:s referenslaboratorium för kräftdjurssjukdomar. Även alternativa tillvägagångssätt, metoder med likvärdiga förhållanden eller kit framställda av olika tillverkare, som ger likvärdig sensitivitet och specificitet som de metoder som beskrivs i denna del får tillämpas. PCR-amplifierade produkter ska under alla omständigheter sekvenseras för att bekräfta WSSV.

2. **Provbearbetning**

Kräftdjursvävnad (bakkroppsben och gälar) innehållande WSSV får förvaras i etanol eller RNAlater, eller snabbfrysas vid – 80 °C. De steg som krävs för att identifiera WSSV från vävnadsprover är följande: homogenisering av vävnad, DNA-extraktion, specifik amplifiering av DNA från WSSV med PCR, visualisering av den amplifierade produkten på en gel, DNA-rening och sekvensering för att bekräfta patogenens identitet.

3. **Homogenisering av vävnad**

Sönderdelningen av vävnad och beredningen av ett homogenat i en lämplig buffert ska utföras med FastPrep homogenisator och Lysing Matrix A-rör (MP Biomedicals). Vävnaden ska vägas, placeras i Lysing Matrix A-rör, spädas 1:10 (w/v) eller enligt tillverkarens anvisningar med en lämplig buffert (G2 och 10 µl proteinas K för DNA Tissue kit (Qiagen)) och homogeniseras med FastPrep-24 homogenisator i 2 minuter. Homogeniserade prover ska inkuberas vid 56 °C i minst 4 timmar eller över natten. Proverna ska vortexas, centrifugeras vid 9 000 rpm i 2 minuter och 50 µl supernatant eller en volym som motsvarar 5 mg vävnad (dvs. den vävnadsvikt som är optimal för extraktionskit) ska tillsättas ett provrör för DNA-extraktion och fyllas upp till 200 µl med G2 buffert.

4. **DNA-extraktion**

Totalt DNA ska extraheras med ett DNA-extraktionskit för vävnader och EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) enligt tillverkarens anvisningar. En extraktionskontroll (DNA från kalvthymus) och en negativ kontroll (G2 buffert) ska köras med varje batch prover. DNA ska elueras i volymen 50 µl. För att säkerställa att extraktionen har lyckats ska DNA-koncentrationen i alla prover och kontroller bestämmas med en NanoDrop-maskin. Extraherat DNA ska frysas vid – 20 °C om det inte ska användas omedelbart.

5. **PCR för påvisande av WSSV**

Det protokoll som ska användas för påvisande av WSSV och som beskrivs i följande stycken använder nästad PCR och amplifierar två av 18s rRNA-genens amplikon på 1 447 baspar och 848 baspar i den första respektive andra PCR-omgången.

Den första PCR-reaktionen ska utföras i volymen 50 µl som innehåller en slutlig koncentration på 1 × GoTaq buffert (Promega), 5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/µl WSSV 146 F1 primer, 1 pmol/µl WSSV 146 R1 primer (tabell 1), 0,25 mM dNTPs, 1,25 enheter Taq polymeras och 2,5 µl DNA. Varje prov ska köras som duplikat tillsammans med en negativ extraktionskontroll, en negativ PCR-kontroll (2,5 µl H_2O tillsätts i stället för DNA) och en positiv kontroll. Den positiva kontrollen ska vara utspädd WSSV-plasmid som framställts och validerats internt (tillgänglig från EU:s referenslaboratorium).

Den andra PCR-reaktionen ska utföras på samma sätt som den första men med primerparet WSSV 146 F2/R2 och med en andra positiv kontroll för att kontrollera att detta PCR-steg har fungerat.

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

Både den första och andra PCR-omgången ska köras vid följande cykelförhållanden på en DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (eller motsvarande): En första denaturering vid 94 °C i 2 minuter, följt av 30 cykler vid 94 °C i 30 sekunder, 62 °C i 30 sekunder och 72 °C i 30 sekunder, elongering vid 72 °C i 2 minuter och därefter hålls reaktionen vid 4 °C.

6. **Gelelektrofores**

Amplifierade PCR-produkter från både den första och den andra PCR-omgången ska visualiseras på 2 % agarosgel med TAE buffert. 15 µl av varje prov ska köras vid 120 volt i cirka 20 minuter och studeras under UV-ljus. Positiva prover ska ge ett band på 1 447 baspar i den första PCR-omgången och på 848 baspar i den andra PCR-omgången. Prover av den storleken ska skäras ut och placeras i ett 1,5 ml mikrofugrör. Det DNA som finns i gelbitarna ska renas med Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System enligt tillverkarens anvisningar. DNA-koncentrationen ska uppskattas med en NanoDrop-maskin. Renat DNA ska frysas vid – 20 °C om det inte ska användas omedelbart.

7. **Sekvensering av PCR-produkter**

DNA ska sekvenseras med BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems). Den totala volymen i varje reaktion är 20 µl med de slutliga koncentrationerna 1 × BigDye Terminator, 1 × sekvenseringsbuffert, 10 pmol/µl framåtriktad eller bakåtriktad primer och 10 µl renat DNA (utspätt till cirka 10 ng/µl); följande cykelförhållanden ska användas på en DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (eller motsvarande): 94 °C i 30 sekunder, följt av 30 cykler vid 96 °C i 10 sekunder, 50 °C i 10 sekunder och 60 °C i 4 minuter.

PCR-produkterna ska fällas ut med en natriumacetatmetod enligt följande: 20 µl DNA tillsätts till 10 µl NaAc, 70 µl H_2O och 250 µl etanol, allt vortexas och centrifugeras vid 13 000 rpm i 20 minuter, supernatanten avlägsnas och pelleten tvättas med 200 µl absolut etanol och centrifugeras vid 13 000 rpm i 5 minuter. Pelleten ska torkas vid 37 °C i 5 minuter. 25 µl Hi-Di formamid ska tillsättas pelleterna och allt ska värmas vid 95 °C i 2 minuter och vortexas ordentligt. Proverna ska sekvenseras med 3130xl Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) enligt tillverkarens anvisningar. Sekvenseringsresultaten ska analyseras med programvaran Sequencher och sökverktyget BLAST och sekvenserna ska överensstämma med sekvenser i NCBI:s databas.