

II

(Akty o charakterze nieustawodawczym)

DECYZJE

DECYZJA WYKONAWCZA KOMISJI (UE) 2015/1554

z dnia 11 września 2015 r.

ustanawiająca przepisy dotyczące stosowania dyrektywy 2006/88/WE w odniesieniu do wymogów w zakresie metod nadzoru i metod diagnostycznych

(notyfikowana jako dokument nr C(2015) 6188)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając dyrektywę Rady 2006/88/WE z dnia 24 października 2006 r. w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób ⁽¹⁾, w szczególności jej art. 49 ust. 3, art. 50 ust. 4, art. 57 lit. b) i art. 61 ust. 3,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W dyrektywie 2006/88/WE ustanowiono minimalne środki zapobiegawcze w zakresie nadzoru i wczesnego wykrywania u zwierząt wodnych chorób wymienionych w wykazie w załączniku IV do tej dyrektywy („choroby ujęte w wykazie”) oraz środków zwalczania choroby stosowanych w wypadku zaistnienia podejrzenia wystąpienia lub wystąpienia ogniska chorób wymienionych w wykazie. W dyrektywie ustanowiono ponadto wymogi konieczne do uzyskania przez państwo członkowskie lub jego strefy lub enklawy statusu obszaru wolnego od choroby.
- (2) W całej Unii stosowane powinny być jednakowe zasady i jednakowe podejście naukowe w odniesieniu do zwalczania chorób ujętych w wykazie oraz do uzyskiwania statusu obszaru wolnego od choroby przez państwo członkowskie, strefę lub enklawę. Z tego powodu należy ustanowić na poziomie unijnym szczególne wymogi dotyczące systemów zwalczania i nadzoru oraz dotyczące metod pobierania próbek i metod diagnostycznych, które państwa członkowskie mają stosować w celu uzyskania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do całego terytorium lub strefy bądź enklawy.
- (3) Badania laboratoryjne, które należy wykonywać w przypadku podejrzenia lub potwierdzenia obecności chorób ujętych w wykazie, powinny być jednakowe na poziomie unijnym i powinny być zgodne z jednakowymi normami naukowymi i protokołami. Zgodnie z dyrektywą 2006/88/WE konieczne jest ustanowienie określonych metod diagnostycznych oraz procedur, z których korzystać mają laboratoria wyznaczone do tego celu przez właściwy organ państwa członkowskiego.
- (4) Kodeks zdrowia zwierząt wodnych (k.z.z.w.) przyjęty przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE) ustanawia ogólnoświatowe normy poprawy zdrowia zwierząt wodnych i poprawy dobrostanu ryb utrzymywanych w gospodarstwie rybackim, w tym normy bezpiecznego handlu międzynarodowego zwierzętami wodnymi oraz wytworzonymi z nich produktami. W szeregu rozdziałów k.z.z.w. ustanawia się zalecenia dotyczące stosowania określonych badań diagnostycznych. Przewidziane przez OIE badania tego typu zawarte są w Podręczniku OIE badań diagnostycznych dotyczących zwierząt wodnych („podręcznik diagnostyki zwierząt wodnych”). Aby zapewnić zgodność wymogów unijnych odnoszących się do diagnostyki chorób zwierząt wodnych z normami międzynarodowymi, przepisy ustanowione w niniejszej decyzji powinny uwzględniać normy i zalecenia podręcznika diagnostyki zwierząt wodnych.

⁽¹⁾ Dz.U. L 328 z 24.11.2006, s. 14.

- (5) W tym kontekście podręcznik diagnostyki zwierząt wodnych wymienia – w odniesieniu do wielu z chorób ujętych w wykazie – kilka badań i procedur, które należy stosować do celów badań laboratoryjnych. Aby ujednoczyć na poziomie unijnym bazę naukową dla prac diagnostycznych odnoszących się do chorób ujętych w wykazie, należy dokonać wyboru między badaniami i procedurami diagnostycznymi zalecanymi przez OIE oraz określić, które badania powinny być obowiązkowe do celów badań laboratoryjnych w ramach realizacji badań nadzoru oraz do celów wykluczenia podejrzenia obecności chorób ujętych w wykazie lub potwierdzenia ich obecności. W określonych przypadkach istnieje będzie potrzeba dysponowania alternatywnymi metodami i procedurami, a zatem należy przygotować opisy i pewne wyjaśnienia naukowe dotyczące okoliczności i sposobu stosowania alternatywnych metod. Konieczne jest to szczególnie w odniesieniu do bardziej szczegółowych procedur diagnostycznych.
- (6) W celu uzyskiwania dokładnych i odtwarzalnych wyników diagnostycznych ważne jest, by szczegółowe procedury i protokoły, które mają być stosowane, były walidowane zgodnie z odpowiednimi normami jakości o których mowa w części I załącznika VI do dyrektywy 2006/88/WE. W przypadku wielu metod diagnostycznych przewidzianych w niniejszej decyzji stosowanie komercyjnych zestawów do badań stanowi nieodzowną część protokołu diagnostycznego i laboratoria referencyjne UE zwalidowały te zestawy w drodze akredytowanych badań w odniesieniu do odpowiednich chorób. Ze względów pewności prawa w niniejszej decyzji należy zawrzeć odniesienia do komercyjnych nazw tych zwalidowanych, komercyjnych zestawów do badań.
- (7) W przypadku niektórych państw członkowskich osiągnięcie statusu obszaru wolnego od choroby dla całego terytorium lub jego strefy bądź enklawy może być trudne w odniesieniu do jednej lub kilku chorób ujętych w wykazie. W takich sytuacjach zdarzyć się może, że dane państwo członkowskie nie chce uzyskać lub odzyskać statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do danych chorób ujętych w wykazie. Minimalne środki zwalczania choroby stosowane w przypadku, gdy państwo członkowskie nie chce uzyskać lub odzyskać statusu obszaru wolnego od choroby, powinny być jednakowe na poziomie unijnym i powinny podlegać jednakowym kryteriom. Konieczne jest zatem ustanowienie zgodnie z dyrektywą 2006/88/WE szczegółowych przepisów dotyczących zapobiegania rozprzestrzenianiu się takich chorób ujętych w wykazie oraz minimalne wymogi dotyczące uchylania środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby.
- (8) W decyzji Komisji 2001/183/WE ⁽¹⁾ ustanowiono wymagania dotyczące planów pobierania próbek oraz metod diagnostycznych do celów wykrywania i potwierdzania chorób ujętych w wykazie, zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb łososiowatych oraz wirusowej posocznicy krwotocznej. W decyzji Komisji 2003/466/WE ⁽²⁾ ustanowiono wymagania dotyczące planów pobierania próbek oraz metod diagnostycznych do celów wykrywania zakaźnej anemii (niedokrwistości) łososia oraz kryteria podziału na strefy i urzędowego nadzoru w następstwie podejrzenia lub potwierdzenia występowania tej choroby. W decyzji Komisji 2002/878/WE ⁽³⁾ ustanowiono wymagania dotyczące planów pobierania próbek oraz metod diagnostycznych do celów wykrywania i potwierdzania chorób mięczaków bonamiozy (*Bonamia ostreae*) i marteiliozy (*Marteilia refringens*). W celu aktualizacji tych wymagań niniejsza decyzja powinna zastąpić wymienione trzy decyzje. Decyzje 2001/183/WE, 2002/878/WE oraz 2003/466/WE powinny zatem zostać uchylone.
- (9) Ponieważ niektóre państwa członkowskie potrzebują czasu na przygotowanie krajowych laboratoriów referencyjnych do spełniania wymogów ustanowionych w niniejszej decyzji, decyzja ta powinna obowiązywać od dnia 1 kwietnia 2016 r.
- (10) Środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Roślin, Zwierząt, Żywności i Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

Artykuł 1

Przedmiot

W niniejszej decyzji reguluje się następujące kwestie:

- a) nadzór, strefy buforowe, metody pobierania próbek i metody diagnostyczne stosowane przez państwa członkowskie w związku z odnoszącym się do państw członkowskich, ich stref lub enklaw statusem dotyczącym nieegzotycznych chorób zwierząt wodnych ujętych w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE („choroby ujęte w wykazie”);

⁽¹⁾ Decyzja Komisji 2001/183/WE z dnia 22 lutego 2001 r. ustanawiająca plany pobierania próbek i metody diagnostyczne do celów wykrywania i potwierdzania występowania niektórych chorób ryb oraz uchylająca decyzję 92/532/EWG (Dz.U. L 67 z 9.3.2001, s. 65).

⁽²⁾ Decyzja Komisji 2003/466/WE z dnia 13 czerwca 2003 r. ustanawiająca kryteria podziału na strefy i urzędowego nadzoru w następstwie podejrzenia lub potwierdzenia występowania niedokrwistości zakaźnej łososia (ISA) (Dz.U. L 156 z 25.6.2003, s. 61).

⁽³⁾ Decyzja Komisji 2002/878/WE z dnia 6 listopada 2002 r. ustanawiająca plany pobierania próbek oraz metody diagnostyczne stosowane w celu wykrywania i potwierdzania występowania u mięczaków Bonamiosis (*Bonamia ostreae*) i Marteiliosis (*Marteilia refringens*) (Dz.U. L 305 z 7.11.2002, s. 57).

- b) metody diagnostyczne stosowane do celów badań laboratoryjnych w przypadku podejrzenia lub potwierdzenia obecności chorób ujętych w wykazie; oraz
- c) minimalne środki zwalczania choroby stosowane w razie podejrzenia lub potwierdzenia obecności chorób ujętych w wykazie w państwie członkowskim, strefie lub enklawie nieuznanych za wolne od chorób ujętych w wykazie.

Artykuł 2

Definicje

Do celów niniejszej decyzji stosuje się następujące definicje:

- a) „wirusowa posocznica krwotoczna” („VHS”) oznacza chorobę spowodowaną przez wirusa posocznicy krwotocznej (VHSV), znanego również jako Egtved wirus, należącego do rodzaju *Novirhabdovirus*, w obrębie rodziny *Rhabdoviridae*;
- b) „zakaźna martwica układu krwiotwórczego” („IHN”) oznacza chorobę spowodowaną przez wirusa zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego (IHNV) należącego do rodzaju *Novirhabdovirus* w obrębie rodziny *Rhabdoviridae*;
- c) „zakażenie herpeswirusem koi” („KHVD”) oznacza chorobę spowodowaną przez herpeswirusa koi (KHV) należącego do rodziny *Alloherpesviridae*. Nazwa systematyczna tego wirusa to *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3).
- d) „zakaźna anemia łososia” („ISA”) oznacza chorobę spowodowaną zakażeniem wirusem zakaźnej anemii łososia (ISAV) z delecją w regionie wysoce polimorficznym (HPR), który to wirus należy do rodzaju *Isavirus* w obrębie rodziny *Orthomyxoviridae*;
- e) „inwazja wywołana przez *Marteilia refringens*” oznacza chorobę spowodowaną inwazją pierwotniaka *Marteilia refringens* należącego do typu *Paramyxia*;
- f) „inwazja wywołana przez *Bonamia ostreae*” oznacza chorobę spowodowaną inwazją pierwotniaka *Bonamia ostreae* należącego do typu *Haplosporea*;
- g) „zespół WSS” („WSD”) oznacza chorobę spowodowaną wirusem WSS (WSSV) będącym wirusem o dwuniciowym DNA należącym do rodzaju *Whispovirus*, w obrębie rodziny *Nimaviridae*.

Artykuł 3

Minimalne wymogi w zakresie programów zwalczania i nadzoru

Przyznając, cofając lub przywracając państwu członkowskiemu lub jego strefie bądź enklawie status obszaru wolnego od choroby ujętej w wykazie, państwo członkowskie zapewnia zachowanie zgodności z przepisami dotyczącymi programów zwalczania i nadzoru, stref buforowych, metod pobierania próbek i metod diagnostycznych ustanowionymi w załączniku I oraz szczególnymi metodami i szczegółowymi procedurami określonymi w załączniku II.

Artykuł 4

Minimalne wymogi w zakresie metod diagnostycznych i szczególnych procedur

Państwo członkowskie zapewnia zachowanie zgodności z metodami kontroli określonymi w załączniku I i ze szczególnymi metodami diagnostycznymi oraz szczegółowymi procedurami określonymi w załączniku II, gdy przeprowadzane są badania laboratoryjne w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności choroby ujętej w wykazie.

Artykuł 5

Minimalne środki zwalczania choroby do celów zapobiegania rozprzestrzenianiu się chorobom ujętym w wykazie oraz minimalne wymogi w odniesieniu do uchylania środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się tych chorób w państwach członkowskich, strefach lub enklawach nieuznanych za wolne od chorób ujętych w wykazie

Przy wykonywaniu środków zwalczania choroby lub uchylaniu środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby ujętej w wykazie w odniesieniu do państwa członkowskiego lub w jego strefy bądź enklawy, które nie zostały uznane za wolne od przedmiotowych chorób ujętych w wykazie, państwo członkowskie zapewnia zachowanie zgodności z minimalnymi środkami zwalczania choroby oraz minimalnymi wymogami w odniesieniu do uchylania środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby określonymi w załączniku I.

Artykuł 6

Uchylenie

Decyzje 2001/183/WE, 2002/878/WE oraz 2003/466/WE tracą moc.

Artykuł 7

Rozpoczęcie stosowania

Niniejszą decyzję stosuje się od dnia 1 kwietnia 2016 r.

Artykuł 8

Adresaci

Niniejsza decyzja skierowana jest do państw członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 11 września 2015 r.

W imieniu Komisji
Vytenis ANDRIUKAITIS
Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK I

METODY NADZORU I KONTROLI

I. Wstęp

Niniejszy załącznik określa:

- a) wymogi w zakresie programów zwalczania i nadzoru przewidzianych w art. 44 dyrektywy 2006/88/WE oraz metody pobierania próbek i metody diagnostyczne stosowane do celów przyznawania państwom członkowskim lub ich strefom bądź enklawom statusu obszaru wolnego od choroby, jak przewidziano w rozdziale VII wspomnianej dyrektywy;
- b) metody pobierania próbek i metody diagnostyczne stosowane do celów badań laboratoryjnych w przypadku podejrzenia obecności oraz w celu potwierdzenia obecności chorób nieegzotycznych wymienionych w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE („choroby ujęte w załączniku”), jak przewidziano w art. 28 lit. a) oraz art. 57 lit. b) wspomnianej dyrektywy;
- c) środki zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby wprowadzane w przypadku potwierdzenia obecności chorób ujętych w wykazie, jak przewidziano w art. 39 dyrektywy 2006/88/WE, oraz środki wprowadzane w celu uzyskania statusu zdrowotnego kategorii III przez państwo członkowskie, strefę lub enklawę, które posiadają status zdrowotny kategorii V.

Wymogi ustanowione w niniejszym załączniku obejmują następujące choroby ujęte w wykazie:

1.	Wirusowa posocznica krwotoczna (VHS)	Część 1
2.	Zakaźna martwica układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHN)	Część 1
3.	Zakażenie herpeswirusem koi (KHV)	Część 2
4.	Zakaźna anemia łososia (ISA)	Część 3
5.	Inwazja wywołana przez <i>Marteilia refringens</i>	Część 4
6.	Inwazja wywołana przez <i>Bonamia ostreae</i>	Część 5
7.	Zespół WSS (WSD)	Część 6

II. Definicje

Do celów załącznika I i II stosuje się następujące definicje:

- a) „enklawa kontynentalna” oznacza gospodarstwo lub gospodarstwa położone w kontynentalnej części przynajmniej jednego państwa członkowskiego, objęte wspólnotowym systemem bezpieczeństwa biologicznego i posiadające populację zwierząt wodnych o odrębnym statusie zdrowotnym w odniesieniu do określonej choroby;
- b) „gospodarstwo kontynentalne” oznacza gospodarstwo utrzymujące zwierzęta akwakultury, położone w kontynentalnej części terytorium jednego państwa członkowskiego;
- c) „strefa kontynentalna” oznacza dokładny obszar geograficzny położony w kontynentalnej części państwa członkowskiego lub państw członkowskich, posiadający jednorodny system hydrologiczny obejmujący części obszaru zlewni od źródeł cieków wodnych do naturalnej lub sztucznej zapory, która zapobiega migracji zwierząt wodnych z położonych niżej odcinków zlewni, całkowity obszar zlewni od źródeł cieków wodnych do ujścia lub więcej niż jeden obszar zlewni wraz z ujściami ze względu na powiązanie epidemiologiczne obszarów zlewni poprzez ujście;

- d) „gospodarstwo uznane urzędowo za zakażone” oznacza gospodarstwo utrzymujące zwierzęta wodne, w którym właściwy organ potwierdził, zgodnie z art. 28 lit. a), art. 29 i art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE, obecność przynajmniej jednej z chorób ujętych w wykazie;
- e) „gospodarstwo kontaktowe” oznacza gospodarstwo, które utrzymuje zwierzęta wodne i wobec którego w jakikolwiek sposób wykazano lub powzięto poważne podejrzenie, że zostało zanieczyszczone materiałem zakaźnym z gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone.

CZĘŚĆ 1

METODY NADZORU I KONTROLI W ODNIESIENIU DO WIRUSOWEJ POSOCZNYCY KRWOTOCZNEJ (VHS) I ZAKAŻNEJ MARTWICY UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO RYB ŁOSOSIOWATYCH (IHN)

- I. **Wymogi w zakresie programów nadzoru i zwalczania do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do VHS i IHN oraz środki zapobiegania rozprzestrzenianiu się tych chorób ujętych w wykazie**
 - I.1. Ogólne wymogi dotyczące badań stanu zdrowia oraz pobierania próbek w kierunku VHS i IHN:
 - a) badania stanu zdrowia oraz, w stosownych przypadkach, pobieranie próbek przeprowadza się w tych okresach w ciągu roku, w których temperatura wody jest niższa niż 14 °C lub w okresach o prawdopodobnie najniższych wartościach rocznych temperatury wody;
 - b) jeśli w populacjach ryb dziko żyjących konieczny jest nadzór ukierunkowany zgodnie z częścią I pkt 2 akapit drugi załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, liczbę i rozmieszczenie geograficzne punktów pobierania próbek ustala się tak, by uzyskać rozsądny stopień pokrycia terytorium państwa członkowskiego, strefy lub enklawy. Punkty pobierania próbek powinny być reprezentatywne dla różnych ekosystemów, w których znajdują się populacje ryb dziko żyjących należących do gatunków podatnych;
 - c) jeśli gospodarstwa lub populacje ryb dziko żyjących podlegają badaniom stanu zdrowia lub pobieraniu próbek częściej niż raz w roku, poszczególne badania stanu zdrowia i poszczególne pobrania próbek odbywają się w odstępach przynajmniej czteromiesięcznych, a jednocześnie możliwie jak najdłuższych przy uwzględnieniu wymogów dotyczących temperatury przewidzianych w lit. a);
 - d) wszystkie jednostki produkcyjne, takie jak stawy, zbiorniki i sadze, podlegają badaniu stanu zdrowia pod kątem obecności ryb martwych, o osłabionej kondycji albo zachowujących się nienaturalnie. Szczególną uwagę zwraca się na miejsca odpływu wody, w których z powodu prądu wody zwykle gromadzą się ryby o osłabionej kondycji;
 - e) ryby gatunków podatnych pobierane jako próbki wybiera się w następujący sposób:
 - (i) jeśli występują pstrągi tęczowe, do pobrania próbki wybiera się wyłącznie ryby tego gatunku, z wyjątkiem sytuacji, gdy występują inne gatunki podatne wykazujące typowe objawy VHS lub IHN; jeśli pstrągi tęczowe nie występują, próbka musi być reprezentatywna dla wszystkich pozostałych gatunków podatnych, które tam występują;
 - (ii) jeśli występują ryby o osłabionej kondycji, zachowujące się nienaturalnie lub świeżo padłe, lecz niebędące w stanie rozkładu, wybiera się takie ryby; jeśli do produkcji ryb wykorzystuje się więcej niż jedno źródło wody, próbka powinna zawierać ryby reprezentujące wszystkie źródła wody zasilające gospodarstwo;
 - (iii) próbka powinna zawierać ryby proporcjonalnie reprezentujące wszystkie części gospodarstwa oraz wszystkie roczniki ryb.
 - I.2. Szczególne wymogi do celów uzyskania statusu obszaru wolnego od choroby (kategoria I) w odniesieniu do VHS i IHN
 - I.2.1. Programy nadzoru
 - a) państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które w odniesieniu do VHS lub IHN posiadają status zdrowotny kategorii III, o którym mowa w części B załącznika III do dyrektywy 2006/88/WE, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tych chorób ujętych w wykazie pod warunkiem że wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do tej dyrektywy, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy, spełniają wymagania określone w załączniku V do tej dyrektywy, a wszystkie te gospodarstwa oraz, o ile wymagane jest to przepisem części I pkt 2 akapit drugi załącznika V do tej dyrektywy, punkty pobierania próbek w populacji ryb dziko żyjących wybrane zgodnie ze wspomnianą częścią poddano jednemu z następujących programów nadzoru:

(i) model A – dwuletni program nadzoru:

Gospodarstwa lub punkty pobierania próbek były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej dwa kolejne lata, jak przewidziano w sekcji II tabela 1.A.

W ciągu tego okresu dwóch lat badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do VHS lub IHN i wykluczono wszelkie podejrzenia obecności VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN zgodnie z metodami pobierania próbek i metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3;

(ii) model B – czteroletni program nadzoru przy próbce zredukowanej:

Gospodarstwa lub punkty pobierania próbek były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej cztery kolejne lata, jak przewidziano w sekcji II tabela 1.B.

W ciągu tego okresu czterech lat badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do VHS lub IHN i wykluczono wszelkie podejrzenia obecności VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN zgodnie z metodami pobierania próbek i metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3;

b) jeśli w trakcie realizacji programu nadzoru, o którym mowa w lit. a), w gospodarstwie objętym tym programem potwierdzono zakażenie VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN i w następstwie cofnięto temu gospodarstwu status zdrowotny kategorii II, gospodarstwo to może natychmiast odzyskać status zdrowotny kategorii II i kontynuować realizację programu nadzoru w celu uzyskania statusu obszaru wolnego od choroby bez wdrażania programu zwalczania przewidzianego w pkt I.2.2, o ile gospodarstwo to spełnia następujące warunki:

- (i) jest gospodarstwem kontynentalnym, którego status zdrowotny odnoszący się do VHS lub IHN jest niezależny od odnoszącego się do tych chorób statusu zdrowotnego populacji zwierząt wodnych w otaczających to gospodarstwo wodach naturalnych, zgodnie z częścią II pkt 3 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE;
- (ii) zostało one opróżnione ze zwierząt, oczyszczone, zdezynfekowane i poddane odłogowaniu; długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej sześć tygodni;
- (iii) populację w gospodarstwie odnowiono rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do VHS lub IHN;

I.2.2. Programy zwalczania

I.2.2.1. Wymogi ogólne

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa o statusie zdrowotnym kategorii V odnoszącym się do VHS lub IHN mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tych chorób, o ile wszystkie gospodarstwa w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte programem zwalczania zgodnym z lit. a)–e):

- a) skutecznie zastosowano minimalne środki zwalczania choroby przewidziane w rozdziale V sekcja 4 dyrektywy 2006/88/WE, a w pobliżu gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN ustanowiono obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby, o którym mowa w art. 32 lit. b) wspomnianej dyrektywy, obejmujący strefę ochronną oraz strefę nadzoru.

Obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby zdefiniowano odrębnie dla każdego przypadku przy uwzględnieniu czynników wpływających na ryzyko rozprzestrzenienia się choroby ujętej w wykazie na ryby utrzymywane w gospodarstwie rybackim i ryby dziko żyjące, takich jak: liczba, odsetek i rozkład śmiertelności ryb znajdujących się w danym gospodarstwie, zakażonych VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN; odległość od sąsiednich gospodarstw i ich gęstość; bliskość rzeźni; gospodarstwa kontaktowe; gatunki występujące w gospodarstwach; praktyki rybackie stosowane w gospodarstwach zarażonych i gospodarstwach sąsiadujących z gospodarstwami zarażonymi; stwierdzone warunki hydrodynamiczne i inne czynniki o znaczeniu epidemiologicznym.

Przy ustanawianiu stref ochronnych i stref nadzoru stosuje się następujące minimalne wymogi w odniesieniu do wyznaczania ich granic geograficznych:

- (i) w bezpośrednim sąsiedztwie gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN ustanawia się strefę ochronną, która odpowiada:
 - 1) w strefach przybrzeżnych: obszarowi znajdującemu się w okręgu o promieniu przynajmniej jednego zakresu ruchu wody podczas pływu lub o promieniu przynajmniej 5 km, w zależności od tego, który z tych promieni jest dłuższy, przy czym środek okręgu stanowi gospodarstwo uznane urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN, lub równoważnemu obszarowi określoneemu zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi;
 - 2) w strefach śródlądowych: całemu obszarowi zlewni gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN; właściwy organ może ograniczyć obszar strefy do części obszaru zlewni lub obszaru gospodarstwa, o ile nie stanowi to zagrożenia dla zapobiegania rozprzestrzenianiu się VHS lub IHN;
- (ii) poza granicą strefy ochronnej właściwy organ ustanawia strefę nadzoru, która odpowiada:
 - 1) w strefach przybrzeżnych: otaczającemu strefę ochronną obszarowi obejmującemu nakładające się strefy zakresu ruchu wody podczas pływu; otaczającemu strefę ochronną obszarowi znajdującemu się w okręgu o promieniu 10 km, licząc od środka strefy ochronnej; lub równoważnemu obszarowi zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi;
 - 2) w strefach śródlądowych: rozszerzonemu obszarowi poza granicą ustanowionej strefy ochronnej;
- b) wszystkie gospodarstwa, które utrzymują w obrębie strefy ochronnej gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, a których nie uznano urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN, podlegają urzędowemu dochodzeniu obejmującemu przynajmniej następujące elementy:
 - (i) pobranie do badań próbki składającej się z 10 ryb, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne wskazujące na zakażenie VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN lub z przynajmniej 30 ryb, jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani zmian anatomopatologicznych;
 - (ii) jedno badanie stanu zdrowia: w gospodarstwach, w odniesieniu do których badania, o których mowa w ppkt (i) dały wyniki ujemne; badania stanu zdrowia prowadzi się co miesiąc w okresie, w którym temperatura wody jest niższa niż 14 °C, chyba że stawy rybne i sadze są pokryte lodem, do czasu zniesienia strefy ochronnej zgodnie z pkt I.2.2.1 lit. c);
- c) wszystkie gospodarstwa uznane urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN podlegają opróżnieniu ze zwierząt, oczyszczeniu, zdezynfekowaniu i odłogowaniu. Długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej sześć tygodni; Po opróżnieniu ze zwierząt wszystkich gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone położonych w obrębie tej samej strefy ochronnej przeprowadza się zsynchronizowane odłogowanie trwające przynajmniej trzy tygodnie. Niniejszy akapit ma również zastosowanie do gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone w trakcie realizacji programu zwalczania.

Po zakończeniu odłogowania w gospodarstwie uznanym urzędowo za zakażone strefy ochronne przekształca się w strefy nadzoru.

Właściwy organ może podjąć decyzję o nałożeniu na inne gospodarstwa w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru wymogu opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, dezynfekcji i odłogowania. Długość okresu odłogowania w takich gospodarstwach ustalana jest przez właściwy organ na podstawie indywidualnej oceny ryzyka;
- d) we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN oraz wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru, o których mowa w lit. c), populację odnawia się rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do VHS lub IHN.

Odnowienie populacji przeprowadza się dopiero po dokonaniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania zgodnie z pkt I.2.2.1 lit. c);

- e) wszystkie gospodarstwa w obrębie państwa członkowskiego, strefy lub enklawy objętych programem zwalczania utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE oraz, gdy wymagany jest nadzór w populacjach ryb dziko żyjących, punkty pobierania próbek wybrane zgodnie z pkt I.1 są następnie objęte systemem nadzoru określonym w pkt I.2.1.

I.2.2.2. Wymogi odnoszące się do odzyskania statusu obszaru wolnego od choroby przez enklawy kontynentalne obejmujące pojedyncze gospodarstwo uznane wcześniej za wolne od choroby w odniesieniu do IHN lub VHS

Enklawa kontynentalna, która obejmuje pojedyncze gospodarstwo uznane wcześniej za wolne od choroby w odniesieniu do VHS lub IHN, a której status zdrowotny odnoszący się do tych chorób jest niezależny od otaczających ją wód naturalnych zgodnie z częścią II pkt 3 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE i której cofnięto status zdrowotny kategorii I zgodnie z art. 53 ust. 3 wspomnianej dyrektywy, może odzyskać status zdrowotny kategorii I natychmiast po potwierdzeniu przez właściwy organ spełnienia następujących warunków:

- a) gospodarstwo uznane urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN zostało opróżnione ze zwierząt, oczyszczone, zdezynfekowane i poddane odłogowaniu; długość okresu odłogowania musi wynosić przynajmniej sześć tygodni;
- b) populację w gospodarstwie uznanym urzędowo za zakażone VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN odnowiono rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do VHS lub IHN;

I.3. Szczególne wymogi do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby (kategoria I) w odniesieniu do VHS lub IHN

Jeśli do utrzymania statusu zdrowotnego kategorii I wymagany jest nadzór ukierunkowany, jak przewidziano w art. 52 dyrektywy 2006/88/WE, wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do tej dyrektywy, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy obejmuje się badaniami stanu zdrowia, a próbki ryb pobiera się zgodnie z sekcją II tabela 1.C, uwzględniając poziom zagrożenia dla danego gospodarstwa w odniesieniu do przeniesienia zakażenia VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN.

Gdy określa się częstotliwość badań stanu zdrowia pod kątem VHS lub IHN w enklawach o statusie zdrowotnym kategorii I, które są położone na obszarach kontynentalnych i których status zdrowotny odnoszący się do VHS lub IHN jest zależny od statusu zdrowotnego populacji zwierząt wodnych w otaczających tę enklawę wodach naturalnych zgodnie z częścią II pkt 2 załącznik V do dyrektywy 2006/88/WE, ryzyko przeniesienia zakażenia VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN uznaje się za wysokie.

Status obszaru wolnego od choroby utrzymuje się dopóty, dopóki badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dają wyniki ujemne w odniesieniu do VHS lub IHN i dopóki wykluczone jest wszelkie podejrzenie obecności VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3.

I.4. Wymogi odnoszące się do uchylenia środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby przewidzianych w art. 39 dyrektywy 2006/88/WE, mianowicie zmiana kategorii statusu zdrowotnego z V na III

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do VHS lub IHN, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do tych chorób ujętych w wykazie pod następującymi warunkami:

- a) spełniono wymogi określone w pkt I.2.2.1 lit. a), b) i c). Jeśli odłogowanie jest technicznie niemożliwe, dane gospodarstwa obejmuje się alternatywnym środkiem, który daje niemal porównywalne gwarancje usunięcia IHN lub VHS ze środowiska gospodarstwa;
- b) we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone i wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu/środkom alternatywnym zgodnie z lit. a), położonych w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru odnowiono populację rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I, II lub III odnoszącym się do VHS lub IHN;

- c) odnowienia populacji dokonano dopiero po przeprowadzeniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania/środków alternatywnych zgodnie z lit. a).

II. Metody diagnostyczne i metody pobierania próbek

II.1. Organy, z których pobiera się materiał biologiczny do próbki:

Materiałem biologicznym podlegającym badaniu jest śledziona, nerka – część głowowa, a także serce lub mózg. Przy pobieraniu próbek od tarlaków zbadać można również płyn jajnikowy lub mlecz.

W przypadku narybku można rozdrobnić całe ryby o długości poniżej 4 cm przy użyciu sterylnych nożyczek lub sterylnego skalpela po uprzednim usunięciu części ciała znajdującej się za otworem jelitowym. Jeżeli próbkę stanowi cała ryba o długości od 4 do 6 cm, pobrać należy narządy wewnętrzne, w tym nerkę.

Można łączyć fragmenty narządów pochodzące od maksymalnie 10 ryb.

II.2. Metody diagnostyczne do celów uzyskania i utrzymania status obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do VHS lub IHN

Metodami diagnostycznymi do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do VHS lub IHN, zgodnie z zatwierdzonymi metodami i procedurami diagnostycznymi określonymi w załączniku II część 1 pkt I, są:

- a) izolacja wirusa w liniach komórkowych z następującą po niej identyfikacją przy wykorzystaniu testu immunoenzymatycznego (ELISA), testu immunofluorescencji pośredniej (IFAT), testu neutralizacji wirusa lub łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR); albo
- b) RT-qPCR.

II.3. Pobieranie próbek i metody diagnostyczne do celów wykluczenia lub potwierdzenia obecności VHS lub IHN

Jeśli istnieje konieczność potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN zgodnie z art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, przestrzega się następujących procedur badań, pobierania próbek i prowadzenia testów:

- a) gospodarstwo będące przedmiotem podejrzenia poddaje się przynajmniej jednemu badaniu stanu zdrowia i jednemu pobraniu próbki 10 ryb, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne wskazujące na zakażenie VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN, lub przynajmniej 30 ryb, jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani zmian anatomopatologicznych. Próbkę bada się przy wykorzystaniu przynajmniej jednej metody diagnostycznej określonej w ppkt (i) i (ii) zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami diagnostycznymi określonymi w załączniku II część 1 sekcja II:
 - (i) konwencjonalna izolacja wirusa w liniach komórkowych z następującą po niej immunochemiczną lub molekularną identyfikacją wirusa;
 - (ii) wykrywanie wirusa przy wykorzystaniu RT-qPCR;
 - (iii) inne techniki diagnostyczne o sprawdzonej podobnej skuteczności, takie jak test immunofluorescencji pośredniej (IFAT), test immunoenzymatyczny (ELISA), RT-PCR i immunohistochemia (IHC).
- b) obecność VHS uznaje się za potwierdzoną, jeśli przynajmniej jedna z tych metod diagnostycznych da wynik dodatni w kierunku VHSV. Obecność IHN uznaje się za potwierdzoną, jeśli przynajmniej jedna z tych metod diagnostycznych da wynik dodatni w kierunku IHNV. Potwierdzenie pierwszego przypadku VHS lub IHN w państwach członkowskich, strefach lub enklawach uprzednio niezakażonych opiera się na konwencjonalnej izolacji wirusa w linii komórkowej lub RT-qPCR;
- c) Można wykluczyć podejrzenie obecności VHSV lub IHNV, jeśli badania przy wykorzystaniu linii komórkowej lub RT-qPCR nie wykazują dalszych dowodów na obecność VHSV lub IHNV.

Tabela 1.A

System nadzoru obowiązujący dla stref i enklaw w dwuletnim okresie kontroli, o którym mowa w pkt I.2.1 lit. a) ppkt (i), poprzedzający uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do VHS lub IHN

Rodzaj gospodarstwa	Liczba badań stanu zdrowia na rok (okres dwóch lat)	Liczba pobierania próbek na rok (okres dwóch lat)	Liczba ryb w próbce ⁽¹⁾	
			Liczba ryb w fazie wzrostu	Liczba tarlaków ⁽²⁾
a) Gospodarstwa utrzymujące tarlaki	2	2	50 (pierwsze badanie) 75 (drugie badanie)	30 (pierwsze lub drugie badanie) 0 (pierwsze lub drugie badanie)
b) Gospodarstwa utrzymujące tylko tarlaki	2	1	0	75 (pierwsze lub drugie badanie)
c) Gospodarstwa nieutrzymujące tarlaków	2	2	75 ⁽³⁾ (pierwsze i drugie badanie)	0

Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 10

⁽¹⁾ Próbki pobiera się nie wcześniej niż trzy tygodnie po przeniesieniu ryb z wody słodkiej do słonej.

⁽²⁾ Płyn jajnikowy lub mlecz tarlaków pobiera się w okresie osiągnięcia dojrzałości przy pobieraniu ikry i nasienia.

⁽³⁾ Próbki pobiera się od takiej liczby ryb, by zapewnić wykrycie VHSV lub IHNV przy poziomie ufności 95 %, przy założeniu szacunkowego czynnika chorobowości wynoszącego 5 %.

Tabela 1.B

System nadzoru przy próbce zredukowanej w czteroletnim okresie kontroli, o którym mowa w pkt I.2.1 lit. a) ppkt (ii), poprzedzający uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do VHS i IHN

Rodzaj gospodarstwa	Liczba badań stanu zdrowia na rok	Liczba pobierania próbek na rok	Liczba ryb w próbce ⁽¹⁾	
			Liczba ryb w fazie wzrostu	Liczba tarlaków ⁽²⁾
Pierwsze dwa lata okresu nadzoru				
a) Gospodarstwa utrzymujące tarlaki	2	1	0 (pierwsze badanie) 30 (drugie badanie)	0 (pierwsze badanie) 0 (drugie badanie)
b) Gospodarstwa utrzymujące tylko tarlaki	2	1	0	30 (pierwsze lub drugie badanie)
c) Gospodarstwa nieutrzymujące tarlaków	2	1	30 ⁽³⁾ (pierwsze lub drugie badanie)	0
Ostatnie dwa lata okresu nadzoru				
a) Gospodarstwa utrzymujące tarlaki	2	2	30 (pierwsze badanie) 0 (drugie badanie)	0 (pierwsze badanie) 30 (drugie badanie)

Rodzaj gospodarstwa	Liczba badań stanu zdrowia na rok	Liczba pobierania próbek na rok	Liczba ryb w próbce ⁽¹⁾	
			Liczba ryb w fazie wzrostu	Liczba tarlaków ⁽²⁾
b) Gospodarstwa utrzymujące tylko tarlaki	2	2		30 (pierwsze i drugie badanie)
c) Gospodarstwa nieutrzymujące tarlaków	2	2	30 ⁽³⁾ (pierwsze i drugie badanie)	

Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 10

⁽¹⁾ Próbki pobiera się nie wcześniej niż trzy tygodnie po przeniesieniu ryb z wody słodkiej do słonej.

⁽²⁾ Płyn jajnikowy lub mlecz tarlaków pobiera się w okresie osiągnięcia dojrzałości przy pobieraniu ikry i nasienia.

⁽³⁾ Próbki pobiera się od takiej liczby ryb, by zapewnić wykrycie VHSV lub IHNV przy poziomie ufności 95 %, przy założeniu szacunkowego czynnika chorobowości wynoszącego 10 %.

Tabela 1.C

Systemy nadzoru obowiązujące dla stref i enklaw do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do VHS lub IHN, jak wskazano w pkt I.3

Poziom zagrożenia	Liczba badań stanu zdrowia	Liczba ryb w próbce ⁽³⁾
Wysoki	2 w roku	30 ⁽¹⁾ ⁽²⁾
Średni	1 w roku	30 ⁽¹⁾
Niski	1 na 2 lata	30 ⁽¹⁾

Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 10

⁽¹⁾ Próbki pobiera się nie wcześniej niż trzy tygodnie po przeniesieniu ryb z wody słodkiej do słonej.

⁽²⁾ Próbki pobiera się od takiej liczby ryb, by zapewnić wykrycie VHSV lub IHNV przy poziomie ufności 95 %, przy założeniu szacunkowego czynnika chorobowości wynoszącego 10 %.

⁽³⁾ W każdym badaniu stanu zdrowia pobiera się przynajmniej jedną próbkę.

CZĘŚĆ 2

METODY NADZORU I KONTROLI W ODNIESIENIU DO ZAKAŻENIA HERPESWIRUSEM KOI (KHVD)

I. Wymogi w zakresie programów nadzoru i zwalczania do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD oraz zapobiegania zakażeniu herpeswirusem koi (KHV)

I.1. Wymogi ogólne

Jeśli w populacjach ryb dziko żyjących konieczny jest nadzór ukierunkowany zgodnie z częścią I pkt 2 akapit drugi załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, liczbę i rozmieszczenie geograficzne punktów pobierania próbek ustala się tak, by uzyskać rozsądny stopień pokrycia terytorium państwa członkowskiego, strefy lub enklawy. Punkty pobierania próbek powinny być reprezentatywne dla różnych ekosystemów stanowiących siedlisko podatnych populacji dzikich, a mianowicie systemów rzecznych i jezior.

Nadzór ukierunkowany opiera się na regularnym monitoringu miejsc stanowiących siedliska gatunków podatnych. Miejsca takie monitoruje się wtedy, gdy temperatura wody osiągnęła poziom umożliwiający rozwój choroby (> 15 °C) i nie wcześniej niż dwa tygodnie od daty osiągnięcia takiej temperatury. Ze wszystkich ryb wykazujących objawy chorobowe lub nienaturalne zachowanie, które zostaną znalezione w takich miejscach, pobiera się próbki, które są następnie badane.

W miarę możliwości próbki pobiera się od ryb utrzymywanych przez dłuższy okres w zakresie temperatur umożliwiającym rozwój choroby, tj. przez dwa do trzech tygodni w temperaturze od 15 do 26 °C. Można jednak zaakceptować następujące podejście:

- a) pobranie podpopulacji przy przeniesieniu ze stawów zimowych do letnich i przetrzymywanie ryb w tej samej jednolitej części wód, do której należy staw letni, do osiągnięcia wymagań dotyczących temperatury; lub
- b) pobranie próbek przy odłowieniu ryb lub podczas innych procesów stanowiących część normalnych praktyk zarządzania zasobami akwakultury. W celu zwiększenia szansy wykrycia KHV próbki pobiera się w miarę możliwości w przedziale czasowym między 24 a 72 godzin po takich czynnościach w ramach praktyk zarządzania zasobami akwakultury w celu zwiększenia szansy wykrycia KHV.

Jeśli gospodarstwa lub populacje ryb dziko żyjących podlegają badaniom stanu zdrowia lub pobieraniu próbek częściej niż raz w roku, poszczególne badania stanu zdrowia lub poszczególne pobrania próbek odbywają się w możliwie największych odstępach czasu w sezonie o prawdopodobnie najwyższych wartościach rocznych temperatury wody, ale nieprzekraczających 28 °C.

Wszystkie jednostki produkcyjne, takich jak stawy lub zbiorniki, podlegają badaniu stanu zdrowia pod kątem obecności ryb martwych, o osłabionej kondycji albo zachowujących się nienaturalnie.

Cyprinus carpio i jego mieszańce, takie jak *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus* zbiera się, jeśli występują w danym gospodarstwie.

Ryby pobierane jako próbki wybiera się w następujący sposób:

- (i) jeśli występują ryby o osłabionej kondycji, zachowujące się nienaturalnie lub świeżo padłe, lecz niebędące w stanie rozkładu, wybiera się takie ryby;
- (ii) jeżeli do produkcji ryb wykorzystuje się więcej niż jedno źródło wody, próbka musi obejmować ryby reprezentujące wszystkie źródła wody zasilające gospodarstwo;
- (iii) próbka powinna zawierać ryby proporcjonalnie reprezentujące wszystkie części gospodarstwa oraz wszystkie roczniki ryb.

I.2. Szczególne wymogi do celów uzyskania statusu obszaru wolnego od choroby (kategoria I) w odniesieniu do KHVD

I.2.1. Programy nadzoru

- a) państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do KHVD, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I, jeśli wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy, spełniają wymagania dotyczące statusu obszaru wolnego od choroby określone w załączniku V do tej dyrektywy, a wszystkie te gospodarstwa oraz, o ile wymagane jest to przepisem części I pkt 2 akapit drugi wspomnianego załącznika, punkty pobierania próbek u populacji ryb dziko żyjących wybrane zgodnie ze wspomnianą częścią poddano jednemu z następujących programów nadzoru:

- (i) model A – dwuletni program nadzoru:

Gospodarstwa lub punkty pobierania próbek były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej dwa kolejne lata, jak przewidziano w sekcji III tabela 2.A.

W ciągu tego dwuletniego okresu badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do KHV i wykluczono wszelkie podejrzenie obecności KHVD zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt III.2;

- (ii) model B – czteroletni program nadzoru przy próbie zredukowanej:

Gospodarstwa lub punkty pobierania próbek były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej cztery kolejne lata, jak przewidziano w sekcji III tabela 2.B.

W ciągu tego okresu czterech lat badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do KHV i wykluczono wszelkie podejrzenie obecności KHVD zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt III.2;

- b) jeśli w trakcie realizacji czteroletniego programu nadzoru określonego w lit. a) w gospodarstwie objętym tym programem potwierdzono zakażenie KHV i w następstwie cofnięto temu gospodarstwu status zdrowotny kategorii II, gospodarstwo to może natychmiast odzyskać status zdrowotny kategorii II i kontynuować realizację programu nadzoru w celu uzyskania statusu obszaru wolnego od choroby bez wdrażania programu zwalczania, o którym mowa w pkt I.2.2, o ile gospodarstwo to spełnia następujące warunki:
- (i) jest gospodarstwem kontynentalnym, którego status zdrowotny odnoszący się do KHVD jest niezależny od odnoszącego się do tej choroby statusu zdrowotnego populacji zwierząt wodnych w otaczających to gospodarstwo wodach naturalnych, zgodnie z częścią II pkt 3 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE;
 - (ii) zostało ono opróżnione ze zwierząt, oczyszczone, zdezynfekowane i poddane odłogowaniu; długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej sześć tygodni;
 - (iii) populację w gospodarstwie odnowiono rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do KHVD.

I.2.2. Programy zwalczania

I.2.2.1. Wymogi ogólne

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do KHVD, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, gdy wszystkie gospodarstwa w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte przynajmniej następującym programem zwalczania:

- a) skutecznie zastosowano minimalne środki zwalczania choroby przewidziane w rozdziale V sekcja 4 dyrektywy 2006/88/WE, a w pobliżu gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone KHV ustanowiono obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby, o którym mowa w art. 32 lit. b) wspomnianej dyrektywy, obejmujący strefę ochronną oraz strefę nadzoru.

Obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby zdefiniowano odrębnie dla każdego przypadku przy uwzględnieniu czynników wpływających na ryzyko rozprzestrzenienia się KHVD na ryby utrzymywane w gospodarstwie rybackim i ryby dziko żyjące, takich jak: liczba, odsetek i rozkład śmiertelności ryb znajdujących się w danym gospodarstwie, zakażonych KHV; odległość od sąsiednich gospodarstw i ich gęstość; bliskość rzeźni; gospodarstwa kontaktowe; gatunki występujące w gospodarstwach; praktyki rybackie stosowane w gospodarstwach zarażonych i sąsiednich; stwierdzone warunki hydrodynamiczne i inne czynniki o znaczeniu epidemiologicznym.

Przy ustanawianiu stref ochronnych i stref nadzoru stosuje się następujące minimalne wymogi w odniesieniu do wyznaczania ich granic geograficznych:

- (i) w bezpośrednim sąsiedztwie gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone KHV ustanawia się strefę ochronną, która odpowiada całemu obszarowi zlewni gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone KHV; właściwy organ może ograniczyć obszar strefy do części obszaru zlewni, o ile nie stanowi to zagrożenia dla zapobiegania rozprzestrzenianiu się KHVD;
- (ii) poza granicą strefy ochronnej ustanawia się strefę nadzoru, która odpowiada rozszerzonemu obszarowi otaczającemu ustanowioną strefę ochronną;

- b) wszystkie gospodarstwa, które utrzymują w obrębie strefy ochronnej gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, a których nie uznano urzędowo za zakażone KHV, podlegają urzędowemu dochodzeniu obejmującemu przynajmniej następujące elementy:
- (i) pobranie do badań próbek składających się z 10 ryb, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne wskazujące na zakażenie KHVD, lub z 30 ryb, jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani zmian anatomopatologicznych;
 - (ii) jedno badanie stanu zdrowia; w gospodarstwach, w odniesieniu do których badania, o których mowa w pkt III.2 dały wyniki ujemne; badania stanu zdrowia prowadzi się co miesiąc w sezonie, w którym temperatura wody prawdopodobnie osiągnie $> 15^{\circ}\text{C}$, do czasu zniesienia strefy ochronnej zgodnie z pkt I.2.2.1 lit. c);
- c) wszystkie gospodarstwa uznane urzędowo za zakażone KHV podlegają opróżnieniu ze zwierząt, oczyszczeniu, zdezynfekowaniu i odłogowaniu. Długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej sześć tygodni. Po opróżnieniu ze zwierząt wszystkich gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone położonych w obrębie tej samej strefy ochronnej przeprowadza się zsynchronizowane odłogowanie trwające przynajmniej trzy tygodnie. Niniejszy akapit ma również zastosowanie do gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone w trakcie realizacji programu zwalczania.
- Po zakończeniu odłogowania w gospodarstwie uznanym urzędowo za zakażone strefy ochronne przekształca się w strefy nadzoru.
- Właściwy organ może podjąć decyzję o nałożeniu na inne gospodarstwa w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru wymogu opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, dezynfekcji i odłogowania. Długość okresu odłogowania ustalana jest przez właściwy organ na podstawie jednostkowej oceny ryzyka;
- d) we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone KHV oraz wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru populację odnawia się:
- (i) rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do KHVD; lub
 - (ii) w okresie przejściowym trwającym do dnia 31 grudnia 2020 r. – rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw posiadających zatwierdzony program nadzoru nad KHVD.
- Odnowienie populacji przeprowadza się dopiero po dokonaniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone KHV opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania zgodnie z pkt I.2.2.1 lit. c);
- e) wszystkie gospodarstwa w obrębie państwa członkowskiego, strefy lub enklawy objętych programem zwalczania utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE oraz, gdy wymagany jest nadzór w populacjach ryb dziko żyjących, punkty pobierania próbek wybrane zgodnie z pkt I.1 są następnie objęte przynajmniej programem nadzoru określonym w pkt I.2.1.

I.2.2.2. Wymogi odnoszące się do odzyskania statusu obszaru wolnego od choroby przez enklawy kontynentalne obejmujące pojedyncze gospodarstwo uznane wcześniej za wolne od choroby w odniesieniu do KHVD

Enklawa kontynentalna obejmująca pojedyncze gospodarstwo posiadające status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do KHVD, której status zdrowotny odnoszący się do KHVD jest niezależny od otaczających ją wód naturalnych zgodnie z częścią II pkt 3 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE i której cofnięto status kategorii I zgodnie z art. 53 ust. 3 wspomnianej dyrektywy, może odzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do KHVD natychmiast po potwierdzeniu przez właściwy organ spełnienia następujących warunków:

- a) została ona opróżniona ze zwierząt, oczyszczona, zdezynfekowana i poddana odłogowaniu; długość okresu odłogowania wynosiła przynajmniej sześć tygodni;
- b) populację w enklawie odnowiono rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do KHVD lub z enklaw posiadających zatwierdzony program nadzoru nad KHVD (status zdrowotny kategorii II).

I.3. Szczególne wymogi do celów utrzymania statusu kategorii I w odniesieniu do KHVD

Jeśli do utrzymania statusu zdrowotnego kategorii I wymagany jest nadzór ukierunkowany, jak przewidziano w art. 52 dyrektywy 2006/88/WE, wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do tej dyrektywy, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy obejmuje się badaniami stanu zdrowia i pobieraniem próbek zgodnie z sekcją III tabela 2.B, uwzględniając poziom zagrożenia dla danego gospodarstwa w odniesieniu do przeniesienia zakażenia KHV.

Częstotliwość badań stanu zdrowia w kierunku KHVD w odniesieniu do enklaw kategorii I położonych na obszarach kontynentalnych i składających się z przynajmniej jednego gospodarstwa, którego status zdrowotny odnoszący się do KHVD jest zależny od statusu zdrowotnego tej choroby otaczających je wód naturalnych zgodnie z częścią II pkt 2 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, jest zgodna z liczbą podaną w tabeli 2.C dla wysokiego poziomu ryzyka.

W państwach członkowskich, strefach lub enklawach, w których liczba gospodarstw jest ograniczona, a nadzór ukierunkowany tych gospodarstw nie dostarcza wystarczających danych epidemiologicznych, systemy nadzoru do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby obejmują punkty pobierania próbek wybrane zgodnie z wymogami określonymi w pkt I.1.

W takich punktach pobierania próbek dokonuje się badań i poboru próbek w systemie rotacyjnym obejmującym co roku 50 % wszystkich punktów. Pobierania próbek dokonuje się zgodnie z tabelą 2.C zawartą w sekcji III. Próbkę wybiera się, przygotowuje i bada zgodnie z sekcją II, a badania laboratoryjne w kierunku obecności czynnika wywołującego KHVD muszą dać wyniki ujemne.

Status obszaru wolnego od choroby utrzymuje się dopóty, dopóki badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dają wyniki ujemne w odniesieniu do KHVD, przy czym wykluczone musi być wszelkie podejrzenie obecności KHVD zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt III.2.

I.4. Szczególne wymogi odnoszące się do uchylenia środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby przewidzianych w art. 39 dyrektywy 2006/88/WE w celu uzyskania statusu zdrowotnego kategorii III odnoszącego się do KHVD przez państwa członkowskie, strefy lub enklawy posiadające status zdrowotny kategorii V

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do KHVD, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do tej choroby ujętej w wykazie pod następującymi warunkami:

- a) spełniono wymogi określone w pkt I.2.2.1 lit. a), b) i c). Jeśli odłogowanie jest technicznie niemożliwe, dane gospodarstwa obejmuje się alternatywnym środkiem, który daje niemal jednakowe gwarancje usunięcia KHV ze środowiska gospodarstwa;
- b) we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone i wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu/środkom alternatywnym zgodnie z lit. a), położonych w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru odnowiono populację rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I, II lub III odnoszącym się do KHVD;
- c) odnowienia populacji dokonano dopiero po przeprowadzeniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania/środków alternatywnych zgodnie z lit. a).

II. **Metody diagnostyczne i metody pobierania próbek w ramach nadzoru do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD**

II.1. Próbki

Materiałem biologicznym podlegającym badaniu są skrzela i nerki. Można łączyć fragmenty narządów pochodzące od maksymalnie dwóch ryb.

II.2. Metody diagnostyczne w ramach nadzoru do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD

Metodą diagnostyczną do celów uzyskania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD jest łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami diagnostycznymi określonymi w załączniku II część 2 pkt II.

III. **Metody diagnostyczne i metody pobierania próbek w ramach dochodzeń urzędowych do celów potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności KHVD**

III.1. **Próbki**

Materiałem biologicznym podlegającym badaniu są skrzela i nerki. Można łączyć fragmenty narządów pochodzące od maksymalnie dwóch ryb.

III.2. **Metody dochodzenia urzędowego i metody diagnostyczne do celów wykluczenia i potwierdzenia zakażenia KHV**

Jeśli istnieje konieczność potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności KHVD zgodnie z art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, przestrzega się następującej procedury badań, pobierania próbek i prowadzenia testów:

a) dochodzenie urzędowe obejmuje przynajmniej jedno badanie stanu zdrowia i jedno pobranie próbki 10 ryb, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne wskazujące na zakażenie KHV, lub 30 ryb, jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani zmian anatomopatologicznych. Próbkę bada się przy wykorzystaniu metody diagnostycznej określonej w lit. b) zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami diagnostycznymi określonymi w załączniku II część 2 pkt II;

b) obecność zakażenia KHV uznaje się za potwierdzoną, jeśli KHV wykryto przy wykorzystaniu PCR;

podejrzenie obecności KHVD można wykluczyć, jeśli badanie to nie wykazuje dalszych dowodów na obecność KHV.

Tabela 2.A

System nadzoru obowiązujący dla stref i enklaw w dwuletnim okresie kontroli poprzedzającym uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD, jak wskazano w pkt I.2.1

		Liczba badań klinicznych na rok (okres dwóch lat)	Liczba badań laboratoryjnych na rok (okres dwóch lat)	Liczba ryb w próbce
Gospodarstwa/miejsca pobierania próbek	Pierwsze dwa lata okresu nadzoru	2	2	75 ⁽¹⁾
	Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 2			

⁽¹⁾ Próbki pobiera się od takiej liczby ryb, by zapewnić wykrycie KHV przy poziomie ufności 95 %, przy założeniu szacunkowego czynnika chorobowości wynoszącego 5 %.

Tabela 2.B

System nadzoru obowiązujący dla stref i enklaw w czteroletnim okresie kontroli poprzedzającym uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD, jak wskazano w pkt I.2.1

		Liczba badań klinicznych na rok	Liczba badań laboratoryjnych na rok	Liczba ryb w próbce
Gospodarstwa/miejsca pobierania próbek	Pierwsze dwa lata okresu nadzoru	1	1	30
Gospodarstwa/miejsca pobierania próbek	Ostatnie dwa lata okresu nadzoru	2	2	30
	Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 2			

Tabela 2.C

Systemy nadzoru obowiązujące dla stref i enklaw do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD, jak wskazano w pkt I.3

Poziom zagrożenia	Liczba badań stanu zdrowia	Liczba ryb w próbce
Wysoki	2 w roku	30
Średni	1 w roku	30
Niski	1 na 2 lata	30

Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 2

Tabela 2.D

System nadzoru do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do KHVD w państwach członkowskich, strefach lub enklawach, w których liczba gospodarstw jest ograniczona, a nadzór ukierunkowany tych gospodarstw nie dostarcza wystarczających danych epidemiologicznych, jak wskazano w pkt I.3

	Liczba badań klinicznych na rok	Liczba badań laboratoryjnych na rok	Liczba ryb w próbce
Punkty pobierania próbek	1 na 2 lata	1 na 2 lata	30

Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 2

CZĘŚĆ 3

METODY NADZORU I KONTROLI W ODNIESIENIU DO ZAKAŻNEJ ANEMII ŁOSOSIA (ISA)

I. Wymogi w zakresie programów nadzoru i zwalczania do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do ISA oraz zapobiegania zakażeniu wirusem zakaźnej anemii łososia z delecją w regionie HPR

I.1. Wymogi ogólne

Jeśli istnieje wymóg, by badania stanu zdrowia i pobieranie próbek w gospodarstwach przeprowadzane były częściej niż raz w roku zgodnie z częścią I pkt 2 akapit drugi załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, poszczególne badania stanu zdrowia lub poszczególne pobrania próbek odbywają się w możliwie największych odstępach czasu.

Jeśli w populacjach ryb dziko żyjących konieczny jest nadzór ukierunkowany zgodnie z częścią I pkt 2 akapit drugi załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, liczbę i rozmieszczenie geograficzne punktów pobierania próbek ustala się tak, by uzyskać rozsądny stopień pokrycia terytorium państwa członkowskiego, strefy lub enklawy. Punkty pobierania próbek powinny być reprezentatywne dla różnych ekosystemów stanowiących siedlisko podatnych populacji dzikich.

Badania stanu zdrowia pod kątem obecności ryb martwych, o osłabionej kondycji albo zachowujących się nienaturalnie przeprowadza się we wszystkich jednostkach produkcyjnych, takich jak stawy, zbiorniki i sadze. Szczególną uwagę zwraca się na miejsca odpływu wody, w których z powodu prądu wody zwykle gromadzą się ryby o osłabionej kondycji.

Ryby pobierane jako próbki wybiera się w następujący sposób:

- a) wybiera się jedynie ryby w stanie agonialnym lub świeżo padłe, lecz niebędące w stanie rozkładu; przy wyborze preferuje się w szczególności ryby wykazujące niedokrwiłość, zmiany krwotoczne lub inne oznaki kliniczne wskazujące na zaburzenia krążenia;
- b) jeśli wśród gatunków podatnych obecnych w danym miejscu jest łosoś atlantycki, należy wybrać go do badania w pierwszym rzędzie. Jeśli w gospodarstwie rybackim nie ma łososia atlantyckiego, należy pobrać inne gatunki podatne;
- c) jeśli do produkcji ryb wykorzystuje się więcej niż jedno źródło wody, próbka powinna zawierać ryby reprezentujące wszystkie źródła wody zasilające gospodarstwo;
- d) próbka powinna zawierać ryby proporcjonalnie reprezentujące wszystkie jednostki produkcyjne gospodarstwa, takie jak stawy, zbiorniki i sadze, oraz wszystkie roczniki ryb.

I.2. Szczególne wymogi do celów uzyskania statusu zdrowotnego kategorii I w odniesieniu do ISA

I.2.1. Programy nadzoru

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które w odniesieniu do ISA posiadają status zdrowotny kategorii III zgodnie z częścią B załącznika III do dyrektywy 2006/88/WE, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, jeśli wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy, spełniają odpowiednie wymagania określone w załączniku V do tej dyrektywy, a wszystkie te gospodarstwa oraz, o ile wymagane jest to przepisem części I pkt 2 akapit drugi załącznika V do tej dyrektywy, punkty pobierania próbek w populacji ryb dziko żyjących wybrane zgodnie ze wspomnianą częścią poddano następującemu programowi nadzoru:

- a) gospodarstwa lub punkty pobierania próbek były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej dwa kolejne lata, jak przewidziano w sekcji II tabela 3.A;
- b) w ciągu tego dwuletniego okresu badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do ISAV z delecją w regionie HPR i wykluczono wszelkie podejrzenie obecności ISA zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3;
- c) jeśli w trakcie realizacji programu nadzoru potwierdzono obecność ISA w gospodarstwie objętym tym programem nadzoru i w związku z tym cofnięto status zdrowotny kategorii II, przeprowadza się program zwalczania zgodnie z pkt I.2.2.

I.2.2. Programy zwalczania

I.2.2.1. Wymogi ogólne

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do ISA, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, gdy wszystkie gospodarstwa w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte przynajmniej następującym programem zwalczania zgodnym z lit. a)–e):

- a) skutecznie zastosowano minimalne środki zwalczania choroby przewidziane w rozdziale V sekcja 3 dyrektywy 2006/88/WE, a w szczególności w pobliżu gospodarstw, które uznano urzędowo za zakażone ISAV z delecją w regionie HPR lub w przypadku których potwierdzono obecność ISA, ustanowiono obszar zapobiegania rozprzestrzenieniu się choroby, o którym mowa w art. 32 lit. b) wspomnianej dyrektywy, obejmujący strefę ochronną oraz strefę nadzoru.

Obszar zapobiegania rozprzestrzenieniu się choroby zdefiniowano odrębnie dla każdego przypadku przy uwzględnieniu czynników wpływających na ryzyko rozprzestrzenienia się ISA na ryby utrzymywane w gospodarstwie rybackim lub ryby dziko żyjące, takich jak: liczba, odsetek i rozkład śmiertelności ryb znajdujących się w danym gospodarstwie, zakażonych ISAV z delecją w regionie HPR; odległość od sąsiednich gospodarstw i ich gęstość; bliskość rzeźni; gospodarstwa kontaktowe; gatunki występujące w gospodarstwach; praktyki rybackie stosowane w gospodarstwach zarażonych i sąsiednich; stwierdzone warunki hydrodynamiczne i inne czynniki o znaczeniu epidemiologicznym.

Przy ustanawianiu stref ochronnych i stref nadzoru stosuje się następujące minimalne wymogi w odniesieniu do wyznaczania ich granic geograficznych:

- (i) w bezpośrednim sąsiedztwie gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone ISA ustanawia się strefę ochronną, która odpowiada:
 - 1) w strefach przybrzeżnych: obszarowi znajdującemu się w okręgu o promieniu przynajmniej jednego zakresu ruchu wody podczas pływu albo o promieniu przynajmniej 5 km, w zależności od tego, który z nich jest większy, przy czym środek okręgu stanowi gospodarstwo uznane urzędowo za zakażone ISA, lub równoważnemu obszarowi określonemu zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi;
 - 2) w strefach śródlądowych: całemu obszarowi zlewni gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone ISA; właściwy organ może ograniczyć obszar strefę do części obszaru zlewni, o ile nie stanowi to zagrożenia dla zapobiegania rozprzestrzenianiu się ISA;
- (ii) poza granicą strefy ochronnej ustanawia się strefę nadzoru, która odpowiada:
 - 1) w strefach przybrzeżnych: otaczającemu strefę ochronną obszarowi obejmującemu nakładające się strefy zakresu ruchu wody podczas pływu; otaczającemu strefę ochronną obszarowi znajdującemu się w okręgu o promieniu 10 km, licząc od środka strefy ochronnej; lub równoważnemu obszarowi zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi; lub
 - 2) w strefach śródlądowych: rozszerzonemu obszarowi poza granicą ustanowionej strefy ochronnej;
- d) wszystkie gospodarstwa, które utrzymują w obrębie strefy ochronnej gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, a których nie uznano urzędowo za zakażone ISA, podlegają urzędowemu dochodzeniu obejmującemu przynajmniej następujące elementy:
 - (i) pobranie do badań próbek składających się z 10 ryb w stanie agonicznym, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne wskazujące na zakażenie ISA, lub z przynajmniej 30 ryb, jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani zmian anatomopatologicznych;
 - (ii) jedno badanie stanu zdrowia; w gospodarstwach, w których badania, o których mowa w ppkt (i) dały wyniki ujemne, badania stanu zdrowia prowadzi się nadal raz w miesiącu do zniesienia strefy ochronnej zgodnie z pkt I.2.2.1. lit. c);
- d) wszystkie gospodarstwa, które uznano urzędowo za zakażone ISAV z delecją w regionie HPR lub w przypadku których potwierdzono obecność ISA, podlegają opróżnieniu ze zwierząt, oczyszczeniu, zdezynfekowaniu i odłogowaniu przez okres przynajmniej trzech miesięcy. Strefę ochrony i strefę nadzoru można znieść, gdy wszystkie gospodarstwa w obrębie strefy ochrony zostały opróżnione ze zwierząt, oczyszczone, zdezynfekowane i poddane zsynchronizowanemu odłogowaniu przez okres wynoszący przynajmniej sześć tygodni.

Po zakończeniu odłogowania w gospodarstwie uznanym urzędowo za zakażone strefy ochronne przekształca się w strefy nadzoru.

Właściwy organ może podjąć decyzję o nałożeniu na inne gospodarstwa w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru wymogu opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, dezynfekcji i odłogowania. Długość okresu odłogowania w takich gospodarstwach ustalana jest przez właściwy organ na podstawie indywidualnej oceny ryzyka;
- e) we wszystkich gospodarstwach, które uznano urzędowo za zakażone ISAV z delecją w regionie HPR lub w przypadku których potwierdzono obecność ISA, i wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru populację odnawia się rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do ISA.

Odnowienie populacji przeprowadza się dopiero po dokonaniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania zgodnie z pkt I.2.2.1 lit. c);
- f) wszystkie gospodarstwa w obrębie państwa członkowskiego, strefy lub enklawy objętych programem zwalczania utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE oraz, gdy wymagany jest nadzór w populacjach ryb dziko żyjących, punkty pobierania próbek wybrane zgodnie z pkt I.1 są następnie objęte systemem nadzoru określonym w pkt I.2.1.

I.2.2.2. Wymogi dla odzyskania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do enklaw kontynentalnych obejmujących pojedyncze gospodarstwo uznane wcześniej za gospodarstwo o statusie zdrowotnym kategorii I

Enklawa kontynentalna obejmująca pojedyncze gospodarstwo posiadające status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do ISA, której status zdrowotny jest niezależny od otaczających ją wód naturalnych zgodnie z częścią II pkt 3 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE i której cofnięto status zdrowotny kategorii I zgodnie z art. 53 ust. 3 wspomnianej dyrektywy, może odzyskać ten status natychmiast po potwierdzeniu przez właściwy organ, że spełnia ona następujące warunki:

- a) została ona opróżniona ze zwierząt, oczyszczona, zdezynfekowana i poddana odłogowaniu; długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej sześć tygodni;
- b) populację w enklawie odnowiono rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do ISA.

I.3. Minimalne środki zwalczania choroby do celów utrzymania statusu kategorii I w odniesieniu do ISA

Jeśli do utrzymania statusu zdrowotnego kategorii I wymagany jest nadzór ukierunkowany, jak przewidziano w art. 52 dyrektywy 2006/88/WE, wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do tej dyrektywy, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy obejmuje się badaniami stanu zdrowia i pobieraniem próbek zgodnie z sekcją II tabela 3.B ⁽¹⁾, uwzględniając poziom zagrożenia dla danego gospodarstwa w odniesieniu do przeniesienia zakażenia ISA.

Gdy określa się częstotliwość badań stanu zdrowia pod kątem ISA w enklawach o statusie zdrowotnym kategorii I, które są położone na obszarach kontynentalnych i których status zdrowotny odnoszący się do ISA jest zależny od statusu zdrowotnego otaczających tę enklawę wód naturalnych będących siedliskiem łososia atlantyckiego (*Salmo salar*), ryzyko przeniesienia zakażenia ISA uznaje się za wysokie.

Status obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do ISA można utrzymać dopóty, dopóki badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dają wyniki ujemne w odniesieniu do ISAV z delecją w regionie HPR, przy czym wykluczono wszelkie podejrzenie obecności ISA zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3.

I.4. Szczególne wymogi do celów uzyskania statusu zdrowotnego kategorii III w odniesieniu do ISAV z delecją w regionie HPR przez państwa członkowskie, strefy lub enklawy posiadające uprzednio status zdrowotny kategorii V

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do ISA, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii III pod następującymi warunkami:

- a) spełniono wymogi określone w pkt I.2.2.1 lit. a), b) i c). Jeśli odłogowanie jest technicznie niemożliwe, gospodarstwa obejmuje się alternatywnym środkiem, który daje niemal jednakowe gwarancje usunięcia ISAV ze środowiska gospodarstwa;
- b) we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone i wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu lub środkom alternatywnym zgodnie z lit. a), położonych w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru odnowiono populację rybami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I, II lub III odnoszącym się do ISA;
- c) odnowienia populacji dokonano dopiero po przeprowadzeniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania/środków alternatywnych zgodnie z lit. a).
- d) w okresie dwóch lat od zakończenia środków, o których mowa w lit. a), b) i c) nie potwierdzono przypadku ISAV z delecją w regionie HPR, a podejrzenia zaistniałe w tym okresie wykluczono zgodnie z procedurami ustanowionymi w pkt II.3.

⁽¹⁾ Nie stosuje się do gospodarstw, które prowadzą wyłącznie chów pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) lub troci wędrowniej (*Salmo trutta*) i których zaopatrzenie w wodę opiera się wyłącznie na źródłach wody słodkiej niebędącej siedliskiem łososia atlantyckiego (*Salmo salar*).

II. Metody diagnostyczne i dochodzenia urzędowe

II.1. Próbkki

Materiał biologiczny podlegający badaniu:

- a) Histologia: nerka – część głowowa, wątroba, serce, trzustka, jelito, śledziona i skrzel;
- b) Immunohistochemia: nerka – część środkowa i serce włącznie z zastawkami i *bulbus arteriosus*;
- c) analiza RT-qPCR: nerka – część środkowa i serce;
- d) Hodowla wirusa: nerka – część środkowa, serce, wątroba i śledziona.

Można łączyć fragmenty narządów pochodzące od maksymalnie pięciu ryb.

II.2. Metody diagnostyczne do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do ISA

Metodą diagnostyczną stosowaną do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do ISA zgodnie z pkt I.2 oraz I.3 jest RT-qPCR z następnym sekwencjonowaniem próbek dodatnich, zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami określonymi w załączniku II część 3.

Jeśli badanie RT-qPCR dało wynik dodatni, przed wprowadzeniem wstępnych środków zwalczania choroby, o których mowa w art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, bada się kolejne próbki.

Próbki te bada się w następujący sposób zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami określonymi w załączniku II część 3:

- a) badanie przesiewowe próbek przy wykorzystaniu RT-qPCR, w tym sekwencjonowanie genu HE w celu sprawdzenia delekcji w obszarze HPR;
oraz
- b) badanie preparatów tkankowych przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał przeciwko ISAV (tj. metody immunohistochemiczne na skrawkach utrwalonych lub test immunofluorescencji pośredniej na odciskach tkankowych); lub
- c) izolacja i identyfikacja ISAV w linii komórkowej z przynajmniej jednej próbki z jakiegokolwiek ryby pobranej w gospodarstwie jako próbka;

II.3. Metody dochodzenia urzędowego i metody diagnostyczne do celów wykluczenia lub potwierdzenia obecności ISA

Jeśli istnieje konieczność potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności ISA zgodnie z art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, przestrzega się następującej procedury badań, pobierania próbek i prowadzenia testów:

- a) dochodzenie urzędowe, które obejmuje przynajmniej jedno badanie stanu zdrowia i jedno pobranie próbki 10 ryb w stanie agonalnym, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub objawy pośmiertne wskazujące na zakażenie ISA. Jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani pośmiertnych wskazujących na zakażenie ISA, po badaniach stanu zdrowia następuje ukierunkowane pobieranie próbek przynajmniej 30 ryb w stanie agonalnym lub świeżo padłych w normalnym stanie zgodnie z pkt I.1. Próbki bada się zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w lit. b);
- b) jeśli badanie RT-qPCR w kierunku ISAV z delecją w regionie HPR dało wynik dodatni, przed wprowadzeniem wstępnych środków zwalczania choroby, o których mowa w art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, bada się kolejne próbki. Przypadek podejrzenia zakażenia ISA potwierdza się zgodnie z następującymi kryteriami przy wykorzystaniu szczegółowych metod i procedur określonych w załączniku II część 3:
 - (i) wykrywanie ISAV przy wykorzystaniu RT-qPCR, w tym sekwencjonowanie genu HE w celu sprawdzenia delekcji w obszarze HPR, oraz wykrywanie ISAV w preparatach tkankowych przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał przeciwko ISAV (tj. metody immunohistochemiczne na skrawkach utrwalonych lub test immunofluorescencji pośredniej na odciskach tkankowych);

lub

- (ii) wykrywanie ISAV przy wykorzystaniu RT-qPCR, w tym sekwencjonowanie genu HE w celu sprawdzenia delekcji w obszarze HPR; oraz

izolacja i identyfikacja ISAV w linii komórkowej z przynajmniej jednej próbki z jakiegokolwiek ryby z gospodarstwa;

- c) jeśli stwierdzono występowanie zmian klinicznych lub makroskopowych patologicznych wskazujących na zakażenie ISA bądź jeśli otrzymano wyniki badania histopatologicznego wskazujące na takie zakażenie, ustalenia takie należy potwierdzić wykrywaniem wirusa przy wykorzystaniu dwóch metod diagnostycznych o niezależnych zasadach wykrywania, takich jak RT-qPCR i metoda immunohistochemiczna zgodnie z załącznikiem II część 3.

Podezrzenie ISA można wykluczyć, jeśli stwierdzono, że testy i badania prowadzone przez okres 12 miesięcy od dnia powzięcia podezrzenia nie przyniosły kolejnych dowodów obecności ISA.

Tabela 3.A

System nadzoru obowiązujący dla stref i enklaw w dwuletnim okresie kontroli poprzedzającym uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do ISA, jak wskazano w pkt I.2.1

Rok, w którym prowadzono nadzór	Liczba badań stanu zdrowia na rok (okres dwóch lat)	Liczba badań laboratoryjnych na rok (okres dwóch lat)	Liczba ryb pobieranych rocznie do próby
Rok 1	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾
Rok 2	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Próbki pobiera się, przechowuje i bada w ciągu dwóch jednomiesięcznych okresów badań na rok (mianowicie wiosną i jesienią) lub w odpowiednich okresach zgodnie z uwarunkowaniami praktycznymi.

⁽²⁾ Maksymalna liczba ryb, z których sporządza się próbkę łączoną: 5.

Tabela 3.B

Systemy nadzoru obowiązujące dla stref i enklaw do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do ISA, jak wskazano w pkt I.3 ⁽²⁾

Poziom zagrożenia	Liczba badań stanu zdrowia na rok	Liczba badań laboratoryjnych na rok	Liczba ryb pobieranych rocznie do próby
Wysoki	2	2 ⁽¹⁾	2 * 30
Średni	1	1 ⁽¹⁾	30
Niski	1 na 2 lata	1 na 2 lata	30 na 2 lata

⁽¹⁾ Próbki pobiera się i bada w ciągu dwóch jednomiesięcznych okresów badań na rok (mianowicie wiosną i jesienią) lub w odpowiednich okresach zgodnie z uwarunkowaniami praktycznymi.

⁽²⁾ Nie stosuje się do gospodarstw, które prowadzą wyłącznie chów pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) lub troci wędrowej (*Salmo trutta*) i których zaopatrzenie w wodę opiera się wyłącznie na źródłach wody słodkiej niebędącej siedliskiem łososa atlantyckiego (*Salmo salar*).

CZĘŚĆ 4

METODY NADZORU I KONTROLI W ODNIESIENIU DO INWAZJI WYWOŁANEJ PRZEZ MARTEILIA REFRINGENS

- I. **Wymogi w zakresie programów nadzoru i zwalczania do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens***

- I.1. Wymogi ogólne

Badania stanu zdrowia oraz, w stosownych przypadkach, pobieranie próbek do badań laboratoryjnych przeprowadza się w okresie roku, w którym występowanie przedmiotowego pasożyta w państwie członkowskim, strefie lub enklawie jest, zgodnie z doświadczeniem, maksymalne. Jeśli tego typu dane nie są dostępne, pobieranie próbek przeprowadza się bezpośrednio po przekroczeniu przez temperaturę wody granicy 17 °C.

Jeśli próbki mięczaków pobiera się zgodnie z wymogami określonymi w części 4, stosuje się następujące kryteria:

- a) jeśli w jednostce produkcyjnej lub na obszarze produkcyjnym występują *Ostrea* spp. i *Mytilus* spp., zwierzęta obu rodzajów pobiera się do próbki po równo. Jeśli występuje tylko jeden ze wspomnianych rodzajów, do próbki pobiera się ten rodzaj. Jeśli nie występuje ani rodzaj *Ostrea*, ani *Mytilus*, próbka musi być reprezentatywna dla wszystkich pozostałych gatunków podatnych, które tam występują;
- b) jeśli w jednostkach produkcyjnych występują mięczaki o osłabionej kondycji, z rozchyloną muszlą lub świeżo śnięte ale niebędące w stanie rozkładu, takie mięczaki wybiera się w pierwszym rzędzie. Jeśli takie mięczaki nie występują, wybrane mięczaki obejmują najstarsze zdrowe zwierzęta;
- c) przy pobieraniu próbek w gospodarstwach utrzymujących mięczaki, w których do produkcji mięczaków wykorzystuje się więcej niż jedno źródło wody, próbka obejmuje mięczaki reprezentujące wszystkie źródła wody zasilające gospodarstwo, tak by wszystkie części gospodarstwa były proporcjonalnie reprezentowane w próbce;
- d) przy pobieraniu próbek na obszarze chowu mięczaków próbka powinna zawierać mięczaki z wystarczającej ilości punktów pobierania próbek, tak by wszystkie części obszaru chowu mięczaków były proporcjonalnie reprezentowane w próbce; Głównymi czynnikami, które uwzględnia się przy wyborze tych punktów pobierania próbek, są: wcześniejsze punkty pobierania próbek, w których stwierdzono obecność *Marteilia refringens*, gęstość obsady, przepływy wody, obecność gatunków podatnych, obecność gatunków wektorów, batymetria i praktyki zarządzania zasobami akwakultury. Pobieraniem próbek obejmuje się naturalne kolonie mięczaków.

I.2. Szczególne wymogi do celów uzyskania statusu zdrowotnego kategorii I w odniesieniu do *Marteilia refringens*

I.2.1. Programy nadzoru

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, gdy wszystkie gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte przynajmniej następującym programem nadzoru obejmującym badania stanu zdrowia oraz pobieranie próbek do badań:

Dwuletni program nadzoru:

- a) Gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej dwa kolejne lata, jak przewidziano w sekcji II tabela 4.A.
- b) w ciągu tego dwuletniego okresu badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do *Marteilia refringens* i wykluczono wszelkie podejrzenie obecności *Marteilia refringens* zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3;
- c) jeśli próbka ma zawierać *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* lub *Mytilus galloprovincialis* pochodzące z państwa członkowskiego, strefy lub enklawy o statusie zdrowotnym kategorii I, do próbki pobiera się zwierzęta wprowadzone do gospodarstwa lub obszaru chowu mięczaków nie później niż w okresie wiosennym bezpośrednio poprzedzającym okres, w którym przeprowadzany jest program nadzoru.

I.2.2. Programy zwalczania

Uznaje się, że wyeliminowanie *Marteilia refringens* w większości przypadków jest niemożliwe, ale jeśli państwo członkowskie uzna je za wykonalne, stosuje się następujący model programu zwalczania:

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, gdy wszystkie gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte przynajmniej następującym programem zwalczania:

- a) skutecznie zastosowano środki przewidziane w rozdziale V sekcja 3 dyrektywy 2006/88/WE, a w szczególności w pobliżu gospodarstw lub obszarów chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens* ustanowiono obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby, o którym mowa w art. 32 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE, obejmujący strefę ochronną oraz strefę nadzoru.

Obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby definiuje się odrębnie dla każdego przypadku przy uwzględnieniu czynników wpływających na ryzyko rozprzestrzenienia się *Marteilia refringens*, takich jak: liczba, wiek, odsetek i rozkład śmiertelności mięczaków w danym gospodarstwie lub obszarze chowu mięczaków z inwazją *Marteilia refringens* z uwzględnieniem mięczaków dziko żyjących; odległość od sąsiednich gospodarstw lub obszarów chowu mięczaków oraz ich gęstość, z uwzględnieniem mięczaków dziko żyjących; bliskość zakładów przetwarzania oraz gospodarstw kontaktowych lub obszarów chowu mięczaków; gatunki, zwłaszcza gatunki podatne lub gatunki wektory, występujące w gospodarstwach lub na obszarach chowu mięczaków; praktyki rybackie stosowane w zarażonych i sąsiednich gospodarstwach oraz obszarach chowu mięczaków; stwierdzone warunki hydrodynamiczne i inne czynniki o znaczeniu epidemiologicznym.

Przy ustanawianiu stref ochronnych i stref nadzoru stosuje się następujące wymagania minimalne:

- (i) w bezpośrednim sąsiedztwie gospodarstw lub obszarów chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens* ustanawia się strefę ochronną, która odpowiada obszarowi określoneemu zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi;
 - (ii) poza granicą strefy ochronnej ustanawia się strefę nadzoru, która odpowiada obszarowi otaczającemu strefę ochronną określoneemu zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi;
- b) wszystkie gospodarstwa i obszary chowu mięczaków, które utrzymują w obrębie strefy ochronnej gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, a których nie uznano urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, podlegają urzędowemu dochodzeniu obejmującemu przynajmniej pobrania do badań próbek 150 mięczaków po rozpoczęciu okresu transmisji *Marteilia refringens*. Jeśli okres transmisji nie jest znany, pobieranie próbek rozpoczyna się w okresie po osiągnięciu przez wodę temperatury przekraczającej 17 °C;
- c) wszystkie gospodarstwa i obszary chowu mięczaków uznane urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens* podlegają opróżnieniu ze zwierząt, odłogowaniu oraz, w miarę możliwości, oczyszczeniu oraz zdezynfekowaniu.

Długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej:

- (i) dwa miesiące w przypadku gospodarstw i obszarów chowu mięczaków o ograniczonych powiązaniach z otaczającymi je wodami, takich jak wylęgarnie i miejsca podchowu;
- (ii) dwa miesiące w przypadku gospodarstw i obszarów chowu mięczaków o nieograniczonych powiązaniach z otaczającymi je wodami, o ile mięczaki z inwazją należące do gatunków podatnych oraz te z mięczaków gatunków podatnych, które mają związki epidemiologiczne z zakażonym gospodarstwem lub obszarem chowu mięczaków, zostały odłowione lub usunięte przed okresem roku, w którym występowanie *Marteilia refringens* zgodnie z doświadczeniem jest maksymalne lub, jeśli okres taki nie jest znany, przed okresem, w którym temperatura wody przekracza 17 °C;
- (iii) czternaście miesięcy w przypadku gospodarstw i obszarów chowu mięczaków o nieograniczonych powiązaniach z otaczającymi je wodami oraz obszarów chowu mięczaków, o ile mięczaki z inwazją należące do gatunków podatnych oraz te z mięczaków gatunków podatnych, które mają związki epidemiologiczne z zakażonym gospodarstwem lub obszarem chowu mięczaków, nie zostały odłowione ani usunięte przed okresem roku, w którym występowanie *Marteilia refringens* zgodnie z doświadczeniem jest maksymalne lub, jeśli dane takie nie są znane, przed okresem, w którym temperatura wody przekracza 17 °C.

Po opróżnieniu ze zwierząt wszystkich gospodarstw i obszarów chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone przeprowadza się zsynchronizowane odłogowanie trwające przynajmniej cztery tygodnie.

Właściwy organ może podjąć decyzję o nałożeniu na inne gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru wymogu, w zależności od przypadku, opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, dezynfekcji i odłogowania. Długość okresu odłogowania ustalana jest przez właściwy organ na podstawie indywidualnej oceny ryzyka;

- d) we wszystkich gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone i wszystkich innych gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków poddanych odłogowaniu w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru populację odnawia się mięczakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*.

Odnowienie populacji przeprowadza się dopiero po dokonaniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania zgodnie z pkt I.2.2 lit. c);

- e) wszystkie gospodarstwa i obszary chowu mięczaków w obrębie państwa członkowskiego, strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, objęte programem zwalczania, poddaje się następnie systemowi nadzoru określonego w pkt I.2.1.

I.3. Szczególne wymogi do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby (kategoria I) w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*

Jeśli do utrzymania statusu zdrowotnego kategorii I wymagany jest nadzór ukierunkowany, jak przewidziano w art. 52 dyrektywy 2006/88/WE, wszystkie gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy obejmuje się badaniami stanu zdrowia i pobieraniem próbek zgodnie z sekcją II tabela 4.B, uwzględniając poziom zagrożenia dla danego gospodarstwa lub obszaru chowu mięczaków w odniesieniu do przeniesienia inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*.

Status obszaru wolnego od choroby można utrzymać dopóty, dopóki badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dają wyniki ujemne w odniesieniu do *Marteilia refringens*, przy czym wykluczone jest wszelkie podejrzenie obecności *Marteilia refringens* zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3.

I.4. Wymogi odnoszące się do uchylenia środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby przewidzianych w art. 39 dyrektywy 2006/88/WE (zmiana kategorii statusu zdrowotnego z V na III) w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do tej choroby ujętej w wykazie pod następującymi warunkami:

- a) spełniono wymogi określone w pkt I.2.2 lit. a), b) i c). Jeśli odłogowanie jest technicznie niemożliwe, gospodarstwa obejmuje się alternatywnym środkiem, który daje niemal jednakowe gwarancje usunięcia *Marteilia refringens* ze środowiska gospodarstwa;
- b) we wszystkich gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone i wszystkich innych gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków poddanych odłogowaniu/środkom alternatywnym zgodnie z lit. a). w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru populację odnawia się mięczakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I, II lub III odnoszącym się do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*;
- c) odnowienia populacji dokonano dopiero po przeprowadzeniu we wszystkich gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania lub środków alternatywnych zgodnie z lit. a);
- d) w okresie dwóch lat od zakończenia środków, o których mowa w lit. a), b) i c), nie potwierdzono żadnego przypadku inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, a podejrzenia zaistniałe w tym okresie wykluczono zgodnie z procedurami ustanowionymi w pkt II.3.

II. **Metody diagnostyczne i dochodzenia urzędowe**

II.1. Próbki

Do laboratorium przekazuje się całe zwierzę w celu przeprowadzenia badań diagnostycznych przewidzianych w pkt II.2 i II.3.

II.2. Metody diagnostyczne do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*

Metodami diagnostycznymi stosowanymi do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami określonymi w załączniku II część 4, są histopatologia, odciski tkankowe lub PCR.

II.3. Metody dochodzenia urzędowego i metody diagnostyczne do celów wykluczenia lub potwierdzenia inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*

Jeśli istnieje konieczność potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens* zgodnie z art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, przestrzega się następującej procedury badań, pobierania próbek i prowadzenia testów:

- a) dochodzenie urzędowe obejmuje przynajmniej pobranie jednej próbki składającej się z 30 mięczaków należących do gatunków podatnych, jeśli podejrzenie opiera się na sprawozdaniu o umieralności, albo – jeśli nie opiera się na takim sprawozdaniu – z 150 mięczaków należących do gatunków podatnych po rozpoczęciu okresu transmisji *Marteilia refringens*. Jeśli okres transmisji nie jest znany, pobieranie próbek rozpoczyna się w okresie po osiągnięciu przez wodę temperatury przekraczającej 17 °C;
- b) Próbkę bada się przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w ppkt (i) zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami diagnostycznymi określonymi w załączniku II część 4 sekcja I:
 - (i) obecność *Marteilia refringens* uznaje się za potwierdzoną, jeśli wyniki dodatnie z histopatologii, odcisków tkankowych lub hybrydyzacji *in situ* łączą się z wynikami dodatnimi z PCR uzupełnionego sekwencjonowaniem;
 - (ii) podejrzenie inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens* można wykluczyć, jeśli badania, o których mowa w ppkt (i), nie przyniosły kolejnych dowodów na obecność *Marteilia refringens*.

Tabela 4.A

System nadzoru obowiązujący dla państw stref i enklaw w okresie kontroli poprzedzającym uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, jak wskazano w pkt I.2.1

	Liczba badań stanu zdrowia na rok	Liczba badań laboratoryjnych na rok	Liczba mięczaków w próbce
Gospodarstwa/obszary chowu mięczaków	1	1	150

Tabela 4.C

Systemy nadzoru obowiązujące dla państw członkowskich, stref i enklaw do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, jak wskazano w pkt I.3

Poziom zagrożenia	Liczba badań stanu zdrowia	Liczba badań laboratoryjnych	Liczba mięczaków w próbce
Wysoki	1 w roku	1 na 2 lata	150
Średni	1 na 2 lata	1 na 2 lata	150
Niski	1 na 2 lata	1 na 4 lata	150

CZĘŚĆ 5

METODY NADZORU I KONTROLI W ODNIESIENIU DO INWAZJI WYWOŁANEJ PRZEZ *BONAMIA OSTREAE*

- I. Wymogi w zakresie programów nadzoru lub zwalczania do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*
- I.1. Wymogi ogólne

Badania stanu zdrowia oraz, w stosownych przypadkach, pobieranie próbek z jednostek produkcyjnych przeprowadza się w okresie roku, w którym występowanie *Bonamia ostreae* w państwie członkowskim, strefie lub enklawie jest, zgodnie z doświadczeniem, maksymalne. Jeśli tego typu dane nie są dostępne, pobieranie próbek przeprowadza się zimą lub wczesną wiosną.

Jeśli próbki mięczaków pobiera się zgodnie z wymogami określonymi w części 5, stosuje się następujące kryteria:

- a) jeśli występują *Ostrea edulis*, do pobrania próbki wybiera się wyłącznie ostrygi tego gatunku. Jeśli *Ostrea edulis* nie występują, próbka musi być reprezentatywna dla wszystkich pozostałych gatunków podatnych, które tam występują;
- b) jeśli występują mięczaki o osłabionej kondycji, z rozchyloną muszlą lub świeżo śnięte, ale niebędące w stanie rozkładu, takie mięczaki wybiera się w pierwszym rzędzie. Jeśli takie mięczaki nie występują, wybrane mięczaki obejmują najstarsze zdrowe zwierzęta;
- c) przy pobieraniu próbek w gospodarstwach, w których do produkcji mięczaków wykorzystuje się więcej niż jedno źródło wody, próbka obejmuje mięczaki reprezentujące wszystkie źródła wody zasilające gospodarstwo, tak by wszystkie części gospodarstwa były proporcjonalnie reprezentowane w próbce;
- d) przy pobieraniu próbek na obszarze chowu mięczaków próbka obejmuje mięczaki z wystarczającej ilości punktów pobierania próbek. Głównymi czynnikami, które uwzględnia się przy wyborze tych punktów pobierania próbek, są: wcześniejsze punkty, w których stwierdzono *Bonamia ostreae*, gęstość obsady, przepływy wody, obecność gatunków podatnych, obecność gatunków wektorów, batymetria i praktyki zarządzania zasobami akwakultury. Pobieraniem próbek obejmuje się naturalne kolonie mięczaków w obrębie obszarów chowu lub do nich przylegające.

I.2. Szczególne wymogi do celów uzyskania statusu zdrowotnego kategorii I w odniesieniu do *Bonamia ostreae*

I.2.1. Programy nadzoru

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do *Bonamia ostreae*, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, gdy wszystkie gospodarstwa w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte przynajmniej następującym programem nadzoru obejmującym badania stanu zdrowia oraz pobieranie próbek do badań:

Dwuletni program nadzoru:

- a) Gospodarstwa i obszary chowu mięczaków utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej dwa kolejne lata, jak przewidziano w tabeli 5.A;
- b) w ciągu tego dwuletniego okresu badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do *Bonamia ostreae* i wykluczono wszelkie podejrzenie obecności *Bonamia ostreae* zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3;
- c) jeśli próbka ma zawierać *Ostrea edulis* pochodzące z państwa członkowskiego, strefy lub enklawy o statusie zdrowotnym kategorii I, do próbki pobiera się zwierzęta wprowadzone do gospodarstwa lub obszaru chowu mięczaków nie później niż w okresie jesiennym bezpośrednio poprzedzającym okres, w którym przeprowadzany jest program nadzoru.

I.2.2. Programy zwalczania

Uznaje się, że wyeliminowanie *Bonamia ostreae* w większości przypadków jest niemożliwe, ale jeśli państwo członkowskie uzna je za wykonalne, stosuje się następujący model programu zwalczania:

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do *Bonamia ostreae*, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, gdy wszystkie gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte przynajmniej następującym programem zwalczania:

- a) skutecznie zastosowano minimalne środki zwalczania choroby przewidziane w rozdziale V sekcja 3 dyrektywy 2006/88/WE, a w szczególności w pobliżu gospodarstw lub obszarów chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* ustanowiono obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby, o którym mowa w art. 32 lit. b) wspomnianej dyrektywy, obejmujący strefę ochronną oraz strefę nadzoru.

Obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby definiuje się odrębnie dla każdego przypadku przy uwzględnieniu czynników wpływających na ryzyko rozprzestrzenienia się przedmiotowej choroby ujętej w wykazie, takich jak: liczba, odsetek i rozkład śmiertelności mięczaków w danym gospodarstwie lub obszarze chowu mięczaków z inwazją *Bonamia ostreae* z uwzględnieniem mięczaków dziko żyjących; odległość od i sąsiednich gospodarstw lub obszarów chowu mięczaków oraz ich gęstość, z uwzględnieniem mięczaków dziko żyjących; bliskość zakładów przetwarzania oraz gospodarstw kontaktowych lub obszarów chowu mięczaków; gatunki występujące w gospodarstwach lub na obszarach chowu mięczaków, zwłaszcza gatunki podatne lub gatunki wektory; praktyki rybackie stosowane w zarażonych i sąsiednich gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków; stwierdzone warunki hydrodynamiczne i inne czynniki o znaczeniu epidemiologicznym.

Przy ustanawianiu stref ochronnych i stref nadzoru stosuje się następujące wymagania minimalne:

- (i) w bezpośrednim sąsiedztwie gospodarstw lub obszarów chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* ustanawia się strefę ochronną, która odpowiada obszarowi określoneemu zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi;
 - (ii) poza granicą strefy ochronnej ustanawia się strefę nadzoru, która odpowiada obszarowi otaczającemu strefę ochronną określonemu zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi;
- b) wszystkie gospodarstwa i obszary chowu mięczaków, które utrzymują w obrębie strefy ochronnej gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, a których nie uznano urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*, podlegają urzędowemu dochodzeniu obejmującemu przynajmniej pobranie do badań próbek 150 mięczaków należących do gatunków podatnych po rozpoczęciu okresu transmisji *Bonamia ostreae*. Jeśli okres transmisji nie jest znany, pobieranie próbek rozpoczyna się zimą lub wczesną wiosną;
- c) wszystkie gospodarstwa i obszary chowu mięczaków uznane urzędowo za zakażone w wyniku inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* podlegają opróżnieniu ze zwierząt, odłogowaniu oraz, w miarę możliwości, oczyszczeniu oraz zdezynfekowaniu. Długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej sześć miesięcy.

Po opróżnieniu ze zwierząt wszystkich gospodarstw lub obszarów chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone przeprowadza się zsynchronizowane odłogowanie trwające przynajmniej cztery tygodnie.

Właściwy organ może podjąć decyzję o nałożeniu na inne gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru wymogu, w zależności od przypadku, opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, dezynfekcji i odłogowania. Długość okresu odłogowania ustalana jest przez właściwy organ na podstawie indywidualnej oceny ryzyka;

- d) we wszystkich gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone i wszystkich innych gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków poddanych odłogowaniu w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru populację odnawia się mięczakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*. Odnowienie populacji przeprowadza się dopiero po dokonaniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania zgodnie z pkt I.2.2 lit. c);
- e) wszystkie gospodarstwa i obszary chowu mięczaków w obrębie państwa członkowskiego, strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, objęte programem zwalczania, poddaje się następnie programowi nadzoru określonemu w pkt I.2.
- I.3. Szczególne wymogi do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby (kategoria I) w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*

Jeśli do utrzymania statusu zdrowotnego kategorii I wymagany jest nadzór ukierunkowany, jak przewidziano w art. 52 dyrektywy 2006/88/WE, wszystkie gospodarstwa lub obszary chowu mięczaków utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do tej dyrektywy, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy obejmuje się badaniami stanu zdrowia i pobieraniem próbek zgodnie z sekcją II tabela 5.B, uwzględniając poziom zagrożenia dla danego gospodarstwa lub obszaru chowu mięczaków w odniesieniu do przeniesienia inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*.

Status obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* można utrzymać dopóty, dopóki badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dają wyniki ujemne w odniesieniu do *Bonamia ostreae*, przy czym wykluczono wszelkie podejrzenie obecności inwazji *Bonamia ostreae* zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3.

- I.4. Wymogi odnoszące się do uchylenia środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby przewidzianych w art. 39 dyrektywy 2006/88/WE (zmiana kategorii statusu zdrowotnego z V na III) w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do tej choroby pod następującymi warunkami:

- a) spełniono wymogi określone w pkt I.2.2 lit. a), b) i c). Jeśli odłogowanie jest technicznie niemożliwe, gospodarstwa obejmuje się alternatywnym środkiem, który daje niemal jednakowe gwarancje usunięcia *Bonamia ostreae* ze środowiska gospodarstwa;
- b) we wszystkich gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone i wszystkich innych gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków poddanych odłogowaniu/środkom alternatywnym zgodnie z lit. a). w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru populację odnawia się mięczakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I, II lub III odnoszącym się do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*;
- c) odnowienia populacji dokonano dopiero po przeprowadzeniu we wszystkich gospodarstwach lub obszarach chowu mięczaków uznanych urzędowo za zakażone opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania/środków alternatywnych zgodnie z lit. a);
- d) w okresie dwóch lat od zakończenia środków, o których mowa w lit. a), b) i c), nie potwierdzono żadnego przypadku inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*, a podejrzenia zaistniałe w tym okresie wykluczono zgodnie z procedurami ustanowionymi w pkt II.3.

II. Metody i kryteria diagnostyczne

II.1. Próbkki

Do laboratorium przekazuje się całe zwierzę w celu przeprowadzenia badań diagnostycznych przewidzianych w pkt II.2 i II.3.

II.2. Metody diagnostyczne do celów uzyskania lub utrzymania status obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*

Metodami diagnostycznymi stosowanymi do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* są histopatologia, odciski tkankowe lub PCR. Przy stosowaniu tych metod diagnostycznych stosuje się odpowiadające im szczegółowe metody i procedury określone w załączniku II część 5.

II.3. Kryteria diagnostyczne do celów potwierdzenia obecności lub wykluczenia podejrzenia inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*

Jeśli istnieje konieczność potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* zgodnie z art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, przestrzega się następującej procedury badań, pobierania próbek i prowadzenia testów:

dochodzenie urzędowe obejmuje przynajmniej pobranie po rozpoczęciu okresu transmisji *Bonamia ostreae* jednej próbki składającej się z 30 mięczaków należących do gatunków podatnych, jeśli podejrzenie opiera się na sprawozdaniu o umieralności, albo – jeśli nie opiera się na takim sprawozdaniu – ze 150 mięczaków należących do gatunków podatnych. Jeśli okres transmisji nie jest znany, pobieranie próbek rozpoczyna się zimą lub wczesną wiosną. Próbkki bada się przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w ppkt (i) zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami diagnostycznymi określonymi w załączniku II część 5 pkt I.

- (i) obecność *Bonamia ostreae* uznaje się za potwierdzoną, jeśli wyniki dodatnie z histopatologii, odcisków tkankowych lub hybrydyzacji *in situ* łączą się z wynikami dodatnimi z PCR uzupełnionego sekwencjonowaniem zgodnie z zatwierdzonymi metodami i procedurami określonymi w załączniku II część 5;
- (ii) podejrzenie inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* wyklucza się, jeśli badania te nie przyniosły kolejnych dowodów na obecność inwazji *Bonamia ostreae*.

Tabela 5.A

System nadzoru obowiązujący dla państw stref i enklaw w okresie kontroli poprzedzającym uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*, jak wskazano w pkt 1.2.1

	Liczba badań stanu zdrowia na rok	Liczba badań laboratoryjnych na rok	Liczba mięczaków w próbce
Gospodarstwa/obszary chowu mięczaków	1	1	150

Tabela 5.B

Systemy nadzoru obowiązujące dla państw członkowskich, stref i enklaw do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*, jak wskazano w pkt 1.3

Poziom zagrożenia	Liczba badań stanu zdrowia	Liczba badań laboratoryjnych	Liczba mięczaków w próbce
Wysoki	1 w roku	1 na 2 lata	150
Średni	1 na 2 lata	1 na 2 lata	150
Niski	1 na 2 lata	1 na 4 lata	150

CZĘŚĆ 6

METODY NADZORU I KONTROLI W ODNIESIENIU DO ZESPOŁU WSS (WSD)

I. Wymogi w zakresie programów nadzoru i zwalczania do celów uzyskania i utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do WSD oraz zapobiegania zakażeniu WSSV

I.1. Ogólne wymogi w odniesieniu do badań i pobierania próbek

Pobieranie próbek skorupiaków do celów badań laboratoryjnych prowadzi się w okresach o prawdopodobnie najwyższych wartościach rocznych temperatury. Powyższy wymóg dotyczący temperatury wody stosuje się również do badań stanu zdrowia, o ile są one wykonalne i stosowne.

Jeśli próbki skorupiaków utrzymywanych w gospodarstwie rybackim pobiera się zgodnie z wymogami określonymi w niniejszej części, stosuje się następujące kryteria:

- a) jeśli w jednostkach produkcyjnych występują skorupiaki o osłabionej kondycji lub w stanie agonalnym, takie skorupiaki wybiera się w pierwszym rzędzie. Jeśli takie skorupiaki nie występują, wybrane zwierzęta obejmują skorupiaki z różnych grup wielkościowych wybranych gatunków podatnych, mianowicie skorupiaki młode i dorosłe, reprezentowanych proporcjonalnie w próbce;
- b) jeżeli do produkcji skorupiaków wykorzystuje się więcej niż jedno źródło wody, próbka musi obejmować podatne skorupiaki reprezentujące wszystkie źródła wody zasilające gospodarstwo;

jeśli w populacjach ryb dziko żyjących konieczny jest nadzór ukierunkowany zgodnie z częścią I pkt 2 akapit drugi załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, liczbę i rozmieszczenie geograficzne punktów pobierania próbek ustala się tak, by uzyskać rozsądny stopień pokrycia terytorium państwa członkowskiego, strefy lub enklawy. Punkty pobierania próbek powinny być reprezentatywne dla różnych ekosystemów stanowiących siedlisko populacji ryb dziko żyjących należących do gatunków podatnych, a mianowicie systemów morskich, przyujściowych, rzecznych i jeziornych.

Jeśli w populacjach ryb dziko żyjących konieczny jest nadzór ukierunkowany zgodnie z częścią I pkt 2 akapit drugi załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, skorupiaki, które mają być pobrane w ramach próbkę, wybiera się następująco:

- (i) w obszarach systemów morskich i przyujściowych wybiera się przynajmniej jeden z następujących gatunków: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* lub rodzaje krewetek należące do rodziny *Penaeidae*, mianowicie *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. jeśli gatunki te nie występują, próbka musi być reprezentatywna dla wszystkich pozostałych gatunków podatnych z rzędu dziesięcionogów, które tam występują; Ze względu na szeroki zakres podatnych organizmów żywicielskich, żywicieli wybrać można spośród rodzajów lub rodzin dziesięcionogów, w przypadku których podatność została wykazana eksperymentalnie lub naturalnie;
- (ii) w systemach rzecznych i jeziornych wybiera się przynajmniej jeden z następujących gatunków: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* lub *Orconectes limosus*. jeśli gatunki te nie występują, próbka musi być reprezentatywna dla wszystkich pozostałych gatunków podatnych z rzędu dziesięcionogów, które tam występują; Ze względu na szeroki zakres podatnych organizmów żywicielskich, żywicieli wybrać można spośród rodzajów lub rodzin dziesięcionogów, w przypadku których podatność została wykazana eksperymentalnie lub naturalnie;
- (iii) jeśli występują skorupiaki o osłabionej kondycji lub w stanie agonalnym, takie skorupiaki wybiera się w pierwszym rzędzie. Jeśli takie skorupiaki nie występują, wybrane zwierzęta obejmują skorupiaki z różnych grup wielkościowych wybranych gatunków podatnych, mianowicie skorupiaki młode i dorosłe, reprezentowanych proporcjonalnie w próbce.

I.2. Szczególne wymogi do celów uzyskania statusu zdrowotnego kategorii I w odniesieniu do WSD

I.2.1. Programy nadzoru

- a) Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które w odniesieniu do WSD posiadają status zdrowotny kategorii III zgodnie z częścią B załącznika III do dyrektywy 2006/88/WE, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, jeśli wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do wspomnianej dyrektywy, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy, spełniają odpowiednie wymogi określone w załączniku V do tej dyrektywy, a wszystkie te gospodarstwa oraz, o ile wymagane jest to przepisem części I pkt 2 akapit drugi załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE, punkty pobierania próbek u populacji ryb dziko żyjących wybrane zgodnie ze wspomnianą częścią poddano następującemu dwuletniemu programowi nadzoru obejmującemu badania stanu zdrowia oraz pobieranie próbek do badań.

Gospodarstwa lub punkty pobierania próbek były objęte badaniami stanu zdrowia i pobierano z nich próbki przez co najmniej dwa kolejne lata, jak przewidziano w sekcji II tabela 6.A.

W ciągu tego dwuletniego okresu badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych określonych w pkt II.2 dały wyniki ujemne w odniesieniu do zakażeń WSD i wykluczono wszelkie podejrzenie obecności WSD zgodnie z metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3;

- b) jeśli w trakcie realizacji programu nadzoru, o którym mowa w lit. a), w gospodarstwie objętym tym programem potwierdzono zakażenie WSSV i w następstwie cofnięto temu gospodarstwu status zdrowotny kategorii II, gospodarstwo to może natychmiast odzyskać status zdrowotny kategorii II i kontynuować realizację programu nadzoru w celu uzyskania statusu obszaru wolnego od choroby bez wdrażania programu zwalczania, o którym mowa w pkt I.2.2, pod następującymi warunkami:
 - (i) jest gospodarstwem kontynentalnym, którego status zdrowotny odnoszący się do WSD jest niezależny od odnoszącego się do tej choroby statusu zdrowotnego otaczających to gospodarstwo wód naturalnych, zgodnie z częścią II pkt 3 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE;
 - (ii) zostało ono opróżnione ze zwierząt, oczyszczone, zdezynfekowane i poddane odlogowaniu; długość okresu odlogowania musi wynosić przynajmniej sześć tygodni;
 - (iii) populację w gospodarstwie odnowiono skorupiakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do WSD.

I.2.2. Programy zwalczania

I.2.2.1. Wymogi ogólne

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do WSD, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do tej choroby, gdy wszystkie gospodarstwa w obrębie tego państwa członkowskiego, tej strefy lub enklawy utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE zostały objęte przynajmniej następującym programem zwalczania:

- a) skutecznie zastosowano minimalne środki zwalczania choroby przewidziane w rozdziale V sekcja 4 dyrektywy 2006/88/WE, a w pobliżu gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone WSD ustanowiono obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby, o którym mowa w art. 32 lit. b) wspomnianej dyrektywy, obejmujący strefę ochronną oraz strefę nadzoru.

Obszar zapobiegania rozprzestrzenianiu się zdefiniowano odrębnie dla każdego przypadku przy uwzględnieniu czynników wpływających na ryzyko rozprzestrzenienia się WSD na skorupiaki utrzymywane w gospodarstwie rybackim i skorupiaki dziko żyjące, takich jak: liczba, odsetek i rozkład śmiertelności skorupiaków znajdujących się w danym gospodarstwie, zakażonych WSD; odległość od sąsiednich gospodarstw i ich gęstość; gospodarstwa kontaktowe; gatunki występujące w gospodarstwach; praktyki rybackie stosowane w gospodarstwach zarażonych i sąsiednich; stwierdzone warunki hydrodynamiczne i inne czynniki o znaczeniu epidemiologicznym.

Przy ustanawianiu stref ochronnych i stref nadzoru stosuje się następujące wymagania minimalne:

- (i) w bezpośrednim sąsiedztwie gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone WSD ustanawia się strefę ochronną, która odpowiada:

- (1) w obszarach morskich i przyujściowych: obszarowi znajdującemu się w okręgu o promieniu przynajmniej jednego zakresu ruchu wody podczas pływu albo o promieniu przynajmniej 5 km, w zależności od tego, który z nich jest większy, przy czym środek okręgu stanowi gospodarstwo uznane urzędowo za zakażone WSD, lub równoważnemu obszarowi określonego zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi; albo
- (2) w wodach słodkich: całemu obszarowi zlewni gospodarstwa uznanego urzędowo za zakażone WSD; właściwy organ może ograniczyć obszar strefę ochronną do części obszaru zlewni, o ile nie stanowi to zagrożenia dla zapobiegania rozprzestrzenianiu się WSD;

- (ii) poza granicą strefy ochronnej ustanawia się strefę nadzoru, która odpowiada:

- 1) w obszarach morskich: otaczającemu strefę ochronną obszarowi obejmującemu nakładające się strefy zakresu ruchu wody podczas pływu; otaczającemu strefę ochronną obszarowi znajdującemu się w okręgu o promieniu 10 km, licząc od środka strefy ochronnej; lub równoważnemu obszarowi zgodnie z odpowiednimi danymi hydrodynamicznymi lub epidemiologicznymi; albo
- 2) w wodach słodkich: rozszerzonemu obszarowi poza granicą ustanowionej strefy ochronnej;

- b) wszystkie gospodarstwa, które utrzymują w obrębie strefy ochronnej gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE, a których nie uznano urzędowo za zakażone WSD, podlegają urzędowemu dochodzeniu obejmującemu przynajmniej następujące elementy:

- (i) pobranie do badań próbek składających się z 10 skorupiaków, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne wskazujące na zakażenie WSD, lub ze 150 skorupiaków, jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani zmian anatomopatologicznych; oraz
- (ii) jedno badanie stanu zdrowia; w gospodarstwach, w których badania, o których mowa w ppkt (i), dały wyniki ujemne, badania stanu zdrowia prowadzi się nadal raz w miesiącu w trakcie sezonu o prawdopodobnie najwyższych wartościach rocznych temperatury, do czasu zniesienia strefy ochronnej zgodnie z pkt I.2.2.1 lit. c);

- c) wszystkie gospodarstwa uznane urzędowo za zakażone WSD podlegają opróżnieniu ze zwierząt, oczyszczeniu, zdezynfekowaniu i odłogowaniu. Długość okresu odłogowania wynosi przynajmniej sześć tygodni. Po opróżnieniu ze zwierząt wszystkich gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone przeprowadza się zsynchronizowane odłogowanie trwające przynajmniej trzy tygodnie. Niniejszy akapit ma również zastosowanie do gospodarstw uznanych urzędowo za zakażone w trakcie realizacji programu zwalczania.

Po zakończeniu odłogowania w gospodarstwie uznanym urzędowo za zakażone strefy ochronne przekształca się w strefy nadzoru.

Właściwy organ może podjąć decyzję o nałożeniu na inne gospodarstwa w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru wymogu opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, dezynfekcji i odłogowania. Długość okresu odłogowania ustalana jest przez właściwy organ na podstawie indywidualnej oceny ryzyka;

- d) we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone oraz wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru populację odnawia się:
- (i) skorupiakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do WSD; lub
 - (ii) w okresie przejściowym trwającym do dnia 31 grudnia 2020 r. – skorupiakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw posiadających zatwierdzony program nadzoru nad WSD.

Odnowienie populacji przeprowadza się dopiero po dokonaniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone WSD opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania zgodnie z pkt I.2.2.1 lit. c);

- e) wszystkie gospodarstwa w obrębie państwa członkowskiego, strefy lub enklawy objętych programem zwalczania utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE oraz, gdy wymagany jest nadzór w populacjach ryb dziko żyjących, punkty pobierania próbek wybrane zgodnie z częścią I pkt 2 akapit drugi załącznika V do wspomnianej dyrektywy są następnie objęte przynajmniej programem określonym w pkt I.2.1.

I.2.2.2. Wymogi odnoszące się do odzyskania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do WSD przez enklawy kontynentalne obejmujące pojedyncze gospodarstwo uznane wcześniej za wolne od choroby w odniesieniu do WSD

Enklawa kontynentalna obejmująca pojedyncze gospodarstwo posiadające status zdrowotny kategorii I w odniesieniu do WSD, której status zdrowotny odnoszący się do tej choroby ujętej w wykazie jest niezależny od otaczających ją wód naturalnych zgodnie z częścią II pkt 3 załącznika V do dyrektywy 2006/88/WE i której cofnięto status kategorii I zgodnie z art. 53 ust. 3 wspomnianej dyrektywy, może odzyskać status zdrowotny kategorii I natychmiast po potwierdzeniu przez właściwy organ, że spełniono następujące warunki:

- a) gospodarstwo zakażone WSD zostało opróżnione ze zwierząt, oczyszczone, zdezynfekowane i poddane odłogowaniu; długość okresu odłogowania wynosiła przynajmniej sześć tygodni;
- b) populację w gospodarstwie zakażonym WSD odnowiono skorupiakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I odnoszącym się do WSD.

I.3. Szczególne wymogi do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby (kategoria I) w odniesieniu do WSD

Jeśli do utrzymania statusu zdrowotnego kategorii I wymagany jest nadzór ukierunkowany, jak przewidziano w art. 52 dyrektywy 2006/88/WE, wszystkie gospodarstwa utrzymujące gatunki podatne wymienione w części II załącznika IV do tej dyrektywy, położone w obrębie danego państwa członkowskiego, danej strefy lub enklawy obejmuje się badaniami stanu zdrowia i pobieraniem próbek zgodnie z sekcją II tabela 6.B, uwzględniając poziom zagrożenia dla danego gospodarstwa w odniesieniu do przeniesienia zakażenia WSD.

W państwach członkowskich, strefach lub enklawach, w których liczba gospodarstw jest ograniczona, a nadzór ukierunkowany tych gospodarstw nie dostarcza wystarczających danych epidemiologicznych, programy nadzoru do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby obejmują punkty pobierania próbek wybrane zgodnie z wymogami określonymi w pkt I.1.

W takich punktach pobierania próbek dokonuje się badań i poboru próbek w systemie rotacyjnym obejmującym co roku 50 % wszystkich punktów. Pobierania próbek dokonuje się zgodnie z tabelą 6.B zawartą w sekcji II. Próbkę wybiera się, przygotowuje i bada zgodnie z metodami diagnostycznymi i metodami pobierania próbek określonymi w sekcji II, a badania laboratoryjne w kierunku obecności czynnika wywołującego KHVD muszą dać wyniki ujemne.

Status obszaru wolnego od choroby utrzymuje się dopóty, dopóki badania wszystkich próbek przeprowadzone przy wykorzystaniu metod diagnostycznych i metod pobierania próbek określonych w pkt II.2 dają wyniki ujemne w odniesieniu do WSD, przy czym wykluczone jest wszelkie podejrzenie obecności WSD zgodnie z metodami dochodzenia urzędowego i metodami diagnostycznymi określonymi w pkt II.3.

I.4. Wymogi odnoszące się do uchylenia środków zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby przewidzianych w art. 39 dyrektywy 2006/88/WE (zmiana kategorii statusu zdrowotnego z V na III) w odniesieniu do WSD

Państwo członkowskie, strefa lub enklawa, które posiadają status zdrowotny kategorii V w odniesieniu do WSD, mogą uzyskać status zdrowotny kategorii III w odniesieniu do tej choroby ujętej w wykazie pod następującymi warunkami:

- a) spełniono wymogi określone w pkt I.2.2.1 lit. a), b) i c). Jeśli odłogowanie jest technicznie niemożliwe, gospodarstwa obejmuje się alternatywnym środkiem, który daje niemal jednakowe gwarancje usunięcia WSSV ze środowiska gospodarstwa;
- b) we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone WSD i wszystkich innych gospodarstwach poddanych odłogowaniu/środkom alternatywnym zgodnie z lit. a), położonych w obrębie ustanowionej strefy ochronnej i strefy nadzoru odnowiono populację skorupiakami pozyskanymi z państw członkowskich, stref lub enklaw o statusie zdrowotnym kategorii I, II lub III odnoszącym się do WSD;
- c) odnowienia populacji dokonano dopiero po przeprowadzeniu we wszystkich gospodarstwach uznanych urzędowo za zakażone WSD opróżnienia ze zwierząt, oczyszczenia, zdezynfekowania i odłogowania/środków alternatywnych zgodnie z lit. a);
- d) w okresie dwóch lat od zakończenia środków określonych w lit. a) i b) nie potwierdzono żadnego przypadku zakażenia WSD, a podejrzenia zaistniałe w tym okresie wykluczono zgodnie z procedurami ustanowionymi w pkt II.3.

II. **Metody diagnostyczne i metody pobierania próbek**

II.1. Próbki

Próbki nabłonka powłokowego, wycięte lub zawarte w nodze, odnożu odwłokowym, narządach gębowych lub skrzelach badanego zwierzęcia przed ich przygotowaniem do dwuetapowego PCR utrwała się w etanolu o stężeniu 95 %.

Dodatkowe próbki, pobrane i utrwalone do badań histologicznych i metodami transmisyjnej mikroskopii elektronowej, mogą być wykorzystywane na poparcie danych diagnostycznych uzyskanych dzięki PCR.

II.2. Metody diagnostyczne do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do WSD

Metodą diagnostyczną stosowaną do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do zakażenia WSD, zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami określonymi w załączniku II część 6, jest dwuetapowy PCR.

Dodatni wynik dwuetapowego PCR potwierdza się, przed wprowadzeniem wstępnych środków zwalczania choroby, o których mowa w art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, w drodze sekwencjonowania ampliconu poprzez, o ile to możliwe w warunkach praktycznych, wykrycie objawów patognomicznych WSD u wybranych podatnych żywicieli w drodze badań histologicznych i metodami transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

II.3. Metody dochodzenia urzędowego i metody diagnostyczne do celów wykluczenia lub potwierdzenia zakażenia WSD

Jeśli istnieje konieczność potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia zakażenia WSD zgodnie z art. 28 dyrektywy 2006/88/WE, przestrzega się następującej procedury badań, pobierania próbek i prowadzenia testów:

- a) dochodzenie urzędowe obejmuje przynajmniej jedno badanie stanu zdrowia i jedno pobranie próbki 10 skorupiaków, jeśli stwierdzono objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne wskazujące na zakażenie WSD, lub 150 skorupiaków, jeśli nie stwierdzono objawów klinicznych ani zmian anatomopatologicznych. Próbki bada się przy wykorzystaniu metody diagnostycznej określonej w pkt II.2 (dwuetapowy PCR);

- b) obecność WSD uznaje się za potwierdzoną, jeśli dwuetapowy PCR z następnym sekwencjonowaniem przeprowadzone zgodnie ze szczegółowymi metodami i procedurami określonymi w załączniku II część 6 dało wyniki dodatnie w odniesieniu do WSSV oraz jeśli u wybranych żywicieli stwierdzono objawy patognomiczne WSD.

Podejrzenie obecności WSD można wykluczyć, jeśli badania te nie wykazują dalszych dowodów na obecność WSD.

Tabela 6.A

System nadzoru obowiązujący dla państw członkowskich, stref i enklaw w dwuletnim okresie kontroli poprzedzającym uzyskanie statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do WSD, jak wskazano w pkt I.2.1

	Liczba badań klinicznych na rok	Liczba badań laboratoryjnych na rok	Liczba skorupiaków w próbce
Gospodarstwa/miejsca pobierania próbek	1	1	150

Tabela 6.B

Systemy nadzoru obowiązujące dla państw członkowskich, stref i enklaw do celów utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do WSD, jak wskazano w pkt I.3

Poziom zagrożenia	Liczba badań stanu zdrowia	Liczba badań laboratoryjnych	Liczba skorupiaków w próbce
Wysoki	1 w roku	1 na 2 lata	150
Średni	1 na 2 lata	1 na 2 lata	150
Niski	1 na 2 lata	1 na 4 lata	150

ZAŁĄCZNIK II

SZCZEGÓLWE METODY I PROCEDURY DIAGNOSTYCZNE

I. Wstęp

W niniejszym załączniku określa się szczegółowe procedury metod diagnostycznych stosowane do celów badań laboratoryjnych w ramach programów zwalczania i nadzoru określonych w załączniku I do niniejszej decyzji oraz do celów potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności wymienionych niżej chorób nieegzotycznych ujętych w części II załącznika IV do dyrektywy 2006/88/WE („choroby ujęte w wykazie”) zgodnie z art. 57 lit. b) tej dyrektywy:

1.	Wirusowa posocznica krwotoczna (VHS)	Część 1
2.	Zakaźna martwica układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHN)	Część 1
3.	Zakażenie herpeswirusem koi (KHV)	Część 2
4.	Zakaźna anemia łososia (ISA)	Część 3
5.	Inwazja wywołana przez <i>Marteilia refringens</i>	Część 4
6.	Inwazja wywołana przez <i>Bonamia ostreae</i>	Część 5
7.	Zespół WSS (WSD)	Część 6

II. Definicje

Do celów niniejszego załącznika „podłoże transportowe” oznacza podłoże do hodowli linii komórkowych zawierające 10 % surowicę cielęcą oraz 200 iu penicyliny, 200 µg streptomycyny oraz 200 µg kanamycyny na mililitr lub inne antybiotyki o sprawdzonej skuteczności.

CZĘŚĆ 1

SZCZEGÓLWE METODY I PROCEDURY DIAGNOSTYCZNE DO CELÓW NADZORU I POTWIERDZENIA W ODNIESIENIU DO IHN I VHS

I. Metody i procedury diagnostyczne do celów nadzoru i potwierdzenia w odniesieniu do IHN i VHS

Gdy do celów uzyskania lub utrzymania statusu obszaru wolnego od choroby w odniesieniu do IHN lub VHS, jak określono w załączniku I część 1 sekcja I, pobiera się próbki i prowadzi badania laboratoryjne przy zastosowaniu metod diagnostycznych określonych w części 1 pkt II.1 i II.2 wspomnianego załącznika, stosując się pkt I.1–I.6 określone poniżej.

I.1. Przygotowanie i wysyłka próbek ryb

I.1.1. Tkanki do badania wirusologicznego przy wykorzystaniu linii komórkowej

Przed wysyłką albo przekazaniem próbek laboratoryjnych od ryby pobiera się za pomocą sterylnych narzędzi sekcyjnych fragmenty narządów przeznaczone do badania i umieszcza w sterylnych probówkach plastikowych zawierających podłoże transportowe.

Ilość materiału biologicznego ryb nadającego się do badania wirusologicznego przy wykorzystaniu linii komórkowej oraz RT-qPCR zależy od wielkości ryb. Materiałem pobieranym do próbki powinny być zatem: wylęg w całości (długość ciała < 4 cm), narządy wewnętrzne włącznie z nerką (4 cm < długość ciała < 6 cm), a w przypadku ryb większych – nerka, śledziona, serce lub mózg, a także płyn jajnikowy tarlaków w czasie tarła.

Płyn jajnikowy lub mlecz lub fragmenty narządów pochodzące od maksymalnie 10 ryb mogą zostać zebrane w jedną sterylną probówkę zawierającą 4 ml podłoża transportowego i stanowić jedną próbkę zbiorczą. Tkanki w każdej próbce powinny ważyć przynajmniej 0,5 g.

Badanie wirusologiczne przy wykorzystaniu linii komórkowej należy rozpocząć jak najwcześniej, ale nie później niż 48 godzin po pobraniu próbek. W wyjątkowych przypadkach badanie wirusologiczne można rozpocząć nie później niż 72 godziny po pobraniu materiału, o ile materiał poddawany badaniu jest chroniony podłożem transportowym oraz o ile możliwe jest spełnienie wymogów dotyczących temperatury podczas transportu.

I.1.2. Próbkki do analizy przy użyciu odwrotnej transkrypcji z łańcuchową reakcją polimerazy (RT-PCR lub RT-qPCR)

Próbki pobiera się od ryb zgodnie z procedurami opisanymi w pkt I.1.1 przy użyciu sterylnej narzędzia i przenosi do sterylnej próbówki plastikowej zawierającej podłoże transportowe. Tkanki z 10 ryb mogą zostać zebrane do jednej próbówki i stanowią jedną próbkę zbiorczą. W przypadku małej ilości inokulum można jednak użyć tkanek pochodzących od maksymalnie pięciu ryb. Alternatywną metodą jest łączenie próbek w odczynnikach do stabilizacji RNA, takich jak 0,2 g tkanek/ml odczynnika zgodnie z zaleceniami producenta, przy czym każdą rybę należy poddać odrębnej obróbce i nie łączyć w próbkach ze względu na małą ilość materiału wykorzystywanego do ekstrakcji.

Do laboratorium wysłać można również całe ryby.

I.2. Wysyłka próbek ryb

Próbówki zawierające tkanki ryb w podłożu transportowym do celów analizy przy wykorzystaniu linii komórkowej lub RT-PCR/RT-qPCR umieszcza się w izolowanych pojemnikach, takich jak grubościenna pudła polistyrenowe, wraz z taką ilością lodu lub alternatywnego chłodziwa o równoważnym efekcie chłodzącym, która zapewnia chłodzenie próbek podczas transportu do laboratorium. Należy jednak unikać zamrażania próbek. Temperatura próbki podczas tranzytu nie może przekroczyć 10 °C, a w chwili przyjęcia w pudle transportowym musi być nadal lód bądź też przynajmniej jeden z bloków mrożących musi być zamrożony w części lub w całości.

Do laboratorium przysyłać można całe ryby, jeśli możliwe jest spełnienie wymogów dotyczących temperatury, o których mowa w akapicie pierwszym. Całą rybę należy owinąć w papier o zdolnościach absorpcyjnych, a przy ostatecznej wysyłce należy stosować torbę plastikową. Wysłać można również ryby żywe.

I.3. Pobieranie dodatkowego materiału diagnostycznego

Jeśli zatwierdzi to laboratorium diagnostyczne, można również pobierać inne tkanki ryb i przygotowywać je do dodatkowych badań.

I.4. Przygotowanie próbek do badania przy wykorzystaniu linii komórkowej i RT-qPCR

I.4.1. Zamrażanie w wyjątkowych przypadkach

W razie pojawienia się trudności natury praktycznej, które uniemożliwiają obróbkę próbek w ciągu 48 godzin od pobrania tkanek ryb, dopuszczalne może być zamrożenie próbek tkanek w podłożu transportowym w temperaturze – 20 °C lub niższej i przeprowadzenie badania wirusologicznego w ciągu 14 dni. Przed badaniem tkanki ryb można zamrozić i odmrozić tylko raz. Zachowuje się dokumentację zawierającą szczegółowe powody każdego przypadku zamrażania próbek tkanek ryb.

I.4.2. Homogenizacja narządów

W laboratorium znajdujące się w próbówce tkanki ryb poddaje się pełnej homogenizacji przy wykorzystaniu stomachera, malaksera lub młynka i tłuczka ze sterylnym piaskiem, a następnie umieszcza w oryginalnym podłożu transportowym.

Próbkę składającą się z całych ryb o długości poniżej 4 cm rozdrabnia się przy użyciu sterylnych nożyczek lub sterylnej skalpela po uprzednim usunięciu części ciała znajdującej się za otworem jelitowym. Jeżeli próbkę stanowi cała ryba o długości ciała między 4 a 6 cm, pobrać należy narządy wewnętrzne, w tym nerkę. Jeśli próbkę stanowi cała ryba o długości ciała ponad 6 cm, próbki tkanek pobiera się, jak określono w pkt I.1. Próbki tkanek rozdrabnia się sterylnymi nożyczkami lub sterylnym skalpelem i homogenizuje zgodnie z opisem w akapicie pierwszym, a następnie umieszcza w podłożu transportowym.

W laboratorium ostateczny stosunek materiału biologicznego do podłoża transportowego koryguje się tak, by odpowiadał 1:10.

I.4.3. Wirowanie homogenatu

Homogenat poddaje się odwirowaniu z prędkością 2 000 do 4 000 × g przez 15 minut w wirówce chłodzącej w temperaturze 2 – 5 °C, a pobrany supernatant można poddać działaniu antybiotyków przez cztery godziny w temperaturze 15 °C lub przez noc w temperaturze 4 – 8 °C. Jeśli próbkę przesłano w podłożu transportowym, można zrezygnować z poddania supernatantu działaniu antybiotyków.

W razie pojawienia się trudności natury praktycznej, takich jak poważne uszkodzenie inkubatora lub problemy z liniami komórkowymi, które to trudności uniemożliwiają inokulację komórek w ciągu 48 godzin od pobrania próbek tkanek ryb, supernatant można zamrozić do temperatury – 80 °C i przeprowadzić badanie wirusologiczne w ciągu 14 dni.

Jeśli pobrany supernatant przechowywano w temperaturze – 80 °C przez 48 godzin od pobrania próbki, można ponownie użyć go jedynie jednokrotnie do badania wirusologicznego.

Przed inokulacją komórek supernatant miesza się w równych częściach z odpowiednio rozcieńczonymi łączonymi surowicami odpornościowymi przeciwko rodzimym serotypom wirusa zakaźnej martwicy trzustki (IPN) i inkubuje go z tymże przez maksymalnie jedną godzinę w temperaturze 15 °C lub przez maksymalnie 18 godzin w temperaturze 4 °C. Miano surowicy odpornościowej powinno wynosić przynajmniej 1/2 000 w teście neutralizacji przy użyciu płytek (50 %).

Poddanie całego inokulum działaniu surowicy odpornościowej przeciwko wirusowi IPN ma zapobiec powstaniu w inokulowanych liniach komórkowych efektu cytopatycznego (CPE) spowodowanego wirusem IPN. Ograniczy to czas trwania badań wirusologicznych oraz liczbę przypadków, w których powstanie efektu cytopatycznego (CPE) prowadziłyby do potencjalnego wskazania obecności VHSV lub IHNV.

Jeśli próbki pochodzą z jednostek produkcyjnych uznanych za wolne od choroby w odniesieniu do IPN, można zaniechać poddania inokulum działaniu surowicy odpornościowej przeciwko wirusowi IPN.

I.4.4. Przygotowanie próbek do programów nadzoru opartych na RT-PCR i RT-qPCR

Jeśli próbki pobrano na podłoże transportowe, przeprowadza się procedury określone w pkt I.4.2. i I.4.3. Po odwirowaniu supernatant pobiera się i ekstrahuje RNA. Jeśli bezpośrednio po odwirowaniu nie mają być prowadzone dalsze badania, próbki zamraża się natychmiast do temperatury – 20 °C lub niższej.

Do celów analizy tkanek ryb zachowanych w odczynniku do stabilizacji RNA należy przeprowadzić dalsze prace z zachowaniem następujących terminów w odniesieniu do próbek przechowywanych w różnych temperaturach:

próbki przechowywane w temperaturze 37 °C: jeden dzień;

próbki przechowywane w temperaturze 25 °C: jeden tydzień;

próbki przechowywane w temperaturze 4 °C: jeden miesiąc;

próbki przechowywane w temperaturze – 20 °C: brak ograniczenia czasowego

Próbki zbiorcze w odczynniku do stabilizacji RNA traktuje się tak samo jak próbki pojedyncze w odczynniku do stabilizacji RNA. Liczba próbek w próbkach zbiorczych w odczynniku do stabilizacji RNA nie może przekraczać liczby zalecanej przez producenta przy ekstrakcji za pomocą zestawów RNA, takich jak RNeasy Mini kits (Qiagen) lub podobnych. W razie łączenia większych próbek zestawy ekstrakcji lub metody muszą odzwierciedlać takie łączenie.

Próbek umieszczonych w odczynnikach do stabilizacji RNA nie wolno wykorzystywać do linii komórkowych.

I.4.5. Łączenie próbek do celów RT-qPCR

Ponieważ istniejące protokoły RT-qPCR mają co najmniej taką samą wrażliwość, co metody z zastosowaniem linii komórkowych, dopuszczalne może być wykorzystanie do PCR supernatantu z homogenizowanego materiału biologicznego ryb składającego się z łączonych narządów pochodzących od maksymalnie 10 ryb w podłożu do hodowli linii komórkowych. Jednak ze względu na to, że do PCR używa się znacznie mniejszego inokulum niż do linii komórkowych, wszystkie tkanki ryb należy poddać starannej homogenizacji przed pobraniem materiału do ekstrakcji.

Tę samą zasadę stosuje się do próbek umieszczonych w odczynnikach do stabilizacji RNA. Jednakże w tym wypadku trudno jest często zebrać reprezentatywny materiał pochodzący od maksymalnie 10 ryb w jedną próbkę i dlatego liczbę ryb na jedną próbkę łączoną należy ograniczyć do 2–5.

I.5. Badanie wirusologiczne przy wykorzystaniu linii komórkowej

I.5.1. Linie komórkowe i podłoża

Linia komórkowa pochodząca z narybku bassa niebieskiego (BF-2) lub linia komórkowa pochodząca z gonad pstrąga tęczowego (RTG-2) oraz linia komórkowa pochodząca z komórek epitelialnych karpia (EPC) albo linia komórkowa pochodząca z komórek epitelialnych ciernika promienistego utrzymywana jest na odpowiednim podłożu w temperaturze 20 do 30 °C, tj. podłożu Eagle'a (podłoże MEM) lub jego modyfikacjach, z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (10 %) oraz antybiotyków w stężeniach standardowych.

W razie hodowli w zamkniętych fiolkach podłoże buforuje się diwęglanem. Podłoże wykorzystywane do hodowli komórek w jednostkach otwartych można buforować trihydroksymetyloaminometanem-HCl (Tris-HCl) (23 mM) oraz diwęglanem sodu (6 mM). Wartość pH musi wynosić $7,6 \pm 0,2$.

Linie komórkowe stosowane do inokulacji materiałem biologicznym ryb muszą być młode, zwykle, w miarę możliwości, jednodniowe, jednowarstwowe; można zaakceptować jednak wiek mieszczący się w zakresie 4 do 48 godzin. Komórki muszą aktywnie rosnąć w momencie inokulacji.

I.5.2. Inokulacja linii komórkowych

Zawiesinę z narządów poddanych działaniu antybiotyków inokuluje się do linii komórkowych w dwóch rozcieńczeniach, tj. w rozcieńczeniu pierwszym i w rozcieńczeniu 1:10 rozcieńczenia pierwszego, co prowadzi do końcowych rozcieńczeń materiału biologicznego w podłożu do hodowli linii komórkowych wynoszących odpowiednio 1:100 i 1:1 000, co ma na celu zapobieżenie interferencji homologicznej. Przynajmniej dwie linie komórkowe należy inokulować, jak opisano w pkt I.5.1. Stosunek wielkości inokulum do objętości podłoża do hodowli linii komórkowych powinien wynosić około 1:10.

Do każdego rozcieńczenia każdej linii komórkowej wykorzystuje się obszar komórek nie mniejszy niż 2 cm², odpowiadający jednemu dołkowi na 24-dołkowej płytce do linii komórkowej. W miarę możliwości należy stosować płytki do linii komórkowej.

I.5.3. Inkubacja linii komórkowych

Inokulowane linie komórkowe inkubuje się w temperaturze 15 °C przez siedem do dziesięciu dni. Jeśli barwa podłoża do hodowli linii komórkowych zmieni się z czerwonej na żółtą, wskazując średnie zakwaszenie, należy dokonać korekty pH przy wykorzystaniu sterylnego roztworu diwęglanu lub równoważnych substancji, aby zapewnić podatność komórek na zakażenie wirusem.

Przynajmniej co sześć miesięcy lub w razie podejrzenia zmniejszenia wrażliwości komórek na zakażenie przeprowadza się mianowanie zarchiwizowanych izolatów VHSV i IHNV w celu sprawdzenia wrażliwości linii komórkowych na zakażenie. W miarę możliwości stosuje się procedurę określoną w sekcji III.

I.5.4. Mikroskopia

Inokulowane linie komórkowe poddane są regularnym kontrolom na obecność CPE nie rzadziej niż trzy razy w tygodniu w powiększeniu 40 do 150 ×. Jeśli stwierdzono ewidentny przypadek CPE, wszczynane są natychmiast procedury identyfikacji wirusa zgodnie z pkt I.6.

I.5.5. Pasażowanie

Jeśli w ciągu 7–10 dni po pierwszej inkubacji nie wystąpił efekt cytopatyczny, dokonuje się pasażowania do świeżych linii komórkowych przy wykorzystaniu podobnego obszaru komórek, co w przypadku pierwszej izolacji.

Supernatant ze wszystkich linii lub dołków stanowiących pierwszą izolację w linii komórkowej łączy się zgodnie z linią komórkową 7 – 10 dni po inokulacji. Połączone próbki inokuluje się następnie do homologicznych linii komórkowych, nierozcieńczonych i rozcieńczonych 1:10 (co prowadzi do rozcieńczeń końcowych supernatantu wynoszących odpowiednio 1:10 i 1:100), jak opisano w pkt I.5.2. Alternatywnie supernatant w ilości 10 % podłoża stanowiącego pierwszą izolację inokuluje się bezpośrednio do dołka ze świeżą linią komórkową (tj. pasażowanie komórek między dołkami). Przed inokulacją rozcieńczenia można inkubować z surowicą przeciwko wirusowi IPN w odpowiednim rozcieńczeniu, jak opisano w pkt I.4.3.

Inokulowane kultury inkubuje się następnie przez 7 do 10 dni w temperaturze 15 °C i kontroluje zgodnie z pkt I.5.4.

Jeśli w ciągu pierwszych trzech dni inkubacji wystąpi efekt toksyczny CPE, pasażowanie przeprowadza się na tym etapie, ale komórki inkubowane są następnie przez siedem dni i pasażowane ponownie oraz poddawane dalszej siedmiodniowej inkubacji. Jeśli efekt toksyczny CPE wystąpi po upływie trzech dni, komórki pasażuje się jednokrotnie i inkubuje tak długo, by łączny okres od dokonania pierwszej inkubacji wyniósł 14 dni. W ostatnich siedmiu dniach inkubacji nie może być żadnych dowodów toksyczności.

Jeśli mimo zastosowania antybiotyków wystąpi zanieczyszczenie bakteryjne, pasażowanie poprzedza się następnie wirowaniem z prędkością 2 000 do 4 000 × g przez 15 do 30 minut w temperaturze 2 do 5 °C lub filtrowaniem supernatantu przez filtr 0,45 μm (membranę o niskim współczynniku wiązalności białek). Ponadto pasażowanie powinno być prowadzone zgodnie z procedurami opisanymi dla efektu toksycznego CPE w akapicie czwartym.

Jeśli CPE nie występuje, można uznać, że badanie dało wynik ujemny.

I.6. Identyfikacja wirusa

Jeśli w linii komórkowej stwierdzono dowody na wystąpienie CPE, podłoże (supernatant) pobiera się i bada za pomocą przynajmniej jednej z następujących technik: test immunoenzymatyczny (ELISA), test immunofluorescencji (IF), test neutralizacji (SNT), RT-PCR lub RT-qPCR. Jeśli badania te nie pozwoliły na definitywne zidentyfikowanie wirusa w ciągu tygodnia, supernatant przekazuje się w celu natychmiastowej identyfikacji krajowemu laboratorium referencyjnemu lub laboratorium referencyjnemu UE ds. chorób ryb, o którym mowa w załączniku VI do dyrektywy 2006/88/WE.

I.6.1. ELISA

W celu identyfikacji izolatu wirusa przeprowadza się test ELISA – test podwójnego wiązania. Mikro płytki powinny być opłaszczone warstwą (50 µl/dołek (0,9 pg)) oczyszczonych immunoglobulin o sprawdzonej jakości wiążących białko A, uzyskanych z surowicy odpornościowej królika przeciwko IHNV lub VHSV, rozcieńczonych w buforze węglanowym (pH 9,6) zawierającym 15mM azydku sodu i inkubowane przez od 18 godzin do 2 tygodni w temperaturze 4 °C.

Każdą próbkę zawierającą 1 % Triton X-100 oraz kontrole dodatnie rozcieńcza się na płytce do rozcieńczania roztworem buforowym (tj. roztworem chlorku sodu buforowany fosforanami (PBS)-T-BSA, 1 % BSA)) w 4-krotnym rozcieńczeniu: nierozcieńczone, 1:4, 1:16, 1:64. Płytki do testu ELISA przemywa się w PBS zawierającym 0,05 % Tween-20 (PBS-T), a 50 µl każdego rozcieńczenia przenosi się z płytki do rozcieńczania na przemytą i opłaszczoną płytkę do ELISA.

Płytki ELISA inkubuje się następnie przez 30 minut w temperaturze 37 °C. Następnie płytki przemywa się i inkubuje przez 30 minut w temperaturze 37 °C ze specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi (tj. do identyfikacji VHSV: MA b IP5B11, a identyfikacji IHNV: Hyb 136-3). 50µl króliczych przeciwciał anty-mysich skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (HRP) rozcieńczonych 1:1 000 w PBS-T-BSA przenosi się na płytkę do testu ELISA.

Następnie, po ponownym przepłukaniu, wywołuje się reakcje poprzez dodanie 50 µl/dołek orto-fenylenodiaminy (OPD). Płytki do testu ELISA inkubuje się przez 20 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, a reakcję zatrzymuje się, dodając 100 µl/dołek 0,5 M H₂SO₄.

Absorbancję obserwuje się w czytniku do testów ELISA przy długości fali 492 i 620 nm. Próbki określa się jako dodatnie lub ujemne po porównaniu wyników testów z wartościami absorbancji dla kontroli dodatnich i ujemnych. Co do zasady próbki o absorbancji łącznej (A) < 0,5 dla materiału nierozcieńczonego uznaje się za ujemne, próbki o wartościach A między 0,5 a 1,0 uznaje się za podejrzone, zaś próbki o wartościach A > 1,0 uznaje się za dodatnie.

Zamiast wersji testu ELISA, o których mowa w niniejszym punkcie, można stosować inne jego wersje o sprawdzonej podobnej skuteczności.

I.6.2. Test immunofluorescencji (IF)

Identyfikacji ujętych w wykazie patogenów VHSV i IHNV dokonuje się poprzez zakażenie komórek na płytkach 96-dołkowych „Black”, konwencjonalnych płytkach 24-dołkowych lub szkiełkach nakrywkowych do płytek 24-dołkowych. Jeśli zidentyfikowano IHNV lub VHSV poprzez zakażenie komórek na szkiełkach nakrywkowych, stosuje się następujący protokół:

- a) na szkiełkach nakrywkowych dokonuje się posiewu komórek prowadzącego do pokrycia powierzchni hodowlanej między 60 % a 90 % po 24 godzinach kultury. W miarę możliwości do tego celu należy wykorzystać linię komórkową EPC ze względu na jej dużą przyczepność do powierzchni szklanych, ale można również wykorzystywać inne linie komórkowe, takie jak BF-2, RTG-2 lub FHM. Dokonuje się podwójnej inokulacji 150 µl supernatantu linii komórkowej w dwóch różnych rozcieńczeniach (1:10 i 1:1 000) na jednodniowe jednowarstwowe hodowle komórek, a następnie poddaje inkubacji w temperaturze 15 °C przez 24 godziny;
- b) następnie usuwa się podłoże do hodowli linii komórkowych oraz zakażone jednowarstwowe hodowle komórek utrwalone za pomocą 0,5 ml lodowatego wodnego roztworu acetonu (80 % vol:vol). Utrwalania dokonuje się w okapie wyciągowym przez 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym usuwa się roztwór acetonu i osusza szkiełka nakrywkowe powietrzem przez przynajmniej 30 minut. Na tym etapie płytki należy poddać natychmiastowej obróbce albo przechowaniu w temperaturze – 20 °C do późniejszego wykorzystania;
- c) specyficzne przeciwciała monoklonalne (tj. MA b IP5B11 do identyfikacji VHSV oraz Hyb 136-3i do identyfikacji IHNV) rozcieńcza się w 0,01 M PBST, pH 7,2 w rozcieńczeniu zalecanym przez dostawcę przeciwciał monoklonalnych; do utrwalonej jednowarstwowej hodowli komórek dodaje się 50 do 100 µl/dołek, a płytki inkubuje w komorze wilgotnej przez jedną godzinę w temperaturze 37 °C;

- d) szkiełka nakrywkowe przemywa się łagodnie trzy razy PBS zawierającym 0,05 % Tween-20 (PBS-T), a po ostatnim przemyciu usuwa się w całości bufor. Komórki inkubuje się następnie przez jedną godzinę w temperaturze 37 °C z przeciwciałami przeciwko mysiej immunoglobulinie (stosowanymi jako przeciwciało pierwszorzędowe) skoniugowanymi z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) lub tetrametylorodamino-5-(oraz-6-)izotiocyjanianem (TRITC) rozcieńczonymi zgodnie ze wskazówkami dostawcy, przemywa ponownie w PBS-T i suszy. Zabarwione kultury osadza się na szklanych szkiełkach przy wykorzystaniu roztworu gliceryny w soli fizjologicznej i bada w świetle ultrafioletowym (UV). Należy korzystać z okularów 10 × lub 12 × i soczewek obiektywów 25 × lub 40 × o aperturze numerycznej, odpowiednio, > 0,7 i > 1,3.

Alternatywnie można korzystać z innych technik IF o sprawdzonej podobnej skuteczności w odniesieniu do linii komórkowych, utrwalania i przeciwciał o jakości referencyjnej.

I.6.3. Neutralizacja

Komórki wytrąca się z pobranego supernatantu za pomocą wirowania (2 000 to 4 000 × g) lub filtracji membranowej (0,45 μm) przy wykorzystaniu membrany o niskim współczynniku wiązalności białek, a supernatant rozcieńcza 1:100 i 1:10 000 w podłożu do hodowli linii komórkowych.

Supernatant pochodzący przynajmniej z dwóch rozcieńczeń miesza się i inkubuje w równych częściach przez 60 minut przy temperaturze 15 °C osobno z następującymi odczynnikami:

- surowica zawierająca swoiste dla grupy przeciwciała przeciwko VHSV w rozcieńczeniu 1:50 (vol:vol);
- surowica zawierająca swoiste dla grupy przeciwciała przeciwko IHNW w rozcieńczeniu 1:50 (vol:vol);
- łączenie surowic odpornościowych przeciwko rodzimym serotypom IPNV w rozcieńczeniu 1:50 (vol:vol);
- samo podłoże (kontrola dodatnia).

Przynajmniej dwie linie komórkowe z każdej mieszaniny supernatantu wirusa z surowicą inokuluje się po 50 μl, a następnie inkubuje w temperaturze 15 °C. Należy sprawdzić występowanie CPE, jak opisano w pkt I.5.4.

Szczepy i izolaty VHSV, które nie reagują na testy neutralizacji, identyfikuje się za pomocą IF lub ELISA.

Alternatywnie można wykorzystać inne testy neutralizacji o sprawdzonej podobnej skuteczności.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Przygotowanie RNA wirusa

Wszelkie prace przy izolacji RNA wykonuje się na lodzie przy użyciu rękawiczek.

Ekstrakcji RNA dokonuje się, stosując metodę fenolowo-chloroformową lub kolumnienkową zgodnie ze wskazówkami producenta. Można stosować dostępne komercyjnie zestawy do ekstrakcji RNA, dzięki którym uzyska się RNA wysokiej jakości nadające się do wykorzystania w ramach protokołów RT-PCR opisanych w poniższych punktach.

RNA zawieszają się ponownie w wodzie wolnej od RNaz (tj. wodzie poddanej działaniu 0,1 % dietylodiiwęglanu) lub odpowiedniego bufora elucyjnego.

I.6.4.2. RT-PCR

Do wykrywania IHNW stosuje się następujące startery:

starter sensowny 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3';

starter antysensowny 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Stosuje się następujące cykle (jednoetapowy RT-PCR): 1 cykl: 50 °C przez 30 minut; 1 cykl: 95 °C przez 2 minut; 30 cykli: 95 °C przez 30 sekund, 50 °C przez 30 sekund, 72 °C przez 60 sekund; 1 cykl: 72 °C przez 7 minut i chłodzenie w płynie w temperaturze 4 °C.

Do wykrywania VHSV stosuje się następujące startery:

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

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

Stosuje się następujące cykle (jednoetapowy RT-PCR): 50 °C przez 30 minut, 95 °C przez 15 minut, 35 cykli w temperaturze 94 °C przez 30 sekund, 55 °C przez 30 sekund oraz 68 °C przez 60 sekund. Następnie reakcję utrzymuje się w temperaturze 68 °C przez 7 minut.

Ilość i swoistość reakcji RT-PCR ewaluuje się za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (1,5 %) z bromkiem etydydy i obserwuje przy wykorzystaniu naswietlenia światłem ultrafioletowym. W przypadku IHNV można zaobserwować amplikon PCR 693 bp. W przypadku VHSV wielkość powinna wynosić 505 bp.

Wyniki PCR mogą być różne w zależności od warunków przeprowadzania testu – optymalizacji wymagać mogą protokoły termiczne w zależności od wykorzystywanego termocyklera. Ponadto wystąpić mogą wyniki fałszywie dodatnie ze względu na nieprawidłowe przyłączanie starterów lub zanieczyszczenia w laboratorium. Dlatego w celu uniknięcia wszelkich wątpliwości należy uwzględnić odpowiednie kontrole dodatnie i ujemne oraz sekwencje amplikonów. W przypadku starterów VHSV należy zachować szczególną staranność przy stosowaniu komórek BF-2, ponieważ startery te mogą reagować z linią komórkową DNA/RNA, dając wyniki fałszywie dodatnie o podobnym rozmiarze. Przy badaniu supernatantu z komórek BF-2 sekwencjonuje się wszystkie amplifikowane fragmenty PCR.

I.6.4.3. RT-qPCR w odniesieniu do VHSV

W przypadku VHSV amplifikację przeprowadza się przy wykorzystaniu następujących starterów i następującej sondy:

starter sensowny: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3';

starter antysensowny: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3';

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

Jednoetapowy RT-qPCR:

Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Warunki reakcji: 50 °C przez 30 minut, 95 °C przez 15 minut, 40 cykli w temperaturze 94 °C przez 15 sekund, 60 °C przez 40 sekund, 72 °C przez 20 sekund; w stosownych przypadkach dokonuje się korekty. Alternatywnie można wykorzystać inne wersje RT-PCR lub RT-qPCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

I.6.4.4. RT-qPCR w odniesieniu do IHNV

W przypadku IHNV amplifikację przeprowadza się przy wykorzystaniu następujących starterów i następującej sondy:

starter sensowny: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3';

starter antysensowny: 5'-TTCTTTGCGGCTTGTTGA-3';

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

Dwuetaapowy RT-qPCR:

Ponieważ przedmiotowy test opiera się na amplifikacji dwuetapowej, należy zachować wyjątkową staranność, obchodząc się z próbkami przy przejściu z jednej reakcji do drugiej, aby uniknąć zanieczyszczenia.

Warunki reakcji (po etapie RT): 50 °C przez 2 minut, 95 °C przez 10 minut, a następnie 40 cykli w temperaturze 95 °C przez 15 sekund, 60 °C przez 1 minutę; w stosownych przypadkach dokonuje się korekty.

Alternatywnie można wykorzystać inne wersje RT-PCR lub RT-qPCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

II. Szczegółowe procedury i metody diagnostyczne do celów potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności VHS albo IHN bądź jednocześnie VHS i IHN w podejrzanych ogniskach choroby

Jeśli konieczne są badania laboratoryjne w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności IHN lub VHS zgodnie z art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE przy zastosowaniu metod diagnostycznych określonych w załączniku I część 1 pkt II.3, stosuje się następujące szczegółowe metody i procedury diagnostyczne:

- konwencjonalna izolacja wirusa z następującą po niej seroneutralizacją oraz immunochemiczną lub molekularną identyfikacją wirusa;
- wykrywanie wirusa przy wykorzystaniu RT-PCR lub RT-qPCR;
- inne techniki diagnostyczne, takie jak IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

- II.1. Konwencjonalna izolacja wirusa z następującą po niej identyfikacją wirusa
- II.1.1. Wybór próbek
Do badania wybrać należy przynajmniej 10 ryb wykazujących typowe objawy IHN lub VHS
- II.1.2. Przygotowanie i wysyłka próbek ryb
Przygotowanie i wysyłka do celów konwencjonalnej izolacji wirusa powinny być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.2.
- II.1.3. Pobieranie dodatkowego materiału diagnostycznego
Pobieranie dodatkowego materiału do celów konwencjonalnej izolacji wirusa powinno być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.3.
- II.1.4. Przygotowanie próbek do badania przy wykorzystaniu linii komórkowej
Przygotowanie próbek do badania przy wykorzystaniu linii komórkowej do celów konwencjonalnej izolacji wirusa powinno być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.4.
- II.1.5. Badanie wirusologiczne przy wykorzystaniu linii komórkowej
Badanie wirusologiczne do celów konwencjonalnej izolacji wirusa powinno być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.5.
- II.1.6. Identyfikacja wirusa
Identyfikacja wirusa do celów konwencjonalnej izolacji wirusa powinna być zgodna z metodami i procedurami określonymi w pkt I.6.
- II.2. Wykrywanie wirusa przy wykorzystaniu RT-qPCR
- II.2.1. Wybór próbek
Wybór próbek do celów wykrywania wirusa przy wykorzystaniu RT-qPCR powinien być zgodny z metodami i procedurami określonymi w pkt I.1.2.
- II.2.2. Przygotowanie i wysyłka próbek ryb
Przygotowanie i wysyłka do celów wykrywania wirusa przy wykorzystaniu RT-qPCR powinny być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.2.
- II.2.3. Pobieranie dodatkowego materiału diagnostycznego
Pobieranie dodatkowego materiału diagnostycznego do celów wykrywania wirusa przy wykorzystaniu RT-qPCR powinno być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.3.
- II.2.4. Przygotowanie próbek do RT-qPCR
Przygotowanie próbek do celów wykrywania wirusa przy wykorzystaniu RT-qPCR powinny być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.6.4.1.
- II.2.5. RT-qPCR
Wykrywanie wirusa przy wykorzystaniu RT-qPCR powinno być zgodne z metodami i procedurami określonymi w pkt I.6.4.1, I.6.4.3 i I.6.4.4.
- II.3. Inne metody diagnostyczne
Supernatant przygotowany zgodnie z opisem zawartym w pkt I.4.3 można poddać testowi ELISA zgodnie z pkt I.6.1, testowi immunofluorescencji pośredniej (IFAT) zgodnie z pkt I.6.2 lub RT-PCR zgodnie z pkt I.6.4. Materiał biologiczny można poddać badaniom przeprowadzonym przy wykorzystaniu innych metod diagnostycznych, takich jak IFAT na tkankach mrożonych, immunohistochemia na materiale biologicznym utrwalonym w formalinie. Te szybkie techniki uzupełnia się badaniami wirusologicznymi zgodnie z pkt II lit. a) lub b) w ciągu 48 godzin od pobrania próbek, jeśli:
- uzyskano wynik ujemny; albo
 - uzyskano wynik dodatni na materiale stanowiącym pierwszy przypadek IHN lub VHS.

III. Procedura mianowania w celu sprawdzenia wrażliwości linii komórkowych na zakażenie

Przy przeprowadzaniu mianowania w celu sprawdzenia wrażliwości linii komórkowych na zakażenie, o czym mowa w pkt I.5.3, stosuje się procedury określone poniżej.

Stosuje się przynajmniej dwa izolaty VHSV lub jeden izolat IHNV. Izolaty powinny reprezentować główne grupy wirusów w Unii Europejskiej, tj. w przypadku VHSV – jeden izolat patogenny dla pstrąga tęczowego z wód słodkich i jeden izolat patogenny dla turkota z wód słonych, zaś w przypadku IHNV – jeden szczep patogenny dla pstrąga tęczowego z Unii Europejskiej. Należy stosować dobrze zdefiniowane izolaty z państw członkowskich. Serie wirusów w liniach komórkowych o niskim pasażu rozmnaża się w butelkach z użyciem komórek BF-2 lub RTG-2 w przypadku VHSV oraz komórek EPC lub FHM w przypadku IHNV. Stosuje się podłoże do hodowli linii komórkowych zawierające przynajmniej 10 % surowicy. Do inokulacji stosuje się niskie MOI (< 1).

Po osiągnięciu całkowitego efektu cytopatycznego wirus zbierany jest poprzez odwirowanie supernatantu linii komórkowej z prędkością $2\ 000 \times g$ przez 15 minut, sterylizowany przez odfiltrowanie przez filtr membranowy $0,45\ \mu\text{m}$ i supernatant przenoszony do oznakowanych krioprobówek. Wirus przechowuje się w temperaturze $-80\ ^\circ\text{C}$.

Tydzień po zamrożeniu rozmraża się pod zimną wodą trzy duplikatowe fiołki każdego z wirusów i mianuje na liniach komórkowych odpowiadających danemu wirusowi. Przynajmniej co sześć miesięcy lub w razie podejrzenia zmniejszenia wrażliwości linii komórkowych na zakażenie każdy izolat wirusa rozmraża się i mianuje.

Procedury mianowania w celu sprawdzenia wrażliwości linii komórkowych na zakażenie muszą być szczegółowo opisane, a za każdym razem należy stosować tę samą procedurę.

Mianowanie do punktu końcowego powinno obejmować przynajmniej sześć powtórzeń każdego szeregu rozcieńczenia. Miana należy porównać z mianami otrzymanymi uprzednio. Jeśli miano któregośkolwiek z trzech izolatów wirusa spadnie, w porównaniu ze stężeniem pierwszym, o współczynnik wynoszący 2 log lub więcej, należy zaniechać dalszego wykorzystywania danej linii wirusa do celów nadzoru.

Jeśli w laboratorium przechowuje się różne linie komórkowe, każdą linię komórkową bada się osobno.

Dokumentację zachowuje się przez okres 10 lat.

CZĘŚĆ 2

SZCZEGÓŁOWE METODY I PROCEDURY DIAGNOSTYCZNE DO CELÓW NADZORU I POTWIERDZENIA W ODNIESIENIU DO ZAKAŻENIA HERPESWIRUSEM KOI (KHVD)

I. Szczegółowe metody i procedury diagnostyczne do celów potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności KHVD

Jeśli konieczne są badania laboratoryjne w celu potwierdzenia obecności KHVD lub wykluczenia podejrzenia obecności tej choroby zgodnie z art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE przy zastosowaniu metod diagnostycznych określonych w załączniku I część 2 sekcja III, stosuje się szczegółowe metody i procedury diagnostyczne określone w pkt I.1–I.2:

I.1. Przygotowanie próbek ryb

Do celów diagnostycznych do badań przy wykorzystaniu metod opartych na konwencjonalnym PCR lub qPCR można wykorzystać ryby przesyłane żywe lub uśmiercone, zapakowane osobno w hermetycznie zamknięte pojemniki aseptyczne lub alternatywnie zamrożone narządy lub fragmenty narządów zachowane w etanolu od 80 % do absolutnego lub wirusowe podłoże transportowe (które należy poddać obróbce w przeciągu 48 godzin od pobrania).

W celu wykrycia KHV pobiera się skrzela i nerki; do dodatkowej, odrębnej próbki włączyć można ponadto śledzionę, mózg i jelito. W nagłych przypadkach łączyć można materiał biologiczny pochodzący od maksymalnie pięciu ryb.

Ponadto w niektórych przypadkach można stosować próbki pobrane bez konieczności uśmiercania zwierząt, takie jak krew, wymaz ze skrzeli, biopsję skrzeli, zeszkrobany śluz (oznacza to możliwość pobrania próbek od bardzo cennych ryb w razie podejrzenia obecności KHV).

I.1.1. Ekstrakcja DNA

Ekstrakcji DNA dokonuje się zgodnie z procedurami standardowymi.

Można stosować dostępne komercyjnie zestawy do ekstrakcji DNA, dzięki którym uzyskuje się DNA wysokiej jakości nadające się do wykorzystania w ramach protokołów PCR opisanych w pkt I.2.

I.2. Detekcja i identyfikacja czynnika za pomocą metod opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

I.2.1. qPCR do wykrywania KHV

Do wykrywania KHV stosuje się następujący test qPCR:

starter sensowny (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3';

starter antysensowny (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3';

i sonda (KHV-109p): 5'-FAM- CTTCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Warunki reakcji: jeden cykl 15 minut w temperaturze 95 °C, a następnie 40 cykli 15 sekund w temperaturze 94 °C i 60 sekund w temperaturze 60 °C. Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Można jednak wykorzystać inne wersje qPCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

I.2.2. Konwencjonalne PCR do wykrywania KHV

Stosuje się opisany w niniejszym punkcie test w kierunku genu kinazy tymidynowej (TK) herpeswirusa koi. Alternatywnie można jednak zastosować inne testy PCR o udowodnionej czułości i swoistości porównywalnej z opisanym testem.

starter sensowny (KHV-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3';

starter antysensowny (KHV-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Warunki reakcji: jeden cykl 5 minut w temperaturze 95 °C, a następnie 35 cykli 30 sekund w temperaturze 95 °C, 30 sekund w temperaturze 52 °C, jednej minuty w temperaturze 72 °C i jeden cykl 10 minut w temperaturze 72 °C. Wielkość produktu powinna wynosić 409 bp.

Wyniki PCR mogą być różne w zależności od warunków przeprowadzania testu – optymalizacji wymagać mogą protokoły termiczne w zależności od wykorzystywanego termocyklera. Ponadto wystąpić mogą wyniki fałszywie dodatnie ze względu na nieprawidłowe przyłączanie starterów lub zanieczyszczenia. Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Można jednak wykorzystać inne wersje PCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

Pierwszy przypadek wykrycia na danym obszarze należy potwierdzić sekwencjonowaniem lub przesłać krajowemu laboratorium referencyjnemu lub laboratorium referencyjnemu UE ds. chorób ryb, o którym mowa w załączniku VI do dyrektywy 2006/88/WE w celu natychmiastowej identyfikacji.

II. **Szczegółowe metody i procedury diagnostyczne do celów nadzoru i potwierdzenia w odniesieniu do KHVD**

Gdy do celów uzyskania lub utrzymania określonego statusu w odniesieniu do KHVD lub VHS, jak określono w załączniku I część 2 sekcja I, pobiera się próbki i prowadzi badania laboratoryjne przy zastosowaniu metod diagnostycznych określonych w części 2 sekcja II lub III wspomnianego załącznika, stosuje się pkt II.1 i II.2.

II.1. Przygotowanie próbek ryb

W miarę możliwości próbki pobiera się od ryb utrzymywanych przez dłuższy okres w zakresie temperatur umożliwiającym rozwój choroby (tj. przez dwa do trzech tygodni w temperaturze 15 – 26 °C). W celu zwiększenia szansy wykrycia KHV próbki pobiera się w miarę możliwości w 24 godziny, ale nie później niż 72 godzin po takich czynnościach w ramach praktyk zarządzania zasobami akwakultury, które mogłyby reaktywować wirus u ryb będących jego żywicielami, jak na przykład odławianie siecią lub transport.

Do celów nadzoru nad KHVD ryby można przysyłać żywe lub uśmiercone, zapakowane osobno w hermetycznie zamkniętych pojemnikach aseptycznych; alternatywnie zamrożone narządy lub fragmenty narządów zachowane w alkoholu 80– 100 % lub wirusowe podłoże transportowe (które należy poddać obróbce w przeciągu 48 godzin od pobrania) można wykorzystać do badań przy wykorzystaniu metod opartych na PCR. W celu nadzoru nad KHVD pobiera się skrawki skrzel i nerek.

Do celów nadzoru nad KHVD należy w miarę możliwości unikać łączenia próbek. Jeśli łączenie jest konieczne, można łączyć materiał biologiczny z nie więcej niż dwóch ryb. Większe próbki homogenizuje się za pomocą móżdżerka i tłuczka lub stomachera, a przed klarowaniem pobiera się podpróbki do ekstrakcji DNA. Alternatywnie podpróbki można pobrać z każdej tkanki wchodzącej w skład próbki i umieścić w próbkach do lizy.

II.1.1. Ekstrakcja DNA

Ekstrakcji DNA dokonuje się zgodnie z procedurami standardowymi. Można stosować dostępne komercyjnie zestawy do ekstrakcji DNA, dzięki którym uzyskuje się DNA wysokiej jakości nadające się do wykorzystania w ramach protokołów PCR opisanych w pkt II.2.

Dopuszczalny stosunek tkanek do podłoża wynosi 1:9 w/v. Badaniem obejmuje się 20 – 25 mg materiału biologicznego.

II.2. Nadzór nad KHVD za pomocą metod opartych na PCR

Do celów nadzoru nad KHV stosuje się qPCR. Jeśli próbki dodatnie pojawią się na obszarze, na którym dotychczas nie potwierdzono występowania próbek dodatnich, wyniki badań należy potwierdzić poprzez:

a) sekwencjonowanie produktu PCR lub zagnieżdżonego PCR z tych próbek.

Otrzymana czysta sekwencja konsensusowa musi zgadzać się (w przynajmniej 98 %) z tymi sekwencjami referencyjnymi.

b) alternatywnie próbki można przesłać do krajowego laboratorium referencyjnego w celu potwierdzenia.

II.2.1. qPCR do wykrywania KHV

Stosuje się qPCR opisane poniżej:

starter sensowny (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3';

starter antysensowny (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3';

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

Warunki reakcji: jeden cykl 15 minut w temperaturze 95 °C, a następnie 50 cykli 15 sekund w temperaturze 94 °C i 60 sekund w temperaturze 60 °C.

Wyniki qPCR mogą być różne w zależności od warunków przeprowadzania testu – optymalizacji wymagać mogą protokoły termiczne w zależności od wykorzystywanego termocyklera. Ponadto wystąpić mogą wyniki fałszywie dodatnie ze względu na nieprawidłowe przyłączanie starterów lub zanieczyszczenia w laboratorium. Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Można jednak wykorzystać inne wersje qPCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

II.2.2. Konwencjonalne PCR do potwierdzania wykrycia KHV

W celu potwierdzenia obecności zakażenia KHV stosuje się generyczne zagnieżdżone PCR opisane w poniższej tabeli 2.1 z następnym sekwencjonowaniem amplifikowanego produktu.

Tabela 2.1

Startery i warunki odnoszące się do testu techniką zagnieżdżonego PCR w kierunku wszystkich herpeswirusów koi karpia (CyHV-1, CyHV-2 i CyHV-3)

Nazwa startera	Sekwencja	Warunki reakcji	Wielkość produktu
CyHVpol-forward	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	Pierwsza runda PCR 1 cykl: 95 °C przez 2 minuty 40 cykli: 95 °C przez 30 sekund 55 °C przez 30 sekund 72 °C przez 45 sekund 1 cykl: 72 °C przez 10 minut	362 bp
CyHVpol-reverse	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'		

Nazwa startera	Sekwencja	Warunki reakcji	Wielkość produktu
CyHVpol-internal forward	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	Druga runda PCR 1 cykl: 95 °C przez 2 minuty	339 bp
CyHVpol-internal reverse	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3'	40 cykli: 95 °C przez 30 sekund 55 °C przez 30 sekund 72 °C przez 45 sekund 1 cykl: 72 °C przez 10 minut	

Wyniki PCR mogą być różne w zależności od warunków przeprowadzania testu – optymalizacji wymagać mogą protokoły termiczne w zależności od wykorzystywanego termocyklera. Ponadto wystąpić mogą wyniki fałszywie dodatnie ze względu na nieprawidłowe przyłączanie starterów lub zanieczyszczenia w laboratorium. Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Można wykorzystać inne wersje PCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

Sekwencjonowanie może być przeprowadzone przez laboratorium lub przez zewnętrzne wyspecjalizowane przedsiębiorstwa zajmujące się sekwencjonowaniem. Wyniki sekwencjonowania analizuje się poprzez dopasowanie sekwencji do znanych sekwencji referencyjnych KHV (numery dostępu GenBank AP008984, DQ657948 i DQ177346). Otrzymana czysta sekwencja konsensusowa musi zgadzać się w przynajmniej 98 % z tymi sekwencjami referencyjnymi.

CZĘŚĆ 3

SZCZEGÓŁOWE METODY I PROCEDURY DIAGNOSTYCZNE DO CELÓW NADZORU I POTWIERDZENIA ZAKAŻENIA ZAKAŻNĄ ANEMIAŁ ŁOSOSIA (ISA)

I. Procedury pobierania próbek do celów nadzoru i kontroli w odniesieniu do ISA

W ramach pobierania próbek i badań laboratoryjnych do celów programów nadzoru lub zwalczania określonych w załączniku I część 3 lub do celów potwierdzenia lub wykluczenia obecności ISA zgodnie z art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE stosuje się szczegółowe metody i procedury określone w pkt I.1, I.2 oraz I.3.

I.1. Przygotowanie próbek ryb

W miarę możliwości nie należy łączyć próbek ryb do celów badań laboratoryjnych na obecność ISA. Jednakże do celów nadzoru nad ISA dopuszcza się łączenie 2 – 5 ryb.

Próbki do analizy przy wykorzystaniu łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) pobiera się ze wszystkich ryb pobranych jako próbka. Za pomocą sterylnego narzędzia od ryby pobiera się fragment nerki – części środkowej i przenosi do probówki zawierającej jeden ml roztworu substancji konserwującej RNA o sprawdzonej skuteczności. Tkanki pochodzące od maksymalnie pięciu ryb mogą zostać zebrane do jednej probówki z roztworem transportowym i stanowią jedną próbkę zbiorczą. Waga tkanek w jednej próbce powinna wynosić 0,5 g. Jeśli ryby są zbyt małe, by można było uzyskać próbkę o wymaganej wadze, można pobrać (w kolejności preferencji) fragmenty nerki, serca, śledziony, wątroby lub wyrostków pylorycznych, aby uzyskać 0,5 g.

Tkanki do celów badania histologicznego pobiera się jedynie ze świeżo uśmierconych ryb w normalnym stanie wykazujących objawy kliniczne lub oznaki pośmiertne wskazujące na obecność ISA. Pobiera się próbki obejmujące wszelkie uszkodzenia zewnętrzne lub wewnętrzne, a w każdych okolicznościach z poszczególnych ryb pobiera się, przy użyciu skalpela, próbki nerki – części środkowej, serca, wątroby, trzustki, przewodu pokarmowego, skrzeli i śledziony, przenosząc je następnie do 8–10 % (vol:vol) roztworu soli fizjologicznej buforowanego formaldehydem. Aby zapewnić wystarczający stopień zakonserwowania tkanek, stosunek utrwalcza do tkanek powinien wynosić przynajmniej 20:1. Do celów immunohistochemii (IHC) pobiera się próbki z nerki – części środkowej i serca.

Od wszystkich ryb pobranych jako próbka pobiera się tkanki do badań wirusologicznych przy wykorzystaniu linii komórkowej. Za pomocą sterylnego narzędzia od ryby pobiera się fragmenty wątroby, nerki – części głowowej lub środkowej, serca i śledziony i przenosi do próbek plastikowych zawierających 9 ml podłoża transportowego. Tkanki pochodzące od maksymalnie pięciu ryb mogą zostać zebrane do jednej próbki zawierającej roztwór transportowy i stanowią jedną próbkę zbiorczą. Waga tkanek w jednej próbce powinna wynosić $1,0 \pm 0,5$ g.

I.2. Wysyłka próbek ryb

Do laboratorium przesyłać można całe ryby, jeśli możliwe jest spełnienie wymogów dotyczących temperatury podczas transportu, o których mowa w akapicie trzecim. Całą rybę owija się w papier higroskopijny i wysyła w torbie plastikowej, schłodzoną, jak opisano w niniejszym akapicie.

Wysyłać można również żywe ryby, ale jedynie pod nadzorem krajowego laboratorium referencyjnego ds. chorób ryb i uwzględniając dodatkowe kwestie związane z dezynfekcją i bezpieczeństwem biologicznym odnoszące się do przewozu żywych ryb.

Próbki krwi i próbki zawierające tkanki ryb do celów badań wirusologicznych lub RT-PCR umieszcza się w izolowanych pojemnikach, takich jak grubościenna pudła polistyrenowe, wraz z taką ilością lodu lub bloków mrożących, która zapewnia chłodzenie próbek podczas transportu do laboratorium. Należy unikać mrożenia, a w chwili przyjęcia wysyłki w pudle transportowym musi być nadal lód bądź też przynajmniej jeden z bloków mrożących musi być zamrożony w części lub w całości. W wyjątkowych okolicznościach próbki do RT-PCR lub do badania wirusologicznego można poddać mrożeniu szokowemu i przesłać do laboratorium w temperaturze -20 °C lub niższej.

Do analizy RT-PCR ekstrakcja RNA powinna być przeprowadzona z tkanek utrwalonych w utrwalaczu RNAlater z zachowaniem następujących terminów zależnych od temperatury, w której przechowywane są próbki:

próbki przechowywane w temperaturze 37 °C: jeden dzień;

próbki przechowywane w temperaturze 25 °C: jeden tydzień;

próbki przechowywane w temperaturze 4 °C: jeden miesiąc;

próbki przechowywane w temperaturze -20 °C: brak ograniczenia czasowego.

Tkanki ryb przewożone w utrwalaczu do celów badania histologicznego wysyła się w szczelnych próbkach w pojemnikach odpornych na uderzenia. Należy unikać zamrażania tych próbek.

Badanie wirusologiczne przy wykorzystaniu linii komórkowej należy rozpocząć jak najwcześniej, ale nie później niż 48 godzin po pobraniu próbek. W wyjątkowych przypadkach badanie wirusologiczne można rozpocząć nie później niż 72 godziny po pobraniu materiału, o ile materiał poddawany badaniu jest chroniony podłożem transportowym oraz o ile możliwe jest spełnienie wymogów dotyczących temperatury podczas transportu.

I.3. Pobieranie dodatkowego materiału diagnostycznego

Jeśli zatwierdzi to laboratorium diagnostyczne, do dodatkowego badania można pobierać i przygotowywać tkanki ryb inne niż tkanki, o których mowa w pkt I.1.

II. Szczegółowe metody i procedury diagnostyczne do celów nadzoru i do celów potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia obecności ISA

Jeśli, wykorzystując metody diagnostyczne określone w załączniku I część 3 sekcja II, przeprowadza się badania laboratoryjne w celu uzyskania lub utrzymania określonego statusu zdrowotnego w odniesieniu do ISA, jak określono w załączniku I część 3 sekcja I, lub w celu potwierdzenia obecności ISA lub wykluczenia podejrzenia obecności tej choroby zgodnie z art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE, stosuje się szczegółowe metody i procedury określone poniżej w pkt II.1–II.5.

II.1. Analiza próbek przy wykorzystaniu RT-PCR

Metodą diagnostyczną stosowaną do celów badań przesiewowych w odniesieniu do ISAV jest RT-qPCR. Jako że metoda RT-qPCR może dawać różne wyniki w zależności od warunków, w jakich przeprowadza się test, należy zastosować odpowiednie kontrole dodatnie i ujemne oraz amplikony w celu uniknięcia wszelkich wątpliwości.

II.1.1. Ekstrakcja całkowitego RNA

Wszelkie prace przy izolacji RNA wykonuje się na lodzie przy użyciu rękawiczek.

Ekstrakcji całkowitego RNA dokonuje się, stosując metodę fenolowo-chloroformową lub kolumnkową zgodnie ze wskazówkami producenta.

Oczyszczone RNA zawieszają się ponownie w wodzie wolnej od RNaz (tj. wodzie poddanej działaniu 0,1 % dietylodiiwęglanu).

Stężenie i czystość wyekstrahowanego RNA ocenia się poprzez pomiar gęstości optycznej przy 260 nm i przy 280 nm. Alternatywną metodą może być uwzględnienie kontroli wewnętrznych w kierunku genomu wirusa, jak opisano w pkt II.1.3.

II.1.2. RT-PCR do wykrywania ISAV

Do amplifikacji genomu ISAV stosować można kilka metod RT-PCR. Można przeprowadzić dwuetapowy RT-qPCR, przy czym etapy reakcji RT i PCR przeprowadza się w dwóch osobnych probówkach. Można jednak także przeprowadzić reakcję jednoetapową, w której wspomniane dwie reakcje przeprowadza się w jednej probówce. W miarę możliwości stosować należy metodę jednoetapową ze względu na to, że ogranicza do minimum ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego, ponieważ nie dokonuje się w niej transferu zawartości, a przy tym jest ona uznawana za równie czułą co metoda dwuetapowa.

Należy stosować startery i testy opisane w niniejszym punkcie, tj. parę starterów ILA1 lub ILA2, które są nakierowane na segment 8 i które uznano za odpowiednie do wykrywania ISAV w ogniskach choroby i u ryb będących żywicielami. Starter antysensowny ILA2 nie działa w odniesieniu do izolatów z Ameryki Północnej i w takich przypadkach stosować należy alternatywne zestawy starterów.

Starter sensowny (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3';

starter antysensowny (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Warunki reakcji: jeden cykl 30 minut w temperaturze 50 °C, 1 cykl 15 minut w temperaturze 94 °C, 40 cykli 30 sekund w temperaturze 94 °C, 30 sekund w temperaturze 55 °C, 60 sekund w temperaturze 72 °C; jeden cykl 5 min w temperaturze 72 °C. Wielkość produktu: 155 bp.

Wyniki PCR mogą być różne w zależności od warunków przeprowadzania testu – optymalizacji wymagać mogą protokoły termiczne w zależności od wykorzystywanego termocyklera. Ponadto wystąpić mogą wyniki fałszywie dodatnie ze względu na nieprawidłowe przyłączanie starterów lub zanieczyszczenia w laboratorium. Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Można jednak wykorzystać inne wersje RT-PCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

II.1.3. RT-qPCR do wykrywania ISAV

Dzięki stosowaniu RT-qPCR można zwiększyć swoistość i prawdopodobnie także czułość. Metoda ta jest szybsza, ponieważ nie wymaga etapu elektroforezy w żelu, a ponadto ogranicza ona ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego, ponieważ możliwe jest oszacowanie ilości genomowego RNA wirusa w probówce. Test RT-qPCR ma tę wadę, że często nie jest możliwe sekwencjonowanie amplifikowanych produktów. Jeżeli jednak są wątpliwości co do swoistości amplifikowanego produktu, należy przeprowadzić kolejny test specyficzny dla ISAV w celu sprawdzenia wyniku.

Stosuje się opisany w niniejszym punkcie test nakierowany na segment 8. Test ten powinien obejmować izolaty z Unii Europejskiej, Europejskiego Stowarzyszenia Wolnego Handlu i Ameryki Północnej. W miarę możliwości stosować należy metodę jednoetapową ze względu na to, że ogranicza do minimum ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego.

starter sensowny: 5'- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3';

starter antysensowny: 5'- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3';

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

Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Warunki reakcji: jeden cykl 30 minut w temperaturze 50 °C, jeden cykl 15 minut w temperaturze 95 °C, 40 cykli 15 sekund w temperaturze 94 °C, 60 sekund w temperaturze 60 °C; w stosownych przypadkach dokonuje się korekty. Alternatywnie można wykorzystać inne wersje RT-PCR lub RT-qPCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

II.1.4. Sekwencjonowanie amplifikowanych produktów PCR

Starter sensowny (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3';

starter antysensowny (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3'.

Kontrole negatywne i kontrole dodatnie należy uwzględnić przy każdej analizie. Warunki reakcji (jednoetapowy RT-PCR): jeden cykl 30 minut w temperaturze 50 °C, jeden cykl 15 minut w temperaturze 94 °C, 40 cykli 30 sekund w temperaturze 94 °C, 30 sekund w temperaturze 55 °C, 60 sekund w temperaturze 72 °C i jeden cykl 5 minut w temperaturze 72 °C; w stosownych przypadkach dokonuje się korekty. Alternatywnie można wykorzystać inne wersje RT-PCR lub RT-qPCR o sprawdzonej podobnej skuteczności.

Alternatywnie można stosować następującą metodę do sekwencjonowania HPR w segmencie 6:

starter sensowny: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3';

starter antysensowny: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3';

Wielkość produktu: 304 nt w przypadku HPR0.

Można również stosować testy RT-PCR o czułości i swoistości równoważnej opisanemu tu testowi.

Przed sekwencjonowaniem czystość amplifikowanego produktu RT-PCR sprawdza się za pomocą elektroforezy w żelu. Jeśli stwierdzi się obecność jedynie jednego czystego fragmentu, powinien on zostać oczyszczony bezpośrednio w wyniku reakcji PCR. Jeśli występuje wiele fragmentów amplifikowanych, interesujący fragment należy oczyścić za pomocą elektroforezy w żelu. Fragmenty PCR z roztworów lub żeli agarozowych oczyszcza się przy użyciu kolumniek do fragmentów PCR zgodnie z zaleceniami producenta.

Sekwencjonowanie przeprowadza się przy użyciu starterów amplifikacji, a zadanie to zleca się zewnętrznym wyspecjalizowanym przedsiębiorstwom zajmującym się sekwencjonowaniem. Wyniki analizuje się przy wykorzystaniu narzędzia bioinformatycznego BLAST, a sekwencje porównuje się z innymi znanymi sekwencjami z bazy danych nukleotydów prowadzonej przez Krajowe Centrum Informacji Biotechnicznej w USA (NCBI).

Sekwencjonowanie powinno usunąć wszelkie wątpliwości dotyczące swoistości amplifikowanego produktu RT-PCR.

II.2. Izolacja ISAV w liniach komórkowych

II.2.1. Przygotowanie próbek

Tkanki można przechowywać w temperaturze – 80 °C. Przed badaniem tkanki mogą zostać jeden raz zamrożone i rozmrożone. Badanie do celów nadzoru i kontroli przeprowadza się w najwcześniejszym możliwym terminie.

Każdą próbkę (tkanki łączone w roztworze transportowym) poddaje się pełnej homogenizacji przy użyciu zwalidowanego homogenizatora, wiruje z prędkością 2 000 to 4 000 × g przez 15 minut w temperaturze 0–6 °C, a supernatant filtruje się (0,45 µm) i inkubuje w równych objętościach z odpowiednio rozcieńczonymi łączonymi surowicami odpornościowymi przeciwko rodzimym serotypom IPNV. Miano surowicy odpornościowej musi wynosić przynajmniej 1:2 000 w teście neutralizacji przy użyciu płytek (50 %). Mieszaninę inkubuje się przez godzinę w temperaturze 15 °C, co stanowić będzie inokulum.

Poddanie całego inokulum działaniu surowicy odpornościowej przeciwko wirusowi zakaźnej martwicy trzustki (który to wirus w niektórych częściach Europy występuje w 50 % próbek ryb) ma zapobiec powstaniu efektu cytopatycznego (CPE) spowodowanego rozwijaniem się wirusa IPN w inokulowanych liniach komórkowych. Obróbkę taką można przeprowadzić w celu ograniczenia czasu trwania badań wirusologicznych oraz liczby przypadków, w których powstanie efektu cytopatycznego (CPE) prowadziłyby do potencjalnego wskazania podejrzenia obecności ISAV. Jeśli próbki pochodzą z jednostek produkcyjnych uznanych za wolne od choroby w odniesieniu do IPN, można zaniechać poddania inokulum działaniu surowicy odpornościowej przeciwko wirusowi IPN.

II.2.2. Inokulacja linii komórkowych

Linie komórkową pochodzącą z komórek nerki łososia atlantyckiego (ASK) wykorzystuje się jako podstawową do izolacji ISAV. Można stosować inne linie komórkowe o sprawdzonej skuteczności i czułości w odniesieniu do izolowania ISAV, uwzględniając dostępność szczepu i zdolność różnych szczepów do namnażania się w różnych liniach komórkowych. Linia komórkowa ASK jest odpowiednia do izolacji i hodowli dotychczas znanych izolatów wirusa, o ile stosuje się niski poziom pasażowania. W linii komórkowej ASK może wystąpić bardziej wyraźny efekt cytopatyczny niż w innych podatnych liniach komórkowych, takich jak SHK-1 (Salmon head kidney-1).

ASK (pasaż 65 lub niższy) hoduje się w podłożu L-15 zawierającym 10 % płodową surowicę bydlęcą, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutaminę i 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanol w płytkach wielodołkowych. Zawiesinę z narządów poddanych działaniu surowicy odpornościowej inokuluje się do młodych, aktywnie rosnących linii komórkowych tak, by osiągnąć ostateczne rozcieńczenie materiału biologicznego w stosunku do podłoża wynoszące 1:1 000. W odniesieniu do każdego organu do dołka zawierającego 2 ml podłoża dodaje się zawiesinę 40 µl inokulum. Aby ograniczyć do minimum ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego, dla próbek z różnych miejsc gospodarstwa rybackiego należy stosować osobne płytki 12- lub 24-dołkowe.

Jednej płytce nie poddaje się inokulacji, tak by służyła jako kontrola ujemna. Osobną płytkę inokuluje się w sposób podany poniżej izolatem referencyjnym wirusa ISAV i stanowi ona kontrolę dodatnią. 100 µl preparatu wyjściowego ISAV (minimalne miano 10^7 dawki zakaźnej dla 50 % hodowli tkankowej (TCID₅₀ ml⁻¹)) inokuluje się do pierwszego dołka i miesza. Całą objętość materiału przenosi się z pierwszego dołka do drugiego i rozcieńcza w stosunku 1:10 oraz miesza. Czynność tę powtarza się na całej płytce, tak aby utworzyć sześć 10-krotnych rozcieńczeń. Preparat wyjściowy ISAV można przechowywać w temperaturze – 80 °C przez co najmniej dwa lata, lecz po rozmrożeniu należy go zużyć w ciągu trzech dni. Należy uważać, by zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu badanych płytek kontrolą dodatnią. Aby uniknąć takiego ryzyka, kontrole dodatnie należy umieścić i obchodzić się z nimi z dala od badanych płytek. Stosowanie przy każdej inokulacji kontroli dodatniej można zastąpić przeprowadzonym co sześć miesięcy badaniem wrażliwości ASK na izolaty ISAV.

Próbki inkubuje się w temperaturze 15 ± 2 °C przez okres do 15 dni. Linie komórkowe sprawdza się za pomocą mikroskopu pod kątem wystąpienia CPE dwukrotnie: między 5 a 7 oraz między 12 a 14 dniem od inokulacji. Jeżeli w którymkolwiek dołku płytki stwierdzi się występowanie CPE, wszczynane są niezwłocznie procedury identyfikacji zgodnie z pkt II.2.4. Jeżeli do 14 dnia nie stwierdzi się wystąpienia CPE, przeprowadza się test immunofluorescencji pośredniej (IFAT), hemadsorpcję lub RT-PCR.

II.2.3. Pasażowanie

Pasażowania dokonuje się między 13 a 15 dniem. Supernatant kultury dodaje się do dołków w wielodołkowych płytkach ze świeżymi, aktywnie rosnącymi komórkami w odpowiednim rozcieńczeniu (1/10) i inkubuje w temperaturze 14 ± 2 °C przez okres do 18 dni. Linie komórkowe sprawdza się za pomocą mikroskopu pod kątem wystąpienia CPE dwukrotnie: między piątym a siódmym oraz między 14 a 18 dniem od inokulacji. Jeżeli w którymkolwiek dołku płytki stwierdzi się występowanie CPE, wszczynane są niezwłocznie procedury identyfikacji zgodnie z pkt II.2.4. Jeżeli do 14–18 dnia nie stwierdzi się wystąpienia CPE, przeprowadza się hemadsorpcję lub test RT-PCR.

W przypadku wystąpienia cytotoksyczności w ciągu pierwszych siedmiu dni od inkubacji, pasażowania dokonuje się na tym etapie, a komórki inkubuje się przez 14 do 18 dni i ponownie pasażuje, poddając je ponownie inkubacji przez 14 do 18 dni. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności po siedmiu dniach, pasażowania dokonuje się raz, a komórki inkubuje się tak, aby całkowity okres inkubacji wynosił 28–36 dni od pierwszej inokulacji.

Jeżeli skażenie bakteryjne wystąpi w pierwszej izolacji, badanie należy powtórzyć z zastosowaniem homogenatu tkanki przechowywanego w temperaturze – 80 °C. Przed inokulacją, homogenat odwirowuje się z prędkością $4\ 000 \times g$ przez 15 do 30 minut i w temperaturze 0–6 °C, a supernatant filtruje się przez filtr 0,22 µm. Jeżeli skażenie bakteryjne wystąpi na etapie pasażowania, supernatant filtruje się przez filtr 0,22 µm, inokuluje na świeże komórki i inkubuje przez kolejne 14 do 18 dni.

II.2.4. Testy identyfikacji wirusa

Jeśli na jakimkolwiek etapie stwierdzono dowody na wystąpienie CPE lub jeśli test hemadsorpcji jest dodatni, należy dokonać identyfikacji wirusa. Preferowanymi metodami służącymi identyfikacji ISAV są RT-PCR zgodnie z pkt II.1 oraz test immunofluorescencji (IF) zgodnie z pkt II.2.6. Jeśli uważa się za możliwą obecność innych wirusów, przeprowadzane są uzupełniające testy identyfikacji wirusa. Jeśli badania te nie doprowadziły do definitywnego zidentyfikowania wirusa w ciągu tygodnia, supernatant przekazuje się w celu natychmiastowej identyfikacji do:

- laboratorium referencyjnego ds. ISA Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), lub;
- krajowego laboratorium referencyjnego lub laboratorium referencyjnego UE ds. chorób ryb, o których mowa w załączniku VI dyrektywy 2006/88/WE.

II.2.5. Hemadsorpcja

Ponieważ replikacja ISAV w liniach komórkowych nie zawsze skutkuje CPE, każdy dołek poddaje się testowi RT-PCR lub testowi hemadsorpcji zgodnie z niniejszym punktem, lub testowi IF zgodnie z pkt II.2.6.

Z każdego dołka, w tym z dołków zawierających kontrolę dodatnią i ujemną, należy usunąć podłoże do linii komórkowej i umieścić w sterylnych probówkach opatrzonych etykietami. Do każdego dołka dodaje się 500 µl 0,2 % (vol:vol) zawiesiny wypłukanych czerwonych krwinek królika lub konia bądź 0,05 % (vol:vol) zawiesiny wypłukanych czerwonych krwinek pstrąga tęczowego lub łososa atlantyckiego i inkubuje w temperaturze pokojowej przez 45 minut. Czerwone krwinki usuwa się, a każdy dołek przemywa dwukrotnie podłożem L-15. Każdy dołek bada się przy użyciu mikroskopu.

Występowanie skupisk czerwonych krwinek przylegających do powierzchni ASK wskazuje na przypuszczalne zakażenie ortomikswirusem. Jeżeli wynik testu hemadsorpcji jest dodatni, wykonuje się niezwłocznie test identyfikacji wirusa zgodnie z pkt II.2.4.

II.2.6. Test immunofluorescencji (IF)

ASK (pasaż 65 lub niższy) hoduje się w podłożu L-15 zawierającym 10 % płodową surowicę bydlęcą, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutaminę i 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanol w płytkach wielodołkowych i stosuje przy konfluencji wynoszącej ponad 50 %. Można użyć innych linii komórkowych o sprawdzonej skuteczności lub innej pożywki o sprawdzonej skuteczności. Do każdego z dwóch dołków dodaje się 225 µl zakażonego wirusem supernatantu z linii komórkowej, miesza zawartość i przenosi 225 µl do dwóch kolejnych dołków, tj. do rozcieńczenia 1:5. Dwóch dodatkowych dołków nie inokuluje się, tak by służyły jako kontrole. Próbkę z każdego miejsca gospodarstwa rybackiego poddaje się obróbce na osobnych płytkach, co dotyczy także kontroli wirusa. Należy utworzyć kontrolę wirusa przy wykorzystaniu izolatu referencyjnego wirusa ISAV.

Płytkę inkubuje się w temperaturze 14 ± 2 °C i poddaje badaniom mikroskopowym przez okres do siedmiu dni. Jeśli stwierdzi się wystąpienie wczesnego CPE lub jeśli nie stwierdzi się wystąpienia CPE w ciągu 7 dni, przystępuje się do następnego etapu, którym jest utrwalanie. Dołki przemywa się roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) i utrwalą poprzez inkubację z acetonem (80 %) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Płytkę osusza się powietrzem i zabarwia natychmiast lub przechowuje przed barwieniem w temperaturze 0–6 °C nie dłużej niż przez 24 godziny.

Dołki do powtórnej analizy barwi się mieszaniną przeciwciał monoklonalnych (MAb) 3H6F8 i 10C9F5 przeciwko ISAV lub innego MAb o sprawdzonej skuteczności i swoistości, rozcieńczonego w PBS i inkubowanego przez 30 minut w temperaturze 37 ± 4 °C. MAb usuwa się, a płytkę przemywa trzykrotnie przy użyciu 0,05 % Tween 20 w PBS. Do każdego dołka dodaje się rozpuszczony w PBS koniugat przeciwciała mysiego anty-IgG i izotiocyanianu fluoresceiny (FITC) oraz inkubuje przez 30 minut w temperaturze 37 ± 4 °C. W każdym laboratorium optymalizuje się rozcieńczenia różnych serii koniugatu MAb i FITC. Przeciwciała usuwa się, a płytkę przemywa trzykrotnie przy użyciu 0,05 % Tween 20 w PBS.

Dołki niezwłocznie poddaje się badaniu przy pomocy mikroskopu odwróconego nastawionego na fluorescencyjne badanie mikroskopowe z zastosowaniem odpowiedniego filtra do wzbudzenia FITC. Wynik badania uważa się za dodatni, jeśli zaobserwowano komórki fluoryzujące. Badanie jest ważne, jeśli kontrole dodatnie dały wynik dodatni, a kontrole ujemne – wynik ujemny.

II.3. Badanie innych tkanek

Technikę, o której mowa w pkt II.2.6, można zastosować do innych tkanek ryb, takich jak wątroba, śledziona i serce, o ile możliwe jest umieszczenie na szkiełku rozsądnej ilości komórek śródbłonka, leukocytów lub limfocytów. Procedura barwienia pozostaje niezmienna dla każdej tkanki, choć w przypadku niektórych tkanek może być wskazane, by pominąć barwienie jodkiem propidyny i polegać na kontraście fazowym w celu identyfikacji rodzajów komórek obecnych w odcisku.

II.4. Histologia:

Skrawki w parafinie można pociąć na 5 µm i zabarwić przy użyciu hematoksyliny i eozyny.

Zmiany histologiczne u klinicznie chorego łososa atlantyckiego są różne, ale mogą obejmować:

- a) liczne erytrocyty w centralnej zatoce żyłnej oraz blaszkowatych naczyniach włosowatych skrzeli, gdzie także mogą powstawać skrzepliny z erytrocytów;
- b) wybroczyny, od wielogniskowych po zlewające się, lub martwica hepatocytów, występujące osobno lub razem w pewnym oddaleniu od większych naczyń w wątrobie; wielogniskowe nagromadzenie erytrocytów w rozszerzonych sinusoidach wątroby;

- c) nagromadzenie erytrocytów w naczyniach krwionośnych blaszki właściwej błony śluzowej jelit i w rezultacie krwotok w obrębie blaszki właściwej;
- d) nabrzmienie warstwy podskórnej śledziony spowodowane nagromadzeniem erytrocytów;
- e) krwotoki śródmiąższowe, od lekko wielogniskowych po rozległe rozlane, z martwicą kanalików nerkowych w obszarach dotkniętych krwotokiem, nagromadzenia erytrocytów w kłębuszkach nerkowych;
- f) erytofagocytoza w śledzionie i wtórne krwotoki w wątrobie i nerkach.

II.5. Immunohistochemia (IHC)

Na skrawkach parafinowych z tkanek utrwalonych w formalinie stosuje się przeciwciało poliklonalne przeciwko nukleoproteinie ISAV. Badane organy to nerka – część środkowa i serce (obszar tranzytowy obejmujący wszystkie trzy komory i zastawki). Przypadki podejrzane ze względu na oznaki patologiczne sprawdza się za pomocą dodatniego IHC. Skrawki histologiczne przygotowuje się zgodnie z metodami standardowymi.

1) Przygotowanie skrawków tkanek

Tkanki utrwała się przez przynajmniej jeden dzień w neutralnej formalinie 10 % buforowanej fosforanami, odwadnia w stopniowanych rozcieńczeniach etanolu, oczyszcza w ksylenie i umieszcza w parafinie, zgodnie z protokołami standardowymi. Skrawki o grubości około 5 μm (w przypadku IHC umieszczonego na szkiełku pokrytym poli-L-lizyną) podgrzewa się przez 20 minut w temperaturze 56 do 58 °C (maksymalnie 60 °C), poddaje odparafinowaniu w ksylenie, uwadnia za pomocą stopniowanych rozcieńczeń etanolu i barwi hematoksyliną i eozyną do celów patomorfologii i IHC zgodnie z pkt 2.

2) Procedura barwienia do IHC

Wszystkie inkubacje przeprowadza się w temperaturze pokojowej na platformie rotacyjnej, o ile w niniejszej decyzji nie przewidziano inaczej:

- a) wykrywania antygenów dokonuje się, gotując skrawki w 0,1 M buforu cytrynianowego o pH 6,0 przez 2 \times 6 minut, a następnie blokując za pomocą 5 % mleka odtłuszczonego w proszku i 2 % surowicy koziej w 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) przez 20 minut;
- b) skrawki inkubuje się przez noc z przeciwciałem pierwszorzędowym (monospecyficzne przeciwciało królicze przeciwko nukleoproteinie ISAV) rozcieńczonym w TBS z 1 % mleka odtłuszczonego w proszku, przemywa trzykrotnie w TBS z 0,1 % Tween 20;
- c) w celu wykrycia przeciwciał związanych skrawki inkubuje się przez 60 minut ze skoniugowanymi z fosfatazą alkaliczną przeciwciałami przeciwko króliczej IgG. Po ostatecznym przemyciu dodaje się Fast Red. (1 mg ml⁻¹) i fosforan naftolu AS-MX (0,2 mg ml⁻¹) z 1 mM lewamizol w 0,1 M TBS (pH 8,2) i pozostawia na 20 minut w celu rozwinięcia. Następnie skrawki przemywa się w wodzie wodociągowej przed barwieniem kontrastowym za pomocą hematoksyliny Harrisa i osadza w wodnym medium zamykającym. Każda analiza powinna obejmować skrawki tkanek ISAV-dodatnich i ISAV-ujemnych.

3) Interpretacja wyników IHC

Wyniki interpretuje się zgodnie z lit. a) i b):

- a) skrawki kontrolne uznaje się za dodatnie, jeśli stwierdzono, że występuje w nich wyraźnie widoczne czerwono zabarwione (czerwonawe), cytoplazmatyczne i wewnątrzjądrowe zabarwienie komórek śródbłonka w naczyniach krwionośnych wsierdza. Skrawek wchodzący w skład badanej próbki uznaje się za dodatni jedynie w przypadku, gdy stwierdzono wystąpienie takiego wyraźnego, czerwonego, wewnątrzjądrowego zabarwienia komórek śródbłonka;
- b) skrawki kontrolne uznaje się za ujemne, jeśli nie wykazują żadnych znaczących reakcji barwnych.

Ponieważ lokalizacja wewnątrzjądrowa jest szczególnie dla nukleoproteiny ortomiksowirusa na etapie replikacji wirusa, a często dominuje równoczesne zabarwienie cytoplazmatyczne, zabarwienia cytoplazmatyczne i inne zabarwienia bez lokalizacji wewnątrzjądrowej uznaje się za niespecyficzne i nierozstrzygające.

Najsilniejsze dodatnie reakcje barwne otrzymuje się zazwyczaj w komórkach śródbłonka serca i nerek. Reakcje barwne w obrębie bardzo rozległych uszkodzeń krwotocznych mogą być lekkie lub nie występować wcale, co wynika zapewne z lizy zakażonych komórek śródbłonka.

CZĘŚĆ 4

SZCZEGÓŁOWE METODY I PROCEDURY DIAGNOSTYCZNE DO CELÓW NADZORU I POTWIERDZENIA W ODNIESIENIU DO INWAZJI WYWOŁANEJ PRZEZ *MARTEILIA REFRINGENS*

I. Szczegółowe metody i procedury diagnostyczne do celów nadzoru i potwierdzenia w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*

Jeśli, wykorzystując metody diagnostyczne określone w załączniku I część 4 sekcja II, przeprowadza się pobieranie próbek i badania laboratoryjne w celu uzyskania lub utrzymania statusu zdrowotnego w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*, jak określono w załączniku I część 4 sekcja I, lub w celu potwierdzenia obecności tej choroby lub wykluczenia podejrzenia jej obecności zgodnie z art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE, stosuje się szczegółowe metody i procedury diagnostyczne określone w pkt I.1, I.2 i I.3.

I.1. Procedura pobierania próbek

Do próby pobiera się przede wszystkim pojedyncze mięczaki z rozchyloną muszlą lub świeżo śnięte, co ma na celu zwiększenie szansy znalezienia zwierząt z inwazją.

Po pobraniu do próby ostrygi lub małże przetrzymuje się w temperaturze 4 °C lub schłodzone lodem przez nie dłużej niż 24 godziny, jeśli próba obejmuje mięczaki z rozchyloną muszlą, a jeśli próba nie obejmuje takich mięczaków – nie dłużej niż 72 godziny, w torbie plastikowej opatrzonej etykietą zawierającą szczegółowe informacje o rodzaju i pochodzeniu ostryg lub małż. Mięczaki z rozchyloną muszlą lub świeżo śnięte przetrzymuje się oddzielnie w stosunku do pozostałych mięczaków.

Do diagnozowania *Marteilia refringens* przy wykorzystaniu histologii wykorzystuje się skrawek tkanek o grubości 3 do 5 mm obejmujący tkankę skrzeli i serca. Do niektórych badań, w tym do odcisków i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), wykorzystuje się fragment gruczołu trawiennego.

I.2. Techniki mikroskopowe

I.2.1. Cytologia (cytologia odciskowa)

Po osuszeniu tkanek gruczołu trawiennego na papierze higroskopijnym dokonuje się kilku odcisków na szklanym szkiełku mikroskopowym. Szkiełka mikroskopowe po wyschnięciu w powietrzu utrwalane są w metanolu lub w etanolu absolutnym i barwione przy użyciu dostępnego komercyjnie zestawu do barwienia krwi, takiego jak Diff-Quik®/Hemacolor®, zgodnie z zaleceniami producenta. Po przepłukaniu w wodzie wodociągowej i osuszeniu szkiełka mikroskopowego umocowuje się na nim szkiełko nakrywkowe przy użyciu odpowiedniej żywicy syntetycznej. Szkiełka mikroskopowe obserwuje się najpierw przy powiększeniu $\times 200$ a następnie, w oleju imersyjnym, przy powiększeniu $\times 1\ 000$.

Wynik dodatni uzyskuje się, jeśli zaobserwuje się komórki o wielkości w przedziale 30 – 40 μm . Cytoplazma zabarwia się zasadochłonna, podczas gdy jądro komórkowe zabarwia się kwasochłonna. Obserwowane są jaśniejsze przebarwienia wokół dużych, silnie zabarwionych ziarnistości, a w większych komórkach obserwowane są komórki ułożone wewnątrz komórek

Technika ta nie jest specyficzna gatunkowo dla pasożytów.

I.2.2. Histologia:

Skrawki tkanek obejmujące skrzela, gruczoł trawienny, płaszcz i gonady utrwalą się przez przynajmniej 24 godziny w utrwalaczu Davidsona, po czym wykonuje się standardowe badanie histologiczne techniką parafinową oraz barwienie, np. przy wykorzystaniu hematoksyliny i eozyny. Obserwacje prowadzi się przy zwiększających się powiększeniach do $\times 1\ 000$.

Wynik dodatni uzyskuje się, jeśli zaobserwuje się komórki o wielkości w przedziale od 4 do 40 μm . We wczesnych fazach występują komórki wielojądrowe, sferyczne i wydłużone. Ich obecność stwierdzić można głównie w nabłonku przełyku i żołądka, a czasami w wyrostkach wargowych. Sporulacja polega na podziale komórek w komórkach i odbywa się w kanalikach i przewodach gruczołu trawiennego. Spory pojawiają się w trakcie sporulacji, ale nie obserwuje się ich we wczesnych etapach. W późnych fazach zakażenia w świetle przewodu pokarmowego występują sporogonie (plazmodia) poza komórkami. Cytoplazma zabarwia się zasadochłonna, podczas gdy jądro komórkowe zabarwia się kwasochłonna. Spory mają barwę od ciemnopomarańczowej do ciemnoczerwonej.

Technika ta nie jest specyficzna gatunkowo dla pasożytów.

I.3. Techniki molekularne

I.3.1. Ekstrakcja DNA

Ekstrakcji DNA dokonuje się zgodnie z procedurami standardowymi.

Można stosować dostępne komercyjnie zestawy do ekstrakcji DNA, dzięki którym zazwyczaj uzyskuje się DNA wysokiej jakości nadające się do wykorzystania w ramach protokołów PCR opisanych w pkt I.3.2.

I.3.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Opracowano i opublikowano kilka protokołów PCR.

Należy stosować startery PCR nakierowane na obszar wewnętrznej transkrybowanej sekwencji rozdzielającej (ITS1), ponieważ lepiej nadają się one do amplifikacji wyłącznie *M. refringens*.

PCR przeprowadza się w objętości 50 µl. Mieszaniny PCR powinny zawierać bufor (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 w temperaturze 25 °C] oraz 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 1 µM starterów sensownych i antysensownych, 0,02 jednostki µl⁻¹ polimerazy *Taq* oraz 10 do 100 ng ekstrahowanego DNA. Po denaturacji DNA w temperaturze 94 °C przez pięć minut, przeprowadza się 30 cykli w następujący sposób: denaturacja w temperaturze 94 °C przez minutę, przyłączanie w temperaturze 55 °C przez minutę oraz wydłużanie w temperaturze 72 °C przez minutę na kilo par zasad. Przeprowadza się etap ostatecznego wydłużania przez 10 minut w temperaturze 72 °C. W celu wykrycia *M. refringens* przeprowadza się PCR z wykorzystaniem starterów nakierowanych na obszar ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' oraz 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Kontrole dodatnie składają się z genomowego DNA pochodzącego od żywiciela z wysoką inwazją lub z plazmidowego DNA z uwzględnieniem obszaru, na który nakierowane jest badanie.

Kontrole ujemne składają się z genomowego DNA od wolnych od inwazji żywicieli oraz odczynników PCR niezawierających DNA, na które nakierowane jest badanie.

Wynikiem dodatnim jest dodatnia amplifikacja PCR przy oczekiwanej wielkości (412 bp), przy czym wszystkie kontrole ujemne są ujemne, a wszystkie kontrole dodatnie – dodatnie.

I.3.3. Hybrydyzacja *in situ* (ISH)

Opracowano i opublikowano kilka protokołów ISH.

Stosuje się sondę nakierowaną na SSU kompleksu genowego rRNA, ponieważ sondę tę zwalidowano pod kątem histologii.

Skrawki tkanek obejmujące skrzela i gruczoły trawienne utrwalą się przez przynajmniej 24 godziny w utrwalczu Davidsona, po czym wykonuje się standardowe badanie histologiczne techniką parafinową. Pocięte skrawki o grubości 5 µm i umieszcza na szkiełkach mikroskopowych powleczonych silanem aminoalkilowym i ogrzewa przez noc w temperaturze 40 °C. Skrawki poddaje się odparafinowaniu poprzez zanurzenie w ksylenie przez 10 minut. Krok ten powtarza się jeden raz, a następnie eliminuje się rozpuszczalnik poprzez zanurzenie w etanolu absolutnym w dwóch następujących po sobie kąpielach po 10 minut każda. Skrawki odwadnia się poprzez zanurzenie w stopniowanych rozcieńczeniach etanolu. Skrawki poddaje się przez 30 minut działaniu proteiny K (100 µg ml⁻¹) w buforze TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) w temperaturze 37 °C. Szkiełka mikroskopowe odwadnia się poprzez zanurzenie w stopniowanych rozcieńczeniach etanolu i następne osuszenie w powietrzu. Skrawki inkubuje się w 100 µl buforu hybrydyzacyjnego (4 × SSC [roztwór soli fizjologicznej z cytrynianem sodu], 50 % formamid, 1 × roztwór Denhardta, 250 µg ml⁻¹ tRNA z drożdży, 10 % siarczan dekstranu) zawierającego 10 ng (1 µl odczynników PCR przygotowanych zgodnie z opisem w pkt I.3.2 przy wykorzystaniu starterów CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG i TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) próby znakowanej digoksygeniną. Skrawki pokrywa się plastikowymi szkiełkami nakrywkowymi do *in situ* i umieszcza na pięć minut na bloku grzejmym ustawionym na temperaturę 95 °C. Skrawki schładza się następnie na lodzie przez minutę przed hybrydyzacją przez noc w temperaturze 42 °C w komorze klimatycznej. Skrawki przemywa się dwukrotnie przez pięć minut w temperaturze pokojowej w 2 × SSC oraz jednokrotnie przez 10 minut w temperaturze 42 °C w 0,4 × SSC. Etapy wykrywania przeprowadza się zgodnie z zaleceniami producenta. Szkiełka mikroskopowe przepłukuje się następnie w sterylnej wodzie destylowanej (dH₂O). Skrawki poddaje się barwieniu kontrastowemu przy użyciu barwnika Bismarck Brown Yellow i przepłukuje w dH₂O, a szkiełka nakrywkowe nakłada się za pomocą wodnego medium zamykającego.

Kontrole, odpowiednio, ujemne i dodatnie stanowią skrawki pochodzące od żywicieli, o których wiadomo, że są zainfekowani i wolni od inwazji.

Wynikiem dodatnim jest fioletowo-czarne zabarwienie komórek *M. refringens* pochodzących z tkanek, o których wiadomo, że są tkankami docelowymi, przy czym wszystkie kontrole ujemne są ujemne, a wszystkie kontrole dodatnie – dodatnie.

I.3.4. Sekwencjonowanie

Przeprowadzenie sekwencjonowania stanowi jeden z końcowych etapów diagnostyki potwierdzającej. Obszarami, na które nakierowane są badania, są SSU rDNA i ITS1.

II. Szczegółowe metody i procedury diagnostyczne do celów nadzoru i potwierdzenia w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*

Metody diagnostyczne i odpowiadające im procedury stosowane do celów programów nadzoru oraz w celu potwierdzenia obecności inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens* lub wykluczenia podejrzenia obecności tej choroby ujętej w wykazie, zgodnie z wymogami określonymi w załączniku I część 4 sekcja II, powinny być zgodne z wytycznymi zawartymi w tabeli 4.1:

Tabela 4.1.

Wytyczne w odniesieniu do metod diagnostycznych stosowanych do celów programów nadzoru oraz w celu potwierdzenia lub wykluczenia inwazji wywołanej przez *Marteilia refringens*

Metoda	Nadzór ukierunkowany	Diagnoza wstępna	Diagnoza potwierdzająca
Odciski gruczołu trawiennego	X	X	X, lub
Histopatologia	X		X, lub
Hybrydyzacja <i>in situ</i>			X, oraz
PCR	X	X	X, oraz
Sekwencjonowanie			X

CZĘŚĆ 5

SZCZEGÓŁOWE METODY I PROCEDURY DIAGNOSTYCZNE DO CELÓW NADZORU I POTWIERDZENIA W ODNIESIENIU DO INWAZJI WYWOŁANEJ PRZEZ *BONAMIA OSTREAE*

I. Procedury diagnostyczne w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*

Jeśli, wykorzystując metody diagnostyczne określone w załączniku I część 5 sekcja II, przeprowadza się badania laboratoryjne w celu uzyskania lub utrzymania statusu zdrowotnego w odniesieniu do *Bonamia ostreae*, jak określono w załączniku I część 5 sekcja I, lub w celu potwierdzenia obecności lub wykluczenia podejrzenia obecności tej choroby zgodnie z art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE, stosuje się szczegółowe metody i procedury diagnostyczne określone poniżej w pkt I.1, I.2 i I.3.

I.1. Proces pobieranie próbek

Do próby pobiera się przede wszystkim pojedyncze mięczaki z rozchyloną muszlą lub świeżo śnięte, co ma na celu zwiększenie szansy znalezienia zwierząt z inwazją.

Po pobraniu do próby ostrzygi przetrzymuje się w temperaturze 4 °C lub schłodzone lodem przez nie dłużej niż 24 godziny, jeśli próba obejmuje mięczaki z rozchyloną muszlą, a jeśli próba nie obejmuje takich mięczaków – 72 godziny, w torbie plastikowej opatrzonej etykietą zawierającą szczegółowe informacje o rodzaju i pochodzeniu ostrzyg. Mięczaki z rozchyloną muszlą lub świeżo śnięte przetrzymuje się oddzielnie w stosunku do pozostałych mięczaków.

Do diagnozowania *Bonamia ostreae* przy wykorzystaniu histologii wykorzystuje się skrawki tkanek o grubości 3 do 5 mm obejmujący tkankę skrzeli i serca. Do niektórych badań, w tym do odcisków i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), wykorzystuje się fragment gruczołu trawiennego.

I.2. Techniki mikroskopowe

I.2.1. Cytologia (cytologia odciskowa)

Po osuszeniu tkanek skrzeli lub serca na papierze higroskopijnym dokonuje się kilku odcisków na szklanym szkiełku mikroskopowym. Szkiełka mikroskopowe po wyschnięciu w powietrzu utrwalane są w metanolu lub w etanolu absolutnym i barwione przy użyciu dostępnego komercyjnie zestawu do barwienia krwi (mianowicie takiego jak Diff-Quik®/Hemacolor®), zgodnie z zaleceniami producenta. Po przepłukaniu w wodzie wodociągowej i osuszeniu szkiełka mikroskopowego umocowuje się na nim szkiełko nakrywkowe przy użyciu odpowiedniej żywicy syntetycznej. Szkiełka mikroskopowe obserwuje się najpierw przy powiększeniu $\times 200$ a następnie, w oleju imersyjnym, przy powiększeniu $\times 1\ 000$.

Wynikiem dodatnim jest obecność w hemocytach małych organizmów o kształcie kulistym lub owalnym (o szerokości od 2 do 5 μm). Pasożyt może jednak także występować pozakomórkowo. Organizmy wykazują cytoplazmę zasadochłonną i kwasochłonne jądro komórkowe (w zależności od barwnika kolory mogą się różnić) oraz – ze względu na rozmazanie na szkiełku mikroskopowym – w preparatach odciskowych mogą wydawać się większe niż w badaniu histologicznym. Mogą występować komórki wielojądrowe. Technika ta nie jest specyficzna gatunkowo dla pasożytów.

I.2.2. Histologia:

Skrawki tkanek obejmujące skrzela i gruczoł trawienny utrwalą się przez okres przynajmniej 24 godzin w utrwalczu Davidsona, po czym wykonuje się standardowe badanie histologiczne techniką parafinową oraz barwienie, np. przy wykorzystaniu hematoksyliny i eozyny. Obserwacje prowadzi się przy zwiększających się powiększeniach do $\times 1\ 000$.

Wynikiem dodatnim jest obecność pasożytów w hemocytach w postaci bardzo małych komórek o szerokości 2 to 5 μm lub poza komórkami w tkance łącznej lub zatokach skrzeli, przewodu pokarmowego i nabłonka płaszczka, której to obecności często towarzyszy intensywne zapalenie. W celu uniknięcia wszelkich wątpliwości do diagnozy dodatniej wymagane jest zaobserwowanie pasożyta wewnątrz hemocytu. Technika ta nie jest specyficzna gatunkowo dla pasożytów.

I.3. Techniki molekularne

I.3.1. Ekstrakcja DNA

Ekstrakcji DNA dokonuje się zgodnie z procedurami standardowymi.

Można stosować dostępne komercyjnie zestawy do ekstrakcji DNA, dzięki którym zazwyczaj uzyskuje się DNA wysokiej jakości nadające się do wykorzystania w ramach protokołów PCR opisanych poniżej.

I.3.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Opracowano i opublikowano kilka protokołów PCR.

Można stosować dwa protokoły PCR nakierowane na małą podjednostkę (SSU) rDNA:

- a) pierwszym z nich jest konwencjonalne PCR amplifikujące kilka organizmów należących do typu *Haplosporidia*, w tym *Bonamia* spp. Starterami o nazwie Bo i Boas są odpowiednio 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' i 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3', które amplifikują produkt o wielkości 300 bp. Mieszaniny PCR zawierają bufor (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 w temperaturze 25 °C] oraz 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 1 μM starterów sensownych i antysensownych, 0,02 jednostki μl^{-1} polimerazy Taq oraz 0,2 ng μl^{-1} matrycy DNA w objętości całkowitej wynoszącej 50 μl . Próbkę denaturuje się w termocyklerze przez pięć minut w temperaturze 94 °C, a następnie poddaje 30 cyklom (94 °C przez jedną minutę, 55 °C przez jedną minutę, 72 °C przez jedną minutę), po czym dokonuje się końcowego wydłużania przez 10 minut w temperaturze 72 °C.

Kontrole dodatnie składają się z genomowego DNA pochodzącego od żywiciela z wysoką inwazją lub z plazmidowego DNA z uwzględnieniem obszaru, na który nakierowane jest badanie.

Kontrole ujemne składają się z genomowego DNA od wolnych od inwazji żywicieli oraz odczynników PCR niezawierających DNA, na które nakierowane jest badanie.

Wynikiem dodatnim jest dodatnia amplifikacja PCR przy oczekiwanej wielkości (tj. 300 bp), przy czym wszystkie kontrole ujemne są ujemne, a wszystkie kontrole dodatnie – dodatnie.

- b) drugim protokołem PCR jest test PCR w czasie rzeczywistym SYBR® Green. Pozwala on na specyficzne wykrycie *B. ostreae* (opisano niżej) i może zostać połączony z testem PCR w czasie rzeczywistym SYBR® Green pozwalającym na specyficzne wykrycie *B. exitiosa* (Ramilo i in. 2013).

Startery BOSTRE-F (5'- TTACGTCCTGCCCTTTGTA-3') i BOSTRE-R (5'- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3') amplifikują produkt o wielkości 208 bp. Mieszaniny PCR zawierają SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM starterów sensownych i antysensownych oraz 200 ng ekstrahowanego DNA. Próbkę denaturuje się w systemie detekcji w czasie rzeczywistym przez 10 minut w temperaturze 95 °C, po czym poddaje 35 cyklom (95 °C przez 30 sekund, 55 °C przez 45 sekund i 72 °C przez jedną minutę). Przeprowadza się analizę krzywej topnienia przy temperaturze podwyższonej o 0,5 °C/s z wyjściowego poziomu 55 °C do końcowego poziomu 95 °C, rejestrując fluorescencję każdej zmiany temperatury.

Kontrole dodatnie składają się z genomowego DNA pochodzącego od żywiciela z wysoką inwazją lub z plazmidowego DNA z uwzględnieniem obszaru, na który nakierowane jest badanie.

Kontrole ujemne składają się z genomowego DNA od wolnych od inwazji żywicieli oraz odczynników PCR niezawierających DNA, na które nakierowane jest badanie.

Wynikiem dodatnim jest dodatnia amplifikacja PCR z pojedynczym pikem temperatury topnienia (78,25 ± 0,25 °C w warunkach opublikowanych w Ramilo i in. 2013), przy czym wszystkie kontrole ujemne są ujemne, a wszystkie kontrole dodatnie – dodatnie.

I.3.3. Hybrydyzacja *in situ* (ISH)

Opracowano i opublikowano kilka protokołów ISH.

Stosuje się sondę nakierowaną na SSU kompleksu genowego rDNA, choć sonda ta wykazała reakcję krzyżową z niektórymi organizmami należącymi do rodziny *Haplosporidia*.

Skrawki tkanek obejmujące skrzela i gruczoły trawienne utrwalą się przez okres przynajmniej 24 godzin w utrwalczu Davidsona, po czym wykonuje się standardowe badanie histologiczne techniką parafinową. Pocięte skrawki o grubości 5 µm i umieszcza na szkiełkach mikroskopowych powleczonych silanem aminoalkilowym i ogrzewa przez noc w temperaturze 40 °C. Skrawki poddaje się odparafinowaniu poprzez zanurzenie w ksylenie przez 10 minut. Krok ten powtarza się jeden raz, a następnie eliminuje się rozpuszczalnik poprzez zanurzenie w etanolu absolutnym w dwóch następujących po sobie kąpielach po 10 minut każda. Skrawki odwadnia się poprzez zanurzenie w stopniowanych rozcieńczeniach etanolu. Skrawki poddaje się przez 30 minut działaniu proteinazy K (100 µg ml⁻¹) w buforze TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) w temperaturze 37 °C. Szkiełka mikroskopowe odwadnia się poprzez zanurzenie w stopniowanych rozcieńczeniach etanolu i następne osuszenie w powietrzu. Skrawki inkubuje się w 100 µl buforu hybrydyzacyjnego (4 × SSC [roztwór soli fizjologicznej z cytrynianem sodu], 50 % formamid, 1 × roztwór Denhardta, 250 µg ml⁻¹ tRNA z drożdży, 10 % siarczan dekstranu) zawierającego 20 ng (2 µl reakcji PCR przygotowanej zgodnie z opisem w pkt I.3.2 przy wykorzystaniu starterów Bo i Boas) próby znakowanej digoksygeniną. Skrawki pokrywa się plastikowymi szkiełkami nakrywkowymi do *in situ* i umieszcza na pięć minut na bloku grzejnym ustawionym na temperaturę 95 °C. Skrawki schładza się następnie na lodzie przez minutę przed hybrydyzacją przez noc w temperaturze 42 °C w komorze klimatycznej. Skrawki przemywa się dwukrotnie przez pięć minut w temperaturze pokojowej w 2 × SSC oraz jednokrotnie przez 10 minut w temperaturze 42 °C w 0,4 × SSC. Etapy wykrywania przeprowadza się zgodnie z zaleceniami producenta. Szkiełka mikroskopowe przepłukuje się następnie w sterylnej wodzie destylowanej (dH₂O). Skrawki poddaje się barwieniu kontrastowemu przy użyciu barwnika Bismarck Brown Yellow i przepłukuje w dH₂O, a szkiełka nakrywkowe nakłada się za pomocą wodnego medium zamykającego.

Kontrole, odpowiednio, ujemne i dodatnie stanowią skrawki pochodzące od żywicieli, o których wiadomo, że są zainfekowani i wolni od inwazji.

Wynik dodatni powinien odpowiadać znakowanym pasożytom w hemocytach, przy czym wszystkie kontrole ujemne są ujemne, a wszystkie kontrole dodatnie – dodatnie.

I.3.4. Sekwencjonowanie

Przeprowadzenie sekwencjonowania stanowi jeden z końcowych etapów diagnostyki potwierdzającej. Obszarami, na które nakierowane są badania, są SSU rDNA i ITS1.

II. **Procedury diagnostyczne do celów nadzoru i potwierdzenia w odniesieniu do inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae***

Metody diagnostyczne i odpowiadające im procedury stosowane do celów nadzoru oraz w celu potwierdzenia inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae* lub wykluczenia podejrzenia takiego zakażenia, zgodnie z wymogami określonymi w załączniku I część 5 sekcja II, powinny być zgodne z wytycznymi zawartymi w poniższej tabeli 5.1:

Tabela 5.1.

Wytyczne w odniesieniu do metod diagnostycznych stosowanych do celów programów nadzoru oraz w celu wykluczenia lub potwierdzenia inwazji wywołanej przez *Bonamia ostreae*

Metoda	Nadzór ukierunkowany	Diagnoza wstępna	Diagnoza potwierdzająca
Odciski serca i skrzelu	X	X	X, lub
Histopatologia	X		X, lub
Hybrydyzacja in situ			X, oraz
PCR	X	X	X, oraz
Sekwencjonowanie			X

CZĘŚĆ 6

SZCZEGÓŁOWE METODY I PROCEDURY DIAGNOSTYCZNE DO CELÓW NADZORU I POTWIERDZENIA W ODNIESIENIU DO ZESPOŁU WSS (WSD)

1. **Procedury diagnostyczne do celów wykrywania WSSV**

Jeśli, wykorzystując metody diagnostyczne określone w załączniku I część 6 sekcja II, przeprowadza się pobieranie próbek i badania laboratoryjne do celów programów zwalczania i nadzoru, jak określono w załączniku I część 6 sekcja I, lub w celu potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia zakażenia WSSV zgodnie z art. 57 lit. b) dyrektywy 2006/88/WE, stosuje się szczegółowe metody i procedury diagnostyczne określone w pkt 2–7.

Metody i procedury opisane w niniejszej części zaadaptowano z testów zatwierdzonych zgodnie z ISO 17025, stosowanych w laboratorium referencyjnym Unii Europejskiej ds. chorób skorupiaków. Można stosować alternatywne podejścia wykorzystujące równoważne warunki lub zestawy wyprodukowane przez innych producentów, ale dające czułość i swoistość równoważną w stosunku do podejść opisanych w niniejszej części. W każdej sytuacji należy dokonać sekwencjonowania produktu amplifikowanego metodą PCR w celu potwierdzenia tożsamości wirusa WSS (WSSV).

2. **Proces pobieranie próbek**

Tkanki (odnóża odwłokowe lub skrzelu) zawierające WSSV ze skorupiaków można przechowywać w etanolu, RNAlater lub zamrożone szokowo do temperatury – 80 °C. Etapami wymaganymi do identyfikacji WSSV z próbek tkanek są: homogenizacja tkanek, ekstrakcja DNA, specyficzna amplifikacja DNA WSSV metodą PCR, wizualizacja amplifikowanego produktu w żelu, oczyszczenie DNA i sekwencjonowanie w celu potwierdzenia tożsamości patogenu.

3. **Homogenizacja tkanek**

Rozdrobienie tkanek i przygotowanie homogenatu w odpowiednim buforze przeprowadza się przy wykorzystaniu rozdrabniacza tkanek Fast Prep oraz próbek Lysing Matrix A (MP Biomedicals). Tkanki waży się i umieszcza w probówkach Lysing Matrix A, rozpuszczone w stosunku 1 do 10 w/v lub zgodnie z zaleceniami producenta, w odpowiednim buforze (G2 i 10 µl proteinazy K do stosowania z zestawem DNA Tissue kit (Qiagen)) i homogenizuje przez dwie minuty przy wykorzystaniu homogenizatora Fast Prep 24. Homogenizowane próbki inkubuje się w temperaturze 56 °C przez co najmniej cztery godziny lub przez noc. Probki należy wymieszać na wstrząsarce, odwirować z prędkością przy 9 000 obrotów na minutę przez dwie minuty i dodać 50 µl supernatantu lub objętość odpowiadającą 5 mg tkanek (masa tkanek optymalna dla zestawu do ekstrakcji) do próbki zawierającej próbkę w celu ekstrakcji DNA i uzupełnić buforem G2 do objętości 200 µl.

4. Ekstrakcja DNA

Ekstrakcji całkowitego DNA dokonuje się przy pomocy zestawu do ekstrakcji tkanek DNA oraz EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen), postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Kontrolę ekstrakcji (Calf Thymus DNA) i kontrolę ujemną (bufor G2) przeprowadza się z każdą partią próbek. DNA należy wymyć do objętości 50 µl. Aby zapewnić w pełni udaną ekstrakcję, stężenia DNA odnoszące się do wszystkich próbek i kontroli ustala się za pomocą urządzenia Nano Drop. Jeśli wyekstrahowane DNA nie ma być wykorzystane natychmiast, należy je zamrozić w temperaturze – 20 °C.

5. Łańcuchowa reakcja polimerazy w odniesieniu do WSSV (PCR)

Metodą stosowaną w celu wykrywania WSSV jest protokół do celów wykrywania WSSV metodą nested PCR określony poniżej, amplifikujący w pierwszej i drugiej rundzie PCR odpowiednio amplikon 1 447 bp i 848 bp genu 18s rRNA.

Pierwszą rundę reakcji PCR przeprowadza się przy objętości 50 µl zawierającej końcowe stężenia buforu 1 × GoTaq (Promega), 5mM MgCl₂, 1pmol/µl startera WSSV 146 F1, 1pmol/µl startera WSSV 146 R1 (tabela 1), 0,25mM dNTPs, 1,25U polimerazy Taq i 2,5 µl of DNA. Analizę każdej próbki przeprowadza się dwa razy, jednocześnie z ujemną kontrolą ekstrakcji, ujemną kontrolą PCR (zamiast DNA dodaje się 2,5 µl H₂O) i kontrolą dodatnią. Kontrolą dodatnią jest rozcieńczony plazmid WSSV wytworzony i zwalidowany do stosowania w laboratorium (dostępny w EURL).

Drugą rundę reakcji PCR przeprowadza się w ten sam sposób, co pierwszą rundę, ale przy użyciu zestawu starterów WSSV 146 F2/R2 i drugiej kontroli dodatniej w celu sprawdzenia, czy ten etap PCR przebiegł pomyślnie.

Starter	Sekwencja
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Zarówno w pierwszej, jak i w drugiej rundzie PCR stosuje się następujące warunki reakcji w termocyklerze DNA Engine Tetrad 2 Peltier (lub równoważnym). Wstępny etap denaturacji w temperaturze 94 °C przez dwie minuty, następnie w temperaturze 94 °C przez 30 sekund, 62 °C przez 30 sekund, 72 °C przez 30 sekund powtórzone w 30 cyklach, etap rozszerzający w temperaturze 72 °C przez dwie minuty oraz utrzymywanie w temperaturze 4 °C.

6. Elektroforeza w żelu

Amplifikowane produkty PCR z pierwszej i drugiej rundy PCR wizualizuje się w żelach agarozowych (2 %) sporządzonych przy użyciu buforu TAE. 15 µl z każdej próbki poddaje się działaniu 120 V przez około 20 minut i obserwuje w świetle ultrafioletowym. Próbkę dodatkowo wykażą obecność prążka odpowiadającego 1 447 bp w pierwszej rundzie PCR i 848 bp w drugiej rundzie PCR. Próbkę tej wielkości wykrawa się z żelu i umieszcza w mikropróbówce 1,5 ml. DNA zawarte w wycinkach żelu oczyszcza się przy pomocy Promega Wizard® SV Gel i PCR clean-Up System zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie DNA ocenia się za pomocą urządzenia Nano Drop. Jeśli oczyszczone DNA nie ma być wykorzystane natychmiast, jest ono zamrażane do temperatury – 20 °C.

7. Sekwencjonowanie produktów PCR

DNA sekwencjonuje się przy użyciu Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). W każdej reakcji objętość całkowita wynosi 20 µl, przy czym stężeniem końcowym jest 1 × Big Dye Terminator, 1 × bufor sekwencjonujący, 10pmol/µl startera sensownego lub antysensownego oraz 10 µl oczyszczonego DNA (rozpuszczonego do około 10 ng/µl); reakcja przeprowadzana jest w termocyklerze DNA Engine Tetrad 2 Peltier (lub równoważnym) w następujących warunkach reakcji: w temperaturze 94 °C przez 30 sekund, a następnie w temperaturze 96 °C przez 10 sekund, w temperaturze 50 °C przez 10 sekund i w temperaturze 60 °C przez cztery minuty, przy czym trzy ostatnie etapy powtarzane są 30 razy.

Produkty PCR strąca się z wykorzystaniem octanu sodu, dodając 20 µl DNA do 10 µl NaAc, 70 µl H₂O i 250 µl etanolu, mieszając na wstrząsarce i odwirowując przez 20 minut przy 13 000 obrotów na minutę; supernatant usuwa się, a osad przemywa 200 µl etanolu absolutnego, odwirowując przez pięć minut przy 13 000 obrotów na minutę. Osad suszy się przez pięć minut w temperaturze 37 °C. Do osadu dodaje się 25 µl formamidu Hi-Di, ogrzewa do temperatury 95 °C przez dwie minuty i miesza dokładnie na wstrząsarce. Próbkę sekwencjonuje się analizatorem genetycznym ABI3130xl Avant zgodnie z zaleceniami producenta. Wyniki sekwencjonowania analizuje się przy użyciu oprogramowania Sequencher, a sekwencje porównuje z sekwencjami w bazie danych NCBI za pomocą funkcji BLAST.
