



# GUVERNUL REPUBLICII MOLDOVA

HOTĂRÂRE nr. \_\_\_\_\_

din \_\_\_\_\_ 2020

Chișinău

## **Pentru aprobarea Normei sanitar-veterinare privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice**

-----

În temeiul art. 29 din Legea nr. 221/2007 privind activitatea sanitar-veterinară (republicată în Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2013, nr. 125-129, art. 396), cu modificările ulterioare, Guvernul HOTĂRĂȘTE:

Prezenta hotărâre transpune Decizia de punere în aplicare (UE) 2015/1554 a Comisiei din 11 septembrie 2015 de stabilire a unor norme pentru aplicarea Directivei 2006/88/CE în ceea ce privește cerințele referitoare la supraveghere și la metodele de diagnostic, publicată în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L 247/1 din 23 septembrie 2015.

**1.** Se aprobă Norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice (se anexează).

**2.** Controlul asupra executării prezentei hotărâri se pune în sarcina Agenției Naționale pentru Siguranța Alimentelor.

**3.** Prezenta hotărâre intră în vigoare la expirarea a 3 luni de la data publicării.

**Prim-ministru**

**ION CHICU**

Contrasemnează:

Ministrul agriculturii,  
dezvoltării regionale  
și mediului

Ion Perju

Aprobată  
prin Hotărârea Guvernului nr.

**NORMA SANITAR-VETERINARĂ**  
**privind cerințele de supraveghere și metodele**  
**de diagnostic a bolilor la animalele acvatice**

**Capitolul I**  
**DISPOZIȚII GENERALE**

1. Norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice (în continuare – *Normă*), stabilește cerințe aplicabile supravegherii sanitar veterinare a bolilor la animale acvatice și a metodelor de diagnostic care trebuie utilizate la determinarea prezenței sau absenței bolilor ca septicemia hemoragică virală (SHV), necroza hematopoietică infecțioasă (NHI), boala herpetică a crapului koi KHVD, anemia infecțioasă a somonului (AIS), infecția cu *Marteilia refringens*, infecția cu *Bonamia ostreae*, boala petelor albe (*white spot disease* – WSD), la animalele acvatice.

2. În sensul prezentei Norme, se aplică definiții indicate în Norma sanitar-veterinară privind condițiile de sănătate a animalelor și produselor de acvacultură și măsurile de prevenire și combatere a anumitor boli la animalele acvatice aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 239/2009.

3. Agenției Naționale pentru Siguranța Alimentelor (în continuare - Agenția) asigură că normele privind programele de supraveghere și de eradicare, metodele de eșantionare și de diagnostic stabilite sunt respectate atunci când statutul „indemn de boală” se acordă, retras sau restabilit pentru o zonă sau compartiment al acestuia, pentru una sau mai multe dintre bolile specificate la pct.1.

4. Agenția asigură că metodele de control, precum și metodele de diagnostic stabilite sunt respectate în cursul efectuării examenelor de laborator pentru a confirma sau a exclude prezența unei boli specificate la pct.1.

5. Agenția se asigură că măsurile minime de supraveghere și cerințele minime pentru înlăturarea măsurilor de limitare a răspândirii bolilor, sunt respectate atunci când se aplică măsuri de supraveghere și când se înlătură măsurile de limitare a răspândirii uneia sau mai multora dintre bolile specificate la pct.1, într-o zonă sau un compartiment al acestuia, care nu sunt declarate indemne de respectivele boli.

## **Capitolul II**

### **CERINȚE DE SUPRAVEGHERE ȘI METODELE DE DIAGNOSTIC ÎN CEEA CE PRIVEȘTE SEPTICEMIA HEMORAGICĂ VIRALĂ (SHV) ȘI NECROZA HEMATOPOIETICĂ INFECȚIOASĂ (NHI)**

#### **Secțiunea 1**

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

6. Supravegherea sanitar-veterinară și, eșantionarea pentru septicemia hemoragică virală (SHV), boală cauzată de virusul septicemiei hemoragice virale (VSHV), cunoscut și sub denumirea de virusul Egtved, un virus aparținând genului *Novirhabdovirus* din familia *Rhabdoviridae* și necroza hematopoietică infecțioasă” („NHI”), boală cauzată de virusul necrozei hematopoietice infecțioase (VNHI), virus care aparține genului *Novirhabdovirus*, din familia *Rhabdoviridae* se efectuează în perioada din an în care temperatura apei este mai mică de 14 °C sau atunci când este probabil ca temperatura apei să atingă valorile minime anuale.

7. În cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare sunt reprezentative pentru diferitele ecosisteme în care se găsesc populații sălbatice aparținând speciilor sensibile;

8. Atunci când fermele sau populațiile sălbatice fac obiectul controalelor sau al eșantionării mai des decât o dată pe an, intervalul dintre controale sanitare și dintre fiecare colectare a eșantioanelor este de cel puțin patru luni și este cât mai lung posibil, ținând cont de cerințele privind temperatura prevăzute la pct.6;

9. Toate unitățile de producție, cum ar fi iazurile, bazinele, și cuștile din plasă, se supun controalelor sanitare în vederea stabilirii prezenței peștilor morți, debilitați sau cu comportament anormal. Să se acorde o atenție deosebită punctelor de evacuare a apei, unde peștii debilitați au tendința de a se acumula din cauza curentului;

10. Peștii din speciile sensibile care urmează să fie incluși în eșantioane:

1) dacă sunt prezenți păstrăvi-curcubeu, sunt selectați pentru eșantionare numai peștii din această specie, cu excepția cazului în care sunt prezente alte specii sensibile care prezintă semnele tipice de SHV sau de NHI, dacă păstrăvii-

curcubeu nu sunt prezenți, eșantionul este reprezentativ pentru toate celelalte specii sensibile care sunt prezente;

2) dacă sunt prezenți pești debilitați, cu comportament anormal sau care au murit recent, dar care nu sunt descompuși, acești pești sunt selectați;

3) dacă se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de pește, se includ în eșantion peștii din toate sursele de apă, peștii sunt colectați în așa fel încât toate părțile fermei și toate clasele de vârstă grupate pe ani sunt reprezentate proporțional în eșantion.

**11.** Pentru obținerea statutului sanitar „indemn de boală” (categoria I) în ceea ce privește SHV și NHI este prevăzut că o zonă sau un compartiment cu un statut sanitar de categoria III în ceea ce privește SHV sau NHI sau ambele boli poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește aceste boli listate, cu condiția ca toate fermele care dețin specii sensibile în zona sau compartimentul în cauză să respecte cerințele stabilite în Norma sanitar-veterinară privind condițiile de sănătate a animalelor și produselor de acvacultură și măsurile de prevenire și combatere a anumitor boli la animalele acvatice aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 239/2009, punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatice selecționate în conformitate cu capitolul respectiv sunt supuse unuia dintre următoarele programe de supraveghere:

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

Fermele sau punctele de prelevare sunt obiectul controalelor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 1. din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice. În această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic are rezultate negative în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele, și este exclusă orice suspiciune privind fie SHV, fie NHI, fie ambele, în conformitate cu metodele de eșantionare și de diagnostic;

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

Fermele sau punctele de prelevare sunt obiectul controalelor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de patru ani consecutivi.

În această perioadă de patru ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic obțin rezultate negative în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele, și este exclusă orice suspiciune privind fie SHV, fie NHI, fie ambele, dacă, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere este confirmată o infecție fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele într-o fermă inclusă în programul de supraveghere respectiv și, prin urmare, a fost retras statutul sanitar de categoria II al fermei, ferma respectivă poate să își recâștige imediat statutul sanitar de categoria II și să continue punerea în aplicare a programului de supraveghere pentru a obține statutul „indemn de boală” fără să pună în aplicare un program de eradicare, cu condiția ca ferma este o fermă al

cărei statut sanitar în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele este independent de starea de sănătate a populațiilor de animale acvatice din apele naturale din vecinătate în ceea ce privește aceste boli listate, este golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni și a fost repopulată cu pești provenind din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele.

**12.** Pentru obținerea statutului sanitar „indemn de boală” (categoria I) în ceea ce privește SHV și NHI, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește aceste boli listate, cu condiția ca toate fermele care dețin specii sensibile în zona sau compartimentul în cauză a făcut obiectul unui program de eradicare.

**13.** Măsurile de control sunt aplicate în mod efectiv în zonă de izolare, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, este instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial infectată (infectate) fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele boli listate menționate. Zona de izolare este definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a bolii listate la peștii de crescătorie și la cei sălbatici, cum ar fi: numărul, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a peștilor în cadrul fermei infectate cu fie SHV, fie cu NHI, fie cu ambele; distanța la care se găsesc fermele învecinate și densitatea acestora; apropierea de abatoare; fermele cu care se intră în contact; speciile prezente la ferme; practicile de acvacultură aplicate în fermele afectate și în fermele învecinate acestora; condițiile hidrodinamice și alți factori relevanți din punct de vedere epidemiologic care sunt identificați.

**14.** Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime în ceea ce privește delimitarea geografică a acestor perimetre este stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial infectată fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele boli listate menționate, în zonele interioare: întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial infectată; Agenția poate limita extinderea perimetrului la anumite părți ale bazinului hidrografic sau ale suprafeței fermei, cu condiția să nu se compromită prevenirea răspândirii bolii listate, în afara perimetrului de protecție Agenția stabilește un perimetru de supraveghere, perimetrul de supraveghere în zonele interioare: unei zone situate în exteriorul perimetrului de protecție stabilit.

**15.** Toate fermele în care sunt ținute specii sensibile stabilite în Anexa 3 la Norma sanitar-veterinară privind condițiile de sănătate a animalelor și produselor

de acvacultură și măsurile de prevenire și combatere a anumitor boli la animalele acvatice aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 239/2009, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial infectate fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele, sunt obiectul unei anchete oficiale care include prelevarea de eșantioane pentru testarea a 10 pești, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu SHV, cu NHI, sau cu ambele, sau pentru testarea a cel puțin 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*, un control sanitar-veterinar, în fermele în care testele au avut rezultate negative; controalele sanitar-veterinare continuă o dată pe lună pe parcursul perioadei în care temperatura apei este mai mică de 14 °C, cu excepția cazului în care iazurile sau cuștile din plasă sunt acoperite cu gheață, până când se renunță la perimetrul de protecție.

**16.** Toate fermele declarate în mod oficial infectate fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele sunt golite, curățate, dezinfectate și supuse unei perioade de vid sanitar. Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni. După golirea tuturor fermelor declarate în mod oficial infectate care se găsesc în același perimetru de protecție, să se respecte o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin trei săptămâni. Prezenta măsură se aplică, de asemenea, noilor ferme declarate în mod oficial infectate în timpul punerii în aplicare a programului de eradicare. Când intervine o perioadă de vid sanitar pentru fermele declarate în mod oficial infectate, perimetrele de protecție sunt transformate în perimetre de supraveghere. Agenția decide, pe baza unei evaluări a riscurilor să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme care se află în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. În cazul acestor ferme, durata perioadei de vid sanitar este stabilită de Agenție pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz.

**17.** Toate fermele declarate în mod oficial infectate fie cu SHV, fie cu NHI, fie cu ambele boli listate și toate celelalte ferme care sunt obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu pești care provin din zone sau din compartimente cu statutul sanitar „indemn de boală” (categoria I), repopularea să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate sunt golite, curățate, dezinfectate și au fost obiectul unui vid sanitar.

**18** Toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare selectate, fac apoi obiectul programului de supraveghere.

**19.** Pentru restabilirea statutului „indemn de boală” compartimentele care cuprind o singură fermă, care au fost declarate anterior indemne de boli listate

menționate, al cărui statut sanitar în ceea ce privește aceste boli listate este independent de cel al apelor naturale din vecinătate și al cărui statut sanitar de categoria I a fost retras, poate redobândi statutul de categoria I imediat ce Agenția a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

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

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

**20.** Pentru menținerea statutului sanitar „indemn de boală” (categoria I) în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele, când este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză sunt supuse inspecției sanitare, iar peștii sunt eșantionați, ținând cont de nivelul riscului de contaminare a fermei cu boli listate menționate.

**21.** La determinarea frecvenței controalelor sanitare pentru compartimentele care au statut sanitar de categoria I, al cărui statut sanitar depinde de starea de sănătate a populațiilor de animale acvatice din apele naturale din vecinătate, riscul de contaminare se consideră ridicat.

**22.** Statutul „indemn de boală” se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate, au rezultate negative pentru bolile listate menționate și atât timp cât a fost exclusă orice suspiciune privind SHV, fie NHI, fie ambele.

**23.** Pentru eliminarea măsurilor de prevenire a răspândirii bolilor o zonă sau un compartiment care are statutul de categoria V în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele poate obține statutul de categoria III în ceea ce privește aceste boli listate, cu condiția ca:

1) cerințele prevăzute la punctele 12-16. sunt îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, se instaurează vidul sanitar, fermele în cauză fac obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea fie a virusului VNHI, fie a virusului VSHV, fie a ambelor virusuri din mediul fermei;

2) toate fermele declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme care sunt obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu pești provenind din zone sau din compartimente cu statut de categoria I, II sau III în ceea ce privește fie SHV, fie NHI, fie ambele;

3) repopularea are loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate sunt golite, curățate, dezinfectate și sunt obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1).

24. Sunt prelevate și examinate următoarele organe: splina, rinichiul, inima, encefalul. În cazul în care prelevarea se face de la genitori, poate fi de asemenea examinat lichidul ovarian sau seminal. În cazul alevinilor, peștii întregi având sub 4 cm lungime pot fi fragmentați cu ajutorul unui foarfece steril sau al unui scalpel după eliminarea părții corpului care se găsește în spatele orificiului anal. În cazul în care un eșantion este constituit din pești întregi cu lungimea cuprinsă între 4 cm și 6 cm, sunt colectate viscerele, inclusiv rinichii. Se permite comasarea fragmentelor de organe care provin de la cel mult 10 pești.

25. Pentru obținerea și menținerea statutului „indemn de boală” fie pentru SHV, fie pentru NHI, fie pentru ambele sunt stabilite următoarele metode:

1) izolarea virusului în culturi celulare, urmată de identificare prin utilizarea testului de imunoenzimatic (ELISA), testul de imunofluorescență indirectă (IFAT), testul de neutralizare a virusului sau testul RT-PCR în timp real (reacție în lanț de transcripție inversă a polimerazei –RT-qPCR);

2) RT-qPCR.

26. În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă suspiciunea privind fie SHV, fie NHI, fie ambele, ferma în legătură cu care există suspiciuni face obiectul cel puțin al unui control și al unei prelevări de eșantioane de la 10 pești, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu SHV, cu NHI, sau cu ambele, sau de la cel puțin 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*. Eșantioanele se testează folosind una sau mai multe dintre metodele de diagnostic: izolarea convențională a virusului în cultură celulară, urmată de identificarea virusului prin metodă imunochimică sau moleculară, detectarea virusului prin RT-qPCR, alte tehnici de diagnostic cu eficacitate similară dovedită, cum ar fi testul de imunofluorescență indirectă (IFAT), testul de imunoenzimatic (ELISA), RT-PCR și imunohistochimie (IHC).

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



**28.** Se permite excluderea suspiciunii privind SHV, NHI sau ambele, în cazul în care rezultatele culturilor celulare sau ale testului RT-qPCR nu furnizează nici o altă dovadă referitoare la prezența SHV, a NHI sau a ambelor.

### **Secțiunea a 2-a**

#### **Metode și proceduri de diagnostic pentru supravegherea și confirmarea NHI și a SHV**

**29.** În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește NHI sau SHV, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic stabilite în prezenta secțiune.

**30.** Țesuturile utilizate pentru examinarea virusologică pe cultură celulară înainte de a fi trimise sau transferate către un laborator acreditat, sunt prelevate cu ajutorul unor instrumente de disecție sterile și plasate în tuburi de plastic sterile care conțin un mediu de cultură celulară care conține 10 % ser fetal bovin, 200 UI de penicilină, 200 μg de streptomycină și 200 μg de kanamicină pe mililitru sau alte antibiotice cu eficacitate dovedită (în continuare - mediu de transport).

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

Lichidul ovarian sau seminal sau fragmente de organe de la cel mult zece pești pot fi reunite într-un tub steril care conține cel puțin 4 ml de mediu de transport. Masa țesuturilor din fiecare eșantion este cel puțin 0,5 grame (g).

**32.** Examenul virusologic pe cultură celulară trebuie să înceapă cel târziu la 48 de ore după colectarea eșantioanelor. În cazuri excepționale, examenul virusologic poate începe cel târziu la 72 de ore după colectarea materialului de examinat, cu condiția ca acesta este protejat de un mediu de transport și sunt respectate condițiile de temperatură în timpul transportului.

**33.** Eșantioane pentru testul RT-PCR sau RT-qPCR (reacția în lanț de transcripție inversă a polimerazei) se prelevează de la pești, cu ajutorul unui instrument steril și sunt transferate într-un tub de plastic steril care conține mediul de transport. Într-un tub se pot colecta țesuturi de la zece pești; acestea constituie un eșantion general. Cu toate acestea, în cazul în care cantitatea de

inocul este mică, pot fi utilizate țesuturi de la cel mult cinci pești. În mod alternativ, eșantioanele pot fi comasate în reactivi de stabilizare a ARN, în conformitate cu recomandările producătorilor, dar fiecare pește trebuie prelucrat separat și nu se comasează cu alți pești în eșantioane, dată fiind cantitatea redusă de material care urmează să fie folosită pentru extracție. Peștele întreg poate fi, de asemenea, trimis la laborator acreditat.

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

**35.** Se pot trimite la laborator acreditat pești întregi dacă sunt respectate, pe durata transportului, condițiile de temperatură care nu trebuie să depășească 10 °C. Peștele întreg se ambalează în hârtie absorbantă și, se expediază într-un sac de plastic. Pot fi, de asemenea, expediați pești vii.

**36.** Se acceptă colectarea materialului de diagnostic suplimentar în cazul în care laboratorul de diagnostic acreditat este de acord, în vederea unor examinări suplimentare.

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

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

**38.** În cazul în care un eșantion este constituit dintr-un pește întreg cu lungimea sub 4 cm, acesta trebuie fragmentat cu ajutorul unui foarfece steril sau al unui scalpel după eliminarea părții corpului care se găsește în spatele orificiului anal. În cazul în care un eșantion este constituit dintr-un pește întreg cu lungimea cuprinsă între 4 cm și 6 cm, se vor colecta viscerele, inclusiv

rinichii. În cazul în care un eșantion este constituit dintr-un pește întreg cu lungimea mai mare de 6 cm, eșantioanele de țesut sunt colectate conform punctelor 30- 33. Eșantioanele de țesut se fragmentează cu ajutorul unui foarfece steril sau al unui scalpel, se omogenizează și se plasează în suspensie în mediul de transport. Raportul final între țesuturi și mediul de transport este ajustat în laborator acreditat la 1:10.

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

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

**41.** Dacă supernatantul colectat este conservat la – 80 °C în intervalul de 48 de ore de la prelevarea eșantioanelor, el se reutilizează o singură dată pentru un examen virusologic.

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

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

**44.** Dacă eșantioanele provin din unități de producție considerate indemne de NPI, tratamentul inoculilor cu antiser împotriva virusului NPI poate fi omis.

**45.** Prepararea eșantioanelor pentru programele de supraveghere care utilizează testul RT-PCR și RT-qPCR și care au fost plasate într-un mediu de transport, se efectuează conform procedurii prevăzute la pct. 37 -44.

**46.** După centrifugare, se colectează supernatantul și se extrage ARN-ul. Dacă nu trebuie realizată o examinare suplimentară imediat după centrifugare, eșantioanele trebuie congelate imediat la  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sau la o temperatură inferioară acesteia.

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

eșantioane depozitate la  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ : o zi;

eșantioane depozitate la  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ : o săptămână;

eșantioane depozitate la  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ : o lună;

eșantioane depozitate la  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ : termen nelimitat.

**48.** Eșantioanele generale conservate în reactiv de stabilizare a ARN sunt tratate la fel ca eșantioanele individuale în reactiv de stabilizare a ARN. În cazul eșantioanelor generale conservate în reactiv de stabilizare a ARN, volumul eșantionului nu trebuie să depășească volumul recomandat de producător pentru extracția ARN cu ajutorul kiturilor. Dacă sunt comasate eșantioane mai mari, kiturile sau metodele de extracție sunt adaptate în consecință. Eșantioanele colectate în reactivi de stabilizare a ARN nu se utilizează pentru culturi celulare.

**49.** La comasarea eșantioanelor, întrucât protocoalele RT-qPCR au o sensibilitate similară sau mai mare decât cea a metodelor de cultură celulară, se poate accepta utilizarea, pentru PCR, a supernatantului obținut din țesuturi de pește omogenizate provenind din organe prelevate de la maximum zece pești și comasate în mediul de cultură celulară. Cu toate acestea, datorită cantității mult mai mici de inocul utilizate pentru PCR, comparativ cu cultura celulară, toate țesuturile de pește sunt omogenizate cu atenție înainte de gruparea materialului pentru extracție. Același principiu se aplică și în cazul în care se prelevează eșantioane în reactivi de stabilizare a ARN. Însă în acest caz este adesea dificil să se colecteze material reprezentativ de la maximum 10 pești într-un tub, iar numărul de pești per eșantion general trebuie prin urmare redus la 2-5.

**50.** La examinarea virusologică pe cultură celulară și medii de cultură se cultivă celule din linia celulară 2 de la alevini din specia *Lepomis macrochirus* (BF-2) sau din linia celulară 2 din gonade de păstrăv-curcubeu (RTG-2) și celule de *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) sau de *Pimephales promelas* (FHM) la o temperatură cuprinsă între  $20$  și  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  într-un mediu adecvat, și anume mediu Eagle (*Eagle's Minimum essential medium* – MEM) sau o variantă a acestuia, la care s-au adăugat ser fetal bovin  $10\%$  și antibiotice în concentrații standard.

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

**52.** Culturile celulare care se folosesc pentru inoculare cu material tisular de la pești sunt tinere, culturi celulare de o zi în monostrat, pot fi acceptate culturi cu vârste situate în intervalul 4-48 de ore. Celulele sunt în faza de creștere activă în momentul inoculării.

**53.** La examinarea virusologică pe cultură celulară se inoculează o suspensie de organe tratată cu antibiotice în culturile celulare în două diluții, și anume diluția inițială și, în plus, o diluție de 1:10 din aceasta, rezultând diluții finale ale materialului tisular în mediul de cultură celulară de 1:100 și de 1:1 000, pentru a se evita interferențele omologilor. Trebuie inoculate cel puțin două linii celulare, astfel cum se menționează la punctul 50-52. Raportul dintre cantitatea de inocul și volumul mediului de cultură celulară este de aproximativ 1:10.

**54.** Pentru fiecare diluție și fiecare linie celulară să se utilizeze o suprafață de cel puțin  $2 \text{ cm}^2$ , ceea ce corespunde unui godeu dintr-o placă de cultură celulară cu 24 de godeuri. Sunt utilizate plăci de cultură celulară, atunci când este posibil.

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

**56.** Cel puțin la fiecare șase luni sau în cazul în care se suspectează o scădere a sensibilității celulare se efectuează titrarea stocurilor de virusuri SHV și NHI congelate, pentru a se verifica sensibilitatea culturilor celulare la infecție.

**57.** Culturile celulare inoculate sunt verificate prin microscopie cu regularitate, cel puțin de trei ori pe săptămână, pentru a se observa apariția ECP, cu un grosiment între  $40 \times$  și  $150 \times$ . În cazul în care ECP este evident, se încep imediat procedurile de identificare a virusului în conformitate cu punctul 64.

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

**59.** Părți alicote din mediu (supernatant) provenind de la toate culturile sau godeurile care constituie cultura primară se reunesc într-un pool pentru fiecare linie celulară, la 7-10 zile de la inoculare. Pool-urile respective sunt apoi inoculate pe culturi celulare omoloage, nediluate și diluate 1:10 (rezultând în final diluții ale supernatantului de respectiv 1:10 și 1:100), în conformitate cu descrierea de la punctul 53. Se inoculează, de asemenea, părți alicote de 10 % din mediul care constituie cultura primară direct într-un godeu cu culturi celulare proaspete (subcultivare godeu la godeu). Inocularea poate fi precedată de o preincubare a diluțiilor cu antiser împotriva virusului NPI la o diluție corespunzătoare, în conformitate cu descrierea de la punctul 39-44.

**60.** Se incubează culturile inoculate timp de 7-10 zile la 15 °C și se examinează ținându-se cont de dispozițiile de la punctul 57.

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

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

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

**64.** Dacă se observă apariția ECP într-o cultură celulară, mediul (supernatantul) este colectat și examinat prin una sau mai multe din următoarele tehnici: testul de imunoenzimatic (ELISA), testul de imunofluorescență (IF), neutralizarea, RT-PCR sau RT-qPCR. În cazul în care aceste teste nu au permis identificarea definitivă a virusului într-o săptămână, supernatantul trebuie trimis la un laborator acreditat de referință național sau la laboratorul acreditat de referință internațional pentru bolile peștilor, în vederea identificării imediate.

**65.** Se efectuează un test ELISA sandwich dublu anticorp în vederea identificării izolatului de virus. Plăcile de microtitrare sunt umplute cu 50  $\mu l$ /godeu (0,9 pg) de soluție de imunoglobuline (Ig) din antiseruri de iepure

împotriva virusului NHI sau a virusului SHV, purificate cu proteina A, de calitate dovedită, diluate într-un tampon de carbonat (pH 9,6) conținând 15 mM azidă de sodiu, și sunt incubate la 4 °C de-a lungul unei perioade cuprinse între 18 ore și 2 săptămâni.

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

**67.** Plăcile ELISA se incubează timp de 30 de minute la 37 °C, apoi se spală și se lasă la incubat timp de 30 de minute la 37 °C în prezența anticorpilor monoclonali specifici (și anume MAb IP5B11 pentru identificarea VHSV și Hyb 136-3 pentru identificarea VNHI). Se transferă pe placa ELISA 50μl anticorpi antișoarece de iepure conjugați cu peroxidază din hrean (HRP), diluați 1:1 000 în PBS-T-BSA. După o nouă spălare, sunt declanșate reacțiile adăugând 50 μl de orto-fenilendiamină (OPD) în fiecare godeu. Plăcile ELISA se incubează timp de 20 de minute la temperatura camerei, în întuneric, iar reacția se oprește prin adăugarea a 100 μl de 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> în fiecare godeu.

**68.** Absorbanța este monitorizată la o lungime de undă de 492 și 620 nm într-un cititor ELISA. Eșantioanele sunt declarate pozitive sau negative, după compararea rezultatelor testului cu valorile absorbantei pentru controarele pozitive și negative. În general, eșantioanele cu absorbantă totală (A) < 0,5 pentru material nediluat sunt considerate negative, eșantioanele cu valori A cuprinse între 0,5 și 1,0 sunt considerate suspecte, iar eșantioanele cu valori A > 1,0 sunt considerate pozitive.

**69.** Pot fi folosite alte variante ELISA cu eficacitate similară dovedită, în locul celor menționate la prezenta secțiune.

**70.** Imunofluorescența (IF) se aplica pentru identificarea agenților patogeni listați VHSV și VNHI și se efectuează prin infectarea celulelor în plăci cu 96 de godeuri „Black”, plăci clasice cu 24 de godeuri sau pe lamele în plăci cu 24 de godeuri. La identificarea VNHI sau a VHSV sau a ambelor virusuri prin infectarea celulelor pe lamele, se aplică următorul protocol:

1) lamelele sunt însămânțate cu celule la o densitate care să asigure o confluență între 60 % și 90 % după 24 de ore de la cultivare. Dacă este posibil se folosesc celule EPC în acest scop, datorită aderenței lor ridicate la suprafețele de sticlă, dar se pot folosi și alte linii celulare, de exemplu BF-2, RTG-2 sau FHM. Se inoculează 150 μl de supernatant al culturii celulare în două diluții diferite

(1:10 și 1:1 000) în două exemplare pe culturi monostrat cu vârsta de o zi și se incubează la 15 °C timp de 24 de ore.

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

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

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

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

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

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

- 1) ser conținând anticorpi împotriva VSHV la o diluție de 1:50 (vol:vol);
- 2) ser conținând anticorpi împotriva VNHI la o diluție de 1:50 (vol:vol);
- 3) amestec de antiser împotriva serotipurilor indigene ale VNPI la o diluție de 1:50 (vol:vol);
- 4) doar mediu (control pozitiv).



50 µl din fiecare amestec format din supernatantul cu virusul de identificat și ser se inoculează pe cel puțin două culturi celulare și se incubează la 15 °C. Se urmărește apariția ECP așa cum este descris la punctul 57.

**74.** Tulpinile de VSHV și izolatele care nu reacționează la testele de neutralizare se identifică prin IF sau ELISA.

**75.** Se pot aplica și alte teste de neutralizare, cu eficacitate similară dovedită.

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

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

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

**79.** Următorii primeri se utilizează pentru detectarea VNHI:

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

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

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

**80.** Următorii primeri se utilizează pentru detectarea VSHV:

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

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

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

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

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

**81.** Amplificarea VSHV, se efectuează utilizând următorii primeri și următoarea sondă:

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

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

*RT-qPCR într-o singură etapă:*

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

**82.** Amplificarea VNHI, se efectuează utilizând următorii primeri și următoarea sondă:

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

Primer antisens: 5'- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3';

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

*RT-qPCR în două etape:*

Se acordă multă atenție manipulării tuburilor între reacții, pentru a preveni contaminarea.

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

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

**83.** În cazul în care este necesar un examen de laborator pentru confirmarea sau infirmarea prezenței NHI sau a SHV sau a ambelor boli, se utilizează următoarele metode de diagnostic;

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

2) detectarea virusului prin RT-PCR sau RT-qPCR;

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

84. Pentru izolarea convențională a virusului, urmată de identificarea acestuia și selectarea eșantioanelor trebuie selectați pentru examinare cel puțin 10 pești care prezintă semnele tipice de NHI sau de SHV.

85. Materialul tisular poate fi supus și altor tehnici de diagnostic, cum ar fi IFAT pe secțiuni congelate sau imunohistochimie pe material tisular fixat cu formol dar și un examen virusologic, în conformitate cu punctul 83 subpunctul 1) sau 2), la mai puțin de 48 de ore de la prelevarea de eșantioane, dacă s-a obținut un rezultat negativ; sau s-a obținut un rezultat pozitiv cu un material care reprezintă primul caz de NHI sau SHV.

86. În cazul în care se efectuează titrarea în vederea verificării sensibilității culturilor celulare la infecție se utilizează cel puțin două izolate de VSHV și un izolat de VNHI. Aceste izolate sunt reprezentative pentru principalele grupe de virusuri. Se folosesc izolate bine definite. Loturile de virusuri având un număr redus de pasaje pe culturi celulare sunt cultivate în flacoane de culturi celulare pe celule BF-2 sau RTG-2 pentru VSHV și pe celule EPC sau FHM pentru VNHI. Se folosește un mediu de cultură celulară la care se adaugă cel puțin 10 % ser. Pentru inoculare se folosește un indicator MOI cu valoare scăzută ( $< 1$ ). Atunci când ECP este total, virusul este colectat prin centrifugarea supernatantului culturii celulare la  $2\ 000 \times g$  timp de 15 minute, sterilizat prin filtrare printr-o membrană de  $0,45\ \mu\text{m}$  și repartizat în criotuburi etichetate. Virusul este păstrat la  $-80\ ^\circ\text{C}$ . La o săptămână după congelare, se decongelează în apă rece trei fiole din fiecare virus și se titrează pe liniile celulare respective. Fiecare izolat de virus se decongelează și se titrează cel puțin o dată la șase luni sau în cazul în care se suspectează o scădere a sensibilității unei linii celulare. Procedurile de titrare se descriu în detaliu și să se aplice aceeași procedură de fiecare dată. Titrarea prin diluție limită să cuprindă cel puțin șase replicări din fiecare serie de diluții. Titrurile sunt comparate cu titrurile obținute anterior. În cazul în care titrul unuia dintre cele trei izolate de virus scade cu un factor de 2 log sau mai mult față de titrul inițial, linia celulară nu mai este folosită în scopuri de supraveghere. În cazul în care se conservă în laboratorul acreditat linii celulare diferite, fiecare linie se examinează separat. Registrele cu evidențele de laborator se păstrează cel puțin 10 ani.

### **Capitolul III**

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

## Secțiunea 1

### **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește boala herpetică a crapului koi KHVD.**

**87.** În cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice, în ceea ce privește boala herpetică a crapului koi KHVD, boală cauzată de virusul herpetic al crapului koi (*koi herpesvirus* – KHV), care aparține familiei *Alloherpesviridae*. Denumirea științifică este herpesvirusul 3 al ciprinidelor (*cyprinid herpesvirus 3* – CyHV-3), precum și a prevenirii răspândirii infecției cu virusul herpetic al crapului koi (KHV), numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare este de asemenea reprezentative pentru diferitele ecosisteme în care se găsesc populațiile sălbatice sensibile, și anume râuri și lacuri.

**88.** Supravegherea individualizată se bazează pe monitorizarea regulată a siturilor care dețin specii sensibile. Siturile sunt monitorizate când temperatura apei a atins niveluri propice apariției bolii ( $> 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) și cel mai devreme la două săptămâni după data la care sunt atinse aceste temperaturi. Toți peștii bolnavi sau care prezintă un comportament anormal găsiți în cadrul sitului fac obiectul eșantionării și al testelor.

**89** Sunt incluși în eșantion pești care sunt ținuți o perioadă de timp îndelungată la temperaturi propice dezvoltării virusului, și anume o perioadă de două până la trei săptămâni la temperaturi cuprinse între  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  și  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poate fi acceptată metoda descrisă în continuare:

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

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

**90.** Atunci când fermele sau populațiile sălbatice fac obiectul controlului sau al eșantionării de mai multe ori pe an, intervalul dintre controalele sau dintre prelevări trebuie să fie cât mai lung posibil în sezonul în care este probabil ca temperatura apei să atingă valorile maxime anuale, fără a depăși limita de  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**91.** Toate unitățile de producție, cum ar fi iazurile și bazinele, sunt supuse controlului în vederea stabilirii prezenței peștilor morți, debilitați sau cu comportament anormal.

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

**92.** Peștii care urmează a fi colectați drept eșantioane sunt selectați după cum urmează:

- 1) dacă sunt prezenți pești debilitați, cu comportament anormal sau care au murit recent, dar care nu sunt descompuși, acești pești trebuie selectați;
- 2) dacă se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de pește, trebuie incluși în eșantion peștii care reprezintă toate sursele de apă;
- 3) peștii sunt colectați în așa fel încât toate părțile fermei și toate clasele de vârstă grupate pe ani sunt reprezentate proporțional în eșantion.

**93.** Pentru obținerea statutului „indemn de boală” (categoria I) în ceea ce privește KHVD se prevede că o zonă sau un compartiment cu un statut de categoria III în ceea ce privește KHVD poate obține statutul de categoria I atunci când toate fermele care dețin specii sensibile din, zona sau compartimentul în cauză respectă cerințele referitoare la statutul „indemn de boală”.

Punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatice selecționate în conformitate cu partea respectivă sunt supuse unuia dintre următoarele programe de supraveghere:

1) modelul A – program de supraveghere cu durata de doi ani, fermele sau punctele de prelevare să fi făcut obiectul controlului și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi și are rezultate negative în ceea ce privește KHV și este exclusă orice suspiciune privind KHVD;

2) modelul B – program de supraveghere cu durata de patru ani, cu eșantion de dimensiuni reduse. Fermele sau punctele de prelevare să fi făcut obiectul controlului și al eșantionării timp de o perioadă minimă de patru ani consecutivi, și în această perioadă de patru ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la punctul 122-123. a obținut rezultate negative în ceea ce privește KHV și este exclusă orice suspiciune privind KHVD;

**94.** În cazul în care, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere de patru ani este confirmată o infecție cu KHV într-o fermă inclusă în programul de supraveghere respectiv și, prin urmare, a fost retras statutul de categoria II al fermei, ferma respectivă poate să își recâștige imediat statutul de categoria II și să continue punerea în aplicare a programului de supraveghere pentru a obține statutul „indemn de boală” fără să pună în aplicare un program de eradicare, astfel cum este descris în prezenta secțiune, cu condiția ca ferma să îndeplinească următoarele condiții:

1) este o fermă al cărei statut în ceea ce privește KHVD este independent de starea de sănătate a populațiilor de animale acvatice din apele naturale din vecinătate în ceea ce privește această boală listată;

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

3) a fost repopulată cu pești proveniți din zone sau din compartimente care au un statut de categoria I în ceea ce privește KHVD.

**95.** Programul de eradicare prevede că o zonă sau un compartiment de categoria V în ceea ce privește KHVD poate obține categoria I în ceea ce privește această boală atunci când toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză sunt obiectul cel puțin al unui program de eradicare, sunt aplicate măsurile de control în mod efectiv și o zonă de izolare, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, este instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial infectată (infectate) cu KHV.

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

**96.** Pentru stabilirea perimetrului de protecție și de supraveghere se stabilește un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial infectată cu KHV și acest perimetru să corespundă întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial infectată cu KHV.

**97.** Agenția poate limita extinderea perimetrului la anumite părți ale bazinului hidrografic, cu condiția să nu se compromită prevenirea răspândirii KHVD, se stabilește un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă unei zone situate în jurul perimetrului de protecție stabilit.

**98.** Toate fermele în care sunt ținute specii sensibile, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial infectate cu KHV sunt obiectul unei anchete oficiale care include cel puțin următoarele elemente:

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

2) un control sanitar-veterinar; în fermele în care testele au avut rezultate negative; controalele sanitar-veterinare continuă o dată pe lună pe parcursul

sezonului în care este probabil ca temperatura apei să depășească 15 °C, până când se renunță la perimetrul de protecție.

**99.** Toate fermele declarate în mod oficial infectate cu KHV sunt golite, curățate, dezinfectate și supuse unei perioade de vid sanitar. Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni. După golirea tuturor fermelor declarate în mod oficial infectate care se găsesc în același perimetru de protecție, să se respecte o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin trei săptămâni.

Prevederile prezentului punct se referă și noilor ferme declarate în mod oficial infectate în timpul punerii în aplicare a programului de eradicare.

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

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

**102.** Toate fermele declarate în mod oficial infectate cu KHV și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu pești provenind din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD; sau pentru o perioadă de tranziție, cu pești provenind din zone sau din compartimente cu un program de supraveghere a KHVD aprobat.

**103.** Repopularea să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate cu KHV sunt golite, curățate, dezinfectate și sunt obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul 99-101.

**104.** Toate fermele care dețin specii sensibile din, zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare selectate sunt apoi obiectul programului de supraveghere prevăzut la punctul 93.

**105.** Un compartiment care cuprinde o singură fermă, care are statut sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD, al cărui statut sanitar în ceea ce privește KHVD este independent de cel al apelor naturale din vecinătate și al cărui statut sanitar de categoria I a fost retras, poate redobândi statutul de categoria I în ceea ce privește KHVD imediat ce Agenția a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

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

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

**106.** În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în Anexa nr.3 la Norma sanitar-veterinară privind condițiile de sănătate a animalelor și produselor de acvacultură și măsurile de prevenire și combatere a anumitor boli la animalele acvatice aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 239/2009 din zona sau compartimentul în cauză sunt supuse inspecției sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 5 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice, ținând cont de nivelul riscului de contaminare a fermei cu KHV.

**107.** În compartimentele cu statut sanitar de categoria I în ceea ce privește KHVD care includ una sau mai multe ferme al căror statut sanitar în ceea ce privește KHVD este dependent de statutul al apelor naturale din vecinătate privind această boală listată, frecvența controalelor sanitare să corespundă numărului cu risc ridicat prevăzut în tabelul 6 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice.

**108.** În zonele sau în compartimentele în care există un număr limitat de ferme, iar supravegherea individualizată a acestor ferme nu furnizează date epidemiologice suficiente, programele de supraveghere în vederea menținerii statutului „indemn de boală” includ puncte de prelevare selecționate în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 128-131.

**109.** Dintre aceste puncte de prelevare, 50 % sunt obiectul inspecției și prelevării de eșantioane în fiecare an, prin rotație. Eșantionarea să se realizeze în conformitate cu tabelul 6 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice. Eșantioanele sunt selectate, pregătite și examinate astfel cum este descris în secțiunea 2, iar examenele de laborator să aibă rezultate negative în ceea ce privește prezența agentului KHVD.

**110.** Statutul „indemn de boală” se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate au rezultate negative pentru KHVD și orice suspiciune privind KHVD este exclusă.



**111.** Cerințe specifice pentru eliminarea măsurilor de prevenire a răspândirii bolilor prevăzute de Norma sanitar-veterinară privind condițiile de sănătate a animalelor și produselor de acvacultură și măsurile de prevenire și combatere a anumitor boli la animalele acvatice aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 239/2009, în vederea obținerii statutului sanitar de categoria III în ceea ce privește KHVD prevăd că, o zonă sau un compartiment care are statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește KHVD poate obține statutul sanitar de categoria III în ceea ce privește această boală listată, cu condiția ca:

1) cerințele prevăzute la punctul 79-101. sunt îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, se instaurează vidul sanitar, fermele în cauză sunt obiectul unei măsuri alternative care oferă garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea virusului KHV din mediul fermei;

2) toate fermele declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme care sunt obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu pești provenind din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește KHVD;

3) repopularea are loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate sunt golite, curățate, dezinfectate și sunt obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1).

**112.** Pentru obținerea și menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD, trebuie examinate țesuturile care sunt părți din branhii și rinichi. Se permite comasarea fragmentelor de organe care provin de la cel mult doi pești, pentru a obține sau pentru a menține statutul „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD este folosită metoda de diagnostic PCR în timp real (qPCR) în conformitate cu metodele și cu procedurile stabilite Secțiunea 2 din prezentul Capitol.

**113.** Pentru anchetele oficiale care au drept scop confirmarea sau excluderea suspiciunii privind KHVD, sunt examinate țesuturile care sunt părți din branhii și rinichi. Este posibilă comasarea fragmentelor de organe care provin de la cel mult doi pești, în ancheta oficială se include cel puțin un control sanitar-veterinar și o prelevare de eșantioane de la 10 pești, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu KHV, sau de la 30 de pești, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*.

**114.** Eșantioanele sunt testate folosind metoda de diagnostic stabilite la Capitolul III secțiunea 2 și prezența infecției se consideră confirmată cu KHV în cazul în care KHV este detectat cu ajutorul PCR., dar suspiciunea privind KHVD poate fi exclusă în cazul în care acest test nu furnizează nicio altă dovadă referitoare la prezența KHV.

## **Secțiunea a 2-a**

### **metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru supravegherea și confirmarea bolii herpetice a crapului koi (KHVD)**

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

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

În anumite cazuri pot fi utilizate și alte eșantioane care nu prevăd sacrificarea, cum ar fi sângele, frotiurile din branhii, biopsia branhiilor și prelevările de mucus (se utilizează la pești foarte valoroși în cazul suspiciunii privind prezența KHV).

**117.** ADN-ul este extras în conformitate cu procedurile standard.

Pot fi utilizate kituri de extracție a ADN-ului disponibile pe piață, care permit obținerea unui ADN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR menționate la punctul 118-120.

**118.** Detectarea și identificarea agentului prin metode bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR). Pentru detectarea KHV se efectuează următorul test qPCR: primer sens (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTTG -3'; primer antisens (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTGTCTTGTT -3' și sondă (KHV-109p): 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'. Succesiunea ciclurilor: un ciclu la 95 °C timp de 15 minute, apoi 40 de cicluri la 94 °C timp de 15 secunde și la 60 °C timp de 60 de secunde. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Cu toate acestea, alternativ se pot aplica și alte versiuni de qPCR, cu eficacitate similară dovedită. Se utilizează testul descris la acest punct, care vizează gena timin kinaza (TK) a KHV. Cu toate acestea, în locul său pot fi folosite alte teste PCR cu sensibilitate și specificitate similare demonstrate.

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

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

Succesiunea ciclurilor: un ciclu la 95 °C timp de 5 minute, urmat de 35 de cicluri la 95 °C timp de 30 de secunde, la 52 °C timp de 30 de secunde, la 72 °C

timp de un minut și un ciclu la 72 °C timp de 10 minute. Dimensiunea produsului ar trebui să fie de 409 pb.

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

**120.** Prima detectare într-o anumită zonă este confirmată prin secvențiere sau trimisă la un laborator acreditat național de referință sau la un laborator acreditat de referință internațional pentru bolile peștilor, în scopul identificării imediate a virusului.

**121.** În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește KHVD, utilizând metodele de diagnostic prevăzute, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute de prezenta Secțiune.

**122.** Se includ în eșantion pești care sunt ținuți o perioadă de timp îndelungată la temperaturi propice dezvoltării virusului (și anume o perioadă de două până la trei săptămâni la temperaturi cuprinse între 15 °C și 26 °C). Eșantioanele sunt colectate la minimum 24 de ore, dar nu mai târziu de 72 de ore după practicile de gestionare care pot reactiva virusul la peștii-vector, în vederea sporirii șanselor de detectare a KHV.

**123.** În scopul supravegherii KHVD se pot trimite pești vii sau sacrificați și ambalați separat în recipiente aseptice sigilate sau, alternativ, organe congelate sau fragmente de organe conservate în alcool 80 %-100 % sau într-un mediu de transport viral (în vederea prelucrării în termen de 48 de ore după colectare) pentru testare prin metode bazate pe PCR. Pentru supravegherea KHVD se va colecta țesut din branhii și din rinichi, dacă este posibil să se evite comasarea țesuturilor de la mai mulți pești și se vor comasa țesuturi care provin de la cel mult doi pești. Eșantioanele de dimensiune mai mare sunt omogenizate cu ajutorul unui mojar și pistil sau al unui stomacher și trebuie prelevate subeșantioane extrase înainte de clarificare, în vederea extracției ADN-ului. În mod alternativ, pot fi colectate subeșantioane din fiecare țesut inclus în eșantion și pot fi introduse în tuburi pentru liză.

**124.** ADN-ul este extras în conformitate cu procedurile standard. Pot fi utilizate kituri de extracție a ADN-ului disponibile pe piață, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR menționate la punctul 125.

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

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

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

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

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

**126.** Trebuie aplicat protocolul de qPCR descris în cele ce urmează:

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

Primer antisens (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGT -3';

și sondă (KHV-109p): 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Sucesiunea ciclurilor: un ciclu la 95 °C timp de 15 minute, apoi 50 de cicluri la 94 °C timp de 15 secunde și la 60 °C timp de 60 de secunde. Rezultatele qPCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, și anume ar putea fi necesară optimizarea protocoalelor termice, în funcție de ciclul termic utilizat. Se pot obține rezultate fals-pozitive din cauza unor erori în ceea ce privește atașarea primerilor sau din cauza contaminării în laboratorul acreditat. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Cu toate acestea, alternativ se pot aplica și alte versiuni de qPCR, cu eficacitate similară dovedită.

**127.** Pentru confirmarea prezenței infecției cu KHV se utilizează protocolul de nested PCR descris în tabelul 8 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatiche, urmat de secvențierea produsului de amplificare. Rezultatele PCR pot varia în funcție de condițiile în care este realizată metoda, și anume ar putea fi necesară optimizarea protocoalelor termice, în funcție de termociclul utilizat. În plus, se pot obține rezultate fals-pozitive din cauza unor erori în ceea ce privește atașarea primerilor sau din cauza contaminării în laboratorul acreditat. Pentru fiecare serie de plăci trebuie incluse controale pozitive și negative. Alternativ, se pot aplica și alte versiuni de PCR, cu eficacitate similară dovedită. Secvențierea poate fi efectuată de laboratorul acreditat sau de societăți externe specializate în secvențiere. Rezultatele secvențierii sunt analizate

comparând secvențele cu secvențele de referință ale KHV cunoscute (numere de acces la GenBank AP008984, DQ657948 și DQ177346). Secvența consens obținută trebuie să coincidă cel puțin în proporție de 98 % cu aceste secvențe de referință.

## **Capitolul IV**

### **METODE DE SUPRAVEGHERE ȘI DE DIAGNOSTIC ÎN CEEA CE PRIVEȘTE ANEMIA INFECȚIOASĂ A SOMONULUI (AIS)**

#### **Secțiunea 1**

#### **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală” în ceea ce privește anemia infecțioasă a somonului „AIS”.**

**128.** În cazul în care fermele fac obiectul controalelor sanitar-veterinare în ceea ce privește anemia infecțioasă a somonului („AIS”)-boală cauzată de virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare (VAIS), virus care aparține genului *Isavirus*, din familia *Orthomyxoviridae* și al eșantionării de mai multe ori pe an, intervalul dintre controalele sanitar-veterinare sau dintre prelevări sunt cât mai lung posibil.

**129.** În cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice, numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare sunt de asemenea reprezentative pentru diferitele ecosisteme în care se găsesc populațiile sălbatice sensibile.

**130.** Se efectuează controale sanitar-veterinara în toate unitățile de producție, cum ar fi iazurile, bazinele și cuștile din plasă, pentru a depista prezența peștilor morți, debilitați sau cu un comportament anormal. Se acordă o atenție deosebită punctelor de evacuare a apei, unde peștii debilitați au tendința de a se acumula din cauza curentului.

**131.** Se prelevează pești muribunzi sau care au murit recent, dar încă nu sunt în stare de putrefacție. În procesul de prelevare se dă prioritate peștilor care prezintă semne de anemie, sângerări sau alte semne clinice care denotă tulburări circulatorii:

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

2) dacă se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de pește, trebuie incluși în eșantion peștii care reprezintă toate sursele de apă, peștii

selecțiați includ pești colectați în așa fel încât toate unitățile de producție, cum ar fi cuștile din plasă, bazinele și iazurile fermei, precum și toate clasele de vârstă grupate pe ani sunt reprezentate proporțional în eșantion.

**132.** Cerințe specifice pentru obținerea statutului sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS prevede că o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește AIS poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză respectă cerințele relevante și atunci când toate aceste ferme, punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatic selectate sunt supuse următorului program de supraveghere:

1) fermele sau punctele de prelevare sunt obiectul controalelor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 9 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice;

2) în această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de diagnostic stabilite la Capitolul IV Secțiunea 2. a avut rezultate negative în ceea ce privește virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare și a fost exclusă orice suspiciune privind AIS;

3) în cazul în care, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere, este confirmată AIS la o fermă inclusă în programul de supraveghere și prin urmare, statutul sanitar de categoria II a fost retras, trebuie efectuat un program de eradicare în conformitate cu punctele 133-141.

**133.** O zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește AIS poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul unui program de eradicare și măsurile minime de control stabilite de Agenție, care sunt aplicate în mod efectiv și, în special, o zonă de izolare, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, a fost instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial infectată (infectate) cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS.

**134.** Zona de izolare trebuie definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a AIS la peștii de crescătorie sau la cei sălbatici, cum ar fi: numărul, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a peștilor în cadrul fermei infectate cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS; distanța la care se găsesc fermele învecinate și

densitatea acestora; apropierea de abatoare; fermele cu care se intră în contact; speciile prezente la ferme; practicile de acvacultură aplicate în fermele afectate și în fermele învecinate acestora; condițiile hidrodinamice și alți factori pertinenti din punct de vedere epidemiologic care sunt identificați.

Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică cerințe minime în ceea ce privește delimitarea geografică a acestor perimetre descrise în prezenta secțiune.

**135.** Se stabilește un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial infectată cu AIS și acest perimetru să corespundă întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial infectată cu AIS; Agenția poate limita extinderea perimetrului la anumite părți ale bazinului hidrografic, cu condiția că să nu se compromită prevenirea răspândirii AIS.

**136.** Se stabilește un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, înscrisă într-un cerc cu raza de 10 km, calculată din centrul perimetrului de protecție; sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare; sau în zonele interioare: unei zone situate în exteriorul perimetrului de protecție stabilit.

**137.** Toate fermele în care sunt ținute specii sensibile, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial infectate cu AIS sunt obiectul unei anchete oficiale care include cel puțin următoarele elemente:

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

2) un control sanitar-veterinar; în fermele pentru care testele sanitar-veterinare au rezultate negative, controalele trebuie să continue o dată pe lună până când se renunță la perimetrul de protecție în conformitate cu punctul 138;

**138.** Toate fermele declarate în mod oficial infectate cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS, sunt golite, curățate, dezinfectate și supuse unei perioade de vid sanitar timp de cel puțin trei luni. Se poate renunța la perimetrele de protecție și de supraveghere atunci când toate fermele situate în perimetrul de protecție sunt golite, curățate, dezinfectate și ulterior a fost respectată o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin șase săptămâni. Atunci când intervine o perioadă de vid sanitar pentru fermele declarate în mod oficial infectate, perimetrele de protecție sunt transformate în perimetre de supraveghere. Agenția decide, pe baza unei evaluări a riscurilor, să solicite golirea, curățarea, dezinfecția și o perioadă de vid sanitar pentru alte ferme care se află în interiorul

perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite. În cazul acestor ferme, durata perioadei de vid sanitar este stabilită de Agenție pe baza unei evaluări a riscurilor de la caz la caz.

**139.** Toate fermele declarate în mod oficial infectate virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare sau în care a fost confirmată prezența AIS și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu pești care provin din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS.

**140.** Repopularea să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate sunt goliți, curățați, dezinfecțate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul 138.

**141.** Toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare selectate în conformitate cu punctele 128.-131., fac apoi obiectul programului de supraveghere prevăzut la punctul 132.

**142.** Un compartiment care cuprinde o singură fermă care are statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS, al cărui statut sanitar este independent de cel al apelor naturale din vecinătate și al cărui statut sanitar de categoria I a fost retras, poate redobândi statutul imediat ce Agenția a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

- 1) ferma a fost golită, curățată, dezinfecțată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni;
- 2) ferma a fost repopulată cu pești provenind din zone sau din compartimente care au un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS.

**143.** În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în Anexa nr.3 la Norma sanitar-veterinară privind condițiile de sănătate a animalelor și produselor de acvacultură și măsurile de prevenire și combatere a anumitor boli la animalele acvatice aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 239/2009 din zona sau compartimentul în cauză sunt supuse controalelor sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 10 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice, ținând cont de nivelul riscului de contaminare a fermei cu AIS.



**144.** La determinarea frecvenței controalelor sanitare pentru compartimentele care au statut sanitar de categoria I în ceea ce privește AIS, și al căror statut sanitar în ceea ce privește AIS depinde de statutul sanitar al apelor naturale din vecinătate în care există somon de Atlantic (*Salmo salar*), riscul de contaminare cu AIS este considerat ridicat.

**145.** Statutul „indemn de boală” în ceea ce privește AIS se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctul 149. au rezultate negative pentru virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare și a fost exclusă orice suspiciune privind AIS, în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la Capitolul IV secțiunea 2.

**146.** O zonă sau un compartiment care are statutul sanitar de categoria V în ceea ce privește virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare poate obține statutul de categoria III cu condiția ca:

1) cerințele prevăzute la punctele 133-138 sunt îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză sunt obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea VAIS din mediul fermei;

2) toate fermele declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu pești provenind din zone sau din compartimente cu statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește AIS;

3) repopularea are loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate sunt golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1);

4) să nu fi fost confirmată infecția cu virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare în cursul perioadei de doi ani care urmează punerii în aplicare a măsurilor menționate la subpunctul 1), 2) și 3) și a fost excluse suspiciunile în cursul acestei perioade, în conformitate cu procedurile stabilite la punctul 150.

**147.** Țesuturile care se examinează sunt:

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

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

3) analiza RT-qPCR: rinichi median și inimă;

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

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

**149.** Metoda de diagnostic care trebuie utilizată pentru a obține sau a menține statutul „indemn de boală” în ceea ce privește AIS este RT-qPCR, urmată de secvențierea eșantioanelor pozitive în conformitate cu metodele și cu procedurile detaliate stabilite în Capitolul IV secțiunea 2. În cazul în care rezultatul RT-qPCR este pozitiv, se testează eșantioanele suplimentare înainte de punerea în aplicare a primelor măsuri de combatere. Aceste eșantioane trebuie testate după cum urmează, în conformitate cu metodele și cu procedurile detaliate stabilite în Capitolul IV secțiunea 2., examinarea eșantioanelor prin RT-qPCR, inclusiv secvențierea genei HE pentru a verifica deleția în regiunea cu polimorfism mare; și examinarea în preparate tisulare, cu ajutorul unor anticorpi specifici împotriva VAIS (și anume IHC pe secțiuni fixate sau IFAT pe amprente tisulare); sau izolarea și identificarea VAIS într-o cultură celulară de la cel puțin un eșantion prelevat de la orice pește care provine din fermă.

**150.** În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă suspiciunea privind AIS, trebuie respectată următoarea procedură în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

1) ancheta oficială include cel puțin un control sanitar-veterinar și o prelevare de eșantioane de la 10 pești muribunzi, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu AIS. În cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu AIS, inspecția sanitară este urmată de prelevarea de eșantioane specifice de la cel puțin 30 de pești muribunzi sau pești care au murit recent, cu constituție normală. Eșantioanele sunt testate în conformitate cu metodele de diagnostic prevăzute la subpunctul 2);

2) în cazul în care rezultatul RT-qPCR este pozitiv pentru virusul anemiei infecțioase a somonului cu deleție în regiunea cu polimorfism mare, trebuie testate eșantioane suplimentare înainte de punerea în aplicare a primelor măsuri de combatere. Suspiciunea privind infecția cu VAIS trebuie confirmată în conformitate cu următoarele criterii, utilizând metodele și procedurile detaliate stabilite în Capitolul IV secțiunea 2, depistarea VAIS prin RT-qPCR, inclusiv secvențierea genei HE pentru a verifica deleția în regiunea cu polimorfism mare, precum și depistarea VAIS în preparate tisulare, cu ajutorul unor anticorpi specifici împotriva VAIS (și anume IHC pe secțiuni fixate sau IFAT pe amprente tisulare); sau depistarea VAIS prin RT-qPCR, inclusiv secvențierea genei HE pentru a verifica deleția în regiunea cu polimorfism mare; și izolarea și identificarea VAIS într-o cultură celulară de la cel puțin un eșantion prelevat de la orice pește care provine din fermă;

3) în cazul în care sunt prezente semne clinice, modificări patologice macroscopice sau există rezultate histopatologice compatibile cu AIS, rezultatele

sunt coroborate în vederea depistării virusului utilizând două metode de diagnostic care au principii de detectare independente, precum RT-qPCR și IHC.

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

### **Secțiunea a 2-a** **metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru supravegherea** **și confirmarea anemiei infecțioase a somonului (AIS)**

**151.** În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul programelor de supraveghere și de eradicare sau pentru a confirma sau a exclude prezența AIS, trebuie aplicate metodele și procedurile detaliate prevăzute de prezenta secțiune.

**152.** În scopul examinării de laborator pentru depistarea prezenței AIS, eșantioanele de pești nu se comasează, în măsura în care este posibil. În scopul supravegherii AIS, se acceptă comasarea a 2-5 pești.

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

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

**155.** Țesuturile utilizate pentru examinarea virusologică pe cultură celulară se prelevă de la toți peștii din eșantion. De la pești se prelevă, cu ajutorul unui

instrument steril, fragmente de ficat, de rinichi anterior sau median, de inimă și de splină, care sunt transferate în tuburi de plastic ce conțin 9 ml de mediu de transport. Într-un tub care conține soluție de transport se pot colecta țesuturi prelevate de la cel mult cinci pești: acestea constituie un eșantion general. Greutatea țesutului dintr-un eșantion este de  $1,0 \pm 0,5$  g.

**156.** Se transporta pești întregi către laboratorul acreditat în cazul în care sunt îndeplinite condițiile termice pe durata transportului.

Peștii întregi sunt înfășurați în hârtie absorbantă și expediați într-un sac de plastic.

Pot fi transportați pești vii, dar numai sub supravegherea laboratorului acreditat național de referință pentru bolile peștilor și ținând cont de aspectele suplimentare referitoare la dezinfecție și la biosecuritate aferente transportului de pești vii.

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

**158.** Pentru analiza RT-PCR a țesuturilor conservate în RNA later, extracția ARN se realizează în următoarele termene, care variază în funcție de temperatura la care sunt depozitate eșantioanele: eșantioane depozitate la 37 °C: o zi, eșantioane depozitate la 25 °C: o săptămână, eșantioane depozitate la 4 °C: o lună, eșantioane depozitate la  $-20$  °C: termen nelimitat.

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

**160.** Examenul virusologic pe cultură celulară să începe cât mai curând posibil și cel târziu la 48 de ore după colectarea eșantioanelor. În cazuri excepționale, examenul virusologic poate începe cel târziu la 72 de ore după colectarea materialului de examinat, cu condiția ca acesta este protejat de mediul de transport și sunt respectate condițiile de temperatură pe durata transportării.

**161.** Sub rezerva aprobării de către laboratorul acreditat de diagnostic, se pot colecta și pregăti alte țesuturi de pești decât cele menționate la Secțiunea 2 prezentului Capitol, în vederea unor examinări suplimentare.

**162.** În cazul în care se efectuează examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește AIS, sau în scopul confirmării prezenței AIS sau al excluderii suspiciunii privind această boală, folosind metodele de diagnostic trebuie aplicate metodele și procedurile detaliate prevăzute în secțiunea 2 prezentului Capitol.

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

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

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

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

Concentrația și puritatea ARN-ului extras este estimată măsurând densitatea optică la 260 nm și la 280 nm. O metodă alternativă constă în includerea de controale interne care vizează genomul virusului, astfel cum se menționează la punctul 165.

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

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

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

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

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

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

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

Trebuie utilizat testul descris la prezentul punct, care vizează segmentul 8. Atunci când este posibil, se folosește metoda într-o singură etapă, deoarece testul realizat într-un singur tub reduce la minimum riscul de contaminare încrucișată.

Primer sens: 5'- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3';

Primer antisens: 5'- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3';

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

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

**169.** Secvențierea produselor PCR amplificate

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

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

Pentru fiecare serie de plăci se includ controale pozitive și negative.

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

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

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

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

Dimensiunea produsului: 304 nt dacă HPR0.

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

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

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

**172.** Secvențierea elimină orice dubiu în ceea ce privește specificitatea unui produs amplificat prin RT-PCR.

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

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

**174.** Tratamentul tuturor inoculilor cu antiser împotriva virusului necrozei pancreatice infecțioase (virus care, în anumite regiuni ale Europei, este prezent în 50 % din eșantioanele de pește) are ca scop împiedicarea apariției ECP datorat virusului NPI în culturile celulare inoculate. Acest tratament poate fi efectuat pentru reducerea duratei examenelor virusologice, precum și a numărului de

cazuri în care apariția ECP ar trebui considerată ca un indicator potențial al VAIS. Atunci când eșantioanele provin din unități de producție considerate indemne de NPI, tratamentul inoculilor cu antiser împotriva virusului NPI poate fi omis.

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

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

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

**178.** Se incubează eșantioanele la  $15 \pm 2^\circ\text{C}$  timp de cel mult 15 zile. Se examinează culturile celulare de două ori la microscop pentru depistarea ECP, mai întâi între a cincea și a șaptea zi, apoi între a douăsprezecea și a paisprezecea



zi de la inoculare. Dacă un amestec prezintă ECP, se inițiază imediat proceduri de identificare a virusului în conformitate cu punctele 180-181. În cazul în care nu se observă niciun ECP până în a paisprezecea zi, se efectuează un test de imunofluorescență indirectă (IFAT), un test de hemadsorbție sau RT-PCR.

**179.** Subcultivarea se va efectua între a treisprezecea și a cincisprezecea zi. Se adaugă supernatant de cultură în godeurile de pe plăci multigodeu care conțin celule proaspete în fază activă de creștere, la o diluție adecvată (1/10), apoi se lasă să incubeze la  $14 \pm 2$  °C timp de cel mult 18 zile. Se examinează culturile celulare de două ori la microscop pentru depistarea ECP, mai întâi între a cincea și a șaptea zi, apoi între a paisprezecea și a optsprezecea zi de la inoculare. Dacă un amestec prezintă ECP, se inițiază imediat proceduri de identificare a virusului în conformitate cu punctul 180-181. Dacă între a paisprezecea și a optsprezecea zi nu se observă ECP, se efectuează un test de hemadsorbție sau RT-PCR. Dacă în decurs de șapte zile de la incubare se observă un efect citotoxic, se realizează o subcultivare în acest stadiu și se lasă celulele la incubat timp de 14 până la 18 zile, apoi celulele sunt supuse unei noi subcultivări cu durata de incubare de 14 până la 18 zile. Dacă efectul citotoxic apare după șapte zile, se realizează o singură subcultivare și celulele se lasă la incubat astfel încât să se ajungă la un număr total de 28 până la 36 de zile de incubare de la prima inoculare. În cazul contaminării bacteriene a culturii primare, se reia testul, pe un omogenat de țesuturi depozitat la  $-80$  °C. Înaintea inoculării, omogenatul de țesuturi este centrifugat la  $4\ 000 \times g$  timp de 15-30 de minute, la o temperatură cuprinsă între 0 și 6 °C, iar supernatantul este filtrat la 0,22 μm. Dacă are loc contaminarea bacteriană în cursul fazei de subcultivare, supernatantul se filtrează la 0,22 μm, se inoculează unor celule proaspete și se lasă la incubat o nouă perioadă de 14 până la 18 zile.

**180.** În cazul depistării ECP, indiferent de stadiu, sau în cazul unui test de hemadsorbție pozitiv, se efectuează identificarea virusului. Metodele de predilecție pentru identificarea VAIS sunt RT-PCR în conformitate cu punctul 163 și de imunofluorescența (IF) în conformitate cu punctele 184-185.

**181.** Dacă se suspectează prezenta altor virusuri se efectueze teste suplimentare de identificare a virusului. În cazul în care testele respective nu au permis identificarea definitivă a virusului într-o săptămână, supernatantul se trimite pentru identificare imediată:

- 1) laboratorului acreditat de referință al Organizației Mondiale pentru Sănătatea Animalelor (OIE) în ceea ce privește AIS; sau
- 2) unui laborator acreditat național de referință sau laboratorului acreditat de referință internațional pentru bolile peștilor.

**182.** Replicarea VAIS în culturile celulare nu are întotdeauna drept rezultat apariția ECP, fiecare godeu este supus unui test RT-PCR sau unui test de hemadsorbție în conformitate cu prezentul punct, sau unui test IF în conformitate cu punctele 184-185.

**183.** Se efectuează o prelevare din mediul de cultură celulară din fiecare godeu, inclusiv din godeurile controalelor pozitive și negative, și se introduce în tuburi sterile etichetate. La fiecare godeu se adaugă 500 μl de suspensie 0,2 % (vol/vol) de globule roșii de iepure sau de cal spălate sau de suspensie 0,05 % (vol/vol) de globule roșii de păstrăv-curcubeu sau de somon de Atlantic spălate și se lasă să incubeze la temperatura camerei timp de 45 de minute. Se îndepărtează globulele roșii și se spală fiecare godeu de două ori cu mediul L-15. Fiecare godeu este examinat la microscop. Prezența ciorchinului de globule roșii aderând la suprafața celulelor ASK indică prezența probabilă a infecției cu un ortomixovirus. Dacă testul de hemadsorbție este pozitiv, se efectuează imediat un test de identificare a virusului în conformitate cu punctele 180-181.

**184.** Se cultivă celule ASK (maximum 65 de pasaje) într-un mediu L-15 care conține 10 % ser fetal bovin, 2 % (vol/vol) de L-glutamină la 200 mM și 0,08 % (vol/vol) de 2-mercaptoetanol la 50 mM în plăci multigodeu, cu o confluență mai mare de 50 %. Se pot utiliza și alte linii celulare sau un mediu de cultură cu o eficacitate dovedită. Se adaugă 225 μl de supernatant de cultură presupusă a fi infectată de virus în fiecare din cele două godeuri, se amestecă și se transferă 225 μl în alte două godeuri, la o diluție de 1:5. Alte două godeuri se lasă neinoculate, pentru a servi drept controale. Eșantioanele de la diferite ferme piscicole se tratează pe plăci separate, la fel ca și controalele. Virusul se controlează pe un izolat de referință al VAIS. Plăcile se incubează la  $14 \pm 2$  °C și sunt examinate la microscop timp de cel mult șapte zile. Dacă se observă ECP într-un stadiu incipient sau dacă nu se observă ECP în termen de șapte zile, etapa următoare este fixarea. Se spală godeurile cu tampon fosfat salin (PBS) și se fixează prin incubare cu acetonă 80 %, timp de 20 de minute, la temperatura camerei. Plăcile sunt lăsate să se usuce la aer și apoi se colorează imediat sau sunt depozitate la o temperatură de 0-6 °C timp de cel mult 24 de ore înainte de colorare.

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

conjugatul FITC trebuie optimizate în fiecare laborator acreditat. Se îndepărtează anticorpii și se spală plăcile de trei ori cu Tween 20 0,05 % în PBS. Se examinează imediat godeurile la un microscop inversat, echipat pentru examinarea fluorescenței cu un filtru corespunzător pentru stimularea FITC. Un test este considerat pozitiv dacă se observă celule fluorescente. Pentru ca un test să fie valabil, controalele pozitive trebuie să dea un rezultat pozitiv, iar cele negative un rezultat negativ.

**186.** Tehnica menționată la punctele 182-183. poate fi aplicată și altor țesuturi de pește, precum ficatul, splina și inima, cu condiția ca pe lamă să se poată depune o cantitate suficientă de celule endoteliale, de leucocite sau de limfocite. Procedura de colorare este identică pentru toate țesuturile, chiar dacă pentru unele dintre ele este preferabil să se renunțe la colorarea cu iodură de propidiu și să se utilizeze iluminarea în faze pentru identificarea tipurilor de celule prezente pe amprentă.

**187.** Secțiunile incluse în parafină sunt tăiate la 5 μm și colorate folosindu-se hematoxină și eozină.

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

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

2) peteșii multifocale sau confluenți sau necroza hepatocitelor, sau ambele, la o anumită distanță de vasele de sânge mai mari din ficat; acumulare multifocală de eritrocite în sinusoidale hepatice dilatate;

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

4) distensia stromei splinei, din cauza acumulării de eritrocite;

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

6) eritrofagocitoză în splină și hemoragii secundare în ficat și rinichi.

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

**190.** Anticorpii policlonali împotriva nucleoproteinelor VAIS trebuie utilizați pe secțiuni de țesuturi fixate cu formol și incluse în parafină. Organele care urmează a fi examinate sunt rinichiul median și inima (inclusiv zona de tranziție, toate cele trei camere și valvele). Cazurile suspecte din cauza semnelor

patologice se verifică prin intermediul unui test IHC pozitiv. Secțiunile histologice se pregătesc în conformitate cu metodele standard.

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

**192.** Procedura de colorare pentru IHC: toate incubațiile se efectuează la temperatura camerei pe platforma de basculare, cu excepția cazului în care se prevede altfel în prezenta decizie:

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

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

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

**193.** Interpretarea rezultatului testului IHC: secțiunile de control sunt considerate pozitive atunci când se observă că citoplasma și interiorul nucleului celulelor endoteliale din vasele de sânge ale endocardului au o culoare roșie (roșiatică) vizibilă în mod clar. O secțiune dintr-un eșantion utilizat pentru testare este considerată pozitivă numai dacă se observă în mod clar o colorare în roșu a interiorului nucleului celulelor endoteliale; secțiunile de control sunt considerate negative dacă nu au nicio reacție de colorare semnificativă. Având în vedere că localizarea în interiorul nucleului este specifică nucleoproteinei ortomixovirusului într-o etapă de replicare a virusului, însă predomină adesea o colorare citoplasmatică concomitentă, zonele de colorare citoplasmatică și de alte

tipuri care nu sunt localizate în interiorul nucleului sunt considerate nespecifice sau neconcludente.

## **Capitolul V**

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

#### **Secțiunea 1**

#### **Cerințe referitoare la obținerea și menținerea statutului sanitar „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*.**

**194.** Controalele sanitar-veterinare și, după caz, prelevarea de eșantioane pentru examenele de laborator, în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* boală cauzată de protozoarul *Marteilia refringens*, se efectuează în perioada din an în care se știe că prevalența parazitului este maximă în zonă sau în compartiment. Atunci când astfel de date nu sunt disponibile, prelevarea de eșantioane se efectuează imediat după ce temperatura apei a depășit 17 °C.

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

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

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

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

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

**196.** O zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul programului de supraveghere de doi ani, care include controale sanitare și colectarea de eșantioane în vederea testării.

**197.** Program de supraveghere de doi ani:

1) fermele sau zonele de cultură a moluștelor au făcut obiectul controalelor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 11. din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice;

2) în această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor a avut rezultate negative în ceea ce privește *Marteilia refringens* și a fost exclusă orice suspiciune privind *Marteilia refringens*;

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

**198.** Eradicarea *Marteilia refringens* este considerată imposibilă în cea mai mare parte a cazurilor, însă, atunci când Agenția consideră că acest lucru este fezabil, se aplică program de eradicare, o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile din, zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul programului de eradicare.

**199.** Este instaurată o zonă de izolare, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, în vecinătatea fermei (fermelor) sau a zonei (zonelor) de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectată (infectate) cu *Marteilia refringens*. Zona de izolare este definită de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscurile de răspândire a *Marteilia refringens*, cum ar fi: numărul, vârsta, rata mortalității și distribuția cazurilor de mortalitate a moluștelor în ferma sau în zona de cultură a moluștelor infectată cu *Marteilia refringens*, incluzând moluștele sălbatice; distanța la care se găsesc fermele învecinate sau zonele de cultură a moluștelor învecinate, precum și densitatea acestora, incluzând moluștele sălbatice; proximitatea față de unitățile de prelucrare, fermele cu care se intră în contact sau zonele de cultură a moluștelor; speciile, în special speciile sensibile și speciile-vector prezente în

ferme sau în zonele de cultură a moluștelor; practicile de acvacultură aplicate în fermele și în zonele de cultură a moluștelor afectate, precum și în cele aflate în vecinătate; condițiile hidrodinamice și alți factori relevanți din punct de vedere epidemiologic care sunt identificați. Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se aplică următoarele cerințe minime:

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

2) este stabilit un perimetru de supraveghere în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, stabilită pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare.

**200.** Toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin speciile sensibile din perimetrul de protecție și care nu sunt în mod oficial declarate ca infectate cu *Marteilia refringens* sunt supuse unei anchete oficiale care cuprinde cel puțin colectarea de eșantioane pentru testarea a 150 de moluște după începutul perioadei de transmitere a *Marteilia refringens*. În cazul în care nu se cunoaște perioada de transmitere, eșantionarea să înceapă după ce temperatura apei depășește 17 °C.

**201.** Toate fermele și zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate cu *Marteilia refringens* sunt golite și fac obiectul unui vid sanitar și, dacă este posibil, sunt curățate și dezinfectate.

**202.** Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin:

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

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

3) paisprezece luni în cazul fermelor și al zonelor de cultură a moluștelor care au legături nelimitate cu apele înconjurătoare, cu condiția ca moluștele infectate care aparțin speciilor sensibile și moluștele din speciile sensibile care au legături epidemiologice cu ferma infectată sau cu zona de cultură a moluștelor infectată să nu fi fost recoltate sau eliminate înainte de perioada din an în care se știe că prevalența *Marteilia refringens* este maximă, sau, în cazul în care nu se

cunoaște această perioadă, atunci când moluștele din speciile sensibile nu sunt recoltate sau eliminate înainte de perioada în care temperatura apei depășește 17 °C.

**203.** După golirea tuturor fermelor și a zonelor de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate, se respectă o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin patru săptămâni.

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

**205.** Toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu moluște care provin din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*. Repopularea are loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate sunt golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar.

**206.** Toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare sunt obiectul programului de supraveghere.

**207.** În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză sunt supuse controalelor sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 12 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice, ținând cont de nivelul riscului de contaminare a fermei sau a zonei de cultură a moluștelor cu *Marteilia refringens*.

**208.** Statutul „indemn de boală” se poate menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic prevăzute la punctul 211 au rezultate negative pentru *Marteilia refringens* și orice suspiciune privind *Marteilia refringens* este exclusă.

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



1) cerințele prevăzute la punctele 198-204. sunt îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză se permite implementarea și măsurilor alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea *Marteilia refringens* din mediul fermei;

2) toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu punctul 1), situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu moluște care provin din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*;

3) repopularea are loc numai după ce toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate sunt golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1);

4) să nu fi fost confirmată infecția cu *Marteilia refringens* în cursul perioadei de doi ani care a urmat punerii în aplicare a măsurilor menționate la subpunctul 1), 2) și 3) și au fost excluse suspiciunile în cursul acestei perioade, în conformitate cu procedurile stabilite la punctul 212.

**210.** Se trimite la laboratorul acreditat animalul întreg pentru efectuarea testelor de diagnostic prevăzute la Secțiunea 2 prezentului Capitol.

**211.** Metodele de diagnostic care trebuie utilizate pentru obținerea sau menținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens* în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în secțiunea 2, sunt examenul histopatologic, amprentele tisulare sau PCR.

**212.** În cazul în care se necesită confirmarea sau excluderea suspiciunii privind infecția cu *Marteilia refringens*, trebuie respectată următoarele proceduri privind inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

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

2) eșantioanele se testează folosind metodele de diagnostic stabilite la subpunctul 1) în conformitate cu metodele și cu procedurile de diagnostic detaliate stabilite în Capitolului V secțiunea 2, prezența *Marteilia refringens* este considerată confirmată atunci când un rezultat pozitiv obținut prin examen

histopatologic, amprente tisulare sau hibridare *in situ* este asociat unui rezultat pozitiv obținut prin PCR și completat prin secvențiere, suspiciunea de infecție cu *Marteilia refringens* poate fi exclusă în cazul în care testele nu sunt pozitive la prezența *Marteilia refringens*.

## Secțiunea a 2-a

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

**213.** În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*, sau în scopul confirmării prezenței acestei boli listate sau al excluderii suspiciunii privind această boală, folosind metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute în secțiunea dată.

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

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

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

**215.** Citologia (tehnica citologică de colorare) ca tehnica de microscopie se aplică în mod următor:

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

**216.** Un rezultat pozitiv constă în observarea unor celule ale căror dimensiuni variază între 30-40  $\mu\text{m}$ . Citoplasma este bazofilă, iar nucleul este eozinofil. Se observă halouri pale în jurul granulelor mari, puternic colorate

(refringente), iar în cazul celulelor de dimensiuni mai mari se observă o dispunere de tip „celulă în celulă”.

Tehnica nu este specifică acestei specii de parazit.

**217.** Histologia ca tehnica de microscopie se aplică în mod următor: se fixează secțiuni de țesut care includ branhiile, glanda digestivă, mantaua și gonadele timp de cel puțin 24 de ore în fixator Davidson, urmând o prelucrare normală pentru examenul histologic după includerea în parafină și colorare cu hematoxilină și eozină. Observațiile trebuie efectuate la grosisme succesive, de maximum  $\times 1\ 000$ .

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

Tehnica nu este specifică acestei specii de parazit.

**218.** ADN-ul este extras în conformitate cu procedurile standard.

Pot fi utilizate și alte kituri de extracție a ADN-ului, care permit de obicei obținerea unui ADN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR menționate la punctele 219-223.

**219.** Pentru *reacția în lanț a polimerazei (PCR)*, trebuie utilizați primeri PCR care vizează regiunea spațierii transcrise intern (ITS1), deoarece aceștia pot amplifica numai *M. refringens*.

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

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

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

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

**224.** Pentru hibridare *in situ* (IHS) trebuie utilizată o sondă care vizează subunitatea mică din complexul de gene al ARNr, deoarece aceasta a fost validată în raport cu histologia.

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

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

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

**228.** În scopul programelor de supraveghere și pentru a confirma prezența unei infecții cu *Marteilia refringens* sau pentru a exclude suspiciunea privind această boală listată, metodele de diagnosticare și procedurile aferente care trebuie utilizate în conformitate cu orientările stabilite în tabelul 13, din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice.

## **Capitolul VI**

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

#### **Secțiunea 1**

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

**229.** Controalele sanitar-veterinare și, după caz, eșantionarea unităților de producție, în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*- o boală cauzată de protozoarul *Bonamia ostreae*, se efectuează în perioada din an în care se știe că prevalența *Bonamia ostreae* este maximă în zonă sau în compartiment, atunci când astfel de date nu sunt disponibile, eșantionarea se efectuează iarna sau la începutul primăverii.

**230.** În cazul în care moluștele fac obiectul eșantionării se aplică următoarele criterii:

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

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

**3).** atunci când se efectuează eșantionarea în cadrul fermelor în care se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producția de moluște, trebuie incluse

în eșantion moluște care reprezintă toate sursele de apă, în așa fel încât toate părțile fermei sunt reprezentate proporțional în eșantion;

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

**231.** O zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae* poate obține din nou statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul cel puțin al programului de supraveghere următor, care include controale sanitare și colectarea de eșantioane în vederea testării.

**232.** Program de supraveghere de doi ani:

1). fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile au făcut obiectul controalelor sanitare și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 14. din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice;

2) în această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor a avut rezultate negative în ceea ce privește *Bonamia ostreae* și a fost exclusă orice suspiciune privind *Bonamia ostreae*;

3) atunci când *Ostrea edulis* provenind dintr-o zonă sau dintr-un compartiment cu statut sanitar de categoria I sunt incluse în eșantion, acestea sunt introduse în fermă sau în zona de cultură a moluștelor cel puțin în toamna imediat precedentă perioadei în care se desfășoară programul de supraveghere.

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

**234.** O zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria V în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae* poate obține din nou statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală, atunci când toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză unde sunt aplicate măsurile minime de control în mod efectiv și, în special, a fost instaurată o zonă de izolare, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, în vecinătatea fermei (fermelor) sau a zonei (zonelor)

de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectată (infectate) cu *Bonamia ostreae*.

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

**236.** Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere se stabilește un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei sau a zonei de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectată cu *Bonamia ostreae* și acest perimetru să corespundă unei zone stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare și în afara perimetrului de protecție, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, stabilită pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare.

**237.** Toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin speciile sensibile din perimetrul de protecție și care nu sunt în mod oficial declarate ca infectate cu *Bonamia ostreae* sunt supuse unei anchete oficiale care cuprinde cel puțin colectarea de eșantioane pentru testarea a 150 de moluște din speciile sensibile după începutul perioadei de transmitere a *Bonamia ostreae*. În cazul în care nu se cunoaște perioada de transmitere, eșantionarea se începe iarna sau la începutul primăverii;

**238.** Toate fermele și zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate cu *Bonamia ostreae* sunt golite, fac obiectul unui vid sanitar și, dacă este posibil, sunt curățate și dezinfectate. Durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase luni.

**239.** După golirea tuturor fermelor sau a zonelor de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate, se respectă o perioadă de vid sanitar sincronizat de cel puțin patru săptămâni.

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

**241.** Toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu moluște care provin din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*. Repopularea are loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate sunt golate, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate cu punctul 238-240.

**242.** Toate fermele și zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare sunt apoi obiectul programului de supraveghere.

**243.** În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului sanitar de categoria I, toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor care dețin specii sensibile din zona sau din compartimentul în cauză sunt supuse controalelor sanitare și eșantionării, în conformitate cu tabelul 15 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice, ținând cont de nivelul riscului de contaminare a fermei sau a zonei de cultură a moluștelor cu *Bonamia ostreae*.

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

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

1) cerințele prevăzute la punctele 233-240, sunt îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză sunt obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea *Bonamia ostreae* din mediul fermei;

2) toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme sau zone de cultură a moluștelor care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu



subpunctul 1), situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu moluște care provin din zone sau din compartimente cu un statut sanitar de categoria I, II sau III în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*.

3) repopularea are loc numai după ce toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor declarate în mod oficial infectate sunt golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1).

4) nu este confirmată infecția cu *Bonamia ostreae* în cursul perioadei de doi ani care urmează punerii în aplicare a măsurilor menționate la subpunctele 1), 2) și 3) și sunt excluse suspiciunile în cursul acestei perioade.

**246.** Animalul întreg este trimis la laborator acreditat pentru efectuarea testelor de diagnostic prevăzute la punctele 247-249.

**247.** Metodele de diagnostic care trebuie utilizate pentru a obține sau a menține statutul „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae* sunt examenul histopatologic, amprentele tisulare sau PCR stabilite în Capitolul VI Secțiunea 2.

**248.** În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă suspiciunea privind infecția cu *Bonamia ostreae*, ancheta oficială cuprinde cel puțin o prelevare de eșantioane de la 30 de moluște din speciile sensibile, în cazul în care suspiciunea respectivă se bazează pe un raport de mortalitate, sau, dacă nu, de la 150 de moluște din speciile sensibile, după începutul perioadei de transmitere a *Bonamia ostreae*. În cazul în care nu se cunoaște perioada de transmitere, eșantionarea să începe iarna sau la începutul primăverii.

**249.** Prezența *Bonamia ostreae* este considerată confirmată atunci când un rezultat pozitiv obținut prin examen histopatologic, amprente tisulare sau hibridare *in situ* este asociat unui rezultat pozitiv obținut prin PCR și completat prin secvențiere în conformitate cu metodele și cu procedurile aprobate, suspiciunea de infecție cu *Bonamia ostreae* poate fi exclusă în cazul în care testele menționate nu furnizează nicio altă dovadă a prezenței *Bonamia ostreae*.

## **Secțiunea a 2-a**

### **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru supravegherea și confirmarea infecției cu *Bonamia ostreae***

**250.** În cazul în care sunt prelevate eșantioane și sunt realizate examene de laborator în scopul obținerii sau al menținerii unui anumit statut sanitar în ceea ce privește *Bonamia ostreae*, sau în scopul confirmării prezenței acestei boli listate sau al excluderii suspiciunii privind această boală, folosind metodele de

diagnostic, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute în prezenta secțiune.

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

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

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

**254.** Citologia (tehnica citologică de colorare) se efectuează în mod următor: după uscarea țesutului branhiar și a celui cardiac pe o hârtie absorbantă se realizează mai multe amprente pe o lamă din sticlă. Lamele sunt lăsate să se usuce la aer, se fixează în metanol sau etanol absolut și se colorează cu ajutorul unui kit de colorare disponibil în comerț (precum Diff-Quik®/Hemacolor®), în conformitate cu instrucțiunile producătorului. După spălare cu apă de la robinet și uscare, lamele se acoperă cu o lamelă cu ajutorul unei rășini sintetice adecvate. Lamelele sunt analizate mai întâi la un grosiment de  $\times 200$  și apoi în imersiune în ulei la un grosiment de  $\times 1\ 000$ .

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

**256.** Histologia se efectuează în mod următor, se fixează secțiunile de țesut care includ branhii și glanda digestivă timp de cel puțin 24 de ore în fixator Davidson, urmând o prelucrare normală pentru examenul histologic după includerea în parafină și colorare, cu hematoxilină și eozină sau alte coloranți. Observațiile trebuie efectuate la grosimente succesive, de maximum  $\times 1\ 000$ .

**257.** Rezultatul pozitiv constă în prezența unor paraziți sub formă de celule foarte mici, cu lățimea de 2-5  $\mu\text{m}$ , în interiorul hemocitelor sau libere în țesutul

conjunctiv sau în sinusurile epitelului branhiilor, tubului digestiv și mantalei, deseori asociați unei reacții inflamatorii intense. Pentru a se înlătura orice îndoială, paraziții sunt observați în interiorul hemocitelor în vederea stabilirii unui diagnostic pozitiv. Tehnica nu este specifică acestei specii de parazit.

**258.** ADN-ul este extras în conformitate cu procedurile standard.

Pot fi utilizate și alte kituri disponibile, de extracție a ADN-ului, care permit de obicei obținerea unui ADN de înaltă calitate, ce poate fi utilizat în protocoalele PCR după cum este descris în prezenta secțiune.

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

1) protocol PCR clasic care permite amplificarea mai multor membri din taxonul *Haplosporidia*, inclusiv *Bonamia spp.* Primerii, denumiți Bo și Boas, sunt 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' și, respectiv, 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-JRC-CC-3' și amplifică un produs de 300 pb. Amestecurile pentru PCR conțin tampon [500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 9,0 la 25 °C) și 1 % Triton® X-100)], 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM amestec dNTP, 1 μM primer sens și antisens, 0,02 unități μl<sup>-1</sup> polimerază ADN Taq și 0,2 ng μl<sup>-1</sup> de matrice ADN într-un volum total de 50 μl. Eșantioanele sunt denaturate într-un termociclu timp de cinci minute la 94 °C, urmând 30 de cicluri (94 °C timp de un minut, 55 °C timp de un minut, la 72 °C timp de un minut) și o elongație finală timp de 10 minute la 72 °C. Controalele pozitive constau în ADN-ul genomic al unei gazde cu o infecție pronunțată sau în ADN plasmidic incluzând regiunea vizată. Controalele negative constau în ADN-ul genomic al unor gazde neinfectate și în reactivi PCR fără ADN țintă. Un rezultat pozitiv constă într-un produs de amplificare pozitiv de mărimea preconizată (și anume, 300 pb), toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive;

2) protocol PCR este un test PCR în timp real cu SYBR® Green. Acesta permite detectarea specifică a *B. ostreae* (descrisă în cele ce urmează) și poate fi combinat cu un test PCR în timp real cu SYBR® Green care să permită detectarea specifică a *B. exitiosa* (Ramilo et al., 2013). Primerii BOSTRE-F (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') și BOSTRE-R (5'-TCGCGGTTGAATTTATCGT-3') amplifică un produs de 208 pb. Amestecurile pentru PCR conțin SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 μM primeri sens și antisens și 200 ng de ADN extras. Eșantioanele sunt denaturate într-un sistem de detectare în timp real timp de 10 minute la 95 °C, urmând 35 de cicluri (95 °C timp de 30 de secunde, 55 °C timp de 45 de secunde și 72 °C timp de un minut). Analiza curbei de topire se efectuează crescând temperatura cu câte 0,5 °C/s, pornind de la o temperatură de 55 °C și ajungând la 95 °C, înregistrând intensitatea fluorescenței la fiecare schimbare de temperatură. Controalele pozitive constau în ADN-ul genomic al unei gazde cu o infecție

pronunțată sau în ADN plasmidic incluzând regiunea vizată. Controalele negative constau în ADN-ul genomic al unor gazde neinfectate și în reactivi PCR fără ADN țintă. Un rezultat pozitiv constă într-un produs de amplificare pozitiv cu un singur vârf al temperaturii de topire ( $78,25 \pm 0,25$  °C în condițiile publicate de Ramilo *et al.*, 2013), toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive.

**260.** Pentru hibridare *in situ* (IHS) sunt stabilite următoarele cerințe. Trebuie utilizată o sondă care vizează subunitatea mică din complexul de gene al ADN<sub>r</sub>, cu toate că s-a demonstrat că poate apărea o reacție încrucișată cu alți membri ai familiei *Haplosporidia*.

**261.** Trebuie fixate secțiuni de țesut care includ branhiile și glanda digestivă timp de cel puțin 24 de ore în fixator Davidson, urmând o prelucrare normală pentru examenul histologic după includerea în parafină. Se decupează secțiuni de 5 μm și se așează pe lame acoperite cu aminoalchilsilan, apoi se incubează în timpul nopții într-o etuvă la 40 °C. Secțiunile sunt deparafinate prin scufundarea în xilen timp de 10 minute. Această etapă se repetă o singură dată și apoi solventul se elimină prin scufundare în două băi succesive de etanol absolut de 10 minute fiecare. Secțiunile sunt apoi deshidratate prin imersie în băi succesive de etanol. Secțiunile sunt tratate cu proteinaza K ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) într-un tampon TE [Tris (50 mM), EDTA (10 mM)], la 37 °C timp de 30 de minute. Lamelele sunt deshidratate prin imersie în băi succesive de etanol și apoi uscate la aer. Secțiunile sunt incubate cu 100 μl de tampon de hibridare [ $4 \times$  SSC (soluție salină de citrat), formamidă 50 %,  $1 \times$  soluție Denhardt,  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  ARNt din drojdie, sulfat de dextran 10 %] conținând 20 ng (2 μl din reacția PCR pregătiți astfel cum se descrie la punctul 259 utilizând primerii Bo și Boas) din sonda marcată cu digoxigenină. Secțiunile sunt acoperite cu lamele de plastic pentru hibridare *in situ* și sunt așezate pe un bloc de încălzire la 95 °C timp de cinci minute. Lamele trebuie apoi răcite pe gheață timp de un minut înainte de hibridizarea la 42 °C timp de o noapte într-o etuvă umedă. Secțiunile se spală de două ori timp de cinci minute în  $2 \times$  SSC la temperatura camerei și o dată timp de 10 minute în  $0,4 \times$  SSC la 42 °C. Etapele de detectare se efectuează în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Lamele sunt apoi clătite în apă distilată sterilă (dH<sub>2</sub>O). Secțiunile sunt contracolorate cu Bismarck Brown Yellow și clătite în dH<sub>2</sub>O; se acoperă cu lamele, utilizând un mediu de montare apos.

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

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

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

**265.** În scopul supravegherii și confirmării prezenței infecției cu *Bonamia ostreae* sau al excluderii suspiciunii privind această boală, metodele de diagnostic și procedurile aferente care trebuie utilizate respectă orientările stabilite în tabelul 16 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice.

## **Capitolul VII**

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

#### **Secțiunea 1**

##### **Cerințe referitoare la programele de supraveghere și de eradicare în vederea obținerii și menținerii statutului sanitar „indemn de boală” în ceea ce privește boala petelor albe (*white spot disease* – „WSD”)**

**266.** Eșantionarea crustaceelor în vederea efectuării examenelor de laborator, în ceea ce privește WSD, precum și a prevenirii răspândirii infecției cu virusul sindromului petelor albe (WSSV), are loc atunci când este probabil ca temperatura apei să atingă cea mai înaltă valoare anuală. Această cerință privind temperatura apei se aplică de asemenea controlului, în cazul în care acestea sunt fezabile și oportune.

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

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

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

**268.** Dacă este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice, numărul și distribuția geografică a punctelor de prelevare sunt determinate astfel încât să se obțină o acoperire rezonabilă a zonei sau a compartimentului. Punctele de prelevare este de asemenea reprezentative pentru

diferitele ecosisteme în care se găsesc populațiile sălbatice din speciile sensibile, și anume zonele marine, estuarele, râurile și lacurile.

**269.** În cazul în care este necesară supravegherea individualizată a populațiilor sălbatice, crustaceele care fac obiectul eșantionării sunt selecționate după cum urmează:

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

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

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

**270.** Conform cerințelor specifice pentru obținerea statutului sanitar de categoria I în ceea ce privește WSD se prevede program de supravegere:

1) o zonă sau un compartiment cu statut sanitar de categoria III în ceea ce privește WSD poate obține statutul sanitar de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză respectă cerințele relevante, punctele în care se prelevează eșantioane de la populațiile sălbatice sunt supuse următorului program de supravegere cu durata de doi ani, care cuprinde controale sanitare și colectarea de eșantioane în vederea testării.

Fermele sau punctele de prelevare au făcut obiectul controlului și al eșantionării timp de o perioadă minimă de doi ani consecutivi, astfel cum se prevede în tabelul 17 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supravegere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice. În această perioadă de doi ani, testarea tuturor eșantioanelor prin utilizarea metodelor de

diagnostic stabilite, a avut rezultate negative în ceea ce privește infecția cu WSD și a fost exclusă orice suspiciune privind WSD.

2) în cazul în care, în timpul punerii în aplicare a programului de supraveghere menționat la subpunctul 1), este confirmată o infecție cu WSD într-o fermă inclusă în programul de supraveghere respectiv și, prin urmare, a fost retras statutul de categoria II al fermei, ferma respectivă poate să își recâștige imediat statutul de categoria II și să continue punerea în aplicare a programului de supraveghere pentru a obține statutul „indemn de boală” fără să pună în aplicare un program de eradicare, cu condiția că este o fermă al cărei statut în ceea ce privește WSD este independent de statutul al apelor naturale din vecinătate în ceea ce privește această boală listată, ferma a fost golită, curățată, dezinfectată și supusă unei perioade de vid sanitar; durata perioadei de vid sanitar este de cel puțin șase săptămâni și a fost repopulată cu crustacee provenind din zone sau din compartimente care au un statut de categoria I în ceea ce privește WSD.

**271.** O zonă sau un compartiment cu statut de categoria V în ceea ce privește WSD poate obține statutul de categoria I în ceea ce privește această boală listată, atunci când toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul în cauză au făcut obiectul unui program de eradicare.

**272.** Măsurile minime de control sunt aplicate în mod efectiv și o zonă de izolare, care include un perimetru de protecție și un perimetru de supraveghere, a fost instaurată în vecinătatea fermei (fermelor) declarate în mod oficial infectată (infectate) cu WSD.

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

**274.** Pentru stabilirea perimetrului de protecție și a celui de supraveghere este stabilit un perimetru de protecție în imediata vecinătate a fermei declarate în mod oficial infectată cu WSD și acest perimetru corespunde: în zone marine și în estuare: unei zone înscrise într-un cerc cu raza cel puțin egală cu o deplasare a mării sau de cel puțin 5 km, reținându-se valoarea cea mai mare dintre cele două, având ca centru ferma declarată în mod oficial infectată cu WSD, sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice

corespunzătoare; sau în apele dulci, întregului bazin hidrografic al fermei declarate în mod oficial infectată cu WSD. Agenția poate limita extinderea perimetrului de protecție la anumite părți ale bazinului hidrografic, cu condiția să nu se compromită prevenirea răspândirii WSD.

**275.** În afara perimetrului de protecție este stabilit un perimetru de supraveghere, perimetrul de supraveghere trebuind să corespundă: în zone marine: unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, a cărei zonă de deplasare a mării se suprapune cu zona de deplasare a mării corespunzătoare perimetrului de protecție; sau unei zone situate în jurul perimetrului de protecție, înscrisă într-un cerc cu raza de 10 km, calculată din centrul perimetrului de protecție; sau unei zone echivalente stabilite pe baza unor date hidrodinamice sau epidemiologice corespunzătoare; sau în apele dulci: unei zone situate în exteriorul perimetrului de protecție stabilit;

**276.** Toate fermele în care sunt ținute specii sensibile, care se află în perimetrul de protecție și care nu sunt declarate în mod oficial infectate cu WSD, sunt obiectul unei anchete oficiale care include cel puțin următoarele elemente: prelevarea de eșantioane pentru testarea a 10 crustacee, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu WSD, sau pentru testarea a 150 de crustacee, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*; și un control; în fermele pentru care testele au avut rezultate negative, controalele să continue o dată pe lună în timpul sezonului în care este probabil ca temperatura apei să atingă cele mai mari valori anuale, până când se renunță la perimetrul de protecție în conformitate cu punctul 277.

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

Atunci când se aplică o perioadă de vid sanitar pentru fermele declarate în mod oficial infectate, perimetrele de protecție este transformat în perimetre de supraveghere.

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



**279.** Toate fermele declarate în mod oficial infectate și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar, situate în interiorul perimetrelor de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu: crustacee provenind din zone sau din compartimente care au un statut de categoria I în ceea ce privește WSD; sau pentru o perioadă de tranziție, cu crustacee provenind din zone sau din compartimente cu un program de supraveghere a WSD aprobat.

**280.** Repopularea să aibă loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate cu WSD sunt golite, curățate, dezinfectate și au făcut obiectul unui vid sanitar în conformitate punctul 277;

**281.** Toate fermele care dețin specii sensibile din zona sau compartimentul care fac obiectul programului de eradicare precum și, în cazul în care este necesară supravegherea populațiilor sălbatice, punctele de prelevare sunt apoi obiectul programului de supraveghere prevăzut la punctul 270.

**282.** Un compartiment care cuprinde o singură fermă, care are statut de categoria I în ceea ce privește WSD, al cărui statut în ceea ce privește această boală listată este independent de cel al apelor naturale din vecinătate și al cărui statut de categoria I a fost retras, poate redobânda statutul de categoria I imediat ce Agenția a confirmat că sunt respectate următoarele condiții:

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

2) ferma infectată cu WSD este repopulată cu crustacee provenind din zone sau din compartimente care au un statut de categoria I în ceea ce privește WSD.

**283.** În cazul în care este necesară o supraveghere individualizată pentru menținerea statutului de categoria I, toate fermele care dețin specii sensibile enumerate în Capitolul VII din zona sau compartimentul în cauză și sunt supuse unui control și eșantionării, în conformitate cu tabelul 18 din Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice, ținând cont de nivelul riscului de contaminare a fermei cu WSD.

**284.** În zonele sau în compartimentele în care există un număr limitat de ferme, iar supravegherea individualizată a acestor ferme nu furnizează date epidemiologice suficiente, programele de supraveghere în vederea menținerii statutului „indemn de boală” includ puncte de prelevare selecționate în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 155. Dintre aceste punctele de prelevare, 50 % sunt obiectul inspecției și al prelevării de eșantioane în fiecare an, prin rotație. Eșantionarea se realizează în conformitate cu tabelul 18 din

Anexa la norma sanitar-veterinară privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice. Eșantioanele sunt selectate, pregătite și examinate în conformitate cu metodele de diagnostic și de eșantionare descrise în secțiunea 2, iar examenele de laborator să aibă rezultate negative în ceea ce privește agentul WSD.

**285.** Statutul „indemn de boală” se menține doar atât timp cât toate eșantioanele testate utilizând metodele de diagnostic și de eșantionare prevăzute la punctele 289-290, au rezultate negative pentru WSD și orice suspiciune privind WSD a fost exclusă, în conformitate cu ancheta oficială și cu metodele de diagnostic prevăzute la punctul 291.

**286.** O zonă sau un compartiment care are statutul de categoria V în ceea ce privește WSD poate obține statutul de categoria III cu condiția ca:

1) cerințele prevăzute la punctele 271-277, sunt îndeplinite. În cazul în care nu este posibil, din punct de vedere tehnic, să se instaureze vidul sanitar, fermele în cauză sunt obiectul unei măsuri alternative care să ofere garanții aproape identice în ceea ce privește eradicarea WSSV din mediul fermei;

2) toate fermele declarate în mod oficial infectate cu WSD și toate celelalte ferme care au făcut obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1), situate în perimetrele de protecție și de supraveghere stabilite, sunt repopulate cu crustacee provenind din zone sau din compartimente cu statut de categoria I, II sau III în ceea ce privește WSD;

3) repopularea are loc numai după ce toate fermele declarate în mod oficial infectate cu WSD sunt golite, curățate, dezinfectate și au fost obiectul unui vid sanitar sau al unor măsuri alternative în conformitate cu subpunctul 1);

4) să nu fi fost detectată WSD în cursul perioadei de doi ani care urmează finalizării măsurilor menționate la subpunctul 1) și 2) și sunt excluse suspiciunile în cursul acestei perioade în conformitate cu procedurile stabilite la punctul 291.

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

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

**289.** Metoda de diagnostic care trebuie utilizată pentru obținerea sau menținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește WSD este PCR în două etape.

**290.** În cazul în care prin PCR în două etape se obține un rezultat pozitiv, acesta este coroborat prin secvențierea produsului de amplificare, înainte de punerea în aplicare a primelor măsuri de combatere, dacă este posibil prin evidențierea semnelor patognomonice de WSD la gazdele sensibile selectate, utilizând examenul histologic și microscopia electronică prin transmisie.

**291.** În cazul în care trebuie confirmată sau exclusă prezența infecției cu WSD, sunt respectate următoarele proceduri în ceea ce privește inspecția, prelevarea de eșantioane și testarea:

1) ancheta oficială include cel puțin un control și o prelevare de eșantioane de la 10 crustacee, în cazul în care se observă semne clinice sau *post-mortem* compatibile cu infecția cu WSD, sau de la 150 de crustacee, în cazul în care nu se observă semne clinice sau *post-mortem*. Eșantioanele sunt testate utilizând metoda de diagnostic prevăzută la punctele 289-290. (PCR în două etape);

2) prezența WSD este considerată confirmată atunci când PCR în două etape urmată de secvențiere, are rezultate pozitive pentru WSSV și atunci când sunt prezente semne patognomonice de WSD la gazdele selectate.

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

## **Secțiunea a 2-a**

### **Metode și proceduri de diagnostic detaliate pentru supravegherea și confirmarea bolii petelor albe (*white spot disease* – WSD)**

**292.** În cazul în care se efectuează prelevări de eșantioane și examene de laborator în scopul programelor de supraveghere, și de și în scopul confirmării prezenței infecției cu WSSV sau al excluderii suspiciunii privind această boală, trebuie aplicate metodele și procedurile de diagnostic detaliate prevăzute la secțiunea dată.

Metodele și procedurile descrise în prezenta Secțiune sunt adaptate după testul acreditat pentru bolile crustaceelor. Pot fi folosite abordări alternative, utilizând condiții echivalente sau kituri fabricate de producători diferiți, dar care au o sensibilitate și o specificitate echivalente celor descrise în prezenta secțiune. În toate cazurile, produsul PCR de amplificare este secvențiat, pentru a confirma că este vorba despre virusul sindromului petelor albe (WSSV).

**293.** Țesuturile (pleopode și branhii) de la crustacee infectate cu WSSV pot fi păstrate în etanol, în RNA later sau pot fi congelate rapid la – 80 °C. Etapele necesare pentru identificarea WSSV utilizând eșantioane de țesuturi sunt următoarele: omogenizarea țesuturilor, extracția ADN-ului, amplificarea specifică a ADN-ului WSSV utilizând PCR, vizualizarea produsului amplificat

pe un gel, purificarea ADN-ului și secvențierea pentru confirmarea identității agentului patogen.

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

**295.** ADN-ul total este extras utilizând un set pentru extracția ADN-ului din țesuturi și EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen), conform instrucțiunilor producătorului. Fiecare lot de eșantioane este însoțit de un control al extracției (ADN din timus de vițel) și de un control negativ (tampon G2). ADN-ul este eluat într-un volum de 50 μl.

**296.** Pentru a se asigura că extracția s-a finalizat cu succes, se determină concentrația ADN-ului pentru toate eșantioanele și controalele, folosind un Nano Drop. ADN-ul extras este congelat la – 20 °C în cazul în care nu este necesar imediat.

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

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

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

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

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

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

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

**303.** Produsele PCR se precipită utilizând o metodă pe bază de acetat de sodiu, în cadrul căreia adăugăm 20 µl ADN la 10 µl NaAc, 70 µl H<sub>2</sub>O și 250 µl etanol; se agită și se centrifughează la 13 000 rpm timp de 20 de minute, se îndepărtează supernatantul și se spală precipitatul cu 200 µl de etanol absolut, centrifugat la 13 000 rpm timp de cinci minute. Precipitatul se usucă timp de cinci minute la 37 °C. Se adaugă la precipitat 25 µl de formamidă înalt deionizată, se încălzește la 95 °C timp de două minute și se agită bine. Eșantioanele sunt secvențiate cu analizorul ABI3130xl Avant Genetic, conform instrucțiunilor producătorului. Rezultatele secvențierii se analizează cu ajutorul software-ului Sequencher, iar secvențele se aliniază cu secvențele care se găsesc în baza de date NCBI folosind funcția BLAST.

Anexă  
la norma sanitar-veterinară privind  
cerințele de supraveghere  
și metodele de diagnostic a bolilor  
la animalele acvatice

*Tabelul nr.1*

**Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul  
perioadei de control de doi ani care precedă obținerea statutului  
„indemn de boală” în ceea ce privește SHV sau NHI**

Tipul de fermă	Numărul de controale sanitare pe an (doi ani)	Numărul de prelevări pe an (doi ani)	Numărul de pești per eșantion <sup>(1)</sup>	
			Numărul de pești în dezvoltare	Numărul de genitori <sup>(2)</sup>
a) Ferme care dețin genitori	2	2	50 (prima inspecție) 75 (a doua inspecție)	30 (prima sau a doua inspecție) 0 (prima sau a doua inspecție)
b) Ferme care dețin numai genitori	2	1	0	75 (prima sau a doua inspecție)
c) Ferme care nu dețin genitori	2	2	75 <sup>(3)</sup> (prima și a doua inspecție)	0
Numărul maxim de pești per eșantion general: 10				
<p><sup>(1)</sup> Eșantioanele sunt prelevate cel mai devreme la trei săptămâni după transferul peștilor din apă dulce în apă sărată.</p> <p><sup>(2)</sup> Lichidul ovarian sau seminal de la genitori este colectat în timpul maturării, cu ocazia ponteii artificiale (<i>stripping</i>).</p> <p><sup>(3)</sup> Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de pești care să garanteze detectarea VSHV sau a VNHI cu un nivel de încredere de 95 % dacă prevalența estimată este de 5 %.</p>				

*Tabelul nr.2*

**Programul de supraveghere, cu eșantion de dimensiuni reduse, pe parcursul  
perioadei de control de patru ani care precedă obținerea statutului  
„indemn de boală” în ceea ce privește SHV sau NHI**

Tipul de fermă	Numărul de controale sanitare pe an	Numărul de prelevări pe an	Numărul de pești per eșantion <sup>(4)</sup>	
			Numărul de pești în dezvoltare	Numărul de genitori <sup>(5)</sup>
<b>Primii doi ani ai perioadei de supraveghere</b>				
a) Ferme care dețin genitori	2	1	0 (prima inspecție) 30 (a doua inspecție)	0 (prima inspecție) 0 (a doua inspecție)
b) Ferme care dețin numai genitori	2	1	0	30 (prima sau a doua inspecție)
c) Ferme care nu dețin genitori	2	1	30 <sup>(6)</sup> (prima sau a doua inspecție)	0
<b>Ultimii doi ani ai perioadei de supraveghere</b>				
Ferme care dețin genitori	2	2	30 (prima inspecție) 0 (a doua inspecție)	0 (prima inspecție) 30 (a doua inspecție)
Ferme care dețin numai genitori	2	2		30 (prima și a doua inspecție)
Ferme care nu dețin genitori	2	2	30 <sup>(6)</sup> (prima și a doua inspecție)	
Numărul maxim de pești per eșantion general: 10				
<p><sup>(4)</sup> Eșantioanele sunt prelevate cel mai devreme la trei săptămâni după transferul peștilor din apă dulce în apă sărată.</p> <p><sup>(5)</sup> Lichidul ovarian sau seminal de la genitori este colectat în timpul maturării, cu ocazia ponteii artificiale (<i>stripping</i>).</p> <p><sup>(6)</sup> Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de pești care să garanteze detectarea VSHV sau a VNHI cu un nivel de încredere de 95 % dacă prevalența estimată este de 10 %.</p>				

Tabelul nr.3

**Programe de supraveghere a zonelor sau a compartimentelor  
în vederea menținerii statutului „indemn de boală”  
în ceea ce privește SHV sau NHI.**



<b>Nivelul de risc</b>	<b>Numărul de controale sanitare</b>	<b>Numărul de pești per eșantion <sup>(9)</sup></b>
Ridicat	2 pe an	30 <sup>(7)</sup> <sup>(8)</sup>
Mediu	1 pe an	30 <sup>(7)</sup>
Scăzut	1 la 2 ani	30 <sup>(7)</sup>
Numărul maxim de pești per eșantion general: 10		
<sup>(7)</sup> Eșantioanele sunt prelevate cel mai devreme la trei săptămâni după transferul peștilor din apă dulce în apă sărată. <sup>(8)</sup> Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de pești care să garanteze detectarea VSHV sau a VNHI cu un nivel de încredere de 95 % dacă prevalența estimată este de 10 %. <sup>(9)</sup> Pentru fiecare inspecție sanitară este prelevat cel puțin un eșantion.		

*Tabelul nr.4*

**Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul perioadei de control de doi ani care precedă obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD**

		<b>Numărul de controale clinice pe an (doi ani)</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an (doi ani)</b>	<b>Numărul de pești per eșantion</b>
<b>Ferme/situri de prelevare</b>	<b>Primii doi ani ai perioadei de supraveghere</b>	2	2	75 <sup>(10)</sup>
Numărul maxim de pești per eșantion general: 2				

*Tabelul nr.5*

**Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul perioadei de control de patru ani care precedă obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește KHVD**

		<b>Numărul de controale clinice pe</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an</b>	<b>Numărul de pești per eșantion</b>

		<b>an</b>		
<b>Ferme/situri de prelevare</b>	<b>Primii doi ani ai perioadei de supraveghere</b>	1	1	30
<b>Ferme/situri de prelevare</b>	<b>Ultimii doi ani ai perioadei de supraveghere</b>	2	2	30
Numărul maxim de pești per eșantion general: 2.				

*Tabelul nr.6*

**Programe de supraveghere a zonelor sau a compartimentelor  
în vederea menținerii statutului „indemn de boală”  
în ceea ce privește KHVD.**

<b>Nivelul de risc</b>	<b>Numărul de controale sanitare</b>	<b>Numărul de pești per eșantion</b>
Ridicat	2 pe an	30
Mediu	1 pe an	30
Scăzut	1 la 2 ani	30
Numărul maxim de pești per eșantion general: 2.		

*Tabelul nr.7*

**Program de supraveghere pentru menținerea statutului „indemn de boală”  
în ceea ce privește KHVD în zonele sau în compartimentele în care există un  
număr limitat de ferme, iar supravegherea individualizată a acestor ferme  
nu furnizează date epidemiologice suficiente.**

	<b>Numărul de controale clinice pe an</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an</b>	<b>Numărul de pești per eșantion</b>
<b>Puncte de prelevare</b>	1 la 2 ani	1 la 2 ani	30

Numărul maxim de pești per eșantion general: 2.

*Tabelul nr.8*

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

<b>Denumirea primerului</b>	<b>Secvența</b>	<b>Sucesiunea ciclurilor</b>	<b>Dimensiunea produsului</b>
CyHVpol-sens	5'- CCAGCAACATGTGCG ACGG-3'	<b>Prima fază PCR</b> <i>1 ciclu:</i> 95 °C timp de 2 minute <i>40 de cicluri:</i> 95 °C timp de 30 de secunde 55 °C timp de 30 de secunde 72 °C timp de 45 de secunde <i>1 ciclu:</i> 72 °C timp de 10 de minute	362 pb
CyHVpol-antisens	5'- CCGTARTGAGAGTTG GCGCA-3'		
CyHVpol-intern sens	5'- CGACGGVGGYATCAG CCC-3'	<b>A doua fază PCR</b> <i>1 ciclu:</i> 95 °C timp de 2 minute <i>40 de cicluri:</i> 95 °C timp de 30 de secunde 55 °C timp de 30 de secunde 72 °C timp de 45 de secunde <i>1 ciclu:</i> 72 °C timp de 10 de minute	339 pb
CyHVpol-intern antisens	5'- GAGTTGGCGCAYACY TTCATC-3'		

*Tabelul nr.9*

**Programul de supraveghere a zonelor și a compartimentelor pe parcursul perioadei de control de doi ani care precedă obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește AIS.**

<b>An de supraveghere</b>	<b>Numărul de controale sanitare pe an (doi ani)</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an (doi ani)</b>	<b>Numărul de pești de la care trebuie să se colecteze eșantioane, pe an</b>
Anul 1	6	2 <sup>(12)</sup>	2 * 75 <sup>(13)</sup>
Anul 2	6	2 <sup>(12)</sup>	2 * 75 <sup>(13)</sup>
<p><sup>(12)</sup> Eșantioanele trebuie să fie prelevate, depozitate și examinate în decursul a două perioade de testare per an, fiecare perioadă având durata de o lună (primăvara și toamna), sau atunci când este cazul, în funcție de considerațiile de ordin practic.</p> <p><sup>(13)</sup> Numărul maxim de pești per eșantion general: 5.</p>			

*Tabelul nr.10*

**Programe de supraveghere a zonelor sau a compartimentelor în vederea menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește AIS <sup>(15)</sup>.**

<b>Nivelul de risc</b>	<b>Numărul de controale sanitare pe an</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an</b>	<b>Numărul de pești de la care trebuie să se colecteze eșantioane, pe an</b>
Ridicat	2	2 <sup>(14)</sup>	2 * 30
Mediu	1	1 <sup>(14)</sup>	30
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 2 an	30 la 2 ani

(<sup>14</sup>) Eșantioanele sunt prelevate și examinate în decursul a două perioade de testare per an, fiecare perioadă având durata de o lună (primăvara și toamna), sau atunci când este cazul, în funcție de considerațiile de ordin practic.

(<sup>15</sup>) Nu se aplică fermelor în care sunt crescuți doar păstrăvi-curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) sau păstrăvi comuni (*Salmo trutta*) sau ambele specii și a căror aprovizionare cu apă se bazează exclusiv pe surse de apă dulce în care nu există somon de Atlantic (*Salmo salar*).

*Tabelul nr.11*

**Programul de supraveghere pentru zonele sau compartimentele pe parcursul perioadei de control care precedă obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*.**

	<b>Numărul de controale sanitare pe an</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an</b>	<b>Numărul de moluște per eșantion</b>
<b>Ferme/zone de cultură a moluștelor</b>	1	1	150

*Tabelul nr.12*

**Programe de supraveghere pentru zonele sau compartimentele în vederea menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Marteilia refringens*.**

<b>Nivelul de risc</b>	<b>Numărul de controale sanitare</b>	<b>Numărul examenelor de laborator</b>	<b>Numărul de moluște per eșantion</b>
Ridicat	1 pe an	1 la 2 ani	150
Mediu	1 la 2 ani	1 la 2 ani	150
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 4 ani	150

*Tabelul nr.13*

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

<b>Metodă</b>	<b>Supraveghere individualizată</b>	<b>Diagnostic prezumtiv</b>	<b>Confirmarea diagnosticului</b>
Amprente ale glandei digestive	X	X	X sau
Histopatologie	X		X sau
Hibridare <i>in situ</i>			X și
PCR	X	X	X și
Secvențiere			X

*Tabelul nr.14*

**Programul de supraveghere pentru zone sau compartimente pe parcursul perioadei de control, care precedă obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae***

	<b>Numărul de controale sanitare pe an</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an</b>	<b>Numărul de moluște per eșantion</b>
<b>Ferme/zone de cultură a moluștelor</b>	1	1	150

*Tabelul nr.15*

**Programe de supraveghere pentru zone sau compartimente în vederea menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește infecția cu *Bonamia ostreae*.**

<b>Nivelul de risc</b>	<b>Numărul de controale sanitare</b>	<b>Numărul examenelor de laborator</b>	<b>Numărul de moluște per eșantion</b>
------------------------	--------------------------------------	--	--

Ridicat	1 pe an	1 la 2 ani	150
Mediu	1 la 2 ani	1 la 2 ani	150
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 4 ani	150

*Tabelul nr.16*

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

<b>Metodă</b>	<b>Supraveghere individualizată</b>	<b>Diagnostic prezumtiv</b>	<b>Confirmarea diagnosticului</b>
Amprente de la inimă sau branhii	X	X	X sau
Histopatologie	X		X sau
Hibridare <i>in situ</i>			X și
PCR	X	X	X și
Secvențiere			X

*Tabelul nr.17*

**Programul de supraveghere pentru zonele și compartimente pe parcursul perioadei de control de doi ani care precedă obținerea statutului „indemn de boală” în ceea ce privește WSD**

	<b>Numărul de controale clinice pe an</b>	<b>Numărul de examene de laborator pe an</b>	<b>Numărul de crustacee per eșantion</b>
<b>Ferme/situri de prelevare</b>	1	1	150

*Tabelul nr.18*

**Programe de supraveghere pentru zonele sau compartimentele în vederea menținerii statutului „indemn de boală” în ceea ce privește WSD.**

<b>Nivelul de risc</b>	<b>Numărul de controale sanitare</b>	<b>Numărul examenelor de laborator</b>	<b>Numărul de crustacee per eșantion</b>
Ridicat	1 pe an	1 la 2 ani	150
Mediu	1 la 2 ani	1 la 2 ani	150
Scăzut	1 la 2 ani	1 la 4 ani	150



## Nota informativă

**la proiectul Hotărârii Guvernului cu privire la aprobarea normei sanitar-veterinare privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice ( număr unic 698/MADRM/2019 )**

### ***1. Denumirea autorului și, după caz, a participanților la elaborarea proiectului***

Proiectul Hotărârii Guvernului privind aprobarea normei sanitar-veterinare privind cerințele de supraveghere și metodele de diagnostic a bolilor la animalele acvatice este elaborat de către Ministerul Agriculturii, Dezvoltării Regionale și Mediului

### ***2. Condițiile ce au impus elaborarea proiectului de act normativ și finalitățile urmărite***

Proiectul Hotărârii de Guvern nominalizat este elaborat în temeiul art. 28 și 29 din Legea nr. 221/2007 privind activitatea sanitar-veterinară și vine întru executarea Hotărârii Guvernului nr.636 din 11 decembrie 2019 cu privire la aprobarea Planului național de acțiuni al Guvernului pentru anii 2020-2023 și a Planul Național de Acțiuni pentru implementarea Acordului de Asociere pentru perioada 2017 – 2019, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 1472 din 28.12.2016.

### ***3. Descrierea gradului de compatibilitate pentru proiectele care au ca scop armonizarea legislației naționale cu legislația Uniunii Europene***

Prezentul proiect este compatibil cu prevederile Deciziei Comisiei 2015/1554 de stabilire a unor norme pentru aplicarea Directivei 2006/88/CE în ceea ce privește cerințele referitoare la supraveghere și la metodele de diagnostic, publicată în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L 247/1 din 23 septembrie 2015., în acest sens a fost întocmit tabelul de concordanță în care se analizează comparativ gradul de transpunere a actului Uniunii Europene în legislația națională.

### ***4. Principalele prevederi ale proiectului și evidențierea elementelor noi***

Elaborarea prezentului act normativ este impusă de necesitatea completării legislației în vigoare cu prevederi ce stabilesc norme de supraveghere care trebuie aplicate în caz de suspiciune sau de confirmare a unor boli la animalele acvatice și metodele de diagnostic care trebuie utilizate pentru examenele de laborator în caz de suspiciune sau de confirmare a prezenței unor boli la animalele acvatice.

### ***5. Fundamentarea economico-financiară***

Implementarea prevederilor proiectului nu presupune cheltuieli suplimentare de la bugetul de stat, îndeplinirea acestora este argumentată economico-financiar, anual, de către Agenția Națională pentru Siguranța Alimentelor.

Toate cheltuielile ce vor surveni în urma implementării proiectului dat, urmează a fi suportate în limita mijloacelor bugetare aprobate pentru aceste scopuri, în strictă conformitate cu legislația în vigoare.

### ***6. Modul de încorporare a actului în cadrul normativ în vigoare***

Prevederile prezentului proiect reprezintă un instrument de punere în aplicare a Legii nr.221/2007 privind activitatea sanitar-veterinară, totodată cadrul

normativ național va fi adus în concordanță cu legislația Uniunii Europene în ceea ce privește domeniul sanitar-veterinar.

**7. Avizarea și consultarea publică a proiectului**

Proiectul a fost supus avizării și consultării publice conform art. 32 din Legea 100/2017 cu privire la actele normative, fiind plasat pe pagina web a Ministerului Agriculturii, Dezvoltării Regionale și Mediului [www.madrm.gov.md](http://www.madrm.gov.md) la compartimentul Transparență decizională / Proiecte de documente, obiecțiile și recomandările fiind luate în considerație la definitivarea proiectului.

**8. Constatările expertizei anticorupție**

Proiectul a fost supus expertizei anticorupție de către Centrul National Anticorupție conform art. 35 din Legea 100/2017, care a constatat că nu au fost identificați careva factori și riscuri de corupție.

**9. Constatările expertizei de compatibilitate**

Prezentul proiect a fost supus expertizei de compatibilitate și conform concluziilor Centrului de Armonizare a Legislației acesta și-a atins finalitatea propusă, asigurând implementarea în modul corespunzător a Deciziei de punere în aplicare (UE) 2015/1554 a Comisiei din 11 septembrie 2015 de stabilire a unor norme pentru aplicarea Directivei 2006/88/CE în ceea ce privește cerințele referitoare la supraveghere și la metodele de diagnostic.

**10. Constatările expertizei juridice**

Proiectul a fost supus expertizei juridice de către Ministerul Justiției conform art. 37 din Legea 100/2017 obiecțiile și recomandările fiind luate în considerație la definitivarea proiectului.

**11. Alte expertize**

Proiectul conține prevederi ce reglementează activitatea de întreprinzător în contextul Legii nr. 235/2006, astfel a fost elaborată Analiza Impactului și supusă expertizei la Grupul de Lucru al Cancelariei de Stat fiind susținută cu luarea în considerație a obiecțiilor și recomandărilor expuse în opinie.

Ministru



Ion PERJU