

II

(Atti non legislativi)

DECISIONI

DECISIONE DI ESECUZIONE (UE) 2015/1554 DELLA COMMISSIONE

dell'11 settembre 2015

recante modalità di applicazione della direttiva 2006/88/CE per quanto riguarda le prescrizioni in materia di sorveglianza e di metodi diagnostici*[notificata con il numero C(2015) 6188]***(Testo rilevante ai fini del SEE)**

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

vista la direttiva 2006/88/CE del Consiglio, del 24 ottobre 2006, relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 49, paragrafo 3, l'articolo 50, paragrafo 4, l'articolo 57, lettera b), e l'articolo 61, paragrafo 3,

considerando quanto segue:

- (1) La direttiva 2006/88/CE stabilisce le misure preventive minime per la sorveglianza e la tempestiva individuazione negli animali acquatici delle malattie comprese nell'elenco contenuto nell'allegato IV di detta direttiva («le malattie elencate») e le misure di lotta da applicarsi in caso di presenza sospetta o confermata di un focolaio delle malattie elencate. Essa stabilisce altresì le prescrizioni da rispettare affinché gli Stati membri o loro zone o compartimenti ottengano lo status di indenne da malattia.
- (2) L'eradicazione delle malattie elencate e l'ottenimento da parte di uno Stato membro o una sua zona o un suo compartimento dello status di indenne da malattia dovrebbero fondarsi su identici principi e applicare l'identico approccio scientifico in tutta l'Unione. Per tale motivo è opportuno stabilire a livello dell'Unione prescrizioni specifiche relative ai programmi di eradicazione e di sorveglianza, come anche ai metodi di campionamento e diagnostici che gli Stati membri devono usare affinché l'intero territorio di uno Stato membro o una sua zona o un suo compartimento ottenga lo status di indenne da malattia.
- (3) Gli esami di laboratorio da effettuare in caso di presenza sospetta o confermata delle malattie elencate dovrebbero essere identici a livello dell'Unione e rispettare standard e protocolli scientifici identici. In conformità alla direttiva 2006/88/CE è opportuno stabilire specifici metodi e procedure diagnostici che devono essere usati dai laboratori a tal fine designati dall'autorità competente di ogni Stato membro.
- (4) Il codice sanitario per gli animali acquatici adottato dall'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE) (nel prosieguo il «codice acquatico») stabilisce standard globali per il miglioramento della salute degli animali acquatici e del benessere dei pesci di allevamento, tra i quali figurano gli standard per la sicurezza del commercio internazionale degli animali acquatici e dei prodotti da essi ottenuti. Diversi capitoli del codice acquatico espongono raccomandazioni relative all'uso di determinate prove diagnostiche. Tali prove, previste dall'OIE, sono stabilite nel manuale di diagnosi delle malattie degli animali acquatici dell'OIE (nel prosieguo il «manuale acquatico»). Al fine di garantire che le prescrizioni dell'Unione in materia di diagnosi delle malattie degli animali acquatici siano coerenti con gli standard internazionali, le norme stabilite nella presente decisione dovrebbero tenere conto degli standard e delle raccomandazioni del codice acquatico.

⁽¹⁾ GUL 328 del 24.11.2006, pag. 14.

- (5) A tale riguardo il manuale acquatico elenca per molte delle malattie elencate diverse prove e procedure da usare per gli esami di laboratorio. Al fine di uniformare a livello dell'Unione la base scientifica dell'attività diagnostica per le malattie elencate è opportuno scegliere tra le prove e le procedure diagnostiche raccomandate dall'OIE e specificare quali di esse dovrebbero essere obbligatorie per gli esami di laboratorio da eseguire nel corso di programmi di sorveglianza e per escludere o confermare il sospetto della presenza di una delle malattie elencate. Per quanto in alcuni casi permanga la necessità di poter utilizzare metodi e procedure alternativi, sarebbe comunque opportuno fornire le descrizioni ed alcune spiegazioni scientifiche concernenti i casi in cui potrebbero essere applicati metodi alternativi e le relative modalità. Ciò è necessario in particolare per le procedure diagnostiche più particolareggiate.
- (6) Al fine di produrre risultati diagnostici precisi e riproducibili è importante che le procedure e i protocolli particolareggiati da usare siano convalidati in conformità alle pertinenti norme di qualità di cui alla direttiva 2006/88/CE, allegato VI, parte I. Per molti dei metodi diagnostici stabiliti nella presente decisione l'uso di kit per le analisi disponibili in commercio è parte essenziale dei protocolli diagnostici e tali kit sono stati convalidati mediante prove accreditate dai laboratori europei di riferimento (EURL) per le malattie corrispondenti. Ai fini della certezza del diritto è opportuno indicare nella presente decisione i nomi commerciali di tali kit per le analisi convalidati disponibili in commercio.
- (7) Può risultare difficile a determinati Stati membri conseguire lo status di indenne da malattia per il loro intero territorio o per una loro zona o un compartimento in rapporto ad una o più malattie elencate. In tali casi lo Stato membro può scegliere di non ottenere o non riottenere lo status di indenne da dette malattie elencate. Le misure minime di lotta da applicare qualora lo Stato membro interessato non intenda ottenere o riottenere lo status di indenne da malattia dovrebbero essere identiche a livello dell'Unione e rispettare identici criteri. È quindi opportuno, in conformità alla direttiva 2006/88/CE, stabilire norme particolareggiate per il contenimento di dette malattie elencate, nonché le condizioni minime da soddisfare per la revoca di dette misure di contenimento.
- (8) La decisione 2001/183/CE della Commissione ⁽¹⁾ stabilisce le prescrizioni relative ai piani di campionamento e ai metodi diagnostici per individuare e confermare la necrosi ematopoietica infettiva e la setticemia emorragica virale comprese nell'elenco. La decisione 2003/466/CE della Commissione ⁽²⁾ reca criteri relativi ai piani di campionamento e ai metodi diagnostici per individuare la presenza dell'anemia infettiva dei salmoni, oltre ai criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale da attuare in caso di presenza sospetta o confermata di tale malattia. La decisione 2002/878/CE della Commissione ⁽³⁾ stabilisce le prescrizioni relative ai piani di campionamento e ai metodi diagnostici per individuare e confermare la presenza delle malattie dei molluschi bonamiosi e marteiliosi. Al fine di aggiornare le prescrizioni citate, dette tre decisioni dovrebbero essere sostituite dalla presente decisione. Di conseguenza la decisione 2001/183/CE, la decisione 2002/878/CE e la decisione 2003/466/CE dovrebbero essere abrogate.
- (9) Dato che alcuni Stati membri hanno bisogno di tempo affinché i loro laboratori nazionali di riferimento si aggiornino in modo da conformarsi alle prescrizioni stabilite nella presente decisione, è opportuno che essa si applichi a decorrere dal 1° aprile 2016.
- (10) Le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato permanente per le piante, gli animali, gli alimenti e i mangimi,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

Oggetto

La presente decisione stabilisce norme riguardanti:

- a) la sorveglianza, le zone cuscinetto, i metodi di campionamento e diagnostici che devono essere usati dagli Stati membri per definire lo stato sanitario degli Stati membri o di loro zone o compartimenti relativamente alle malattie non esotiche di animali acquatici comprese nell'elenco di cui all'allegato IV, parte II, della decisione 2006/88/CE (le «malattie elencate»);

⁽¹⁾ Decisione 2001/183/CE della Commissione, del 22 febbraio 2001, che stabilisce i piani di campionamento e i metodi diagnostici per individuare e confermare alcune malattie dei pesci e che abroga la decisione 92/532/CEE (GU L 67 del 9.3.2001, pag. 65).

⁽²⁾ Decisione 2003/466/CE della Commissione, del 13 giugno 2003, recante criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale da attuare in caso di sospetto o conferma della presenza di anemia infettiva dei salmoni (ISA) (GU L 156 del 25.6.2003, pag. 61).

⁽³⁾ Decisione 2002/878/CE della Commissione, del 6 novembre 2002, che stabilisce i piani di campionamento e i metodi diagnostici per individuare e confermare la presenza delle malattie dei molluschi bonamiosi (*Bonamia ostreae*) e marteiliosi (*Marteilia refringens*) (GU L 305 del 7.11.2002, pag. 57).

- b) i metodi diagnostici da usare per gli esami di laboratorio in caso di presenza sospetta o confermata delle malattie elencate; e
- c) le misure minime di lotta da applicare in caso di presenza sospetta o confermata di una malattia elencata in uno Stato membro, o in una sua zona o in un suo compartimento, non dichiarato indenne da tale malattia elencata.

Articolo 2

Definizioni

Ai fini della presente decisione si intende per:

- a) «setticemia emorragica virale» («VHS»): malattia causata dal virus della setticemia emorragica virale (VHSV), noto anche come virus Egtved, appartenente al genere *Novirhabdovirus*, famiglia *Rhabdoviridae*;
- b) «necrosi ematopoietica infettiva» («IHN»): malattia causata dal virus della necrosi ematopoietica infettiva (IHNV), appartenente al genere *Novirhabdovirus*, famiglia *Rhabdoviridae*;
- c) «herpesvirus della carpa koi» («KHVD»): malattia causata dall'herpesvirus della carpa koi (KHV), appartenente alla famiglia *Alloherpesviridae*. Il nome scientifico è herpesvirus dei ciprinidi 3(CyHV-3);
- d) «anemia infettiva del salmone» («ISA»): malattia causata dall'infezione da virus dell'anemia infettiva del salmone (ISAV) con delezione a livello di HPR (highly polymorphic region), appartenente al genere *Isavirus*, famiglia *Orthomyxoviridae*;
- e) «infezione da *Marteilia refringens*»: malattia causata da infezione dal protozoo del phylum Paramixea *Marteilia refringens*;
- f) «infezione da *Bonamia ostreae*»: malattia causata da infezione dal protozoo del phylum Haplosporidia *Bonamia ostreae*;
- g) «malattia dei punti bianchi» («WSD»): malattia causata dal causata dal virus della White Spot Syndrome (sindrome dei punti bianchi — WSSV), virus a DNA a doppia elica del genere *Whispovirus*, famiglia *Nimaviridae*.

Articolo 3

Prescrizioni minime in materia di programmi di eradicazione e di sorveglianza

Gli Stati membri garantiscono il rispetto delle norme in materia di programmi di eradicazione e di sorveglianza, di zone cuscinetto, di metodi di campionamento e diagnostici di cui all'allegato I, nonché degli specifici metodi e procedure particolareggiate di cui all'allegato II, ai fini della dichiarazione, revoca o ripristino dello status di indenne, da una o più malattie elencate, di uno Stato membro o una sua zona o un suo compartimento.

Articolo 4

Prescrizioni minime in materia di metodi diagnostici e procedure specifiche

Gli Stati membri garantiscono il rispetto dei metodi di controllo di cui all'allegato I e degli specifici metodi diagnostici e procedure particolareggiate di cui all'allegato II quando si effettuano esami di laboratorio allo scopo di confermare o escludere la presenza di una malattia elencata.

Articolo 5

Misure minime di lotta per il contenimento delle malattie elencate e condizioni minime da soddisfare per la revoca delle misure di contenimento in Stati membri, o loro zone o compartimenti, non dichiarati indenni dalle malattie elencate

Gli Stati membri garantiscono il rispetto delle misure minime di lotta e delle condizioni minime per la revoca delle misure di contenimento di cui all'allegato I quando vengono applicate misure di lotta o vengono revocate misure di contenimento di una o più malattie elencate in uno Stato membro o in una sua zona o un suo compartimento non dichiarato indenne da tali malattie elencate.

*Articolo 6***Abrogazioni**

La decisione 2001/183/CE, la decisione 2002/878/CE e la decisione 2003/466/CE sono abrogate.

*Articolo 7***Data di applicazione**

La presente decisione si applica a decorrere dal 1° aprile 2016.

*Articolo 8***Destinatari**

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, l'11 settembre 2015

Per la Commissione
Vytenis ANDRIUKAITIS
Membro della Commissione

ALLEGATO I

SORVEGLIANZA E METODI DI LOTTA

I. Introduzione

Il presente allegato stabilisce:

- a) le prescrizioni in materia di programmi di eradicazione e sorveglianza, a norma dell'articolo 44 della direttiva 2006/88/CE, e di metodi di campionamento e diagnostici da usare per dichiarare lo status di indenne da malattie degli Stati membri, o loro zone o compartimenti, come previsto al capo VII di detta direttiva;
- b) i metodi di campionamento e diagnostici da usare per gli esami di laboratorio in caso di sospetta o confermata presenza delle malattie non esotiche elencate all'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE (le «malattie elencate»), come previsto all'articolo 28, lettera a), e articolo 57, lettera b), di detta direttiva;
- c) le misure di contenimento da adottare qualora sia confermata la presenza di una malattia elencata, come previsto all'articolo 39 della direttiva 2006/88/CE, e le misure da adottare affinché uno Stato membro, o una sua zona o compartimento con stato sanitario di categoria V possa ottenere uno stato sanitario di categoria III.

Le prescrizioni del presente allegato riguardano le seguenti malattie elencate:

1.	Setticemia emorragica virale (VHS)	Parte 1
2.	Necrosi ematopoietica infettiva (IHN)	Parte 1
3.	Herpesvirus della carpa koi (KHV)	Parte 2
4.	Anemia infettiva del salmone (ISA)	Parte 3
5.	Infezione da <i>Marteilia refringens</i>	Parte 4
6.	Infezione da <i>Bonamia ostreae</i>	Parte 5
7.	Malattia dei punti bianchi (WSD)	Parte 6

II. Definizioni

Ai fini del presente allegato si intende per:

- a) «compartimento continentale»: una o più aziende situate nella parte continentale di uno o più Stati membri, che rientrano in un sistema comune di biosicurezza e contengono una popolazione di animali acquatici con uno specifico stato sanitario in relazione ad una determinata malattia;
- b) «azienda continentale»: un'azienda che detiene animali d'acquacoltura situata nella parte continentale del territorio di uno Stato membro;
- c) «zona continentale»: una precisa area geografica, situata nella parte continentale del territorio di uno o più Stati membri caratterizzata da un sistema idrologico omogeneo comprendente parti di un bacino idrografico incluse tra le sorgenti e una barriera naturale o artificiale che impedisca la migrazione a ritroso degli animali acquatici dai tratti inferiori del bacino, o un intero bacino idrografico dalle sorgenti all'estuario, oppure più di un bacino, inclusi i loro estuari a causa del legame epidemiologico tra i diversi bacini idrografici attraverso l'estuario;

- d) «azienda ufficialmente dichiarata infetta»: un'azienda che detiene animali acquatici e nella quale l'autorità competente ha confermato la presenza di una o più malattie elencate in conformità all'articolo 28, lettera a), all'articolo 29 e all'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE.
- e) «azienda di contatto»: un'azienda che detiene animali acquatici per la quale, in qualsiasi modo, è stata dimostrata, o esiste il forte sospetto, di contaminazione da materiali infettivi provenienti da un'azienda ufficialmente dichiarata infetta.

PARTE 1

SORVEGLIANZA E METODI DI LOTTA CONTRO LA SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (VHS) E LA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (IHN)

I. Prescrizioni in materia di programmi di sorveglianza e di eradicazione per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da VHS e IHN e misure di contenimento di tali malattie elencate

I.1. Prescrizioni generali per le ispezioni sanitarie e il campionamento in relazione a VHS e IHN:

- a) le ispezioni sanitarie e, se del caso, il campionamento sono effettuati nel periodo dell'anno in cui la temperatura dell'acqua è inferiore a 14 °C o quando è probabile che la temperatura dell'acqua raggiunga i valori minimi dell'anno;
- b) se è prescritta una sorveglianza mirata delle popolazioni selvatiche a norma dell'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, della direttiva 2006/88/CE, il numero e la distribuzione geografica dei punti di campionamento sono determinati in modo da ottenere una copertura ragionevole dello Stato membro o della sua zona o del suo compartimento. I punti di campionamento devono essere rappresentativi dei diversi ecosistemi nei quali si trovano le popolazioni selvatiche delle specie sensibili;
- c) se aziende o popolazioni selvatiche devono essere sottoposte a ispezioni sanitarie o a campionamento più di una volta all'anno, gli intervalli tra le ispezioni sanitarie e tra i prelievi di campioni sono almeno di quattro mesi e prolungati il più possibile tenuto conto delle prescrizioni relative alla temperatura di cui al punto a);
- d) tutte le unità di produzione, quali stagni, vasche e gabbie, sono soggette a ispezioni sanitarie per rilevare la presenza di pesci morti, deboli o dal comportamento anomalo. Vanno controllate con particolare attenzione le zone in prossimità delle griglie di scarico, dove i soggetti deboli tendono ad accumularsi spinti dalla corrente;
- e) i pesci delle specie sensibili da sottoporre a campionamento vengono così selezionati:
 - i) se sono presenti trote iridee, sono selezionati per il campionamento solo pesci di tale specie, tranne qualora siano presenti altre specie sensibili che mostrano i sintomi tipici della VHS o dell'IHN; se non sono presenti trote iridee, i campioni devono essere rappresentativi di tutte le altre specie sensibili presenti;
 - ii) se sono presenti soggetti deboli, che presentano un comportamento anomalo o sono morti recentemente ma non in stato di decomposizione, sono selezionati tali soggetti; se per l'allevamento è utilizzata acqua proveniente da diverse fonti, devono essere inclusi nel campione pesci che rappresentino tutte le fonti;
 - iii) i pesci selezionati devono comprendere soggetti raccolti in modo da assicurare che siano rappresentate in proporzione tutte le zone dell'azienda e tutte le classi di età.

I.2. Prescrizioni specifiche per il riconoscimento dello status di indenne da VHS e IHN (stato sanitario di categoria I)

I.2.1. Programmi di sorveglianza:

- a) uno Stato membro, una sua zona o suo compartimento, di stato sanitario di categoria III di cui all'allegato III, parte B, della direttiva 2006/88/CE, relativamente a VHS o IHN o entrambe, può ottenere lo stato sanitario di categoria I in relazione a tali malattie elencate a condizione che tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, di detta direttiva, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, risultino conformi alle prescrizioni di cui all'allegato V di detta direttiva e che tutte le aziende, nonché, se prescritto dall'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma di detta direttiva, tutti i punti di campionamento di popolazioni selvatiche selezionati in conformità a tale parte, siano stati sottoposti ad uno dei seguenti programmi di sorveglianza:

i) modello A — programma di sorveglianza biennale:

le aziende o i punti di campionamento devono essere stati sottoposti a ispezioni sanitarie, con prelievo di campioni, per un periodo minimo di due anni consecutivi come indicato alla tabella 1.A della sezione II.

Durante detto periodo di due anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per VHS o IHN o entrambe e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di VHS o IHN o entrambe applicando i metodi di campionamento e diagnostici di cui al punto II.3;

ii) modello B — programma di sorveglianza quadriennale con campione di dimensioni ridotte:

le aziende o i punti di campionamento devono essere stati sottoposti a ispezioni sanitarie, con prelievo di campioni, per un periodo minimo di quattro anni consecutivi come indicato alla tabella 1.B della sezione II.

Durante detto periodo di quattro anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per VHS o IHN o entrambe e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di VHS o IHN o entrambe applicando i metodi di campionamento e diagnostici di cui al punto II.3;

b) se, durante l'attuazione del programma di sorveglianza di cui al punto a), viene confermata l'infezione da VHS o IHN o entrambe in un'azienda inclusa in detto programma di sorveglianza, e pertanto le viene revocato lo stato sanitario di categoria II, tale azienda può riottenere immediatamente il proprio stato sanitario di categoria II e continuare ad attuare il programma di sorveglianza per ottenere il riconoscimento dello status di indenne da malattia senza attuare un programma di eradicazione di cui al punto I.2.2, purché rispetti le seguenti condizioni:

i) è un'azienda continentale il cui stato sanitario in relazione a VHS o IHN o entrambe è indipendente dallo stato sanitario delle popolazioni di animali acquatici nelle acque naturali circostanti relativamente a tali malattie elencate, come da allegato V, parte II, punto 3, della direttiva 2006/88/CE;

ii) è stata svuotata, pulita, disinfettata e sottoposta al fermo degli impianti; la durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei settimane;

iii) è stata ripopolata con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente a VHS, IHN o entrambe.

I.2.2. Programmi di eradicazione

I.2.2.1. Prescrizioni generali

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria V relativamente a VHS o IHN o entrambe, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tali malattie elencate a condizione che tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, siano state sottoposte ad un programma di eradicazione conforme ai punti da a) a e):

a) le misure minime di lotta stabilite al capo V, sezione 4, della direttiva 2006/88/CE devono essere state effettivamente applicate e deve essere stata stabilita una zona di protezione, come previsto dall'articolo 32, lettera b), di detta direttiva, che comprenda una zona riservata alla protezione e una zona di sorveglianza, in prossimità delle aziende ufficialmente dichiarate infette da VHS o IHN o entrambe tali malattie elencate.

La zona di protezione deve essere stata definita in base ad un'analisi caso per caso, tenendo presenti i fattori agenti sul rischio di diffusione della malattia elencata agli animali d'allevamento e selvatici, quali: il numero di morti, il tasso e la distribuzione della mortalità degli animali nelle aziende infette da VHS o IHN o entrambe; la distanza delle aziende vicine e la loro densità; la prossimità a macelli; le aziende di contatto; le specie presenti nelle aziende; le pratiche di allevamento applicate nelle aziende infette e nelle aziende limitrofe; le condizioni idrodinamiche ed altri fattori di rilevanza epidemiologica individuati.

Per l'istituzione delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza si applicano le seguenti prescrizioni minime per quanto riguarda la delimitazione geografica:

- i) deve essere istituita una zona riservata alla protezione nelle immediate vicinanze di un'azienda ufficialmente dichiarata infetta da VHS o IHN o entrambe tali malattie elencate che deve corrispondere a:
 - 1) nelle zone costiere: una zona circolare con un raggio pari almeno ad un'escursione di marea oppure ad almeno 5 km se questa misura è superiore, intorno all'azienda ufficialmente dichiarata infetta da VHS o IHN o entrambe, oppure un'area equivalente determinata in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica;
 - 2) nelle zone interne: l'intero bacino idrografico dell'azienda ufficialmente dichiarata infetta da VHS o IHN o entrambe; l'autorità competente può limitare l'estensione della zona a parti del bacino idrografico o all'area dell'azienda, a condizione che non sia compromessa la prevenzione della diffusione di VHS o IHN o entrambe;
 - ii) una zona di sorveglianza deve essere istituita dall'autorità competente all'esterno della zona riservata alla protezione e deve corrispondere:
 - 1) nelle zone costiere: a una zona, circostante la zona riservata alla protezione, in cui le escursioni di marea si sovrappongono; oppure a una zona circolare, circostante la zona riservata alla protezione, del raggio di dieci km dal centro della zona riservata alla protezione; oppure a un'area equivalente determinata in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica;
 - 2) nelle zone interne: a una zona più ampia intorno alla zona riservata alla protezione istituita;
 - b) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, all'interno della zona riservata alla protezione non dichiarate ufficialmente infette da VHS o IHN o entrambe, devono essere sottoposte ad un'indagine ufficiale che comprenda almeno gli elementi seguenti:
 - i) la raccolta di campioni da sottoporre a prova di 10 pesci, se sono stati riscontrati sintomi clinici o sintomi *post-mortem* compatibili con un'infezione da VHS o IHN o entrambe, o di almeno 30 pesci, se non sono stati riscontrati sintomi clinici o sintomi *post-mortem* di tale genere;
 - ii) un controllo sanitario: nelle aziende nelle quali gli esami di cui al punto i) hanno prodotto risultati negativi; le ispezioni sanitarie devono proseguire una volta al mese durante il periodo in cui la temperatura dell'acqua è inferiore a 14 °C, tranne quando gli stagni e le gabbie sono coperti di ghiaccio, fino a che la zona riservata alla protezione sia stata revocata in conformità al punto I.2.2.1, lettera c);
 - c) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da VHS o IHN o entrambe devono essere state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti. La durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei settimane. Dopo che tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette all'interno di una stessa zona riservata alla protezione siano state svuotate, si applica un periodo di almeno tre settimane di fermo degli impianti sincronizzato. Il presente paragrafo si applica anche alle aziende nuove ufficialmente dichiarate infette durante l'attuazione del programma di eradicazione.
- Quando viene effettuato il fermo degli impianti delle aziende dichiarate ufficialmente infette le zone riservate alla protezione vengono trasformate in zone di sorveglianza.
- L'autorità competente può decidere di imporre lo svuotamento, la pulizia, la disinfezione e il fermo degli impianti in altre aziende all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite. La durata del periodo di fermo degli impianti per tali aziende è determinata dall'autorità competente in base ad una valutazione dei rischi caso per caso;
- d) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da VHS o IHN o entrambe tali malattie elencate e tutte le altre aziende soggette a fermo degli impianti all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite di cui al punto c) sono ripopolate con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti riconosciuti indenni (con uno stato sanitario di categoria I) relativamente a VHS, IHN o entrambe.

Si procede al ripopolamento solo quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti in conformità al punto I.2.2.1, lettera c);

- e) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, compreso nel programma di eradicazione e, nei casi in cui è prescritta la sorveglianza delle popolazioni selvatiche, i punti di campionamento selezionati a norma del punto I.1, sono successivamente sottoposti al programma di sorveglianza di cui al punto I.2.1.

I.2.2.2. Prescrizioni per il riottenimento dello status di indenne da malattia destinate ai compartimenti continentali che comprendono una sola azienda precedentemente dichiarati indenni da IHN o VHS o entrambe

Un compartimento continentale comprendente una sola azienda precedentemente dichiarato indenne da VHS o IHN o da entrambe tali malattie elencate, il cui stato sanitario relativamente a tali malattie elencate è indipendente dalle acque naturali circostanti come stabilito all'allegato V, parte II, punto 3, della direttiva 2006/88/CE, e il cui stato sanitario di categoria I è stato revocato a norma dell'articolo 53, paragrafo 3, di tale direttiva, può riottenere lo stato sanitario di categoria I immediatamente dopo che l'autorità competente ha confermato che sono state soddisfatte le seguenti condizioni:

- a) l'azienda per cui è stata ufficialmente confermata l'infezione da VHS o IHN o entrambe deve essere stata svuotata, pulita, disinfettata e sottoposta al fermo degli impianti; la durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei settimane;
- b) l'azienda per cui è stata ufficialmente confermata l'infezione da VHS o IHN o entrambe è stata ripopolata con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente a VHS, IHN o entrambe.

I.3. Prescrizioni specifiche per il mantenimento dello status di indenne da VHS e IHN o entrambe (stato sanitario di categoria I)

Quando è prescritta una sorveglianza mirata per il mantenimento dello stato sanitario di categoria I, come previsto dall'articolo 52 della direttiva 2006/88/CE del Consiglio, tutte le aziende che detengono specie sensibili elencate nell'allegato IV, parte II, di tale direttiva, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono sottoposte a ispezioni sanitarie e si procede a campionamenti dei pesci come stabilito alla tabella 1.C che figura nella presente parte, sezione II, tenendo presente il grado di rischio dell'azienda per quanto riguarda la diffusione di VHS o IHN o entrambe tali malattie elencate.

Nel determinare la frequenza delle ispezioni sanitarie nei compartimenti con stato sanitario di categoria I relativamente a VHS o IHN o entrambe, in zone continentali e per i quali lo stato sanitario relativamente a VHS o IHN o entrambe dipende dallo stato sanitario delle popolazioni di animali acquatici nelle acque naturali circostanti come previsto all'allegato V, parte II, punto 2, della direttiva 2006/88/CE, il rischio di VHS o IHN o entrambe deve essere considerato elevato.

È possibile mantenere lo status di indenne da malattia solo se tutti i campioni sottoposti a prova con l'applicazione dei metodi diagnostici di cui al punto II.2. hanno dato risultati negativi per VHS o IHN o entrambe tali malattie elencate e se è stato escluso qualsiasi sospetto di presenza di VHS o IHN o entrambe applicando i metodi diagnostici di cui al punto II.3.

I.4. Prescrizioni per la revoca delle misure di contenimento previste dall'articolo 39 della direttiva 2006/88/CE, ossia per il passaggio dallo stato sanitario della categoria V a quello della categoria III

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento con stato sanitario di categoria V relativamente a VHS o IHN o entrambe può ottenere lo stato sanitario di categoria III relativamente a tali malattie in elenco alle seguenti condizioni:

- a) siano state rispettate le prescrizioni di cui al punto I.2.2.1, lettere a), b) e c). Qualora il fermo dell'impianto non sia tecnicamente possibile, le aziende interessate saranno soggette ad una misura alternativa che fornisca garanzie quasi simili dell'eliminazione dei virus di VHS o IHN o di entrambe dall'ambiente dell'azienda;
- b) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende sottoposte a fermo degli impianti o a misure alternative a norma della lettera a) all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite sono state ripopolate con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I, II o III relativamente a VHS o IHN o entrambe;

- c) il ripopolamento è stato effettuato solo dopo che tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette siano state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti o a misure alternative a norma della lettera a).

II. Metodi diagnostici e di campionamento

II.1. Organi da prelevare a fini di campionamento:

Il materiale tissutale da esaminare è composto da milza, rene anteriore e cuore o, in alternativa, encefalo. Se il campionamento riguarda i pesci riproduttori, si può esaminare anche il fluido ovarico o il liquido seminale.

Se il campione è costituito da avannotti, i pesci interi di lunghezza inferiore a 4 cm possono essere sezionati con forbici o bisturi sterili previo asporto della parte del corpo situata dopo l'apertura anale. Se il campione è costituito da un pesce intero di lunghezza compresa tra 4 e 6 cm si prelevano le viscere compreso il rene.

Si possono inserire nel medesimo pool parti di organi provenienti da massimo 10 pesci.

II.2. Metodi diagnostici per ottenere o mantenere lo status di indenne da VHS o IHN o entrambe

In conformità ai metodi e alle procedure di diagnosi approvati di cui all'allegato II, parte 1, punto I, per ottenere o mantenere lo status di indenne da VHS o IHN o entrambe il metodo diagnostico da applicare sarà uno dei seguenti:

- a) isolamento del virus su culture cellulari seguito da identificazione con saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), prova di immunofluorescenza indiretta (IFAT), prova di neutralizzazione del virus o amplificazione con reazione a catena della polimerasi-trascrittasi inversa in tempo reale (RT-qPCR); oppure
- b) RT-qPCR.

II.3. Metodi di campionamento e diagnostici per escludere o confermare la presenza di VHS o IHN

Quando è necessario confermare o escludere la sospetta presenza di VHS o IHN o entrambe, ai sensi dell'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE, si devono applicare le seguenti procedure di ispezione, campionamento e prova:

- a) l'azienda sospetta viene sottoposta ad almeno un'ispezione sanitaria e al prelievo di un campione di 10 pesci, se sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con un'infezione da VHS o IHN o entrambe, o di almeno 30 pesci, se non sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem*. I campioni sono esaminati applicando almeno uno dei metodi diagnostici di cui ai punti i) e ii) in conformità ai metodi e alle procedure diagnostici particolareggiati di cui all'allegato II, parte 1, sezione II:
 - i) isolamento convenzionale del virus su culture cellulari con sua successiva identificazione per via immunochimica o molecolare;
 - ii) rilevamento del virus attraverso RT-qPCR;
 - iii) altre tecniche diagnostiche di analoga provata efficacia, quali prova di immunofluorescenza indiretta (IFAT), saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), RT-PCR e immunoistochimica (IHC).
- b) la presenza di VHS si considera confermata se almeno uno di tali metodi diagnostici produce risultati positivi per il virus VHS. La presenza di IHN si considera confermata se almeno uno di tali metodi diagnostici produce risultati positivi per il virus IHN. La conferma del primo caso di VHS o IHN in Stati membri, loro zone o compartimenti precedentemente non infetti deve essere fondata sull'isolamento convenzionale del virus su culture cellulari o RT-qPCR;
- c) Il sospetto di virus VHS o IHN o di entrambi può essere escluso se la cultura cellulare o le prove RT-qPCR non rivelano ulteriormente la presenza del virus VHS o IHN o di entrambi.

Tabella 1.A

Programma di sorveglianza per zone e compartimenti per il periodo di controllo biennale di cui al punto I.2.1, lettera a), punto i), che deve precedere l'ottenimento dello status di indenne da VHS o IHN o entrambe.

Tipo di azienda	Numero di ispezioni sanitarie all'anno (per due anni)	Numero di campionamenti all'anno (per due anni)	Numero di pesci nel campione ⁽¹⁾	
			Numero di pesci in crescita	Numero di pesci riproduttori ⁽²⁾
a) Aziende con riproduttori	2	2	50 (primo controllo) 75 (secondo controllo)	30 (primo o secondo controllo) 0 (primo o secondo controllo)
b) Aziende con soli riproduttori	2	1	0	75 (primo o secondo controllo)
c) Aziende senza riproduttori	2	2	75 ⁽³⁾ (primo e secondo controllo)	0

Numero massimo di pesci per pool: 10

⁽¹⁾ I campioni devono essere raccolti non prima di tre settimane dopo il trasferimento dei pesci dall'acqua dolce all'acqua salata.

⁽²⁾ Il fluido ovarico o il liquido seminale dei pesci riproduttori devono essere raccolti al momento della maturazione in coincidenza con la spremitura.

⁽³⁾ Devono essere prelevati campioni da un numero di pesci sufficiente per garantire la rilevazione del virus VHS o IHN con un intervallo di confidenza del 95 % se la prevalenza attesa è del 5 %.

Tabella 1.B

Programma di sorveglianza con campione di dimensioni ridotte per il periodo di controllo quadriennale di cui al punto I.2.1, lettera a), punto ii), che deve precedere l'ottenimento dello status di indenne da VHS o IHN o entrambe.

Tipo di azienda	Numero di ispezioni sanitarie all'anno	Numero di campionamenti all'anno	Numero di pesci nel campione ⁽¹⁾	
			Numero di pesci in crescita	Numero di pesci riproduttori ⁽²⁾
Primi due anni del periodo di sorveglianza				
a) Aziende con riproduttori	2	1	0 (primo controllo) 30 (secondo controllo)	0 (primo controllo) 0 (secondo controllo)
b) Aziende con soli riproduttori	2	1	0	30 (primo o secondo controllo)
c) Aziende senza riproduttori	2	1	30 ⁽³⁾ (primo o secondo controllo)	0
Ultimi due anni del periodo di sorveglianza				
a) Aziende con riproduttori	2	2	30 (primo controllo) 0 (secondo controllo)	0 (primo controllo) 30 (secondo controllo)

Tipo di azienda	Numero di ispezioni sanitarie all'anno	Numero di campionamenti all'anno	Numero di pesci nel campione ⁽¹⁾	
			Numero di pesci in crescita	Numero di pesci riproduttori ⁽²⁾
b) Aziende con soli riproduttori	2	2		30 (primo e secondo controllo)
c) Aziende senza riproduttori	2	2	30 ⁽³⁾ (primo e secondo controllo)	

Numero massimo di pesci per pool: 10

⁽¹⁾ I campioni devono essere raccolti non prima di tre settimane dopo il trasferimento dei pesci dall'acqua dolce all'acqua salata.

⁽²⁾ Il fluido ovarico o il liquido seminale dei pesci riproduttori devono essere raccolti al momento della maturazione in coincidenza con la spremitura.

⁽³⁾ Devono essere prelevati campioni da un numero di pesci sufficiente per garantire la rilevazione del virus VHS o IHN con un intervallo di confidenza del 95 % se la prevalenza attesa è del 10 %.

Tabella 1.C

Programmi di sorveglianza per le zone o i compartimenti al fine di mantenere lo status di indenne da VHS o IHN di cui al punto I.3.

Livello di rischio	Numero di ispezioni sanitarie	Numero di pesci nel campione ⁽³⁾
Elevato	2 all'anno	30 ⁽¹⁾ ⁽²⁾
Medio	1 all'anno	30 ⁽¹⁾
Basso	1 ogni 2 anni	30 ⁽¹⁾

Numero massimo di pesci per pool: 10

⁽¹⁾ I campioni devono essere raccolti non prima di tre settimane dopo il trasferimento dei pesci dall'acqua dolce all'acqua salata.

⁽²⁾ Devono essere prelevati campioni da un numero sufficiente di pesci per garantire la rilevazione del virus VHS o IHN con un intervallo di confidenza del 95 % se la prevalenza attesa è del 10 %.

⁽³⁾ Deve essere previsto almeno un campione per ogni controllo sanitario.

PARTE 2

SORVEGLIANZA E METODI DI LOTTA CONTRO L'HERPESVIRUS DELLA CARPA KOI (KHVD)

I. Prescrizioni in materia di programmi di sorveglianza e di eradicazione per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da KHVD e per il contenimento dell'infezione da herpesvirus della carpa koi

I.1. Prescrizioni generali

Se è prescritta una sorveglianza mirata delle popolazioni selvatiche a norma dell'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, della direttiva 2006/88/CE, il numero e la distribuzione geografica dei punti di campionamento sono determinati in modo da ottenere una copertura ragionevole dello Stato membro o della sua zona o del suo compartimento. I punti di campionamento devono inoltre essere rappresentativi dei diversi ecosistemi nei quali vivono le popolazioni selvatiche sensibili, ossia sistemi fluviali e laghi.

La sorveglianza mirata si basa sul monitoraggio regolare dei siti che ospitano specie sensibili. I siti devono essere monitorati quando la temperatura dell'acqua ha raggiunto livelli tali da permettere lo sviluppo della malattia ($> 15^{\circ}\text{C}$) e non prima che siano trascorse due settimane dal raggiungimento di tale temperatura. Devono essere inseriti nel campione e sottoposti a prove tutti i pesci del sito che sono malati o mostrano un comportamento anormale.

Ogni volta che ciò sia possibile devono essere campionati pesci che siano stati tenuti per un periodo prolungato entro la gamma di temperature che permette lo sviluppo della malattia, ossia da due a tre settimane ad una temperatura compresa tra 15°C e 26°C . Sono comunque ammissibili gli approcci seguenti:

- a) raccogliere una subpopolazione durante il trasferimento dagli stagni di svernamento agli stagni estivi e detenere i pesci nello stesso specchio d'acqua dello stagno estivo fino al raggiungimento delle soglie prescritte di temperatura minima, oppure
- b) raccogliere campioni al momento della raccolta o quando i pesci sono movimentati nel corso delle normali pratiche di gestione. Se possibile i campioni devono essere raccolti tra 24 e 72 ore dopo tali pratiche di gestione in modo da incrementare la probabilità di rilevazione di KHV.

Se aziende o popolazioni selvatiche devono essere sottoposte a ispezioni sanitarie o campionamento più di una volta all'anno, gli intervalli tra le ispezioni sanitarie o tra i prelievi di campioni devono essere prolungati il più possibile entro i limiti della stagione in cui è probabile che la temperatura dell'acqua raggiunga i valori annuali massimi, senza superare la soglia di 28°C .

Tutte le unità di produzione, quali stagni e vasche, sono soggette a ispezioni sanitarie per rilevare la presenza di pesci morti, deboli o dal comportamento anormale.

Se nell'azienda sono presenti *Cyprinus carpio* e i suoi ibridi, quali la *Cyprinus carpio* $\times$ *Carassius auratus*, devono esserne raccolti esemplari.

I pesci da raccogliere a fini di campionamento sono così selezionati:

- i) se sono presenti soggetti deboli, che presentano un comportamento anormale o sono morti recentemente ma non in stato di decomposizione, devono essere selezionati tali soggetti;
- ii) se un'azienda utilizza acqua proveniente da diverse fonti per l'allevamento, devono essere selezionati pesci che rappresentino tutte le fonti idriche.
- iii) i pesci selezionati devono comprendere soggetti raccolti in modo da assicurare che siano rappresentate in proporzione tutte le zone dell'azienda e tutte le classi di età.

I.2. Prescrizioni specifiche per l'ottenimento dello status di indenne da KHVD (stato sanitario di categoria I)

I.2.1. Programmi di sorveglianza

- a) uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria III relativamente a KHVD, può ottenere lo stato sanitario di categoria I se tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono conformi alle prescrizioni relative allo status di indenne di cui all'allegato V di detta direttiva e che tutte le aziende, nonché, se prescritto dallo stesso allegato, parte I, punto 2, secondo comma, tutti i punti di campionamento di popolazioni selvatiche selezionati in conformità a tale parte, siano stati sottoposti ad uno dei seguenti programmi di sorveglianza:

- i) modello A — programma di sorveglianza biennale:

le aziende o i punti di campionamento devono essere stati sottoposti a ispezioni sanitarie, con prelievo di campioni, per un periodo minimo di due anni consecutivi come indicato alla tabella 2.A della sezione III.

Durante detto periodo di due anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per KHV e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di presenza di KHVD applicando i metodi di campionamento e diagnostici di cui al punto III.2;

ii) modello B — programma di sorveglianza quadriennale con campione di dimensioni ridotte:

le aziende o i punti di campionamento devono essere stati sottoposti a ispezioni sanitarie, con prelievo di campioni, per un periodo minimo di quattro anni consecutivi come indicato alla tabella 2.B della sezione III.

Durante detto periodo di quattro anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per KHV e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di presenza di KHVD applicando i metodi di campionamento e diagnostici di cui al punto III.2;

b) se, durante l'attuazione del programma di sorveglianza indicato al punto a), viene confermata l'infezione da KHV in un'azienda inclusa in detto programma di sorveglianza, e pertanto le viene revocato lo stato sanitario di categoria II, tale azienda può riottenere immediatamente il proprio stato sanitario di categoria II e continuare ad attuare il programma di sorveglianza per ottenere lo status di indenne da malattia senza attuare un programma di eradicazione di cui al punto I.2.2, purché rispetti le seguenti condizioni:

- i) è un'azienda continentale il cui stato sanitario in relazione a KHVD è indipendente dallo stato sanitario delle popolazioni di animali acquatici nelle acque naturali circostanti relativamente a tale malattia elencata di cui all'allegato V, parte II, punto 3, della direttiva 2006/88/CE;
- ii) è stata svuotata, pulita, disinfettata e sottoposta al fermo degli impianti; la durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei settimane;
- iii) è stata ripopolata con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente a KHVD.

I.2.2. Programmi di eradicazione

I.2.2.1. Prescrizioni generali

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, di stato sanitario di categoria V relativamente a KHVD, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tale malattia elencata a condizione che tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, siano state sottoposte al seguente programma di eradicazione:

- a) le misure minime di lotta stabilite al capo V, sezione 4, della direttiva 2006/88/CE devono essere state effettivamente applicate e deve essere stata stabilita una zona di protezione, come previsto dall'articolo 32, lettera b), di detta direttiva, che comprenda una zona riservata alla protezione e una zona di sorveglianza, in prossimità delle aziende ufficialmente dichiarate infette da KHV.

La zona di protezione deve essere stata definita in base ad un'analisi caso per caso, tenendo presenti i fattori agenti sul rischio di diffusione di KHVD agli animali d'allevamento e selvatici, quali: il numero di morti, il tasso e la distribuzione della mortalità degli animali nelle aziende infette da KHV; la distanza delle aziende vicine e la loro densità; la prossimità a macelli; le aziende di contatto; le specie presenti nelle aziende; le pratiche di allevamento applicate nelle aziende infette e nelle aziende limitrofe; le condizioni idrodinamiche ed altri fattori di rilevanza epidemiologica individuati.

Per l'istituzione delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza si applicano le seguenti prescrizioni minime per quanto riguarda la delimitazione geografica:

- i) deve essere istituita una zona riservata alla protezione nelle immediate vicinanze di un'azienda ufficialmente dichiarata infetta da KHV che deve corrispondere all'intero bacino idrografico di tale azienda; l'autorità competente può limitare l'estensione della zona a parti del bacino idrografico, purché non risulti compromessa la prevenzione della diffusione di KHVD;
- ii) una zona di sorveglianza deve essere istituita all'esterno della zona riservata alla protezione che deve corrispondere ad un'area estesa che circonda la zona riservata alla protezione istituita;

- b) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, all'interno della zona riservata alla protezione non dichiarata ufficialmente infetta da KHV, devono essere sottoposte ad un'indagine ufficiale che comprenda almeno gli elementi seguenti:
- i) la raccolta di campioni da sottoporre a prova, di 10 pesci, se sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con un'infezione da KHVD, o di 30 pesci, se non sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem*;
 - ii) un controllo sanitario; nelle aziende per le quali le prove di cui al punto III.2. hanno prodotto risultati negativi; le ispezioni sanitarie proseguiranno una volta al mese durante la stagione in cui è probabile che la temperatura dell'acqua raggiunga $> 15^{\circ}\text{C}$ fino a che la zona riservata alla protezione sia stata revocata in conformità al punto I.2.2.1, lettera c);
- c) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da KHV devono essere state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti. La durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei settimane. Dopo che tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette all'interno di una stessa zona riservata alla protezione siano state svuotate, si applica un periodo di almeno tre settimane di fermo degli impianti sincronizzato. Il presente paragrafo si applica anche alle aziende nuove ufficialmente dichiarate infette durante l'attuazione del programma di eradicazione.

Quando viene effettuato il fermo degli impianti delle aziende dichiarate ufficialmente infette le zone riservate alla protezione vengono trasformate in zone di sorveglianza.

L'autorità competente può decidere di imporre lo svuotamento, la pulizia, la disinfezione e il fermo degli impianti in altre aziende all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite. La durata del periodo di fermo degli impianti per tali aziende è determinata dall'autorità competente in base ad una valutazione dei rischi caso per caso;

- d) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da KHV e tutte le altre aziende sottoposte al fermo dell'impianto all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite devono essere ripopolate:
- i) con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente a KHVD; oppure
 - ii) per un periodo transitorio fino al 31 dicembre 2020, con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti che dispongono di un programma di sorveglianza di KHVD approvato.

Si procede al ripopolamento solo quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da KHV sono state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti in conformità al punto I.2.2.1, lettera c);

- e) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, compreso nel programma di eradicazione e, nei casi in cui è prescritta la sorveglianza delle popolazioni selvatiche, i punti di campionamento selezionati a norma del punto I.1, sono stati successivamente sottoposti almeno al programma di sorveglianza di cui al punto I.2.1.

I.2.2.2. Prescrizioni per riottenere lo status di indenne dalla malattia per i compartimenti che comprendono una sola azienda precedentemente dichiarata indenne da KHVD

Un compartimento continentale comprendente una sola azienda il cui stato sanitario è di categoria I relativamente a KHVD e il cui stato sanitario relativamente a tale malattia è indipendente dalle acque naturali circostanti come stabilito all'allegato V, parte II, punto 3, della direttiva 2006/88/CE, e il cui stato sanitario di categoria I è stato revocato a norma dell'articolo 53, paragrafo 3, di detta direttiva, può riottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a KHVD immediatamente dopo che l'autorità competente ha confermato che sono state soddisfatte le seguenti condizioni:

- a) è stato svuotato, pulito, disinfettato e soggetto al fermo degli impianti; la durata del periodo di fermo deve essere stata di almeno sei settimane;
- b) deve essere stato ripopolato con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I o che dispongono di un programma di sorveglianza di KHVD approvato (stato sanitario di categoria II).

I.3. Prescrizioni specifiche per il mantenimento dello status di indenne da KHVD

Se è prescritta una sorveglianza mirata per il mantenimento dello stato sanitario di categoria I, a norma dell'articolo 52 della direttiva 2006/88/CE, tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, di detta direttiva, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono sottoposte a ispezioni sanitarie e campionamento in conformità alla tabella 2.B di cui alla sezione III della presente parte, tenendo conto del rischio per l'azienda di contrarre KHV.

La frequenza delle ispezioni sanitarie nei compartimenti con stato sanitario di categoria I relativamente a KHVD, in zone continentali e comprendenti una o più aziende per le quali lo stato sanitario relativamente a KHVD dipende dallo stato sanitario relativamente a tale malattia elencata delle acque naturali circostanti come previsto dall'allegato V, parte II, punto 2, della direttiva 2006/88/CE, deve corrispondere a quella stabilita per i casi di rischio elevato nella tabella 2.C.

Negli Stati membri o loro zone o compartimenti nei quali il numero delle aziende è limitato e la sorveglianza mirata in tali aziende non fornisce sufficienti dati epidemiologici, i programmi di sorveglianza per il mantenimento dello status di indenne comprendono punti di campionamento selezionati come previsto dal punto I.1.

Tali punti di campionamento devono essere ispezionati e soggetti a campionamento a rotazione, coprendo il 50 % dei punti di campionamento ogni anno. Il campionamento viene effettuato in conformità alla tabella 2.C della sezione III. I campioni devono essere selezionati, preparati ed esaminati come descritto nella sezione II e le analisi di laboratorio devono fornire risultati negativi circa la presenza dell'agente patogeno di KHVD.

È possibile mantenere lo status di indenne da malattia solo se tutti i campioni sottoposti a prova utilizzando i metodi diagnostici di cui al punto II.2. sono risultati negativi a KHVD e qualsiasi sospetto di presenza di KHVD è stato escluso applicando i metodi diagnostici di cui al punto III.2.

I.4. Prescrizioni specifiche per la revoca delle misure di contenimento di cui all'articolo 39 della direttiva 2006/88/CE per l'ottenimento dello stato sanitario di categoria III relativamente a KHVD in Stati membri, loro zone o compartimenti con stato sanitario di categoria V

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento di stato sanitario di categoria V relativamente a KHVD può ottenere lo stato sanitario di categoria III relativamente a tale malattia elencata a condizione che:

- a) siano state rispettate le prescrizioni di cui al punto I.2.2.1, lettere a), b) e c). Qualora il fermo dell'impianto non sia tecnicamente possibile, le aziende interessate saranno sottoposte ad una misura alternativa che fornisca garanzie quasi simili dell'eliminazione del virus KHV dall'ambiente dell'azienda;
- b) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende sottoposte a fermo degli impianti o a una misura alternativa a norma della lettera a) all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite siano state ripopolate con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I, II o III relativamente a KHVD;
- c) il ripopolamento sia stato effettuato solo quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette siano state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo dell'impianto o a misure alternative a norma della lettera a).

II. **Metodi diagnostici e di campionamento a fini di sorveglianza per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da KHVD**

II.1. Campioni

Il materiale tissutale da esaminare è composto da parti delle branchie e del rene. Si possono inserire nel medesimo pool parti di organi provenienti da massimo due pesci.

II.2. Metodi diagnostici a fini di sorveglianza per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da KHVD

Il metodo diagnostico per l'ottenimento o il mantenimento dello status di indenne da KHVD è la reazione a catena della polimerasi quantitativa in tempo reale (RT-qPCR) unitamente ai metodi e alle procedure diagnostici dettagliati di cui all'allegato II, parte 2, punto II.

III. Metodi diagnostici e di campionamento per le indagini ufficiali al fine di confermare o escludere una sospetta presenza di KHVD

III.1. Campioni

Il materiale tissutale da esaminare è composto da parti delle branchie e del rene. Si possono inserire nel medesimo pool parti di organi provenienti da massimo due pesci.

III.2. Indagini ufficiali e metodi diagnostici per escludere o confermare la presenza infezione da KHV

Quando è necessario confermare o escludere la sospetta presenza di KHVD ai sensi dell'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE, si devono applicare le seguenti procedure di ispezione, campionamento e prova:

a) l'indagine ufficiale deve comprendere almeno un'ispezione sanitaria e il prelievo di un campione di 10 pesci, se sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con un'infezione da KHV, o di 30 pesci, se non sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem*. I campioni sono esaminati applicando il metodo diagnostico di cui alla lettera b) in conformità ai metodi e alle procedure diagnostici particolareggiati di cui all'allegato II, parte 2, sezione II;

b) la presenza dell'infezione da KHV si considera confermata se mediante PCR viene rilevato KHV;

il sospetto di KHV può essere escluso se tale prova non rivela ulteriore evidenza della presenza di KHV.

Tabella 2.A

Programma di sorveglianza per zone e compartimenti per il periodo biennale di controllo che precede l'ottenimento dello status di indenne da KHVD di cui al punto I.2.1.

		Numero di ispezioni cliniche all'anno (per due anni)	Numero di esami di laboratorio all'anno (per due anni)	Numero di pesci nel campione
Aziende o punti di campionamento	Primi due anni del periodo di sorveglianza	2	2	75 ⁽¹⁾
	Numero massimo di pesci per pool: 2			

⁽¹⁾ Devono essere prelevati campioni da un numero sufficiente di pesci per garantire la rilevazione del KHV con un intervallo di confidenza del 95 % se la prevalenza attesa è del 5 %.

Tabella 2.B

Programma di sorveglianza per zone e compartimenti per il periodo quadriennale di controllo che precede il riconoscimento dello status di indenne da KHVD di cui al punto I.2.1.

		Numero di ispezioni cliniche all'anno	Numero di esami di laboratorio all'anno	Numero di pesci nel campione
Aziende o punti di campionamento	Primi due anni del periodo di sorveglianza	1	1	30
Aziende o punti di campionamento	Ultimi due anni del periodo di sorveglianza	2	2	30
	Numero massimo di pesci per pool: 2			

Tabella 2.C

Programmi di sorveglianza per le zone o i compartimenti al fine di mantenere lo status di indenne da KHVD di cui al punto I.3.

Livello di rischio	Numero di ispezioni sanitarie	Numero di pesci nel campione
Elevato	2 all'anno	30
Medio	1 all'anno	30
Basso	1 ogni 2 anni	30

Numero massimo di pesci per pool: 2

Tabella 2.D

Programma di sorveglianza al fine di mantenere lo status di indenne da KHVD in Stati membri, loro zone o compartimenti nei quali il numero di aziende è limitato e la sorveglianza mirata in tali aziende non fornisce sufficienti dati epidemiologici, come indicato al punto I.3.

	Numero di ispezioni cliniche all'anno	Numero di esami di laboratorio all'anno	Numero di pesci nel campione
Punti di campionamento	1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni	30

Numero massimo di pesci per pool: 2

PARTE 3

SORVEGLIANZA E METODI DI LOTTA CONTRO L'ANEMIA INFETTIVA DEL SALMONE (ISA)**I. Prescrizioni in materia di programmi di sorveglianza e di eradicazione per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente all'infezione da ISA e per il contenimento dell'infezione da virus ISA con delezione a livello di HPR****I.1. Prescrizioni generali**

Quando le prescritte ispezioni sanitarie e il campionamento delle aziende in conformità all'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma della direttiva 2006/88/CE devono essere eseguiti più di una volta all'anno gli intervalli tra le ispezioni sanitarie o tra i prelievi di campioni devono essere i più lunghi possibile.

Se è prescritta una sorveglianza mirata delle popolazioni selvatiche a norma dell'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, della direttiva 2006/88/CE, il numero e la distribuzione geografica dei punti di campionamento sono determinati in modo da ottenere una copertura ragionevole dello Stato membro o della sua zona o del suo compartimento. I punti di campionamento devono inoltre essere rappresentativi dei diversi ecosistemi nei quali vivono le popolazioni selvatiche sensibili.

Tutte le unità di produzione, quali stagni, vasche e gabbie, sono sottoposte a ispezioni sanitarie per rilevare la presenza di pesci morti, deboli o dal comportamento anomalo. Vanno controllate con particolare attenzione le zone in prossimità delle griglie di scarico, dove i soggetti deboli tendono ad accumularsi spinti dalla corrente.

I pesci da raccogliere a fini di campionamento sono così selezionati:

- a) vengono selezionati solo pesci morenti o morti recentemente ma non in stato di decomposizione; in particolare, si dà la priorità alla raccolta di pesci che mostrano sintomi di anemia, emorragie o altri sintomi clinici tali da far sospettare disturbi della circolazione;
- b) se tra le specie sensibili nel sito sono presenti esemplari di salmone atlantico, si deve dare la priorità ai campioni di tale specie. Se nell'azienda non sono presenti esemplari di salmone atlantico si devono raccogliere per il campionamento altre specie sensibili;
- c) se per l'allevamento è utilizzata acqua proveniente da diverse fonti, devono essere inclusi nel campione pesci che rappresentino tutte le fonti;
- d) i pesci selezionati devono comprendere soggetti raccolti in modo da assicurare che siano rappresentate in proporzione tutte le unità di produzione, quali gabbie, vasche e stagni, dell'azienda, nonché tutte le classi di età.

I.2. Prescrizioni specifiche per l'ottenimento dello stato sanitario di categoria I in relazione all'ISA

I.2.1. Programmi di sorveglianza

Uno Stato membro, un sua zona o un suo compartimento con stato sanitario di categoria III relativamente all'ISA, come da allegato III, parte B, della direttiva 2006/88/CE, può ottenere lo stato sanitario di categoria I in relazione a tale malattia elencata quando tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, risultino conformi alle pertinenti prescrizioni di cui all'allegato V di detta direttiva e che tutte le aziende, nonché, se prescritto dall'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, di detta direttiva, tutti i punti di campionamento di popolazioni selvatiche selezionati in conformità a tale punto, siano stati sottoposti al seguente programma di sorveglianza:

- a) le aziende o i punti di campionamento devono essere stati sottoposti a ispezioni sanitarie e prelievo di campioni, per un periodo minimo di due anni consecutivi come indicato alla tabella 3.A della sezione II;
- b) durante detto periodo di due anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per il virus dell'ISA con delezione a livello di HPR e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di presenza dell'ISA applicando i metodi di campionamento e diagnostici di cui al punto II.3;
- c) se, durante l'attuazione del programma di sorveglianza, viene confermata la presenza di ISA in un'azienda inclusa nel programma di sorveglianza, e pertanto a tale azienda viene revocato lo stato sanitario di categoria II, deve essere stato effettuato un programma di eradicazione come da punto I.2.2.

I.2.2. Programmi di eradicazione

I.2.2.1. Prescrizioni generali

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, di stato sanitario di categoria V relativamente all'ISA, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tale malattia elencata quando tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, siano state sottoposte ad un programma di eradicazione conforme ai seguenti punti da a) a e):

- a) le misure minime di lotta stabilite al capo V, sezione 3, della direttiva 2006/88/CE devono essere state effettivamente applicate e in particolare deve essere stata stabilita una zona di protezione, come previsto dall'articolo 32, lettera b), di detta direttiva, che comprenda una zona riservata alla protezione e una zona di sorveglianza, in prossimità delle aziende ufficialmente dichiarate infette dal virus dell'ISA con delezione a livello di HPR o da ISA confermata.

La zona di protezione deve essere stata definita in base ad un'analisi caso per caso, tenendo presenti i fattori agenti sul rischio di diffusione dell'ISA ai pesci d'allevamento e selvatici, quali: il numero di morti, il tasso e la distribuzione della mortalità dei pesci nelle aziende infette da virus dell'ISA con delezione a livello di HPR o da ISA confermata; la distanza delle aziende vicine e la loro densità; la prossimità a macelli; le aziende di contatto; le specie presenti nelle aziende; le pratiche di allevamento applicate nelle aziende infette e nelle aziende limitrofe; le condizioni idrodinamiche ed altri fattori di rilevanza epidemiologica individuati.

Per l'istituzione delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza si applicano le seguenti prescrizioni minime per quanto riguarda la delimitazione geografica:

- i) deve essere istituita una zona riservata alla protezione nelle immediate vicinanze di un'azienda ufficialmente dichiarata infetta da ISA, che deve corrispondere:
 - (1) nelle zone costiere: a una zona circolare di raggio pari almeno ad un'escursione di marea o ad almeno 5 km se questa misura è superiore, con centro nell'azienda ufficialmente dichiarata infetta da ISA, oppure un'area equivalente determinata in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica;
 - (2) nelle zone interne: all'intero bacino idrografico dell'azienda ufficialmente dichiarata infetta da ISA; l'autorità competente può limitare l'estensione della zona a parti del bacino idrografico, purché non risulti compromessa la prevenzione della diffusione dell'ISA;
- ii) una zona di sorveglianza deve essere istituita all'esterno della zona riservata alla protezione che deve corrispondere:
 - (1) nelle zone costiere: a una zona, circostante la zona riservata alla protezione, in cui le escursioni di marea si sovrappongono; oppure a una zona, circostante la zona riservata alla protezione, compresa in un cerchio del raggio di 10 km dal centro della zona riservata alla protezione; oppure a un'area equivalente determinata in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica; oppure
 - (2) nelle zone interne: a una zona più ampia intorno alla zona riservata alla protezione istituita;
- b) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, all'interno della zona riservata alla protezione non dichiarata ufficialmente infetta da ISA, devono essere sottoposte ad un'indagine ufficiale che comprenda almeno gli elementi seguenti:
 - i) la raccolta di un campione da sottoporre a prova di almeno 10 pesci morenti, quando si riscontrino sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con ISA, o di almeno 30 pesci, quando non si riscontrino detti sintomi;
 - ii) un'ispezione sanitaria; nelle aziende per le quali le prove di cui al punto i) hanno fornito risultati negativi le ispezioni sanitarie continueranno una volta al mese fino alla revoca della zona riservata alla protezione in conformità al punto I.2.2.1, lettera c);
- c) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da virus dell'ISA con delezione a livello di HPR o da ISA confermata devono essere svuotate, ripulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti per un periodo di almeno tre mesi. Le zone riservate alla protezione e di sorveglianza possono essere revocate quando tutte le aziende all'interno della zona di protezione sono state svuotate, ripulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti per un periodo di almeno sei settimane.

Quando viene effettuato il fermo degli impianti delle aziende dichiarate ufficialmente infette le zone riservate alla protezione vengono trasformate in zone di sorveglianza.

L'autorità competente può decidere di imporre lo svuotamento, la pulizia, la disinfezione e il fermo degli impianti in altre aziende all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite. La durata del periodo di fermo degli impianti per tali aziende è determinata dall'autorità competente in base ad una valutazione dei rischi caso per caso;

- d) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da virus dell'ISA con delezione a livello di HPR o da ISA confermata e tutte le altre aziende sottoposte al fermo degli impianti nelle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite sono ripopolate con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente all'ISA.

Si procede al ripopolamento solo quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti in conformità al punto I.2.2.1, lettera c);

- e) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento incluso nel programma di eradicazione e, nei casi in cui è prescritta la sorveglianza delle popolazioni selvatiche, i punti di campionamento selezionati a norma del punto I.1, sono successivamente sottoposti al programma di sorveglianza di cui al punto I.2.1.

- I.2.2.2. Prescrizioni per riottenere lo status di indenne da malattia per i compartimenti continentali comprendenti una sola azienda con stato sanitario di categoria I

Un compartimento continentale comprendente una sola azienda il cui stato sanitario è di categoria I relativamente all'ISA e il cui stato sanitario è indipendente dalle acque naturali circostanti in conformità all'allegato V, parte II, punto 3, della direttiva 2006/88/CE, e il cui stato sanitario di categoria I è stato revocato a norma dell'articolo 53, paragrafo 3, di tale direttiva, può riottenere lo stato sanitario di categoria I immediatamente dopo che l'autorità competente ha confermato che il compartimento rispetta le seguenti condizioni:

- a) è stato svuotato, pulito, disinfettato e sottoposto al fermo degli impianti; la durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei settimane;
- b) è stato ripopolato con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente all'ISA.

- I.3. Prescrizioni minime di lotta per il mantenimento dello stato sanitario di categoria I relativamente a ISA

Se è prescritta una sorveglianza mirata per il mantenimento dello stato sanitario di categoria I, a norma dell'articolo 52 della direttiva 2006/88/CE, tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, di detta direttiva, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono sottoposte a ispezioni sanitarie e campionamento in conformità alla tabella 3.B ⁽¹⁾ di cui alla sezione II della presente parte, tenendo conto del rischio di contrarre l'ISA per tale azienda.

Nel determinare la frequenza delle ispezioni sanitarie nei compartimenti con stato sanitario di categoria I relativamente all'ISA, in zone continentali e per i quali lo stato sanitario relativamente all'ISA dipende dallo stato sanitario delle popolazioni di animali acquatici nelle acque naturali circostanti che ospitano salmone atlantico (*Salmo salar*), il rischio di contrarre l'ISA deve essere considerato elevato.

È possibile mantenere lo status di indenne da ISA solo se tutti i campioni esaminati con l'applicazione dei metodi diagnostici di cui al punto II.2. sono risultati negativi all'ISA con delezione a livello di HPR e se qualsiasi sospetto di presenza dell'ISA è stato escluso applicando i metodi diagnostici di cui al punto II.3.

- I.4. Prescrizioni specifiche per il riconoscimento dello stato sanitario di categoria III relativamente al virus dell'ISA con delezione a livello di HPR negli Stati membri, loro zone o compartimenti con stato sanitario di categoria V

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento con stato sanitario di categoria V relativamente all'ISA può ottenere lo stato sanitario di categoria III a condizione che:

- a) siano state rispettate le prescrizioni di cui al punto I.2.2.1, lettere a), b) e c). Qualora il fermo dell'impianto non sia tecnicamente possibile, le aziende interessate saranno sottoposte ad una misura alternativa che fornisca garanzie quasi simili dell'eliminazione del virus ISA dall'ambiente dell'azienda;
- b) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende che sono state sottoposte a fermo degli impianti o ad una misura alternativa a norma della lettera a) all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite siano state ripopolate con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I, II o III relativamente all'ISA;
- c) il ripopolamento sia stato effettuato solo dopo che tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette siano state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti o a misure alternative a norma della lettera a).
- d) non vi è stata nessuna conferma di virus dell'ISA con delezione a livello di HPR durante il periodo di due anni successivo al completamento delle misure di cui alle lettere a), b) e c), e i sospetti manifestatisi durante questo periodo sono stati esclusi applicando le procedure di cui al punto II.3.

⁽¹⁾ Non si applica alle aziende che allevano solo trote iridee (*Onchorhynchus mykiss*) e/o salmotrota (*Salmo trutta*) e nelle quali l'apporto di acqua dipende esclusivamente da fonti di acqua dolce che non ospitano salmone atlantico (*Salmo salar*).

II. Metodi diagnostici e indagini ufficiali

II.1. Campioni

Il materiale tissutale da esaminare è:

- a) istologia: rene anteriore, fegato, cuore, pancreas, intestino, milza e branchie;
- b) immunoistochimica: rene medio e cuore comprese le valvole e il bulbo arterioso;
- c) analisi RT-qPCR: rene medio e cuore;
- d) per coltura virale: rene medio, cuore, fegato e milza.

Si possono inserire nel medesimo pool parti di organi provenienti da massimo cinque pesci.

II.2. Metodi diagnostici per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne dall'ISA

Il metodo diagnostico da applicare per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne dall'ISA, a norma dei punti I.2 e I.3, è l'analisi RT-qPCR, seguita dal sequenziamento dei campioni positivi in conformità ai metodi e alle procedure particolareggiati di cui all'allegato II, parte 3.

Qualora l'analisi RT-qPCR dia un risultato positivo si devono sottoporre a prova altri campioni prima di applicare le prime misure di lotta di cui all'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE.

Tali campioni devono essere sottoposti a prova in conformità ai metodi e alle procedure particolareggiati di cui all'allegato II, parte 3:

- a) analisi dei campioni con RT-qPCR, compreso il sequenziamento del gene della proteina HE per verificare la delezione a livello di HPR;
- e
- b) esame su preparati tissutali utilizzando anticorpi specifici contro il virus dell'ISA (in particolare immunoistochimica su sezioni fissate o IFAT su impronte di tessuto); oppure
- c) isolamento e identificazione del virus dell'ISA su coltura cellulare prelevata da almeno un campione di qualsiasi pesce prelevato nell'azienda.

II.3. Indagini ufficiali e metodi diagnostici per escludere o confermare la presenza dell'ISA

Quando è necessario confermare o escludere la sospetta presenza dell'ISA a norma dell'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE, si applicano le seguenti procedure di ispezione, campionamento e prova:

- a) un'indagine ufficiale che deve comprendere almeno un'ispezione sanitaria e un prelievo di un campione di 10 pesci morenti, se sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con un'infezione da ISA. Se non sono riscontrati sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con l'ISA, l'ispezione sanitaria deve essere seguita da un campionamento mirato, formando un campione di almeno 30 pesci morenti o morti recentemente di costituzione normale, in conformità al punto I.1. I campioni devono essere sottoposti a prova applicando i metodi diagnostici indicati alla lettera b);
- b) qualora l'analisi RT-qPCR dia un risultato positivo per il virus dell'ISA con delezione a livello di HPR si devono sottoporre a prova altri campioni prima di applicare le prime misure di lotta di cui all'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE. Un caso di sospetta infezione da ISA deve essere confermato in conformità ai criteri seguenti usando i metodi e le procedure particolareggiati di cui all'allegato II, parte 3:
 - i) rilevamento del virus dell'ISA con analisi RT-qPCR, compreso il sequenziamento del gene della proteina HE per verificare la delezione a livello di HPR, e rilevamento del virus dell'ISA nei preparati tissutali mediante anticorpi specifici contro il virus dell'ISA (in particolare immunoistochimica su sezioni fissate o IFAT su impronte di tessuto)

oppure

- ii) rilevamento del virus dell'ISA con analisi RT-qPCR, compreso il sequenziamento del gene della proteina HE per verificare la delezione a livello di HPR, e

isolamento e identificazione del virus dell'ISA su coltura cellulare prelevata da almeno un campione di qualsiasi pesce prelevato nell'azienda;

- c) se si riscontrano mutamenti clinici macroscopici di tipo patologico, o risultati istopatologici compatibili con l'ISA, i risultati devono essere corroborati mediante rilevamento del virus con due metodi diagnostici che applichino principi indipendenti per il rilevamento, quali RT-qPCR e immunisto chimica in conformità all'allegato II, parte 3.

La sospetta presenza dell'ISA può essere esclusa se da prove e indagini svolte in un periodo di 12 mesi dall'annuncio del caso sospetto non emergono altre prove della presenza dell'ISA.

Tabella 3.A

Programma di sorveglianza per zone e compartimenti per il periodo biennale di controllo che precede l'ottenimento dello status di indennità dall'ISA di cui al punto I.2.1.

Anno di sorveglianza	Numero di ispezioni sanitarie all'anno (per due anni)	Numero di esami di laboratorio all'anno (per due anni)	Numero di pesci da campionare all'anno
Anno 1	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾
Anno 2	6	2 ⁽¹⁾	2 * 75 ⁽²⁾

⁽¹⁾ I campioni devono essere raccolti, conservati ed esaminati durante due periodi di prova all'anno, ciascuno della durata di un mese, da effettuarsi in primavera e in autunno oppure quando ciò sia opportuno in base a considerazioni pratiche.

⁽²⁾ Numero massimo di pesci per pool: 5.

Tabella 3.B

Programmi di sorveglianza per le zone o i compartimenti al fine di mantenere lo status di indennità dall'ISA di cui al punto I.3 ⁽²⁾.

Livello di rischio	Numero di ispezioni sanitarie all'anno	Numero di esami di laboratorio all'anno	Numero di pesci da campionare all'anno
Elevato	2	2 ⁽¹⁾	2 * 30
Medio	1	1 ⁽¹⁾	30
basso	1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni	30 ogni 2 anni

⁽¹⁾ I campioni devono essere raccolti ed esaminati durante due periodi di prova all'anno, ciascuno della durata di un mese, da effettuarsi in primavera e in autunno oppure quando ciò sia opportuno in base a considerazioni pratiche.

⁽²⁾ Non si applica alle aziende che allevano solo trote iridee (*Onchorhynchus mykiss*) e/o salmotrota (*Salmo trutta*) e nelle quali l'apporto di acqua dipende esclusivamente da fonti di acqua dolce che non ospitano salmone atlantico (*Salmo salar*).

PARTE 4

SORVEGLIANZA E METODI DI LOTTA CONTRO L'INFEZIONE DA MARTEILIA REFRINGENS

I. Prescrizioni in materia di programmi di sorveglianza e di eradicazione per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*

I.1. Prescrizioni generali

Le ispezioni sanitarie e, se opportuno, il campionamento per gli esami di laboratorio sono da eseguire nel periodo dell'anno nel quale la prevalenza del parassita nello Stato membro, nella sua zona o nel suo compartimento è notoriamente massima. Quando tali dati non sono disponibili il campionamento deve essere effettuato subito dopo che la temperatura dell'acqua abbia superato i 17 °C.

Quando si effettua il campionamento dei molluschi come prescritto dalla parte 4 si applicano i criteri seguenti:

- a) se nelle unità di produzione o nella zona di produzione sono presenti *Ostrea* spp. e *Mytilus* spp., entrambi i generi devono essere presenti in egual misura nel campione. Se è presente un solo genere tale genere è incluso nei campioni. Se non sono presenti né il genere *Ostrea* né il genere *Mytilus*, il campione deve rappresentare tutte le altre specie sensibili presenti;
- b) se nelle unità di produzione sono presenti molluschi deboli, dalle valve schiuse o morti recentemente, ma non decomposti, il prelievo deve comprendere innanzitutto tali soggetti. In assenza di tali molluschi sono selezionati i molluschi sani di età più avanzata;
- c) se il campionamento è effettuato in aziende di molluschicoltura che utilizzano acqua proveniente da diverse fonti, si devono prelevare molluschi che rappresentino tutte le fonti idriche, in modo tale che il campione sia proporzionalmente rappresentativo di tutte le parti dell'azienda;
- d) quando il prelievo avviene in zone destinate alla molluschicoltura, si devono includere nel campione molluschi provenienti da un numero sufficiente di punti di campionamento in modo da ottenere un campione proporzionalmente rappresentativo di tutte le parti della zona destinata alla molluschicoltura. I fattori principali da tenere in considerazione per la selezione di tali punti di campionamento sono i punti di campionamento dove è stata precedentemente rilevata la *Marteilia refringens*, la densità di allevamento, i flussi d'acqua, la presenza di specie sensibili, la presenza di specie vettrici, le caratteristiche batimetriche e le pratiche di gestione. Nel campionamento devono essere compresi i banchi naturali.

I.2. Prescrizioni specifiche per l'ottenimento dello stato sanitario di categoria I in relazione alla *Marteilia refringens*

I.2.1. Programmi di sorveglianza

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria III relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tale malattia elencata quando tutte le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, siano state sottoposte almeno al programma di sorveglianza seguente, che comprende ispezioni sanitarie e il prelievo di campioni da sottoporre a prova.

Programma di sorveglianza biennale:

- a) le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura devono essere state sottoposte a ispezioni sanitarie, con prelievo di campioni, per un periodo minimo di due anni consecutivi come indicato alla tabella 4.A della sezione II;
- b) durante detto periodo di due anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per la *Marteilia refringens* e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di presenza di *Marteilia refringens* in conformità ai metodi di campionamento e diagnostici di cui al punto II.3;
- c) se nel campione devono essere compresi *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* o *Mytilus galloprovincialis* provenienti da uno Stato membro o sua zona o suo compartimento con stato sanitario di categoria I, è necessario che essi siano stati introdotti nell'azienda o zona destinata alla molluschicoltura almeno nella primavera immediatamente precedente il periodo nel quale si effettua il programma di sorveglianza.

I.2.2. Programmi di eradicazione

L'eradicazione della *Marteilia refringens* è considerata impossibile nella maggior parte dei casi, ma se lo Stato membro ritiene che sia ottenibile si deve applicare il seguente modello di programma di eradicazione.

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria V relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tale malattia elencata quando tutte le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono state sottoposte almeno al seguente programma di eradicazione:

- a) le misure stabilite al capo V, sezione 3, della direttiva 2006/88/CE devono essere state effettivamente applicate e in particolare deve essere stata stabilita una zona di protezione, come previsto all'articolo 32, lettera b), di detta direttiva, che comprenda una zona riservata alla protezione e una zona di sorveglianza, in prossimità delle aziende o delle zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette da *Marteilia refringens*.

La zona di protezione deve essere definita in base ad un'analisi caso per caso, tenendo presenti i fattori agenti sul rischio di diffusione di *Marteilia refringens*, quali: il numero di morti e la loro età, il tasso e la distribuzione della mortalità dei molluschi nell'azienda o zona destinata alla molluschicoltura infetta da *Marteilia refringens*, compresi i molluschi selvatici; la distanza e la densità delle aziende o zone destinate alla molluschicoltura limitrofe, comprese quelle con molluschi selvatici; la vicinanza a stabilimenti di lavorazione, aziende di contatto o zone destinate alla molluschicoltura; le specie, in particolare le specie sensibili e le specie vettrici, presenti nelle aziende o nelle zone destinate alla molluschicoltura; le pratiche di allevamento applicate nelle aziende e nelle zone destinate alla molluschicoltura colpite e limitrofe; le condizioni idrodinamiche ed altri fattori di rilevanza epidemiologica individuati.

Per l'istituzione delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza si applicano le seguenti prescrizioni minime:

- i) deve essere istituita una zona riservata alla protezione nelle immediate vicinanze di un'azienda o zona destinata alla molluschicoltura ufficialmente dichiarata infetta da *Marteilia refringens*, che deve corrispondere a un'area determinata secondo adeguati dati idrodinamici o epidemiologici;
- ii) deve essere istituita una zona di sorveglianza all'esterno della zona riservata alla protezione, che corrisponda ad un'area tale da circondare la zona riservata alla protezione, determinata secondo adeguati dati idrodinamici o epidemiologici;
- b) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, all'interno della zona riservata alla protezione non dichiarata ufficialmente infetta da *Marteilia refringens*, devono essere sottoposte ad un'indagine ufficiale che comprenda almeno il prelievo di un campione di 150 molluschi da sottoporre a prova dopo l'inizio del periodo di trasmissione della *Marteilia refringens*. Se il periodo di trasmissione non è noto il prelievo inizia nel periodo successivo a quando la temperatura dell'acqua ha superato i 17 °C;
- c) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette da *Marteilia refringens* devono essere svuotate, sottoposte al fermo degli impianti e se possibile ripulite e disinfettate.

La durata del periodo di fermo deve essere almeno:

- i) di due mesi nel caso di aziende e zone destinate alla molluschicoltura con collegamenti limitati con le acque circostanti, quali incubatoi e vivai;
- ii) di due mesi nel caso di aziende e zone destinate alla molluschicoltura con collegamenti illimitati con le acque circostanti, a condizione che i molluschi infetti delle specie sensibili e i molluschi delle specie sensibili con legami epidemiologici con l'azienda o la zona destinata alla molluschicoltura infetta siano stati raccolti o rimossi prima del periodo dell'anno in cui la prevalenza di *Marteilia refringens* è notoriamente massima, oppure, se tale periodo non è noto, prima del periodo nel quale la temperatura dell'acqua supera i 17 °C;
- iii) di quattordici mesi nel caso di aziende e zone destinate alla molluschicoltura con collegamenti illimitati con le acque circostanti, se i molluschi infetti delle specie sensibili e i molluschi delle specie sensibili con legami epidemiologici con l'azienda o la zona destinata alla molluschicoltura infetta non sono stati raccolti o rimossi prima del periodo dell'anno in cui la prevalenza di *Marteilia refringens* è notoriamente massima, oppure, se tale periodo non è noto, se i molluschi delle specie sensibili non sono stati raccolti o rimossi prima del periodo nel quale la temperatura dell'acqua supera i 17 °C.

Quando tutte le aziende e zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, si applica un periodo di almeno quattro settimane di fermo degli impianti sincronizzato.

L'autorità competente può decidere di imporre lo svuotamento, la pulizia, la disinfezione e il fermo degli impianti in altre aziende o zone destinate alla molluschicoltura, secondo il caso, all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite. La durata del periodo di fermo degli impianti è determinata dall'autorità competente in base ad una valutazione dei rischi caso per caso;

- d) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende e le zone destinate alla molluschicoltura sottoposte al fermo degli impianti entro le zone riservate alla protezione e sorveglianza stabilite con molluschi provenienti da Stati membri, loro zone e compartimenti con stato sanitario di categoria I relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*.

Si procede al ripopolamento solo quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti in conformità al punto I.2.2, lettera c);

- e) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento compreso nel programma di eradicazione sono successivamente sottoposte al programma di sorveglianza di cui al punto I.2.1 della presente parte.

I.3. Prescrizioni specifiche per il mantenimento dello status di indenne da malattia (categoria I) relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*

Se è prescritta una sorveglianza mirata per il mantenimento dello stato sanitario di categoria I, a norma dell'articolo 52 della direttiva 2006/88/CE, tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono sottoposte a ispezioni sanitarie e campionamento in conformità alla tabella 4.B di cui alla sezione II, tenendo conto del rischio per tale azienda o zona di molluschicoltura di contrarre la *Marteilia refringens*.

È possibile mantenere lo status di indenne solo se per tutti i campioni esaminati con l'applicazione dei metodi diagnostici di cui al punto II.2. si riscontrano risultati negativi per *Marteilia refringens* e se qualsiasi sospetto di presenza di *Marteilia refringens* è stato escluso applicando i metodi diagnostici di cui al punto II.3.

I.4. Prescrizioni per la revoca delle misure di contenimento di cui all'articolo 39 della direttiva 2006/88/CE (passaggio dallo stato sanitario di categoria V allo stato di categoria III) relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento con stato sanitario di categoria V relativamente all'infezione da *Marteilia refringens* può ottenere lo stato sanitario di categoria III relativamente a tale malattia elencata alle seguenti condizioni:

- a) sono state rispettate le prescrizioni di cui al punto I.2.2, lettere a), b) e c). Qualora il fermo dell'impianto non sia tecnicamente possibile, le aziende interessate saranno soggette ad una misura alternativa che fornisca garanzie quasi simili dell'eliminazione della *Marteilia refringens* dall'ambiente dell'azienda;
- b) tutte le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende o zone destinate alla molluschicoltura sottoposte al fermo degli impianti o a misure alternative come da lettera a) entro le zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite sono state ripopolate con molluschi provenienti da Stati membri, loro zone e compartimenti con stato sanitario di categoria I, II o III relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*;
- c) il ripopolamento è stato effettuato solo dopo che tutte le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette siano state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti o a misure alternative a norma della lettera a);
- d) non vi è stata nessuna conferma di infezione da *Marteilia refringens* durante il periodo di due anni successivo al completamento delle misure di cui alle lettere a), b) e c) e i sospetti manifestatisi durante questo periodo sono stati esclusi applicando le procedure di cui al punto II.3.

II. Metodi diagnostici e indagini ufficiali

II.1. Campioni

Per l'esecuzione delle prove diagnostiche di cui ai punti II.2 e II.3 va inoltrato al laboratorio l'animale intero.

II.2. Metodi diagnostici per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne dall'infezione da *Marteilia refringens*

Per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne dall'infezione da *Marteilia refringens* seguendo i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui all'allegato II, parte 4, i metodi diagnostici da applicare sono istopatologia, impronte di tessuto o analisi PCR.

II.3. Indagini ufficiali e metodi diagnostici per confermare la presenza o escludere il sospetto dell'infezione da *Marteilia refringens*

Quando è necessario confermare o escludere la sospetta presenza di *Marteilia refringens* a norma dell'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE, si devono applicare le seguenti procedure di ispezione, campionamento e prova:

- a) l'indagine ufficiale deve comprendere almeno un campionamento di 30 molluschi delle specie sensibili se il sospetto di basa su una relazione sulla mortalità; in caso contrario, di 150 molluschi delle specie sensibili dopo l'inizio del periodo di trasmissione della *Marteilia refringens*. Se il periodo di trasmissione non è noto il prelievo inizia nel periodo successivo a quando la temperatura dell'acqua ha superato i 17 °C;
- b) I campioni sono esaminati applicando il metodo diagnostico di cui al punto i) in conformità ai metodi e alle procedure diagnostici particolareggiati di cui all'allegato II, parte 4, sezione I:
 - i) la presenza di *Marteilia refringens* si considera confermata se un risultato positivo ottenuto mediante istopatologia, impronte di tessuto o ibridizzazione in situ è associato ad un risultato positivo di analisi PCR completato da sequenziamento;
 - ii) si può escludere il sospetto di infezione da *Marteilia refringens* se le prove di cui al punto i) non forniscono ulteriore evidenza della presenza di *Marteilia refringens*.

Tabella 4.A

Programma di sorveglianza per Stati membri, loro zone e compartimenti per il periodo di controllo che precede il riconoscimento dello status di indenne da *Marteilia refringens* di cui al punto I.2.1.

	Numero di ispezioni sanitarie all'anno	Numero di esami di laboratorio all'anno	Numero di molluschi nel campione
Aziende o zone destinate alla molluschicoltura	1	1	150

Tabella 4.B

Programmi di sorveglianza per gli Stati membri, loro zone o compartimenti al fine di mantenere lo status di indenne da *Marteilia refringens* di cui al punto I.3.

Livello di rischio	Numero di ispezioni sanitarie	Numero di esami di laboratorio	Numero di molluschi nel campione
Elevato	1 all'anno	1 ogni 2 anni	150
Medio	1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni	150
Basso	1 ogni 2 anni	1 ogni 4 anni	150

PARTE 5

SORVEGLIANZA E METODI DI LOTTA CONTRO L'INFEZIONE DA *BONAMIA OSTREAE*

I. Prescrizioni in materia di programmi di sorveglianza o di eradicazione per il riconoscimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae*

I.1. Prescrizioni generali

Le ispezioni sanitarie e, ove opportuno, il campionamento delle unità di produzione sono da eseguire nel periodo dell'anno nel quale la prevalenza della *Bonamia ostreae* nello Stato membro o nella sua zona o nel suo compartimento è notoriamente ai livelli più alti. Quando tali dati non sono disponibili il campionamento deve essere effettuato in inverno o all'inizio della primavera.

Quando si effettua il campionamento dei molluschi come prescritto dalla parte 5 si applicano i criteri seguenti:

- a) se la specie *Ostrea edulis* è presente nell'azienda, sono selezionate per il campionamento solo ostriche di questa specie. Se la specie *Ostrea edulis* non è presente i campioni devono essere rappresentativi di tutte le altre specie sensibili presenti;
- b) se sono presenti molluschi deboli, dalle valve schiuse o morti recentemente ma non decomposti, il prelievo deve comprendere innanzitutto tali soggetti. Se tali molluschi non sono presenti, i molluschi selezionati devono comprendere i molluschi sani di età più avanzata;
- c) se il campionamento è effettuato in aziende che per la produzione dei molluschi utilizzano acqua proveniente da diverse fonti si devono prelevare molluschi che rappresentino tutte le fonti idriche, in modo tale che il campione sia proporzionalmente rappresentativo di tutte le parti dell'azienda;
- d) quando il prelievo avviene in zone destinate alla molluschicoltura, si devono includere nel campione molluschi provenienti da un numero sufficiente di punti di campionamento. I fattori principali da tenere in considerazione per la selezione di tali punti di campionamento sono i punti di campionamento dove è stata precedentemente rilevata la *Bonamia ostreae*, la densità di allevamento, i flussi d'acqua, la presenza di specie sensibili, la presenza di specie vettrici, le caratteristiche batimetriche e le pratiche di gestione. Nel campionamento devono essere compresi i banchi naturali situati all'interno di zone destinate alla molluschicoltura o ad esse limitrofi.

I.2. Prescrizioni specifiche per l'ottenimento dello stato sanitario di categoria I in relazione alla *Bonamia ostreae*

I.2.1. Programmi di sorveglianza

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria III relativamente alla *Bonamia ostreae*, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tale malattia elencata quando tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono state sottoposte almeno al programma di sorveglianza seguente, che comprende ispezioni sanitarie e il prelievo di campioni da sottoporre a prova.

Programma di sorveglianza biennale:

- a) le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, devono essere state sottoposte a ispezioni sanitarie, con prelievo di campioni, per un periodo minimo di due anni consecutivi come indicato alla tabella 5.A della presente parte;
- b) durante detto periodo di due anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per la *Bonamia ostreae* e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di presenza di *Bonamia ostreae* in conformità ai metodi di campionamento e diagnostici di cui al punto II.3;
- c) se nel campione devono essere compresi esemplari di *Ostrea edulis* provenienti da uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento con stato sanitario di categoria I, essi devono essere stati introdotti nell'azienda o zona destinata alla molluschicoltura almeno nell'autunno immediatamente precedente il periodo nel quale si effettua il programma di sorveglianza.

I.2.2. Programmi di eradicazione

L'eradicazione della *Bonamia ostreae* è considerata impossibile nella maggior parte dei casi, ma se lo Stato membro ritiene che sia ottenibile si deve applicare il seguente modello di programma di eradicazione.

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria V relativamente alla *Bonamia ostreae*, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tale malattia elencata quando tutte le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono state sottoposte almeno al seguente programma di eradicazione:

- a) le misure minime di lotta stabilite al capo V, sezione 3, della direttiva 2006/88/CE devono essere state effettivamente applicate e in particolare deve essere stata stabilita una zona di protezione, come previsto dall'articolo 32, lettera b), di detta direttiva, che comprenda una zona riservata alla protezione e una zona di sorveglianza, in prossimità delle aziende o delle zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette da *Bonamia ostreae*.

La zona di protezione deve essere definita in base ad un'analisi caso per caso, tenendo presenti i fattori agenti sul rischio di diffusione della malattia elencata in oggetto, quali: il numero, il tasso, l'età e la distribuzione della mortalità dei molluschi nell'azienda o nella zona destinata alla molluschicoltura infetta da *Bonamia ostreae*, compresi i molluschi selvatici; la distanza e la densità delle aziende o zone destinate alla molluschicoltura limitrofe, compresi i molluschi selvatici; la vicinanza a stabilimenti di lavorazione, aziende di contatto o zone destinate alla molluschicoltura; le specie presenti nelle aziende o nelle zone destinate alla molluschicoltura, in particolare le specie sensibili e le specie vettrici; le pratiche di allevamento applicate nelle aziende o nelle zone destinate alla molluschicoltura limitrofe colpite; le condizioni idrodinamiche ed altri fattori di rilevanza epidemiologica individuati.

Per l'istituzione delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza si applicano le seguenti prescrizioni minime:

- i) deve essere istituita una zona riservata alla protezione nelle immediate vicinanze di un'azienda o zona destinata alla molluschicoltura ufficialmente dichiarata infetta da *Bonamia ostreae*, che deve corrispondere ad un'area determinata secondo adeguati dati idrodinamici o epidemiologici;
 - ii) deve essere istituita una zona di sorveglianza all'esterno della zona riservata alla protezione, che corrisponda ad un'area tale da circondare la zona riservata alla protezione, determinata secondo adeguati dati idrodinamici o epidemiologici;
- b) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, all'interno della zona riservata alla protezione non ufficialmente dichiarata infetta da *Bonamia ostreae* devono essere sottoposte ad un'indagine ufficiale che comprenda almeno il prelievo di un campione da sottoporre a prova di 150 molluschi delle specie sensibili dopo l'inizio del periodo di trasmissione della *Bonamia ostreae*. Se il periodo di trasmissione non è noto il prelievo inizia in inverno o all'inizio della primavera;
- c) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette da *Bonamia ostreae* devono essere svuotate, sottoposte al fermo degli impianti e se possibile ripulite e disinfettate. La durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei mesi.

Quando tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, si applica un periodo di almeno quattro settimane di fermo degli impianti sincronizzato.

L'autorità competente può decidere di imporre lo svuotamento, la pulizia, la disinfezione e il fermo degli impianti in altre aziende o zone destinate alla molluschicoltura, secondo il caso, all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite. La durata del periodo di fermo degli impianti è determinata dall'autorità competente in base ad una valutazione dei rischi caso per caso;

- d) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende o zone destinate alla molluschicoltura sottoposte al fermo degli impianti entro le zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite sono ripopolate con molluschi provenienti da Stati membri, loro zone e compartimenti con stato sanitario di categoria I relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae*. Si procede al ripopolamento solo quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti in conformità al punto I.2.2, lettera c);
- e) tutte le aziende e le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento compreso nel programma di eradicazione devono essere successivamente sottoposte al programma di sorveglianza di cui al punto I.2.
- I.3. Prescrizioni specifiche per il mantenimento dello status di indenne da malattia (categoria I) relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae*

Se è prescritta una sorveglianza mirata per il mantenimento dello stato sanitario di categoria I, a norma dell'articolo 52 della direttiva 2006/88/CE, tutte le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, di detta direttiva, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento sono sottoposte a ispezioni sanitarie e campionamento in conformità alla tabella 5. B di cui alla sezione II della presente parte, tenendo conto del rischio per tale azienda o zona di contrarre l'infezione da *Bonamia ostreae*.

È possibile mantenere lo status di indenne da malattia relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae* solo se tutti i campioni esaminati con l'applicazione dei metodi diagnostici di cui al punto II.2 producono risultati negativi per *Bonamia ostreae* e se qualsiasi sospetto della presenza di *Bonamia ostreae* è escluso in conformità ai metodi diagnostici di cui al punto II.3.

- I.4. Prescrizioni per la revoca delle misure di contenimento di cui all'articolo 39 della direttiva 2006/88/CE (passaggio dallo stato sanitario di categoria V allo stato di categoria III) relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae*.

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento con stato sanitario di categoria V relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae* può ottenere lo stato sanitario di categoria III relativamente a tale malattia elencata alle seguenti condizioni:

- a) sono state rispettate le prescrizioni di cui al punto I.2.2, lettere a), b) e c). Qualora il fermo dell'impianto non sia tecnicamente possibile, le aziende interessate saranno soggette ad una misura alternativa che fornisca garanzie quasi simili dell'eliminazione della *Bonamia ostreae* dall'ambiente dell'azienda;
- b) tutte le aziende o le zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende o zone destinate alla molluschicoltura sottoposte al fermo degli impianti o a misure alternative a norma della lettera a) entro le zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite sono state ripopolate con molluschi provenienti da Stati membri, loro zone e compartimenti con stato sanitario di categoria I, II o III relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae*;
- c) il ripopolamento è stato effettuato solo dopo che tutte le aziende o zone destinate alla molluschicoltura ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti o a misure alternative a norma della lettera a);
- d) non vi è stata nessuna conferma di infezione da *Bonamia ostreae* durante il periodo di due anni successivo al completamento delle misure di cui alle lettere a), b) e c), e i sospetti manifestatisi durante questo periodo sono stati esclusi applicando le procedure di cui al punto II.3.

II. Metodi e criteri diagnostici

II.1. Campioni

Per l'esecuzione delle prove diagnostiche di cui ai punti II.2 e II.3 va inoltrato al laboratorio l'animale intero.

II.2. Metodi diagnostici per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae*

I metodi diagnostici da utilizzare per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae* sono istopatologia, impronte di tessuto o analisi PCR. Nell'applicazione di tali metodi diagnostici sono da seguire i corrispondenti metodi e procedure particolareggiati di cui all'allegato II, parte 5.

II.3. Criteri diagnostici per confermare la presenza o escludere il sospetto di infezione da *Bonamia ostreae*

Quando è necessario confermare o escludere la sospetta presenza dell'infezione da *Bonamia ostreae* a norma dell'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE, si devono applicare le seguenti procedure di ispezione, campionamento e prova.

L'indagine ufficiale deve comprendere almeno un campionamento di 30 molluschi delle specie sensibili se il sospetto si basa su una relazione sulla mortalità; in caso contrario, di 150 molluschi delle specie sensibili dopo l'inizio del periodo di trasmissione della *Bonamia ostreae*. Se il periodo di trasmissione non è noto il prelievo inizia in inverno o all'inizio della primavera. I campioni sono esaminati utilizzando i metodi diagnostici di cui al punto i) seguendo i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui all'allegato II, parte 5, sezione I.

- i) la presenza di *Bonamia ostreae* si considera confermata se un risultato positivo ottenuto mediante istopatologia, impronte di tessuto o ibridizzazione in situ è associato ad un risultato positivo ottenuto con analisi PCR completata da sequenziamento, nel rispetto dei metodi e delle procedure approvati di cui all'allegato II, parte 5;
- ii) il sospetto di presenza dell'infezione da *Bonamia ostreae* è escluso se tali prove non forniscono ulteriori evidenze della presenza di *Bonamia ostreae*.

Tabella 5.A

Programma di sorveglianza per Stati membri, loro zone e compartimenti per il periodo di controllo che precede il riconoscimento dello status di indenne da *Bonamia ostreae* di cui al punto I.2.1.

	Numero di ispezioni sanitarie all'anno	Numero di esami di laboratorio all'anno	Numero di molluschi nel campione
Aziende o zone destinate alla molluschicoltura	1	1	150

Tabella 5.B

Programmi di sorveglianza per gli Stati membri, loro zone o compartimenti al fine di mantenere lo status di indenne da *Bonamia ostreae* di cui al punto I.3.

Livello di rischio	Numero di ispezioni sanitarie	Numero di esami di laboratorio	Numero di molluschi nel campione
Elevato	1 all'anno	1 ogni 2 anni	150
Medio	1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni	150
Basso	1 ogni 2 anni	1 ogni 4 anni	150

PARTE 6

SORVEGLIANZA E METODI DI LOTTA CONTRO LA MALATTIA DEI PUNTI BIANCHI (WSD)

I. Prescrizioni in materia di programmi di sorveglianza e di eradicazione per il riconoscimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente a WSD e per il contenimento dell'infezione da virus WSS

I.1. Prescrizioni generali per i controlli e il campionamento

Il prelievo dei campioni di crostacei da sottoporre a esami di laboratorio deve essere effettuato in qualsiasi periodo in cui è probabile che la temperatura dell'acqua raggiunga il valore massimo annuale. Tale prescrizione relativa alla temperatura dell'acqua si applica anche alle ispezioni sanitarie quando questi sono realizzabili e opportuni.

Quando si effettua il campionamento dei crostacei di allevamento come prescritto dalla presente parte si applicano i criteri seguenti:

- a) se nelle unità di produzione sono presenti crostacei deboli o morenti, il prelievo deve comprendere innanzitutto tali soggetti. Se tali crostacei non sono presenti, il prelievo deve comprendere crostacei di coorti di diverse taglie, in particolare esemplari giovani e adulti, delle specie sensibili selezionate, rappresentati in modo proporzionale nel campione;
- b) se un'azienda utilizza per l'allevamento dei crostacei acqua proveniente da diverse fonti, nel campione sono inclusi crostacei sensibili che rappresentano tutte le fonti idriche.

Se è prescritta una sorveglianza mirata delle popolazioni selvatiche a norma dell'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, della direttiva 2006/88/CE, il numero e la distribuzione geografica dei punti di campionamento sono determinati in modo da ottenere una copertura ragionevole dello Stato membro, della sua zona o del suo compartimento. I punti di campionamento devono inoltre essere rappresentativi dei diversi ecosistemi nei quali vivono le popolazioni selvatiche sensibili, ossia sistemi marini, estuari, sistemi fluviali e lacustri.

Se è prescritta una sorveglianza mirata delle popolazioni selvatiche a norma dell'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, della direttiva 2006/88/CE, i crostacei da prelevare devono essere selezionati secondo le seguenti modalità:

- i) negli estuari e nelle aree marine, devono essere selezionate una o più delle specie seguenti: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* oppure specie di gamberi peneidi, ossia *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Se tali specie non sono presenti, il campione deve essere rappresentativo di tutte le altre specie sensibili di decapodi presenti. Data l'ampia gamma di specie ospiti sensibili, gli esemplari ospiti possono essere scelti tra generi o famiglie dei decapodi nei quali la sensibilità è stata dimostrata per via sperimentale o in natura;
- ii) nei fiumi e nei laghi devono essere selezionate una o più delle specie seguenti: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* oppure *Orconectes limosus*. Se tali specie non sono presenti, il campione deve essere rappresentativo di tutte le altre specie sensibili di decapodi presenti. Data l'ampia gamma di specie ospiti sensibili, gli esemplari ospiti possono essere scelti tra generi o famiglie dei decapodi nei quali la sensibilità è stata dimostrata per via sperimentale o in natura;
- iii) se sono presenti crostacei deboli o morenti, il prelievo deve comprendere innanzitutto tali soggetti. Se tali crostacei non sono presenti, il prelievo deve comprendere crostacei di coorti di diverse taglie, in particolare esemplari giovani e adulti delle specie sensibili selezionate, rappresentati in modo proporzionale nel campione.

I.2. Prescrizioni specifiche per il riconoscimento dello stato sanitario di categoria I in relazione a WSD

I.2.1. Programmi di sorveglianza

- a) Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria III, come da allegato III, parte B, della direttiva 2006/88/CE, relativamente a WSD, può ottenere lo stato sanitario di categoria I in relazione a tale malattia elencata tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, di detta direttiva, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, risultano conformi alle prescrizioni di cui all'allegato V di detta direttiva e tutte le aziende, nonché, se prescritto dall'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, della direttiva 2006/88/CE, tutti i punti di campionamento di popolazioni selvatiche selezionati in conformità a tale punto, sono stati sottoposti al seguente programma di sorveglianza biennale, che comprende ispezioni sanitarie e il prelievo di campioni da sottoporre a prova.

Le aziende o i punti di campionamento devono essere stati sottoposti a ispezioni sanitarie e prelievo di campioni, per un periodo minimo di due anni consecutivi come indicato alla tabella 6.A della sezione II.

Durante detto periodo di due anni le prove di tutti i campioni, effettuate con i metodi diagnostici di cui al punto II.2, devono aver prodotto risultati negativi per l'infezione da WSD e deve essere stato escluso qualsiasi sospetto di WSD applicando i metodi diagnostici di cui al punto II.3.

- b) se, durante l'attuazione del programma di sorveglianza indicato alla lettera a), viene confermata l'infezione da virus WSS in un'azienda inclusa in detto programma di sorveglianza, e pertanto le viene revocato lo stato sanitario di categoria II, tale azienda può riottenere immediatamente il proprio stato sanitario di categoria II e continuare ad attuare il programma di sorveglianza per ottenere lo status di indenne da malattia senza attuare un programma di eradicazione come indicato al punto I.2.2 purché rispetti le seguenti condizioni:
 - i) è un'azienda continentale il cui stato sanitario relativamente a WSD è indipendente dallo stato sanitario relativamente a tale malattia elencata delle acque naturali circostanti, come da allegato V, parte II, punto 3, della direttiva 2006/88/CE;
 - ii) è stata svuotata, pulita, disinfettata e sottoposta al fermo degli impianti; la durata del fermo deve essere di almeno sei settimane;
 - iii) è stata ripopolata con crostacei provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente a WSD.

I.2.2. Programmi di eradicazione

I.2.2.1. Prescrizioni generali

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento, con stato sanitario di categoria V relativamente a WSD, può ottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a tale malattia elencata quando tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, siano state sottoposte almeno al seguente programma di eradicazione:

- a) le misure minime di lotta stabilite al capo V, sezione 4, della direttiva 2006/88/CE devono essere state effettivamente applicate e deve essere stata stabilita una zona di protezione, come previsto all'articolo 32, lettera b), di detta direttiva, che comprenda una zona riservata alla protezione e una zona di sorveglianza, in prossimità delle aziende ufficialmente dichiarate infette da WSD.

La zona di protezione deve essere stata definita in base ad un'analisi caso per caso, tenendo presenti i fattori agenti sul rischio di diffusione di WSD ai crostacei d'allevamento e selvatici, quali: il numero di morti, il tasso e la distribuzione della mortalità dei crostacei nelle aziende infette da WSD; la distanza delle aziende vicine e la loro densità; le aziende di contatto; le specie presenti nelle aziende; le pratiche di allevamento applicate nelle aziende infette e nelle aziende limitrofe; le condizioni idrodinamiche ed altri fattori di rilevanza epidemiologica individuati.

Per l'istituzione delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza si applicano le seguenti prescrizioni minime:

- i) deve essere istituita una zona riservata alla protezione nelle immediate vicinanze di un'azienda ufficialmente dichiarata infetta da WSD che deve corrispondere:
 - (1) nelle aree marine e degli estuari: a una zona circolare di raggio pari almeno ad un'escursione di marea o ad almeno 5 km se questa misura è superiore, con centro nell'azienda ufficialmente dichiarata infetta da WSD, oppure un'area equivalente determinata in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica; oppure
 - (2) nelle acque dolci: all'intero bacino idrografico dell'azienda ufficialmente dichiarata infetta da WSD; l'autorità competente può limitare l'estensione della zona riservata alla protezione a parti del bacino idrografico, purché non risulti compromessa la prevenzione della diffusione della WSD;
- ii) deve essere istituita una zona di sorveglianza all'esterno della zona riservata alla protezione e corrispondere:
 - (1) nelle aree marine: a una zona, circostante la zona riservata alla protezione, in cui le escursioni di marea si sovrappongono; oppure una zona, circostante la zona riservata alla protezione, compresa in un cerchio del raggio di 10 km dal centro della zona riservata alla protezione; oppure un'area equivalente determinata in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica; oppure
 - (2) nelle acque dolci: a una zona estesa, esterna alla zona riservata alla protezione istituita;
- b) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, all'interno della zona riservata alla protezione non dichiarata ufficialmente infetta da WSD, devono essere sottoposte ad un'indagine ufficiale che comprenda almeno gli elementi seguenti:
 - i) la raccolta di campioni da sottoporre a prova, di 10 crostacei, se sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con un'infezione da WSD, o di 150 crostacei, se non sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem*; e
 - ii) un controllo sanitario; nelle aziende per le quali le prove di cui al punto i) hanno prodotto risultati negativi, le ispezioni sanitarie devono continuare una volta al mese nella stagione in cui è probabile che la temperatura dell'acqua raggiunga il proprio livello massimo annuale, fino a che sia stata revocata la zona riservata alla protezione in conformità al punto I.2.2.1, lettera c);

- c) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da WSD devono essere svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti. La durata del periodo di fermo deve essere di almeno sei settimane. Quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette sono state svuotate, si applica un periodo di almeno tre settimane di fermo degli impianti sincronizzato. Il presente paragrafo si applica anche alle aziende nuove ufficialmente dichiarate infette durante l'attuazione del programma di eradicazione.

Quando viene effettuato il fermo degli impianti delle aziende dichiarate ufficialmente infette le zone riservate alla protezione vengono trasformate in zone di sorveglianza.

L'autorità competente può decidere di imporre lo svuotamento, la pulizia, la disinfezione e il fermo degli impianti in altre aziende all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite. La durata del fermo degli impianti è determinata dall'autorità competente in base ad una valutazione dei rischi caso per caso;

- d) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende sottoposte al fermo degli impianti all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite devono essere ripopolate:
- i) con crostacei provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente a WSD; oppure
 - ii) per un periodo transitorio fino al 31 dicembre 2020, con crostacei provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti che dispongono di un programma di sorveglianza di WSD approvato.

Si procede al ripopolamento solo quando tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da WSD sono state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti in conformità al punto I.2.2.1, lettera c).

- e) tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE, entro uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento incluso nel programma di eradicazione e, nei casi in cui è prescritta la sorveglianza delle popolazioni selvatiche, i punti di campionamento selezionati a norma dell'allegato V, parte I, punto 2, secondo comma, di detta direttiva, devono essere sottoposti successivamente almeno al programma di cui al punto I.2.1.

I.2.2.2. Prescrizioni per riottenere il riconoscimento dello status di indenne da malattia relativamente a WSD per i compartimenti continentali che comprendono una sola azienda precedentemente dichiarata indenne da WSD

Un compartimento continentale comprendente una sola azienda con stato sanitario di categoria I relativamente a WSD e il cui stato sanitario relativamente a tale malattia elencata è indipendente dalle acque naturali circostanti come stabilito all'allegato V, parte II, punto 3, della direttiva 2006/88/CE, e il cui stato sanitario di categoria I è stato revocato a norma dell'articolo 53, paragrafo 3, di detta direttiva, può riottenere lo stato sanitario di categoria I relativamente a WSD immediatamente dopo che l'autorità competente ha confermato che sono state soddisfatte le seguenti condizioni:

- a) l'azienda infetta da WSD è stata svuotata, pulita, disinfettata e sottoposta al fermo degli impianti; la durata del periodo di fermo deve essere stata di almeno sei settimane;
- b) l'azienda infetta da WSD deve essere stata ripopolata con crostacei provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I relativamente a WSD.

I.3. Prescrizioni specifiche per il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente a WSD (stato sanitario di categoria I)

Se è prescritta una sorveglianza mirata per il mantenimento dello stato sanitario di categoria I, a norma dell'articolo 52 della direttiva 2006/88/CE, tutte le aziende che detengono specie sensibili, elencate nell'allegato IV, parte II, di detta direttiva, entro lo Stato membro in questione, una sua zona o un suo compartimento, sono sottoposte a ispezioni sanitarie e campionamento in conformità alla tabella 6.B di cui alla sezione II, tenendo conto del rischio per l'azienda di contrarre la WSD.

Negli Stati membri o loro zone o compartimenti nei quali il numero delle aziende è limitato e la sorveglianza mirata in tali aziende non fornisce sufficienti dati epidemiologici i programmi di sorveglianza per il mantenimento dello status di indenne da malattia comprendono punti di campionamento selezionati come previsto dal punto I.1.

Tali punti di campionamento devono essere ispezionati e soggetti a campionamento a rotazione, coprendo il 50 % dei punti di campionamento ogni anno. Il campionamento deve essere effettuato in conformità alla tabella 6.B. di cui alla sezione II. I campioni devono essere selezionati, preparati ed esaminati in conformità ai metodi diagnostici e di campionamento di cui alla sezione II e gli esami di laboratorio devono aver prodotto risultati negativi per quanto riguarda l'agente della WSD.

È possibile mantenere lo status di indenne da malattia solo se tutti i campioni sottoposti a prova utilizzando i metodi diagnostici di cui al punto II.2 risultano negativi a WSD e se qualsiasi sospetto di WSD è stato escluso in conformità ai metodi di indagine ufficiale e diagnostici di cui al punto II.3.

I.4. Prescrizioni per la revoca delle misure di contenimento di cui all'articolo 39 della direttiva 2006/88/CE (passaggio dallo stato sanitario di categoria V allo stato di categoria III) relativamente alla WSD

Uno Stato membro, una sua zona o un suo compartimento con stato sanitario di categoria V relativamente a WSD può ottenere lo stato sanitario di categoria III relativamente a tale malattia elencata alle seguenti condizioni:

- a) sono state rispettate le prescrizioni di cui al punto I.2.2.1, lettere a), b) e c). Qualora il fermo dell'impianto non sia tecnicamente possibile, le aziende interessate saranno soggette ad una misura alternativa che fornisca garanzie quasi simili dell'eliminazione del virus ISA dall'ambiente dell'azienda;
- b) tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette e tutte le altre aziende soggette a fermo degli impianti o ad una misura alternativa a norma della lettera a) all'interno delle zone riservate alla protezione e di sorveglianza istituite sono state ripopolate con pesci provenienti da Stati membri, loro zone o compartimenti con uno stato sanitario di categoria I, II o III relativamente a WSD.
- c) il ripopolamento è stato effettuato solo dopo che tutte le aziende ufficialmente dichiarate infette da WSD siano state svuotate, pulite, disinfettate e sottoposte al fermo degli impianti o a misure alternative a norma della lettera a);
- d) non vi è stato nessun rilevamento di WSD durante il periodo di due anni successivo al completamento delle misure di cui alle lettere a) e b) e i sospetti manifestatisi durante questo periodo sono stati esclusi applicando le procedure di cui al punto II.3.

II. **Metodi diagnostici e di campionamento**

II.1. Campioni

I campioni di epidermide tegumentaria, dissezionati o contenuti nelle appendici locomotorie, nei pleopodi, nelle parti boccali o nelle branchie dell'animale sottoposto a prova sono fissati in etanolo al 95 % prima della preparazione dei campioni per l'analisi two-step PCR.

Si possono raccogliere altri campioni, fissati per istologia e microscopia elettronica a trasmissione, al fine di confermare i dati diagnostici ottenuti dall'analisi PCR.

II.2. Metodi diagnostici per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da WSD

Il metodo diagnostico da utilizzare per l'ottenimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente a WSD, seguendo i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui all'allegato II, parte 6, è l'analisi two-step PCR.

Qualora l'analisi two-step PCR dia un risultato positivo, questo va corroborato con sequenziamento dell'amplicon prima di attuare le prime misure di lotta di cui all'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE, se possibile, in concreto, mettendo in evidenza sintomi patognomici di WSD negli ospiti sensibili selezionati, mediante istologia e microscopia elettronica a trasmissione.

II.3. Indagini ufficiali e metodi diagnostici per escludere il sospetto o confermare la presenza dell'infezione da WSD

Quando è necessario confermare la presenza dell'infezione da WSD o escluderne il sospetto a norma dell'articolo 28 della direttiva 2006/88/CE, si devono applicare le seguenti procedure di ispezione, campionamento e prova:

- a) l'indagine ufficiale deve comprendere almeno un'ispezione sanitaria e il prelievo di un campione di 10 crostacei, se sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem* compatibili con un'infezione da WSD, o di 150 crostacei, se non sono stati riscontrati sintomi clinici o *post-mortem*. I campioni devono essere sottoposti a prova applicando i metodi diagnostici indicati al punto II.2 (*two-step PCR*);

- b) la presenza di WSD si considera confermata se un'analisi two-step PCR, seguita da sequenziamento, con l'applicazione dei metodi e delle procedure diagnostici particolareggiati di cui all'allegato II, parte 6, risulta positiva al virus WSS, e se negli ospiti selezionati sono presenti sintomi patognomnici di WSD.

Il sospetto di WSD può essere escluso se tale prova non rivela ulteriore evidenza della presenza di WSD.

Tabella 6.A

Programma di sorveglianza per Stati membri, zone e compartimenti per il periodo biennale di controllo che precede il riconoscimento dello status di indenne da malattia relativamente a WSD di cui al punto I.2.1.

	Numero di ispezioni cliniche all'anno	Numero di esami di laboratorio all'anno	Numero di crostacei nel campione
Aziende o punti di campionamento	1	1	150

Tabella 6.B

Programmi di sorveglianza per gli Stati membri, loro zone o compartimenti al fine di mantenere lo status di indenne da malattia relativamente a WSD di cui al punto I.3.

Livello di rischio	Numero di ispezioni sanitarie	Numero di esami di laboratorio	Numero di crostacei nel campione
Elevato	1 all'anno	1 ogni 2 anni	150
Medio	1 ogni 2 anni	1 ogni 2 anni	150
Basso	1 ogni 2 anni	1 ogni 4 anni	150

ALLEGATO II

METODI E PROCEDURE DIAGNOSTICI PARTICOLAREGGIATI

I. Introduzione

Il presente allegato stabilisce le procedure particolareggiate per i metodi diagnostici da usare per gli esami di laboratorio nel corso dei programmi di eradicazione e sorveglianza di cui all'allegato I della presente decisione e al fine di confermare o escludere la sospetta presenza delle seguenti malattie non esotiche elencate nell'allegato IV, parte II, della direttiva 2006/88/CE («malattie elencate») a norma dell'articolo 57, lettera b), di detta direttiva:

1.	Setticemia emorragica virale (VHS)	Parte 1
2.	Necrosi ematopoietica infettiva (IHN)	Parte 1
3.	Herpesvirus della carpa koi (KHVD)	Parte 2
4.	Anemia infettiva del salmone (ISA)	Parte 3
5.	Infezione da <i>Marteilia refringens</i>	Parte 4
6.	Infezione da <i>Bonamia ostreae</i>	Parte 5
7.	Malattia dei punti bianchi (WSD)	Parte 6

II. Definizioni

Ai fini del presente allegato per «terreno di trasporto» si intende un terreno di coltura cellulare con aggiunta di siero fetale bovino al 10 % e 200 I.U. di penicillina, 200 µg di streptomicina e 200 µg di kanamicina per millilitro, o con altri antibiotici di provata efficacia.

PARTE 1

METODI E PROCEDURE DIAGNOSTICI PARTICOLAREGGIATI PER LA SORVEGLIANZA E LA CONFERMA DI INFEZIONI DA IHN E VHS

I. Metodi e procedure diagnostici per la sorveglianza delle infezioni da VHS e IHN

Durante il campionamento e lo svolgimento di esami di laboratorio finalizzati all'ottenimento o al mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente a IHN o VHS, di cui all'allegato I, parte 1, sezione I, utilizzando i metodi diagnostici stabiliti in detto allegato, parte 1, punti II.1 e II.2, si applicano i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati esposti nei seguenti punti da I.1 a I.6.

I.1. Preparazione e spedizione dei campioni ittici

I.1.1. Tessuti per l'esame virologico su coltura cellulare

Prima della spedizione o del trasferimento dei campioni al laboratorio, si asportano dai pesci, con strumenti di dissezione sterili, frammenti degli organi da esaminare, che vengono posti in provette di plastica sterili contenenti terreno di trasporto.

La quantità di materiale ittico idonea per l'esame virologico su coltura cellulare e l'analisi RT-qPCR dipende dalla taglia del pesce. Quindi nel caso degli avannotti i tessuti da prelevare saranno il pesce intero (se il corpo misura in lunghezza fino a 4 cm), le viscere compreso il rene (se il corpo misura in lunghezza da 4 a 6 cm) oppure, nel caso di pesci di taglia superiore, il rene, la milza, il cuore e/o l'encefalo, nonché il fluido ovarico dei pesci riproduttori nel periodo della fregola.

In una provetta sterile contenente almeno 4 ml di terreno di trasporto si possono raccogliere fluido ovarico, liquido seminale o parti di organi provenienti da un massimo di 10 pesci, che costituiscono un campione composto da un solo pool. In ogni campione il tessuto deve pesare almeno 0,5 grammi (g).

L'esame virologico su coltura cellulare deve iniziare quanto prima, e comunque non più tardi di 48 ore dalla raccolta dei campioni. In casi eccezionali l'esame virologico può iniziare al massimo entro 72 ore dalla raccolta del materiale da esaminare, purché tale materiale sia protetto da terreno di trasporto e possano essere soddisfatti i requisiti di temperatura durante il trasporto.

I.1.2. Campioni per l'analisi con reazione a catena della polimerasi-trascrittasi inversa in tempo reale (RT-PCR o RT-qPCR)

I campioni devono essere prelevati dai pesci secondo la procedura descritta al punto I.1.1 con uno strumento sterile e immessi in una provetta di plastica sterile contenente terreno di trasporto. In una provetta si possono raccogliere tessuti prelevati da 10 pesci al massimo, che costituiscono un campione composto da un solo pool. Se però la quantità di inoculo è limitata, si possono usare tessuti provenienti da massimo cinque pesci. In alternativa si possono raccogliere i campioni in soluzioni stabilizzanti dell'RNA, ad esempio nella proporzione 0,2 g di tessuto/ml di soluzione secondo le raccomandazioni dei fabbricanti; ogni pesce deve però essere trattato individualmente e non va inserito in campioni composti da pool a motivo della piccola quantità di materiale da usare per l'estrazione.

Al laboratorio possono essere inviati anche pesci interi.

I.2. Spedizione dei campioni ittici

Le provette contenenti tessuti ittici in terreno di trasporto per la coltivazione cellulare o l'analisi RT-PCR/RT-qPCR vanno collocate in contenitori isolati, quali ad esempio scatole di polistirolo con pareti spesse, con sufficiente ghiaccio o altri agenti refrigeranti in modo da assicurare la bassa temperatura dei campioni durante il trasporto al laboratorio. Si deve però evitare che i campioni si congelino. La temperatura del campione durante il trasporto non deve mai superare i 10 °C e, all'arrivo, nel contenitore deve ancora trovarsi del ghiaccio oppure uno o più blocchi di refrigerazione devono essere ancora parzialmente o totalmente congelati.

Al laboratorio possono essere inviati anche pesci interi se durante il trasporto si possono soddisfare le condizioni di temperatura di cui al primo comma. I pesci interi devono essere avvolti in carta assorbente per essere poi spediti in sacchetti di plastica. Si possono anche inviare al laboratorio pesci vivi.

I.3. Raccolta di materiale diagnostico supplementare

Previo approvazione del laboratorio diagnostico, possono essere raccolti e preparati anche altri tessuti ittici in vista di ulteriori esami.

I.4. Preparazione dei campioni per l'esame su coltura cellulare e la RT-qPCR

I.4.1. Congelamento in casi eccezionali

In caso di difficoltà pratiche che rendano impossibile trattare i campioni entro 48 ore dalla raccolta dei tessuti è ammesso congelare i campioni tissutali nel terreno di trasporto a - 20 °C o a temperatura inferiore ed eseguire gli esami virologici entro 14 giorni. I tessuti devono però essere congelati e scongelati una sola volta prima dell'esame. È necessario annotare e conservare tutte le informazioni sul motivo del congelamento dei campioni tissutali.

I.4.2. Omogeneizzazione degli organi

In laboratorio, il tessuto contenuto nelle provette viene interamente omogeneizzato (con stomacher, miscelatore o mortaio e pestello con sabbia sterile) e quindi messo in sospensione nel terreno di trasporto originale.

Se il campione è costituito da un pesce intero di lunghezza inferiore a 4 cm, esso deve essere tritato con forbici o bisturi sterili previo asportato della parte del corpo situata dopo l'apertura anale. Se il campione è costituito da un pesce intero di lunghezza compresa tra 4 e 6 cm si prelevano le viscere compreso il rene. Se il campione è costituito da un pesce intero di lunghezza superiore a 6 cm, si prelevano campioni di tessuti secondo le modalità descritte al punto I.1. I campioni tissutali debbono essere tritati con forbici o bisturi sterili, omogeneizzati come descritto al primo comma e messi in sospensione nel terreno di trasporto.

Il rapporto finale tra materiale tissutale e terreno di trasporto deve essere corretto in laboratorio per risultare 1:10.

I.4.3. Centrifugazione dell'omogeneizzato

L'omogeneizzato è centrifugato in una centrifuga refrigerata a temperatura compresa tra 2 °C e 5 °C e sottoposto ad una accelerazione tra 2 000 e 4 000 × g per 15 minuti; il supernatante viene raccolto e può essere trattato per quattro ore a 15 °C o per una notte a temperatura compresa tra 4 e 8 °C con antibiotici. Se il campione è stato trasportato in terreno di trasporto si può omettere il trattamento del supernatante con antibiotici.

In caso di difficoltà pratiche, quali un guasto della stufa termostatica o problemi con le colture cellulari, che rendano impossibile inoculare le cellule entro 48 ore dalla raccolta dei campioni tissutali, è possibile congelare il supernatante a - 80 °C ed eseguire gli esami virologici entro 14 giorni.

Se il supernatante raccolto viene conservato a -80°C entro le 48 ore successive al campionamento, esso può essere riutilizzato una sola volta per l'esame virologico.

Prima dell'inoculazione delle cellule il supernatante viene miscelato con parti uguali di un gruppo di antisieri, opportunamente diluiti, dei sierotipi indigeni del virus della necrosi pancreatica infettiva (IPN) e il tutto viene incubato minimo un'ora a 15°C o massimo 18 ore a 4°C . Il titolo dell'antisiero deve essere di almeno 1:2 000 in una prova di neutralizzazione delle placche al 50 %.

Il trattamento di tutti gli inoculi con antisiero del virus dell'IPN serve a impedire che si sviluppino nelle colture cellulari inoculate effetti citopatogeni (CPE) provocati dal virus dell'IPN. Si riduce in tal modo la durata degli esami virologici, nonché il numero di casi in cui la comparsa di CPE dovrebbe essere considerata potenzialmente indicativa di virus della VHS o dell'IHN.

Se i campioni provengono da unità di produzione considerate indenni da IPN, si può omettere il trattamento degli inoculi con il relativo antisiero.

I.4.4. Preparazione dei campioni per i programmi di sorveglianza basati su analisi RT-PCR e RT-qPCR

Se i campioni sono stati raccolti in terreno di trasporto si segue la procedura indicata ai punti I.4.2 e I.4.3. Dopo la centrifugazione il supernatante viene raccolto e si estrae il DNA. Se non si procede ad esami ulteriori immediatamente dopo la centrifugazione i campioni sono immediatamente congelati a -20°C o a temperatura inferiore.

Per l'analisi dei tessuti ittici conservati in soluzione stabilizzante dell'RNA si procede alle seguenti operazioni supplementari entro i periodi di tempo indicati per i campioni conservati alle diverse temperature:

campioni conservati a 37°C : un giorno;

campioni conservati a 25°C : una settimana;

campioni conservati a 4°C : un mese;

campioni conservati a -20°C : senza limite di tempo.

I campioni composti da pool conservati in soluzione stabilizzante dell'RNA vanno trattati come campioni individuali conservati in soluzione stabilizzante dell'RNA. Per i campioni composti da pool conservati in soluzione stabilizzante dell'RNA il quantitativo del campione non deve superare quanto indicato nelle raccomandazioni del fabbricante per l'estrazione con kit per il DNA, come RNeasy Mini kits (Qiagen) o prodotti simili. Se il campione composto da pool contiene una quantità superiore, i kit di estrazione o i metodi devono essere adattati di conseguenza.

I campioni raccolti in soluzioni stabilizzanti dell'RNA non vanno usati per la coltura cellulare.

I.4.5. Campioni composti da pool per analisi RT-qPCR

Dato che i protocolli per RT-qPCR indicati hanno una sensibilità simile o superiore a quella dei metodi di coltura cellulare, è ammesso utilizzare per l'analisi PCR il supernatante proveniente da materiale tissutale omogeneizzato ottenuto da un campione composto da pool di organi (fino a 10 pesci) in terreno di coltura cellulare. Tuttavia, data la quantità molto inferiore di inoculo usata per l'analisi PCR al confronto con la coltura cellulare, tutti i tessuti ittici devono essere omogeneizzati attentamente prima di raccogliere il materiale per l'estrazione.

Si applica lo stesso principio anche se i campioni sono raccolti in soluzione stabilizzante dell'RNA. In tal caso però è spesso difficile raccogliere materiale rappresentativo che può provenire anche da 10 pesci in una sola provetta, per cui il numero di pesci per ogni campione composto da pool viene ridotto a un numero compreso tra 2 e 5.

I.5. Esame virologico su coltura cellulare

I.5.1. Colture cellulari e terreni

La linea cellulare BF-2 (fibroblasto del persico sole) o la linea cellulare RTG-2 (gonade di trota iridea) e cellule di *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) o di Fathead minnow (*pimephales promelas*) (FHM) sono coltivate a temperatura da 20 a 30°C in un terreno adatto, specificamente il terreno di coltura di Eagle (MEM) o sue modifiche, con aggiunta di siero fetale bovino al 10 % e di antibiotici a concentrazioni standard.

Se le cellule sono coltivate in fiale chiuse, il terreno deve essere tamponato con bicarbonato. Il terreno utilizzato per la coltura di cellule in unità aperte può essere tamponato con tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris-HCl) (23 mM) e bicarbonato di sodio (6 mM). Il pH deve essere di $7,6 \pm 0,2$.

Le colture cellulari da utilizzare per l'inoculazione con il materiale tissutale ittico devono essere fresche, normalmente, se possibile, monostrati di colture cellulari di un giorno; è comunque accettabile che abbiano da 4 a 48 ore. Le cellule devono essere in fase di crescita al momento dell'inoculazione.

I.5.2. Inoculazione delle colture cellulari

La sospensione di organi trattata con antibiotici deve essere inoculata nelle colture cellulari in due diluizioni, che sono la diluizione primaria e, in aggiunta, una diluizione 1:10 della precedente, che hanno come esito diluizioni finali del materiale tissutale in terreno di coltura cellulare rispettivamente di 1:100 e 1:1 000, per prevenire interferenze omologhe. Come indicato al punto I.5.1 devono essere inoculate almeno due linee cellulari. Il rapporto tra la dimensione dell'inoculo e il volume del terreno di coltura cellulare dovrebbe approssimarsi a 1:10.

Per ogni diluizione ed ogni linea cellulare si utilizza una superficie cellulare minima di circa 2 cm², corrispondente ad un pozzetto su una piastra di coltura cellulare di 24 pozzetti. Si utilizzano ove possibile piastre per colture cellulari.

I.5.3. Incubazione delle colture cellulari

Le colture cellulari inoculate sono incubate alla temperatura di 15 °C per 7-10 giorni. Se il colore del terreno di coltura cellulare vira dal rosso al giallo e indica quindi una acidificazione del terreno, occorre regolare il pH con una soluzione di bicarbonato sterile o sostanze equivalenti, in modo da garantire la sensibilità delle cellule all'infezione virale.

Almeno una volta ogni sei mesi, oppure quando si sospetta una ridotta sensibilità delle cellule, si procede alla titolazione delle scorte congelate dei virus della VHS e dell'IHN per controllare la sensibilità delle colture cellulari all'infezione. Si deve utilizzare ove possibile la procedura di cui alla sezione III.

I.5.4. Microscopia

Le colture cellulari inoculate devono essere controllate regolarmente, almeno 3 volte per settimana, per individuare la comparsa di CPE mediante ingrandimento di 40-150 ×. Qualora si constati chiaramente la presenza di CPE, si inizia immediatamente la procedura di identificazione del virus secondo quanto disposto al punto I.6.

I.5.5. Subcoltivazione

Se dopo 7-10 giorni di incubazione primaria non si sono sviluppati CPE, si effettua una subcoltivazione di cellule colturali fresche, utilizzando una superficie cellulare simile a quella della coltura principale.

7-10 giorni dopo l'inoculazione vengono inserite in un pool, in base alla linea cellulare, alcune aliquote del terreno (supernatante) di tutte le colture o tutti i pozzetti che costituiscono la coltura primaria. Tali pool vengono successivamente inoculati in colture cellulari omologhe non diluite e diluite in proporzione 1:10 (che danno come esito diluizioni finali del supernatante rispettivamente di 1:10 e 1:100) come descritto al punto I.5.2. Alternativamente si possono inoculare aliquote del 10 % del terreno che costituisce la coltura primaria direttamente in un pozzetto contenente una coltura cellulare fresca (subcoltivazione da pozzetto a pozzetto). L'inoculazione può essere preceduta da preincubazione delle diluizioni con l'antisiero del virus IPN, ad una diluizione adeguata come descritto al punto I.4.3.

Le colture inoculate vengono poi incubate per 7-10 giorni alla temperatura di 15 °C, effettuando le osservazioni di cui al punto I.5.4.

Se nei primi 3 giorni di incubazione si sviluppano CPE tossici, si deve eseguire in quella fase una subcoltivazione, ma le cellule devono essere in tal caso incubate per 7 giorni e nuovamente subcoltivate con ulteriore incubazione per altri 7 giorni. Se si sviluppano CPE tossici dopo 3 giorni, le cellule devono essere subcoltivate una volta e incubate per un totale di 14 giorni dall'inoculazione primaria. Negli ultimi 7 giorni di incubazione non deve emergere prova di tossicità.

Se, nonostante il trattamento con antibiotici, si verifica una contaminazione batterica, la subcoltivazione deve essere preceduta da centrifugazione del supernatante (da 2 000 a 4 000 × g) per 15-30 minuti a 2-5 °C e/o da filtraggio del supernatante su filtro di 0,45 µm (membrana a basso assorbimento proteico), o entrambi. Inoltre la subcoltivazione deve seguire le procedure già descritte in caso di CPE tossici al quarto comma del presente punto.

Se non si manifestano CPE la prova può essere dichiarata negativa.

I.6. Identificazione del virus

Se in una coltura cellulare sono stati osservati CPE, il terreno (supernatante) viene raccolto ed esaminato mediante una o più delle seguenti tecniche: saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), immunofluorescenza (IF), neutralizzazione, analisi RT-PCR o RT-qPCR. Se le prove non hanno permesso un'identificazione definitiva del virus entro una settimana, il supernatante deve essere inviato, per l'identificazione immediata, al laboratorio nazionale di riferimento o al laboratorio dell'UE di riferimento per le malattie dei pesci di cui all'allegato VI della direttiva 2006/88/CE.

I.6.1. ELISA

Si deve eseguire un saggio ELISA sandwich per individuare l'isolato del virus. Le piastre per microtitolazione vanno rivestite con 50 µl/pozzetto (0,9 pg) di una soluzione di immunoglobuline (Ig) di sieri anti-virus dell'IHN o anti-virus della VHS di coniglio purificate con proteina A, di qualità riconosciuta, diluite in un tampone di carbonato (pH 9,6) contenente 15 mM di sodio azide e incubate a 4 °C per un periodo compreso tra 18 ore e 2 settimane.

Su una piastra di diluizione ogni campione, contenente 1 % di Triton X-100 e i controlli positivi, deve essere diluito con la soluzione tampone [ossia una soluzione salina tamponata al fosfato (PBS)-T-BSA, 1 % BSA] a 4 diverse diluizioni: non diluita, 1:4, 1:16, 1:64. Le piastre per saggio ELISA devono essere lavate in PBS contenente 0,05 % di Tween 20 (PBS-T) e 50 µl di ogni diluizione vanno trasferiti dalla piastra di diluizione alla piastra ELISA lavata e rivestita.

Le piastre ELISA devono poi essere incubate 30 minuti a 37 °C. Si devono poi lavare e incubare 30 minuti a 37 °C in presenza di anticorpi monoclonali specifici (ossia MAb IP5B11 per l'identificazione del virus della VHS e Hyb 136-3 per il virus dell'IHN). 50 µl di anticorpi di coniglio antitopo coniugati a perossidasi di rafano (HRP) diluiti a 1:1 000 in PBS-T-BSA sono trasferiti sulla piastra ELISA.

Infine, dopo un nuovo lavaggio, le reazioni sono avviate dall'aggiunta di 50 µl di ortofenilendiammina (OPD) per pozzetto. Le piastre ELISA devono essere incubate per 20 minuti a temperatura ambiente al buio, e la reazione deve essere fermata aggiungendo 100 µl di 0,5 M H₂SO₄ per pozzetto.

L'assorbanza va monitorata ad una lunghezza d'onda di 492 e 620 nm in un lettore ELISA. I campioni sono dichiarati positivi o negativi dopo aver confrontato i risultati del saggio con i valori di assorbanza dei controlli negativi e positivi. In linea generale i campioni con assorbanza totale (A) < 0,5 per materiale non diluito sono considerati negativi, i campioni i cui valori A sono compresi tra 0,5 e 1,0 sono considerati sospetti e i campioni con valori A > 1,0 sono considerati positivi.

Si possono utilizzare altre versioni del saggio ELISA di analoga provata efficacia in sostituzione della versione qui indicata.

I.6.2. Immunofluorescenza (IF)

L'identificazione degli agenti patogeni elencati virus della VHS e virus dell'IHN si effettua infettando le cellule in piastre «Black» a 96 pozzetti, piastre convenzionali a 24 pozzetti o piastre a coprivetrino a 24 pozzetti. Se il virus dell'IHN o della VHS o entrambi sono individuati infettando cellule su vetrini si applica il protocollo seguente:

- i vetrini sono seminati con cellule ad una densità che conduca ad una confluenza del 60-90 % dopo 24 ore di coltivazione. Si utilizzano a tale scopo ove possibile cellule EPC a causa della loro forte aderenza alle superfici vetrose, ma si possono usare anche altre linee cellulari, ad esempio BF-2, RTG-2 o FHM. 150 µl di supernatante di coltura cellulare a due diluizioni diverse (1:10 e 1:1 000) sono inoculati in due esemplari su colture monostrato di un giorno e incubati a 15 °C per 24 ore;
- si deve rimuovere successivamente il terreno di coltura cellulare e i monostrati di cellule infette devono essere fissati con 0,5 ml di soluzione acquosa di acetone ghiacciata (80 % vol:vol). La fissazione avviene sotto cappa da laboratorio per 15 minuti a temperatura ambiente, poi la soluzione di acetone è rimossa e i vetrini asciugati all'aria per almeno 30 minuti. A questo punto le piastre devono essere esaminate immediatamente o conservate a - 20 °C per essere usate in seguito;
- gli anticorpi monoclonali specifici (ossia MAb IP5B11 per il virus della VHS e Hyb 136-3 per il virus dell'IHN) devono essere diluiti in 0,01 M di PBST, con pH 7,2, alla diluizione raccomandata dal fornitore degli anticorpi monoclonali; da 50 a 100 µl per pozzetto vengono aggiunti al monostrato fissato, e le piastre vengono poi incubate per un'ora a 37 °C in una camera umida;

- d) i vetrini sono lavati delicatamente tre volte con PBS contenente 0,05 % Tween-20 (PBS-T), e il tampone viene rimosso completamente dopo l'ultimo risciacquo. Le cellule devono successivamente essere incubate per un'ora a 37 °C con anticorpi anti-immunoglobulina di topo coniugati a isotiocianato di fluoresceina (FITC) o tetrametilrodamina-5-(e 6-)isotiocianato (TRITC), utilizzati come anticorpi primari, diluiti secondo le istruzioni del fornitore prima di ripetere il lavaggio in PBS-T, seguito da asciugatura. Le colture colorate devono essere montate su vetrini con una soluzione fisiologica di glicerolo ed esaminate sotto luce ultravioletta incidente, utilizzando oculari da 10 o da 12 ingrandimenti ed obiettivi da 25 o da 40 con aperture rispettivamente > 0,7 e > 1,3.

In alternativa, sono ammesse altre tecniche di IF (per quanto riguarda le colture cellulari, la fissazione e gli anticorpi di riferimento) purché di analoga provata efficacia.

I.6.3. Neutralizzazione

Le cellule presenti nel supernatante raccolto devono essere eliminate per centrifugazione (tra 2 000 e 4 000 × g) o per filtraggio su membrana (0,45 µm) con membrana a basso assorbimento proteico e il supernatante deve essere diluito nelle proporzioni 1:100 e 1:10 000 nel terreno di coltura cellulare.

Alcune aliquote di almeno due diluizioni del supernatante sono mescolate e inoculate per 60 minuti a 15 °C separatamente con aliquote uguali delle seguenti soluzioni:

- a) siero contenente anticorpo specifico del gruppo contro il virus della VHS ad una diluizione di 1:50 (vol:vol);
- b) siero contenente anticorpo specifico del gruppo contro il virus dell'IHN ad una diluizione di 1:50 (vol:vol);
- c) gruppo di antisieri dei sierotipi indigeni del virus dell'IPN ad una diluizione di 1:50 (vol:vol);
- d) solo terreno (controllo positivo).

Almeno due colture cellulari devono essere inoculate con 50 µl ciascuna del miscuglio supernatante-siero di ogni virus e poi incubate a 15 °C. L'apparizione di CPE deve essere osservata come descritto al punto I.5.4.

Ceppi e isolati del virus della VHS che non reagiscono al test di neutralizzazione devono essere identificati con IF o con saggio ELISA

In alternativa sono ammessi altri test di neutralizzazione, purché di analoga provata efficacia.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Preparazione dell'RNA virale

Ogni manipolazione dell'RNA deve avvenire su ghiaccio utilizzando dei guanti.

L'RNA va purificato con il metodo fenolo-cloroformio o per affinità mediante colonnine, secondo le istruzioni del fabbricante. Si possono utilizzare kit disponibili in commercio di estrazione dell'RNA tali da produrre RNA di alta qualità, adatto all'uso con i protocolli RT-PCR descritti in dettaglio più oltre.

L'RNA va rimesso in sospensione in acqua distillata priva di RNAsi (ossia acqua trattata con pirocarbonato di dietile a 0,1 %) o un tampone di eluizione idoneo.

I.6.4.2. RT-PCR

Per la rilevazione del virus dell'IHN sono utilizzati i primer seguenti:

primer forward 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3';

primer reverse 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Si utilizzano i cicli seguenti (RT-PCR a una fase): 1 ciclo: 50 °C per 30 minuti; 1°Ciclo: 95 °C per 2 minuti; 30 cicli: 95 °C per 30 secondi, 50 °C per 30 secondi, 72 °C per 60 secondi; 1 Ciclo: 72 °C per 7 minuti e macerare a 4 °C.

Per la rilevazione del virus della VHS sono utilizzati i primer seguenti:

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

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

Si utilizzano i cicli seguenti (RT-PCR a una fase): 50 °C per 30 minuti, 95 °C per 15 minuti, 35 cicli a 94 °C per 30 secondi, 55 °C per 30 secondi, e 68 °C per 60 secondi. La reazione va poi mantenuta a 68 °C per 7 minuti.

La quantità e la specificità delle reazioni di RT-PCR devono essere valutate con elettroforesi su gel di agarosio all'1,5 % con bromuro di etidio e osservate con transilluminazione UV. Si può osservare un amplicon di PCR di 693 coppie di basi (bp) per il virus dell'IHN. Per il virus della VHS la dimensione è di 505 coppie di basi.

I risultati della PCR possono variare in funzione delle condizioni in cui si utilizza tale tecnica, ossia può rendersi necessaria un'ottimizzazione dei protocolli termici in funzione del termociclatore utilizzato. Possono inoltre presentarsi falsi positivi a causa di un errato appaiamento (annealing) del primer o di contaminazione in laboratorio. Si devono quindi prevedere idonei controlli positivi e negativi e amplicon a sequenza positiva e negativa per evitare dubbi. Per i primer del virus della VHS è prescritta particolare attenzione quando si utilizzano cellule BF-2 in quanto i primer possono reagire con il DNA o l'RNA della linea cellulare e produrre falsi positivi di dimensioni simili. Se si sottopone a prova un supernatante ottenuto da cellule BF-2 tutti i frammenti amplificati con PCR devono essere sequenziati.

I.6.4.3. Rilevamento del virus della VHS mediante RT-qPCR

Per il virus della VHS si deve eseguire l'amplificazione usando i primer e la sonda qui indicati:

primer forward: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3';

primer reverse: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3';

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

RT-qPCR a una fase:

Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. Successione dei cicli: 50 °C per 30 minuti, 95 °C per 15 minuti, 40 cicli a 94 °C per 15 secondi, 60 °C per 40 secondi, e 72 °C per 20 secondi; da adattare se necessario. In alternativa sono ammesse altre versioni dei saggi RT-PCR o RT-qPCR, purché di analoga provata efficacia.

I.6.4.4. Rilevamento del virus dell'IHN mediante RT-qPCR

Per il virus dell'IHN si deve eseguire l'amplificazione usando i primer e la sonda qui indicati:

primer forward: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3';

primer reverse: 5'-TTCTTTGCGGCTTGTTGA — 3';

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

Two-step RT-qPCR:

Poiché l'analisi si fonda su un'amplificazione in due fasi è necessario prestare particolare attenzione nel manipolare le provette tra una reazione e l'altra in modo da impedire la contaminazione.

Successione dei cicli (dopo la fase RT): 50 °C per 2 minuti, 95 °C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 1 minuto; da adattare se necessario.

In alternativa sono ammesse altre versioni dei saggi RT-PCR o RT-qPCR, purché di analoga provata efficacia.

II. **Metodi e procedure diagnostici particolareggiati per confermare o escludere il sospetto di VHS o IHN o entrambe nei casi sospetti**

Quando è prescritto un esame di laboratorio per confermare o escludere la presenza di IHN o VHS o entrambe a norma dell'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE usando i metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 1, punto II.3, si applicano i seguenti metodi e procedure diagnostici particolareggiati:

- isolamento convenzionale del virus seguito da sua identificazione sierologica, immunochimica o molecolare;
- rilevamento del virus attraverso RT-PCR o RT-qPCR;
- altre tecniche diagnostiche quali IFAT, ELISA, RT-PCR, immunoistochimica.

- II.1. Isolamento convenzionale del virus e sua successiva identificazione
 - II.1.1. Selezione dei campioni

Per l'esame si selezionano almeno 10 pesci che presentino sintomi clinici di IHN o VHS.
 - II.1.2. Preparazione e spedizione dei campioni ittici

La preparazione e la spedizione per l'isolamento convenzionale del virus seguono i metodi e le procedure di cui al punto I.2.
 - II.1.3. Raccolta di materiale diagnostico supplementare

La raccolta di materiale diagnostico supplementare per l'isolamento convenzionale del virus segue i metodi e le procedure di cui al punto I.3.
 - II.1.4. Preparazione dei campioni per l'esame su coltura cellulare

La preparazione dei campioni per l'esame su coltura cellulare per l'isolamento convenzionale del virus segue i metodi e le procedure di cui al punto I.4.
 - II.1.5. Esame virologico su coltura cellulare

L'esame virologico per l'isolamento convenzionale del virus segue i metodi e le procedure di cui al punto I.5.
 - II.1.6. Identificazione del virus

L'esame virologico per l'isolamento convenzionale del virus segue i metodi e le procedure di cui al punto I.6.
- II.2. Rilevamento del virus attraverso RT-qPCR
 - II.2.1. Selezione dei campioni

La selezione dei campioni per il rilevamento del virus attraverso RT-qPCR segue i metodi e le procedure di cui al punto I.1.2.
 - II.2.2. Preparazione e spedizione dei campioni ittici

La preparazione e la spedizione per il rilevamento del virus attraverso RT-qPCR seguono i metodi e le procedure di cui al punto I.2.
 - II.2.3. Raccolta di materiale diagnostico supplementare

La raccolta di materiale diagnostico supplementare per il rilevamento del virus attraverso RT-qPCR segue i metodi e le procedure di cui al punto I.3.
 - II.2.4. Preparazione dei campioni per RT-qPCR

La preparazione dei campioni per il rilevamento del virus attraverso RT-qPCR segue i metodi e le procedure di cui al punto I.6.4.1.
 - II.2.5. RT-qPCR.

Il rilevamento del virus attraverso RT-qPCR segue i metodi e le procedure di cui ai punti I.6.4.1., I.6.4.3. e I.6.4.4.
- II.3. Altre tecniche diagnostiche

Il supernatante, preparato come descritto al punto I.4.3, può essere sottoposto a saggio ELISA, prova di immunofluorescenza indiretta (IFAT) o RT-PCR come indicato rispettivamente ai punti I.6.1, I.6.2 o I.6.4. Il materiale tissutale può essere sottoposto ad esame con altre tecniche diagnostiche quali IFAT su sezioni congelate oppure immunoistochimica su materiale tissutale fissato in formalina. Queste tecniche rapide vanno integrate con un'indagine virologica come da punto II, lettera a), o punto II, lettera b), entro le 48 ore successive alla raccolta dei campioni, qualora:

 - a) si ottenga un risultato negativo oppure
 - b) si ottenga un risultato positivo a partire da materiale che rappresenta il primo caso di IHN o VHS.

III. Procedura di titolazione per verificare la sensibilità delle colture cellulari all'infezione

Quando si effettua la titolazione per verificare la sensibilità delle colture cellulari all'infezione, come da punto I.5.3, si devono seguire le procedure indicate ai paragrafi successivi.

Si utilizzano almeno due isolati di virus della VHS e un isolato di virus dell'IHN. Gli isolati devono rappresentare il principale gruppo di virus presenti nell'Unione europea ossia, per il virus della VHS, un isolato patogeno di trota iridea di acqua dolce e un isolato patogeno marino di rombo e, per il virus dell'IHN, un ceppo patogeno europeo di trota iridea. Occorre utilizzare isolati ben definiti provenienti dagli Stati membri. I lotti di virus sono propagati con un basso numero di passaggi cellulari in fiasche di coltura su cellule BF-2 o RTG-2 per il virus della VHS e su cellule EPC o FHM per il virus dell'IHN. Si utilizza un terreno di coltura cellulare con almeno il 10 % di siero. Per l'inoculazione si ricorre a una MOI (molteplicità dell'infezione) bassa (< 1).

Raggiunto l'effetto citopatico totale, il virus è raccolto centrifugando il supernatante della coltura cellulare a $2\,000 \times g$ per 15 minuti e poi sterilizzato mediante filtraggio su membrana di $0,45\ \mu\text{m}$ e distribuito in provette criogeniche etichettate. Il virus è tenuto alla temperatura di $-80\ ^\circ\text{C}$.

Una settimana dopo il congelamento tre fiale per ogni virus, con identico contenuto virale, sono scongelate sotto acqua fredda e titolate sulle corrispondenti linee cellulari. Il virus è scongelato e titolato almeno ogni sei mesi, oppure qualora si sospetti che la sensibilità delle linee cellulari sia diminuita.

Le procedure di titolazione devono essere annotate dettagliatamente ed occorre seguire la stessa procedura ogni volta.

La titolazione per diluizione limite include almeno sei repliche in ogni fase di diluizione. I titoli sono messi a confronto con quelli ottenuti in precedenza. Se il titolo di uno dei tre isolati di virus diminuisce di un fattore di almeno 2 log rispetto al titolo iniziale, le linee cellulari non possono più essere utilizzate a fini di sorveglianza.

Qualora nel laboratorio siano detenute varie linee cellulari, ciascuna è esaminata separatamente.

I verbali di laboratorio sono conservati per almeno 10 anni.

PARTE 2

METODI E PROCEDURE DIAGNOSTICI PARTICOLAREGGIATI PER LA SORVEGLIANZA E LA CONFERMA DELLA PRESENZA DI HERPESVIRUS DELLA CARPA KOI (KHVD)

I. Metodi e procedure diagnostici particolareggiati per confermare la presenza di KHVD o escluderne il sospetto

Quando è prescritto un esame di laboratorio per confermare la presenza di KHVD o escluderne il sospetto a norma dell'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE usando i metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 2, sezione III, si applicano i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui ai punti da I.1 a I.2 della presente parte.

I.1. Preparazione dei campioni ittici

A fini diagnostici i pesci (spediti vivi oppure soppressi e imballati separatamente in contenitori asettici sigillati), o, in alternativa, gli organi o frammenti di organi congelati, conservati in etanolo da 80 % ad assoluto o terreno di trasporto virale (per essere trattati entro 48 ore dalla raccolta) possono essere utilizzati per prove basate su PCR classica o su qPCR.

Per il rilevamento dell'herpesvirus della carpa koi si raccolgono branchie e rene; in aggiunta, si possono inserire in un altro campione distinto milza, encefalo e intestino. Nei casi di infezione acuta si possono inserire in un pool materiali tissutali provenienti da massimo cinque pesci.

Si possono inoltre utilizzare in alcuni casi campioni non letali quali sangue, tampone o biopsia delle branchie, prelievi di muco (e quindi anche pesci di grande valore possono essere utilizzati qualora si sospetti la presenza di KHVD).

I.1.1. Estrazione del DNA

Il DNA è estratto seguendo le procedure standard.

Si possono utilizzare i kit di estrazione del DNA disponibili in commercio che producono DNA di alta qualità utilizzabile nei protocolli di cui al punto I.2.

I.2. Rilevamento e identificazione dell'agente infettivo con metodi basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)

I.2.1. Rilevamento dell'infezione da KHV mediante qPCR

Per il rilevamento di KHV mediante qPCR si applica il protocollo seguente:

Primer forward (KHV-86f): 5'- GACGCCGAGACCTTGTG -3';

Primer reverse (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTGCCTTGTT -3';

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

Successione dei cicli: un ciclo di 95 °C per 15 minuti, seguito da 40 cicli a 94 °C per 15 secondi e 60 °C per 60 secondi. Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. In alternativa sono ammesse altre versioni di qPCR, purché di analoga provata efficacia.

I.2.2. Rilevamento di KHV mediante qPCR convenzionale

Si deve utilizzare il protocollo descritto al presente punto, che prende di mira il gene del KHV che codifica per la timina chinasi (TK). Si possono però utilizzare in alternativa altri protocolli PCR di analoga provata sensibilità e specificità.

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

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

Successione dei cicli: un ciclo di 95 °C per 5 minuti seguito da 35 cicli di 95 °C per 30 secondi, 52 °C per 30 secondi, 72 °C per un minuto e un ciclo di 72 °C per 10 minuti. La dimensione del prodotto dovrebbe essere di 409 coppie di basi (bp).

I risultati della PCR possono variare in funzione delle condizioni in cui si utilizza tale tecnica, ossia può rendersi necessaria un'ottimizzazione dei protocolli termici in funzione del termociclature utilizzato. Possono inoltre presentarsi falsi positivi a causa di un errato appaiamento (annealing) del primer o di contaminazione. Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. In alternativa sono ammesse altre versioni di PCR, purché di analoga provata efficacia.

Il primo rilevamento in una zona deve essere confermato mediante sequenziamento o inviato per l'identificazione immediata ad un laboratorio nazionale di riferimento o al laboratorio dell'UE di riferimento per le malattie dei pesci di cui all'allegato VI della direttiva 2006/88/CE.

II. **Metodi e procedure diagnostici particolareggiati per la sorveglianza dell'infezione da KHV**

Durante il campionamento e lo svolgimento di esami di laboratorio finalizzati all'ottenimento o al mantenimento dello status di indenne da malattia relativamente a KHVD di cui all'allegato I, parte 2, sezione I, usando i metodi diagnostici stabiliti in detto allegato, parte 2, sezione II o III, si applicano i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati esposti nei punti II.1 e II.2 della presente parte.

II.1. Preparazione dei campioni ittici

Se possibile sono campionati pesci che sono stati tenuti per un periodo prolungato entro la gamma di temperature favorevole allo sviluppo della malattia, ossia da due a tre settimane tra 15 °C e 26 °C. Se possibile i campioni sono raccolti tra 24 ore e al massimo 72 ore dopo che sono state eseguite pratiche di gestione che possono aver riattivato il virus nei pesci portatori, quali la cattura a rete o il trasporto, in modo da aumentare la probabilità di rilevamento del virus.

Ai fini della sorveglianza dell'infezione da KHV i pesci possono essere spediti vivi o soppressi e imballati separatamente in contenitori asettici sigillati, o, in alternativa, possono essere utilizzati organi o frammenti di organi congelati, conservati in alcool di gradazione da 80 a 100 % o in terreno di trasporto virale (per essere trattati entro 48 ore dalla raccolta) per prove basate sulla PCR. Per la sorveglianza dell'infezione da KHV si raccolgono tessuti di branchie e di rene.

Ai fini della sorveglianza dell'infezione da KHV se possibile si evitano i campioni in pool. Se ciò non è possibile è ammesso inserire in un pool materiale tissutale prelevato da due pesci al massimo. I campioni di dimensioni maggiori devono essere omogeneizzati con mortaio e pestello o stomacher, e i sottocampioni per l'estrazione del DNA devono essere prelevati prima della chiarificazione. In alternativa si possono raccogliere sottocampioni da ogni tessuto compreso nel campione, per collocarli in provette di lisi.

II.1.1. Estrazione del DNA

Il DNA è estratto seguendo le procedure standard. Si possono utilizzare i kit di estrazione del DNA disponibili in commercio che producono DNA di alta qualità utilizzabile nei protocolli di PCR di cui al punto II.2.

Il rapporto tessuto/terreno ammissibile è di 1:9 p/v. Devono essere sottoposti a prova da 20 a 25 mg di materiale tissutale.

II.2. Sorveglianza dell'infezione da KHV con metodi basati sulla PCR

Per la sorveglianza dell'infezione da KHV si usa la qPCR. Se appaiono campioni positivi in una zona che non era stata confermata positiva in precedenza, i risultati delle prove devono essere confermati:

a) mediante sequenziamento di un prodotto ottenuto per PCR o *nested* PCR, ricavato dai campioni.

La sequenza di consenso pura ottenuta deve coincidere (almeno al 98 %) con le sequenze di riferimento;

b) in alternativa, i campioni possono essere inviati per conferma ad un laboratorio nazionale di riferimento.

II.2.1. Rilevamento dell'infezione da KHV mediante qPCR

Si applica il protocollo di qPCR seguente:

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

Primer reverse (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTGCCTTGTT -3';

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

Successione dei cicli: un ciclo di 95 °C per 15 minuti, seguito da 50 cicli a 94 °C per 15 secondi e 60 °C per 60 secondi.

I risultati della PCR possono variare in funzione delle condizioni in cui si utilizza tale tecnica, ossia può rendersi necessaria un'ottimizzazione dei protocolli termici in funzione del termociclatore utilizzato. Possono inoltre presentarsi falsi positivi a causa di un errato appaiamento (annealing) del primer o di contaminazione in laboratorio. Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. In alternativa sono ammesse altre versioni di qPCR, purché di analoga provata efficacia.

II.2.2. Conferma del rilevamento dell'infezione da KHV con PCR classica

Per confermare la presenza dell'infezione da KHV si usa la *nested* PCR generica descritta nella seguente tabella 2.1, seguita dal sequenziamento del prodotto amplificato.

Tabella 2.1.

Primer e successioni della prova con *nested* PCR mirata a tutti gli herpesvirus dei ciprinidi (CyHV-1, CyHV-2 e CyHV-3).

Nome del primer	Sequenza	Successione dei cicli	Dimensioni del prodotto
CyHVpol-forward	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	Prima fase della PCR	362 bp
CyHVpol-reverse	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'	1 ciclo: 95 °C per 2 minuti; 40 cicli: 95 °C per 30 secondi 55 °C per 30 secondi 72 °C per 45 secondi 1 ciclo: 72 °C per 10 minuti;	

Nome del primer	Sequenza	Successione dei cicli	Dimensioni del prodotto
CyHVpol-internal forward	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	Seconda fase della PCR	339 bp
CyHVpol-internal reverse	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3'	1 ciclo: 95 °C per 2 minuti; 40 cicli: 95 °C per 30 secondi 55 °C per 30 secondi 72 °C per 45 secondi 1 ciclo: 72 °C per 10 minuti;	

I risultati della PCR possono variare in funzione delle condizioni in cui si utilizza tale tecnica, ossia può rendersi necessaria un'ottimizzazione dei protocolli termici in funzione del termociclatore utilizzato. Possono inoltre presentarsi falsi positivi a causa di un errato appaiamento (annealing) del primer o di contaminazione in laboratorio. Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. In alternativa sono ammesse altre versioni di PCR, purché di analoga provata efficacia.

Il sequenziamento può essere effettuato dal laboratorio o da società esterne specializzate nel sequenziamento. I risultati del sequenziamento sono analizzati allineando le sequenze con le sequenze note di riferimento del KHV (numeri di accesso a Gen Bank AP008984, DQ657948 e DQ177346). La sequenza di consenso pura ottenuta deve coincidere (almeno al 98 %) con tali sequenze di riferimento.

PARTE 3

METODI E PROCEDURE DIAGNOSTICI PARTICOLAREGGIATI PER SORVEGLIANZA ED ERADICAZIONE DELL'ANEMIA INFETTIVA DEL SALMONE (ISA)

I. Procedure di campionamento per la sorveglianza e la lotta all'ISA

Quando si effettuano il campionamento e gli esami di laboratorio ai fini della sorveglianza o nel contesto di programmi di eradicazione di cui all'allegato I, parte 3, oppure per confermare o escludere la presenza dell'ISA a norma dell'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE, si applicano i metodi e le procedure particolareggiati di cui ai punti I.1, I.2 e I.3 della presente sezione.

I.1. Preparazione dei campioni ittici

Ai fini degli esami di laboratorio eseguiti per accertare la presenza dell'ISA, se possibile si evita di raggruppare i campioni di pesce in pool. Ai fini della sorveglianza dell'ISA invece è ammesso formare pool di campioni da 2 a 5 pesci.

Per l'analisi con reazione a catena della polimerasi-trascrittasi inversa (RT-PCR) i campioni sono prelevati da tutti i pesci raccolti. Con uno strumento sterile si asporta dal pesce un frammento di rene medio, che viene posto in una provetta da microcentrifuga contenente un ml di soluzione di conservazione dell'RNA di provata efficacia. In una provetta contenente la soluzione di trasporto si possono raccogliere i tessuti prelevati da cinque pesci al massimo, che costituiscono un pool. Il peso del tessuto di un campione è di 0,5 g. Se i pesci sono troppo piccoli per ottenere un campione del peso prescritto, possono essere prelevati, frammenti di rene, cuore, milza, fegato o cieco pilorico (in quest'ordine di preferenza) per raggiungere il peso di 0,5 g.

I campioni per l'esame istologico devono essere prelevati esclusivamente da pesci appena soppressi di costituzione normale, che presentino segni clinici o risultanze post mortem compatibili con la presenza di ISA. Ogni lesione esterna o interna è sottoposta a campionamento e in ogni caso sono prelevati con un bisturi da ciascun esemplare campioni di rene medio, cuore, fegato, pancreas, intestino, branchie e milza e posti in una soluzione di formalina tamponata all'8-10 % (vol:vol). La proporzione di fissativo rispetto al tessuto deve essere di almeno 20:1 per garantire una conservazione soddisfacente dei tessuti. Per l'analisi con immunisto chimica (IHC) si prelevano campioni dal rene medio e dal cuore.

Per l'esame virologico su coltura cellulare si prelevano tessuti da tutti i pesci del campione. Con uno strumento sterile si asportano dai pesci frammenti di fegato, di rene anteriore o medio, di cuore e di milza che vengono posti in provette di plastica contenenti 9 ml di terreno di trasporto. In una provetta contenente terreno di trasporto si possono raccogliere i tessuti prelevati da cinque pesci al massimo, che costituiscono un pool. Il peso del tessuto di un campione è di $1,0 \pm 0,5$ g.

I.2. Spedizione dei campioni ittici

Al laboratorio possono essere spediti anche pesci interi purché sia possibile rispettare i requisiti descritti al paragrafo 3 del presente punto riguardo alla temperatura durante il trasporto. I pesci interi devono essere avvolti in carta assorbente e quindi spediti in sacchetti di plastica, refrigerati come indicato sopra.

Si possono spedire anche pesci vivi, ma solo sotto la supervisione del laboratorio nazionale di riferimento per le malattie dei pesci e tenendo conto di ogni altro elemento in materia di disinfezione e biosicurezza valido per il trasporto di pesci vivi.

I campioni di sangue e le provette contenenti i tessuti ittici per l'esame virologico o l'analisi RT-PCR sono posti in contenitori isolati, quali scatole di polistirolo con pareti spesse, con sufficiente ghiaccio o blocchi di refrigerazione per mantenere al fresco i campioni durante il trasporto al laboratorio. Si deve evitare il congelamento e all'arrivo in laboratorio il contenitore deve contenere ancora del ghiaccio oppure uno o più dei blocchi di refrigerazione devono essere ancora del tutto o parzialmente congelati. In casi eccezionali i campioni destinati all'analisi RT-PCR e quelli destinati all'esame virologico possono essere surgelati e trasportati al laboratorio ad una temperatura di -20°C o inferiore.

Per l'analisi RT-PCR di tessuti conservati in RNAlater, l'estrazione dell'RNA deve aver luogo entro un certo tempo che varia in funzione della temperatura di conservazione dei campioni:

campioni conservati a 37°C : un giorno;

campioni conservati a 25°C : una settimana;

campioni conservati a 4°C : un mese;

campioni conservati a -20°C : senza limite di tempo.

I tessuti ittici trasportati in fissativo per l'esame istologico devono essere contenuti in provette a tenuta stagna, collocate in contenitori resistenti agli urti. Si deve evitare che i campioni si congelino.

L'esame virologico su coltura cellulare deve iniziare quanto prima, e comunque non più tardi di 48 ore dopo la raccolta dei campioni. In casi eccezionali l'esame virologico può iniziare al massimo 72 ore dopo la raccolta del materiale, purché esso sia protetto da terreno di trasporto e siano soddisfatti i requisiti di temperatura durante il trasporto.

I.3. Raccolta di materiale diagnostico supplementare

Con l'approvazione del laboratorio diagnostico si possono raccogliere e preparare per esami supplementari tessuti ittici diversi da quelli indicati al punto I.1.

II. **Metodi e procedure diagnostici particolareggiati per la sorveglianza dell'ISA, per confermarne la presenza o escluderne il sospetto**

Quando è prescritto un esame di laboratorio per ottenere o mantenere un determinato stato sanitario relativamente all'ISA, come indicato all'allegato I, parte 3, sezione I, o per confermare la presenza di ISA o escluderne il sospetto a norma dell'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE usando i metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 3, sezione II, si applicano i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui ai seguenti punti da II.1 a II.5.

II.1. Esame dei campioni mediante RT-PCR

Il metodo diagnostico da utilizzare per la ricerca del virus dell'ISA è RT-qPCR. Poiché i risultati della RT-qPCR possono variare in funzione delle condizioni in cui si utilizza tale tecnica, si deve includere per evitare dubbi un numero adeguato di controlli e amplicon positivi e negativi.

II.1.1. Estrazione dell'RNA totale

Ogni manipolazione dell'RNA deve avvenire su ghiaccio utilizzando dei guanti.

L'RNA totale va estratto con il metodo fenolo-cloroformio o per affinità mediante colonnine secondo le istruzioni del fabbricante.

L'RNA purificato va rimesso in sospensione in acqua distillata priva di RNAsi (ossia acqua trattata con pirocarbonato di dietile a 0,1 %) o un tampone di eluizione idoneo.

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto si valutano misurando la densità ottica a 260 nm e a 280 nm. Un approccio alternativo può consistere nell'inserire controlli interni che hanno come bersaglio il genoma del virus come indicato al punto II.1.3.

II.1.2. Rilevamento del virus dell'ISA con RT-PCR

Per l'amplificazione del genoma del virus dell'ISA si possono usare diverse metodologie di RT-PCR. Si può effettuare un'analisi two-step RT-PCR, nella quale le reazioni di RT e PCR si svolgono in provette separate. Si può però effettuare anche una reazione a fase singola nella quale le due reazioni si svolgono nella stessa provetta. Si deve usare ove possibile il metodo a fase singola in quanto il saggio con una sola provetta minimizza il rischio di contaminazione incrociata, dato che non si deve procedere al trasferimento del contenuto; questo metodo è considerato di pari sensibilità rispetto al metodo a due fasi.

Si devono usare i primer e l'analisi descritti nel presente punto, ossia la coppia di primer ILA1 o ILA2 che hanno come bersaglio il segmento 8 e che sono risultati idonei per il rilevamento del virus dell'ISA nei focolai di infezione e nei pesci vettori. Il primer reverse ILA2 non corrisponde agli isolati provenienti dal Nord America e in tali casi va quindi utilizzato un primer alternativo.

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

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

Successione dei cicli: un ciclo a 50 °C per 30 minuti, un ciclo a 94 °C per 15 minuti, 40 cicli a 94 °C per 30 secondi, 55 °C per 30 secondi, 72 °C per 60 secondi; un ciclo a 72 °C per 5 minuti. Dimensione del prodotto: 155 coppie di basi (bp).

I risultati della PCR possono variare in funzione delle condizioni in cui si utilizza tale tecnica, ossia può rendersi necessaria un'ottimizzazione dei protocolli termici in funzione del termociclatore utilizzato. Possono inoltre presentarsi falsi positivi a causa di un errato appaiamento (annealing) del primer o di contaminazione in laboratorio. Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. In alternativa sono ammesse altre versioni di RT-PCR, purché di analoga provata efficacia.

II.1.3. Rilevamento del virus dell'ISA con RT-qPCR

L'impiego di RT-qPCR può aumentare la specificità e probabilmente anche la sensibilità. Tale metodo può essere eseguito più rapidamente, in quanto non richiede la fase dell'elettroforesi su gel e riduce il rischio di contaminazione crociata dato che è possibile valutare la quantità di RNA genomico virale dentro la provetta. Un inconveniente del saggio RT-qPCR è che spesso non è possibile sequenziare i prodotti amplificati. Se però sussistono dubbi sulla specificità del prodotto amplificato si deve procedere ad un altro saggio specifico per il virus dell'ISA per verificare il risultato.

Si deve utilizzare il saggio descritto al presente punto, che ha come bersaglio il segmento 8. Tale saggio è valido per isolati provenienti dall'Unione europea, dall'Associazione europea di libero scambio e dal Nord America. Se possibile si usa il metodo a fase singola in quanto il saggio con una sola provetta minimizza il rischio di contaminazione crociata.

Primer forward: 5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3';

Primer reverse: 5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3';

e sonda: 5'-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC—MGBNFQ-3'.

Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. Successione dei cicli: un ciclo a 50 °C per 30 minuti, un ciclo a 95 °C per 15 minuti, 40 cicli a 94 °C per 15 secondi, 60 °C per 60 secondi; da adattare se necessario. In alternativa sono ammesse altre versioni di RT-PCR o RT-qPCR, purché di analoga provata efficacia.

II.1.4. Sequenziamento dei prodotti di PCR amplificati

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

primer reverse (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3'.

Su ogni piastra trattata devono essere inseriti controlli negativi e positivi. Successione dei cicli (RT-PCR a fase singola) un ciclo a 50 °C per 30 minuti, un ciclo a 94 °C per 15 minuti, 40 cicli a 94 °C per 30 secondi, 55 °C per 30 secondi, 72 °C per 60 secondi, un ciclo a 72 °C per 5 minuti; da adattare se necessario. In alternativa sono ammesse altre versioni di RT-PCR o RT-qPCR, purché di analoga provata efficacia.

Si può usare in alternativa il metodo seguente per sequenziare l'HPR nel segmento 6:

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

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

Dimensioni del prodotto: 304 nucleotidi se HPR0.

Si possono utilizzare in alternativa altre analisi RT-PCR di sensibilità e specificità simili alle analisi descritte nel presente punto.

La purezza del prodotto di RT-PCR amplificato è verificata con elettroforesi su gel prima del sequenziamento. Se appare un solo frammento puro questo è purificato direttamente a partire dalla reazione di PCR. Se si presentano frammenti amplificati multipli il frammento di interesse è purificato con elettroforesi su gel. La purificazione di prodotti di amplificazione da soluzioni o da gel di agarosio è fatta mediante l'utilizzo di colonnine per affinità come da istruzioni del fabbricante.

Il sequenziamento deve essere effettuato con primer di amplificazione presso società esterne specializzate nel sequenziamento. I risultati del sequenziamento sono analizzati utilizzando lo strumento di ricerca BLAST e le sequenze sono confrontate con altre sequenze note della banca dati dei nucleotidi del Centro nazionale di informazioni biotecnologiche degli Stati Uniti (NCBI).

Il sequenziamento deve eliminare ogni dubbio quanto alla specificità di un prodotto di RT-PCR amplificato.

II.2. Isolamento del virus dell'ISA su colture cellulari

II.2.1. Preparazione dei campioni

Il tessuto può essere tenuto a - 80 °C e deve essere congelato e scongelato una sola volta prima dell'esame. A fini di sorveglianza e lotta l'esame va effettuato appena possibile.

Ogni campione (pool di tessuti in terreno di trasporto) viene omogeneizzato completamente con un omogenizzatore convalidato e quindi centrifugato alla velocità di $2\,000-4\,000 \times g$ per 15 minuti a temperatura tra 0 e 6 °C; il supernatante viene filtrato (0,45 µm) e incubato con pari volume di antisieri, opportunamente diluiti, dei sierotipi indigeni del virus dell'IPN. Il titolo dell'antisiero deve essere almeno di 1:2 000 in una prova di neutralizzazione delle placche al 50 %. La miscela è incubata per un'ora alla temperatura di 15 °C. Si ottiene così un inoculo.

Il trattamento di tutti gli inoculi con antisiero del virus della necrosi pancreatica infettiva (virus che in alcune parti d'Europa si manifesta nel 50 % dei campioni ittici) serve a impedire che si sviluppino nelle colture cellulari inoculate effetti citopatogeni (CPE) provocati dal virus dell'IPN. Tale trattamento si può applicare per ridurre la durata degli esami virologici, nonché il numero di casi in cui la comparsa di CPE dovrebbe essere considerata potenzialmente indicativa di virus dell'ISA. Se i campioni provengono da unità di produzione considerate indenni da IPN, si può omettere il trattamento degli inoculi con il relativo antisiero.

II.2.2. Inoculazione su colture cellulari

Per il primo isolamento del virus dell'ISA sono usate cellule di rene di salmone atlantico (ASK). Si possono usare altre linee cellulari di provata efficacia e sensibilità per l'isolamento del virus dell'ISA, tenendo conto della variabilità del ceppo e della capacità dei differenti ceppi di moltiplicarsi in diverse linee cellulari. Le cellule ASK sembrano supportare l'isolamento e la crescita degli isolati di virus finora noti purché il numero di passaggi sia ridotto. Nelle cellule ASK può presentarsi un effetto citopatico (CPE) più distinto che in altre linee cellulari sensibili quali le SHK-1 (rene anteriore di salmone-1).

Le cellule ASK (con un numero di passaggi pari o inferiore a 65) sono coltivate in un terreno L-15 contenente siero bovino fetale al 10 %, 200 mM di L-glutamina al 2 % (vol:vol) e di 50 mM di 2-mercaptoetanolo allo 0,08 % (vol:vol) in piastre multipozzetto. La sospensione di organi trattata con antisiero è inoculata in colture cellulari giovani in rapido sviluppo, in modo da ottenere una diluizione finale del materiale tissutale nel terreno di coltura di 1:1 000. Per ogni organo si aggiungono 40 µl di sospensione di inoculo in ciascun pozzetto contenente 2 ml di terreno di coltura. Per ridurre al minimo i rischi di contaminazione incrociata si usano piastre distinte da 12 o 24 pozzetti per campioni ittici provenienti da aziende diverse.

Una piastra è lasciata senza inoculazione per avere un controllo negativo. In una piastra separata è inoculato un isolato di riferimento del virus dell'ISA come controllo positivo, secondo le seguenti modalità. 100 µl di preparazione originale del virus dell'ISA [titolo minimo 10^7 , diluizione limite in grado di infettare il 50 % della coltura tissutale (DITC50 ml⁻¹)] sono inoculati nel primo pozzetto e mescolati. Un volume di questo materiale è trasferito dal primo al secondo pozzetto per ottenere una diluizione di 1:10 ed è mescolato. Quest'operazione è ripetuta sulla piastra in modo da ottenere 6 diluizioni di 1:10. La preparazione originale del virus dell'ISA può essere conservata alla temperatura di - 80 °C per almeno due anni, ma una volta scongelata deve essere usata entro tre giorni. Occorre prendere ogni precauzione per evitare la contaminazione incrociata delle piastre di prova con materiale di controllo positivo. Per evitare tale rischio i controlli positivi sono allestiti e trattati separatamente dalle piastre di prova. Il controllo positivo per ogni inoculazione si può sostituire con una prova semestrale di sensibilità delle cellule ASK al virus dell'ISA.

I campioni devono essere tenuti in incubazione per un periodo massimo di quindici giorni alla temperatura di 15 ± 2 °C. Le colture cellulari devono essere esaminate al microscopio per il controllo dell'effetto citopatico due volte: la prima 5-7 giorni e la seconda 12-14 giorni dopo l'inoculazione. Se si osserva CPE in un pool, si iniziano immediatamente le procedure di identificazione del virus come da punto II.2.4. Se non si osserva alcun CPE entro il quattordicesimo giorno si esegue una prova di immunofluorescenza indiretta (IFAT), emoassorbimento o RT-PCR.

II.2.3. Subcoltivazione

La subcoltivazione è eseguita tra il tredicesimo e il quindicesimo giorno. Si aggiunge supernatante di coltura opportunamente diluito (1:10) a pozzetti che contengono cellule fresche in fase di rapido sviluppo su piastre multipozzetto, e si incubano per massimo 18 giorni alla temperatura di 14 ± 2 °C. Le colture cellulari sono esaminate al microscopio per la ricerca dell'effetto citopatico due volte: la prima 5-7 giorni e la seconda 14-18 giorni dopo l'inoculazione. Se si osserva CPE in un pool, si iniziano immediatamente le procedure di identificazione del virus come da punto II.2.4. Se non si osserva alcun effetto citopatico tra il quattordicesimo e il diciottesimo giorno, occorre procedere ad una prova di emoassorbimento o analisi RT-PCR.

Se nei primi 7 giorni di incubazione si osserva un effetto citotossico, si esegue una subcoltivazione in tale fase e le cellule sono incubate per 14-18 giorni e nuovamente subcoltivate, con un'ulteriore periodo di incubazione di 14-18 giorni. Se l'effetto citotossico si presenta dopo 7 giorni si procede alla subcoltivazione una sola volta e le cellule sono incubate in modo da raggiungere in totale 28-36 giorni di incubazione dall'inoculazione iniziale.

Se si presenta una contaminazione batterica nella coltura primaria, la prova è allestita nuovamente usando il tessuto omogeneizzato conservato a - 80 °C. Prima dell'inoculazione il tessuto omogeneizzato è centrifugato alla velocità di $4\,000 \times g$ per 15-30 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 6 °C e il supernatante è filtrato a 0,22 µm. Se durante la subcoltivazione si verifica una contaminazione batterica, il supernatante è filtrato a 0,22 µm, inoculato in cellule fresche e lasciato incubare per un ulteriore periodo di 14-18 giorni.

II.2.4. Test di identificazione del virus

Se in qualsiasi fase si osserva un effetto citopatico o se la prova di emoassorbimento risulta positiva si procede all'identificazione del virus. I metodi da applicare per l'identificazione del virus dell'ISA sono l'analisi RT-PCR di cui al punto II.1. e l'immunofluorescenza (IF) di cui al punto II.2.6. Se si ritiene possibile la presenza di altri virus si procede a test supplementari di identificazione dei virus. Se tali test non hanno permesso un'identificazione definitiva del virus entro una settimana, il supernatante dev'essere inviato, per l'identificazione immediata:

- a) al laboratorio di riferimento per l'ISA dell'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE), o
- b) ad un laboratorio nazionale di riferimento o al laboratorio dell'UE di riferimento per le malattie dei pesci di cui all'allegato VI della direttiva 2006/88/CE.

II.2.5. Emoassorbimento

Poiché la replicazione del virus dell'ISA nelle colture cellulari non sempre produce un effetto citopatico, ogni pozzetto va sottoposto ad analisi RT-PCR o prova di emoassorbimento secondo le modalità di cui al presente punto o ad una prova IF di cui al punto II.2.6.

Da ciascun pozzetto, anche quelli dei controlli positivi e negativi, si preleva un'aliquota di terreno di coltura cellulare che viene immessa in provette sterili etichettate. Ad ogni pozzetto si aggiungono 500 µl di una sospensione allo 0,2 % (vol:vol) di globuli rossi di coniglio o cavallo lavati, o di una sospensione allo 0,05 % (vol:vol) di globuli rossi di trota iridea o di salmone Atlantico lavati e si lascia in incubazione a temperatura ambiente per 45 minuti. Si prelevano quindi i globuli rossi e si lava ogni pozzetto due volte con la soluzione L-15. Ogni pozzetto è esaminato al microscopio.

La presenza di aggregati di globuli rossi che aderiscono alla superficie delle cellule ASK indica una presunta infezione da ortomixovirus. Se la prova di emioassorbimento è positiva è avviata immediatamente la procedura di identificazione del virus secondo le modalità di cui al punto II.2.4.

II.2.6. Immunofluorescenza (IF)

Le cellule ASK (con un numero di passaggi pari o inferiore a 65) sono coltivate in un terreno L-15 contenente siero bovino fetale al 10 %, 200 mM di L-glutamina al 2 % (vol:vol) e 50 mM 2-mercaptoetanolo allo 0,08 % (vol:vol) su piastre multipozzetto e usate ad una confluenza superiore al 50 %. Si possono usare anche altre linee cellulari o altro terreno di coltura di provata efficacia. Si aggiungono 225 µl di supernatante della coltura che si presume infetta in due pozzetti, si mescola e si trasferiscono 225 µl in altri due pozzetti in modo da ottenere una diluizione di 1:5. Altri due pozzetti, da usare come controlli, sono lasciati senza inoculazione. I campioni provenienti da ciascuna azienda sono trattati in piastre separate, come pure il campione di controllo del virus. Il campione di controllo del virus si allestisce usando un isolato di riferimento del virus dell'ISA.

Le piastre sono tenute in incubazione per un periodo di 7 giorni al massimo alla temperatura di 14 ± 2 °C ed osservate al microscopio. Qualora si osservi un effetto citopatico precoce oppure non si osservi alcun effetto citopatico entro sette giorni, si procede alla fissazione. I pozzetti sono sciacquati con soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) e poi fissati mediante incubazione con acetone all'80 % per 20 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono lasciate asciugare all'aria e colorate immediatamente oppure conservate alla temperatura di 0-6 °C per non più di 24 ore prima di aggiungere il colorante.

I pozzetti replicati sono colorati con una miscela di anticorpi monoclonali (MAb) 3H6F8 e di 1OC9F5 contro il virus dell'ISA o con un altro anticorpo monoclonale di provata efficacia e specificità, diluiti in PBS e incubati per 30 minuti alla temperatura di 37 ± 4 °C. Si rimuove l'anticorpo monoclonale e si sciacquano le piastre tre volte con aggiunta di Tween-20 a 0,05 % in tampone PBS. Si aggiungono a ciascun pozzetto immunoglobuline antitipo coniugate con isotiocianato di fluoresceina (FITC), diluite in PBS, e si incubano per 30 minuti alla temperatura di 37 ± 4 °C. Ogni laboratorio deve ottimizzare le diluizioni delle varie partite di anticorpo monoclonale e di coniugato FITC. Si rimuove l'anticorpo e si sciacquano le piastre tre volte con aggiunta di Tween-20 a 0,05 % in PBS.

I pozzetti sono esaminati utilizzando un microscopio a fluorescenza invertito dotato di un filtro idoneo per l'eccitazione del FITC. La prova è considerata positiva se si osservano cellule fluorescenti. Affinché la prova sia valida i controlli positivi devono dare risultato positivo e i controlli negativi risultato negativo.

II.3. Esame di altri tessuti

La tecnica di cui al punto II.2.6 si può applicare ad altri tessuti dei pesci, come il fegato, la milza e il cuore, a condizione che si possa depositare sul vetrino una quantità ragionevole di cellule endoteliali, leucociti o linfociti. La procedura di colorazione rimane la stessa per ogni tessuto, benché per alcuni tessuti sia preferibile non ricorrere alla colorazione con ioduro di propidio, ma affidarsi all'illuminazione a contrasto di fase per identificare i tipi di cellule presenti nell'impronta.

II.4. Istologia

Si tagliano sezioni ricoperte di paraffina a 5 µm e si colorano con ematossilina e eosina.

I cambiamenti istologici nel salmone atlantico clinicamente malato sono variabili ma possono comprendere quanto segue:

- a) numerosi eritrociti nel seno venoso centrale e nei capillari lamellari delle branchie, dove possono formarsi anche trombi di eritrociti;
- b) petecchie da multifocali a confluenti o necrosi degli epatociti, o entrambe, ad una certa distanza dai vasi sanguigni più importanti del fegato; accumulo multifocale di eritrociti nei sinusoidi epatici dilatati;

- c) accumulo di eritrociti nei vasi sanguigni della lamina propria intestinale che possono avere come esito un'emorragia nella lamina propria;
- d) stroma della milza disteso per l'accumulo degli eritrociti;
- e) emorragia interstiziale diffusa da multifocale a generalizzata con necrosi tubolare nelle zone emorragiche, accumulo di eritrociti nei glomeruli renali;
- f) eritrofagocitosi nella milza ed emorragie secondarie nel fegato e nel rene.

II.5. Immunoistochimica (IHC)

Gli anticorpi policlonali contro le nucleoproteine del virus dell'ISA devono essere utilizzati su sezioni di tessuti fissate con formalina e coperte di paraffina. Gli organi da esaminare sono il rene medio e il cuore (zona di transizione che comprende tutte e tre le camere e le valvole). I casi sospetti per sintomi patologici devono essere verificati con esame IHC positivo. Le sezioni istologiche sono preparate con l'applicazione di metodi standard.

(1) Preparazione delle sezioni di tessuti

I tessuti sono fissati con una soluzione neutra di formalina al 10 % tamponata al fosfato per almeno un giorno, poi disidratati in una serie di bagni di etanolo di diverse gradazioni, ripuliti con xilolo e inclusi in paraffina secondo i protocolli standard. Sezioni dello spessore di circa 5 µm (per IHC su vetrini trattati con poli-L-lisina) sono riscaldate ad una temperatura compresa tra 56 °C e 58 °C (massimo 60 °C) per 20 minuti, ripulite con xilolo, reidratate con una serie di bagni di etanolo di diverse gradazioni, poi colorate con ematossilina e eosina per esami di patomorfologia e IHC in conformità al punto 2.

(2) Procedura di colorazione per IHC

Se non disposto diversamente dalla presente decisione tutte le incubazioni si effettuano a temperatura ambiente su piano oscillante:

- a) il recupero antigenico si ottiene facendo bollire le sezioni in 0,1 M di tampone citrato a pH 6,0 per 2 × 6 minuti, per procedere poi alla fase di inibizione con 5 % di estratto secco di latte sgrassato e 2 % di siero di capra in 50 mM di TBS (TBS; 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6) per 20 minuti;
- b) le sezioni sono poi incubate durante la notte con l'anticorpo primario (anticorpo monospecifico di coniglio contro nucleoproteine del virus dell'ISA) diluito in TBS con 1 % di estratto secco di latte sgrassato, seguito da tre lavaggi in TBS con 0,1 % Tween 20;
- c) per il rilevamento di anticorpi legati, le sezioni sono incubate con anticorpi anti IgG di coniglio coniugati alla fosfatasi alcalina per 60 minuti. Dopo un lavaggio finale, si aggiungono rosso solido (1 mg ml⁻¹) e Naphthol AS-MX fosfato (0,2 mg ml⁻¹) con 1 mM Levamisole in 0,1 M TBS (pH 8,2) e si lasciano sviluppare per 20 minuti. Le sezioni sono poi lavate in acqua di rubinetto prima di applicare come colorante di contrasto ematossilina Harris, e poi montate in mezzo di montaggio acquoso. In ogni lotto si includono controlli composti da sezioni di tessuto positive e negative al virus dell'ISA.

(3) Interpretazione dei risultati dell'esame IHC

L'interpretazione dei risultati dell'esame di IHC segue le modalità indicate in a) e b):

- a) le sezioni di controllo sono considerate positive se si osserva una evidente colorazione rossa (rossastra) citoplasmica e intranucleare delle cellule endoteliali nei vasi sanguigni dell'endocardio. Una sezione di campione sottoposta a prova è considerata positiva solo se si osserva tale evidente colorazione rossa intranucleare delle cellule endoteliali;
- b) le sezioni di controllo si considerano negative se non mostrano mutazioni di colore significative.

Dato che la localizzazione intranucleare è specifica della nucleoproteina dell'ortomixovirus durante una fase di replicazione del virus ma la colorazione citoplasmatica concomitante è spesso dominante, zone di colorazione citoplasmiche o di altro pattern senza localizzazione intranucleare sono considerate non specifiche o inconcludenti.

Le reazioni di colorazione positive più marcate si ottengono di solito nelle cellule endoteliali del cuore e del rene. La colorazione delle cellule endoteliali può essere debole o assente a livello di lesioni emorragiche di ampia estensione, probabilmente a causa della lisi delle cellule endoteliali infette.

PARTE 4

METODI E PROCEDURE DIAGNOSTICI PARTICOLAREGGIATI PER LA SORVEGLIANZA E LA CONFERMA DELL'INFEZIONE DA *MARTEILIA REFRINGENS*

I. Metodi e procedure diagnostici particolareggiati per la diagnosi dell'infezione da *Marteilia refringens*

Quando si effettuano il campionamento e gli esami di laboratorio per ottenere o mantenere un determinato stato sanitario relativamente all'infezione da *Marteilia refringens*, come indicato all'allegato I, parte 4, sezione I, o per confermare la presenza di tale malattia elencata o escluderne il sospetto a norma dell'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE utilizzando i metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 4, sezione II, si applicano i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui ai punti I.1, I.2 e I.3. della presente parte.

I.1. Procedura di campionamento

Si raccolgono prioritariamente i molluschi dalle valve schiuse o morti recentemente, in modo da aumentare la probabilità di reperire animali infetti.

Una volta prelevati i campioni di ostriche o mitili, questi sono tenuti a 4 °C o su ghiaccio non più di 24 ore se comprendono molluschi dalle valve schiuse e non più di 72 ore in caso contrario, in una borsa di plastica che reca un'etichetta indicante la natura e l'origine delle ostriche o dei mitili. I molluschi dalle valve schiuse o morti recentemente sono conservati separatamente dagli altri molluschi.

Per la diagnosi istologica dell'infezione da *Marteilia refringens* si usa una sezione dei tessuti dello spessore da 3 a 5 mm, comprendente le branchie e tessuti cardiaci. Per alcune prove, tra cui le impronte e la reazione a catena della polimerasi (PCR), si usa un frammento di ghiandola digestiva.

I.2. Tecniche microscopiche

I.2.1. Citologia (citologia per apposizione)

Dopo aver asciugato i tessuti della ghiandola digestiva su carta assorbente si prendono diverse impronte su vetrini. I vetrini devono essere asciugati all'aria, fissati in metanolo o etanolo assoluto e colorati usando un kit di colorazione disponibile in commercio quale il Diff-Quick®/Hemacolor® seguendo le istruzioni del fabbricante. Dopo risciacquo in acqua di rubinetto e asciugatura i vetrini sono montati con coprivetrino usando un'idonea resina artificiale. I vetrini si osservano dapprima con ingrandimento 200× e poi in olio di immersione con ingrandimento 1 000×.

Un risultato positivo consiste nell'osservazione di cellule di dimensioni comprese tra 30 e 40 µm. La colorazione del citoplasma è basofila, quella del nucleo è eosinofila. Si osservano aloni pallidi intorno a granuli grandi con colorazione intensa (rifrangente) e nelle cellule di dimensioni maggiori si osserva una struttura a cellule nidificate.

Questa tecnica non è specifica per la specie del parassita.

I.2.2. Istologia

Sezioni di tessuti che comprendono branchie, ghiandola digestiva, mantello e gonade sono fissate per almeno 24 ore in fissativo di Davidson, poi preparate normalmente per esame istologico dopo inserimento in paraffina e colorazione, ad esempio con ematossilina e eosina. Le osservazioni sono condotte con ingrandimenti sempre maggiori fino a 1 000×.

Un risultato positivo consiste nell'osservazione di cellule di dimensioni da 4 a 40 µm. Le prime fasi consistono di cellule multinucleate da sferiche a allungate, che si riscontrano principalmente nell'epitelio dell'esofago e dello stomaco, a volte dei palpi labiali. La sporulazione comprende divisioni di cellule all'interno di cellule e ha luogo nei tubuli e nei dotti della ghiandola digestiva. Granuli rifrangenti appaiono durante la sporulazione ma non si osservano nelle fasi iniziali. Nelle fasi avanzate dell'infezione si osservano sporangi liberi nel lumen dell'apparato digerente. La colorazione del citoplasma è basofila, quella del nucleo è eosinofila. I granuli possono avere colore variabile dall'arancio carico al rosso intenso.

Questa tecnica non è specifica per la specie del parassita.

I.3. Tecniche molecolari

I.3.1. Estrazione del DNA

Il DNA è estratto seguendo le procedure standard.

Si possono utilizzare i kit di estrazione del DNA disponibili in commercio che producono di solito DNA di alta qualità utilizzabile in protocolli della PCR di cui al punto I.3.2.

I.3.2. Reazione a catena della polimerasi(PCR)

Sono stati elaborati e pubblicati diversi protocolli della PCR.

Si utilizzano i primer della PCR che hanno come bersaglio la regione dello spaziatore trascritto interno (ITS1), in quanto sono in grado di amplificare solo la *Marteilia refringens*.

La PCR si effettua in un volume di 50 µl. Le miscele per la PCR contengono soluzione tampone [500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 9,0 a 25 °C) e 1 % Triton® X-100], 2,5 mM MgCl₂, miscela di 0,2 mM dNTP, 1 µM di primer forward e reverse, 0,02 unità µl⁻¹ Taq DNA polimerasi e da 10 a 100 ng di DNA estratto. Dopo denaturazione del DNA a 94 °C per cinque minuti si compiono 30 cicli secondo le modalità seguenti: denaturazione a 94 °C per un minuto, appaiamento (annealing) a 55 °C per un minuto e allungamento a 72 °C per un minuto per migliaia di coppie di basi. Si esegue una fase finale di allungamento di 10 minuti a 72 °C. Per il rilevamento della *M. refringens*, la PCR deve essere eseguita con primer che hanno come bersaglio la regione ITS1(5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' e 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

I controlli positivi sono costituiti da DNA genomico proveniente da ospiti gravemente infetti o DNA plasmidico che comprenda la regione bersaglio.

I controlli negativi sono costituiti da DNA genomico proveniente da ospiti non infetti e soluzioni per PCR senza DNA bersaglio.

Un risultato positivo consiste in un prodotto d'amplificazione positivo della dimensione prevista (412 pb), accompagnato da negatività di tutti i controlli negativi e positività di tutti i controlli positivi.

I.3.3. Ibridizzazione in situ (ISH)

Sono stati elaborati e pubblicati diversi protocolli per l'ISH.

Si utilizza una sonda che ha per bersaglio la subunità piccola del complesso dei geni dell'rRNA in quanto è stata convalidata istologicamente.

Sezioni di tessuti che comprendono branchie e ghiandola digestiva sono fissate per almeno 24 ore in fissativo di Davidson, poi preparate normalmente per esame istologico dopo inserimento in paraffina. Si prelevano sezioni di 5 µm che vengono posate su vetrini ricoperti di amminoalchilsilano che sono poi incubati durante la notte in camera termostatica a 40 °C. Le sezioni sono ripulite con immersione per 10 minuti in xilolo. Questa fase è ripetuta una volta e poi si elimina il solvente con immersione in due bagni successivi di etanolo assoluto, ogni volta per 10 minuti. Le sezioni sono poi deidratate mediante immersione in una serie di bagni di etanolo a gradazioni diverse. Le sezioni sono trattate con proteinasi K (100 µg ml⁻¹) in tampone TE [Tris (50 mM), EDTA (10 mM)], a 37 °C per 30 minuti. I vetrini sono deidratati mediante immersione in una serie di bagni di etanolo a gradazioni diverse e poi asciugati all'aria. Le sezioni sono incubate con 100 µl di tampone di ibridizzazione [4 × SSC (soluzione salina di citrato), 50 % formamide, 1 × soluzione di Denhardt, 250 µg ml⁻¹ di tRNA di lievito, 10 % destrano solfato] contenente 10 ng (1 µl dei reattivi di PCR preparati come descritto al punto I.3.2 usando i primer CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG e TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) della sonda marcata con digoxigenina. Le sezioni sono coperte con coprivetrino di plastica per ISH e poste su una piastra riscaldante a 95 °C per cinque minuti. I vetrini sono poi raffreddati su ghiaccio per un minuto prima di essere ibridizzati durante la notte a 42 °C in camera umida. Le sezioni sono lavate due volte per cinque minuti in 2 × SSC a temperatura ambiente e una volta per 10 minuti in 0,4 × SSC a 42 °C. Le fasi di rilevamento sono effettuate secondo le istruzioni del fabbricante. I vetrini sono poi sciacquati in acqua distillata sterile (dH₂O). Alle sezioni si applica il colorante Bruno Bismarck Y, poi queste sono sciacquate in dH₂O e si applicano i coprivetrini usando un mezzo di montaggio acquoso.

I controlli positivi e negativi sono costituiti da sezioni di ospiti notoriamente infetti o, rispettivamente, non infetti.

Il risultato positivo consiste nella colorazione violetto-nera delle cellule di *M. refringens* nei tessuti bersaglio noti, accompagnata da negatività di tutti i controlli negativi e positività di tutti i controlli positivi.

I.3.4. Sequenziamento

Il sequenziamento è effettuato nell'ambito delle fasi finali per ottenere diagnosi di conferma. Le regioni bersaglio sono la subunità piccola dell'rDNA e ITS1.

II. **Metodi e procedure diagnostici particolareggiati per la sorveglianza e la conferma dell'infezione da *Marteilia refringens***

Ai fini dei programmi di sorveglianza e per la conferma della presenza di un'infezione da *Marteilia refringens* o per escludere il sospetto di tale malattia elencata, in conformità alle prescrizioni dell'allegato I, parte 4, sezione II, i metodi diagnostici e le corrispondenti procedure da utilizzare sono conformi agli orientamenti indicati nella seguente tabella 4.1:

Tabella 4.1.

Orientamenti per l'uso di metodi diagnostici per i programmi di sorveglianza e per la conferma o l'esclusione della presenza dell'infezione da *Marteilia refringens*

Metodo	Sorveglianza mirata	Diagnosi presunta	Diagnosi di conferma
Impronte della ghiandola digestiva	X	X	X, oppure
Istopatologia	X		X, oppure
Ibridizzazione in situ			X, e
PCR	X	X	X, e
Sequenziamento			X

PARTE 5

METODI E PROCEDURE DIAGNOSTICI PARTICOLAREGGIATI PER LA SORVEGLIANZA E LA CONFERMA DELL'INFEZIONE DA *BONAMIA OSTREAE*

I. **Procedure per la diagnosi dell'infezione da *Bonamia ostreae***

Quando si effettuano il campionamento e gli esami di laboratorio per ottenere o mantenere un determinato stato sanitario relativamente all'infezione da *Bonamia ostreae*, come indicato all'allegato I, parte 5, sezione I, o per confermare la presenza di tale malattia elencata o escluderne il sospetto a norma dell'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE utilizzando i metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 5, sezione II, si applicano i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui ai seguenti punti I.1, I.2 e I.3.

I.1. Campionamento

Sono raccolti prioritariamente i molluschi dalle valve schiuse o morti recentemente, in modo da aumentare la probabilità di reperire animali infetti.

Una volta prelevati i campioni di ostriche, questi sono tenuti a 4 °C o su ghiaccio non più di 24 ore se comprendono molluschi dalle valve schiuse e 72 ore in caso contrario, in una borsa di plastica che reca un'etichetta indicante la natura e l'origine delle ostriche. I molluschi dalle valve schiuse o morti recentemente sono conservati separatamente dagli altri molluschi.

Per la diagnosi istologica dell'infezione da *Bonamia ostreae* si usa una sezione dello spessore da 3 a 5 mm di tessuti, comprendenti branchie e tessuto cardiaco. Per alcuni esami, comprese le impronte e la reazione a catena della polimerasi (PCR), si usa un frammento di ghiandola digestiva.

I.2. Tecniche microscopiche

I.2.1. Citologia (citologia per apposizione)

Dopo aver asciugato le branchie o i tessuti cardiaci su carta assorbente si prendono diverse impronte su vetrini. I vetrini devono essere asciugati all'aria, fissati in metanolo o etanolo assoluto e colorati usando un kit di colorazione disponibile in commercio (quale il Diff-Quick®/Hemacolor®) seguendo le istruzioni del fabbricante. Dopo risciacquo in acqua di rubinetto e asciugatura i vetrini vanno montati con coprivetrino usando un'idonea resina artificiale. I vetrini sono osservati dapprima con ingrandimento 200× e poi in olio di immersione con ingrandimento 1 000×.

Un risultato positivo consiste nella presenza di piccoli organismi sferici o ovoidali (di grandezza da 2 a 5 µm) negli emociti. Il parassita può però essere presente anche all'esterno delle cellule. Questi organismi hanno un citoplasma basofilo e un nucleo eosinofilo (i colori possono variare in funzione del colorante usato) e, poiché si spandono sul vetrino, possono sembrare nelle impronte più grandi che all'esame istologico. Si possono osservare cellule multinucleate. Questa tecnica non è specifica per la specie del parassita.

I.2.2. Istologia

Sezioni di tessuti che comprendono branchie e ghiandola digestiva vanno fissate per almeno 24 ore in fissativo di Davidson, poi preparate normalmente per esame istologico dopo inserimento in paraffina e colorazione, ad esempio con ematossilina e eosina. Le osservazioni vanno condotte con ingrandimenti sempre maggiori fino a 1 000×.

Il risultato positivo consiste nella presenza di parassiti rappresentati da cellule molto piccole, di dimensioni da 2 a 5 µm, all'interno degli emociti o non legate nel tessuto connettivo o nei seni dell'epitelio di branchie, intestino e mantello, spesso associate ad intensa reazione infiammatoria. Per evitare qualsiasi dubbio ai fini di una diagnosi positiva è necessario che il parassita sia osservato nell'emocito. Questa tecnica non è specifica per la specie del parassita.

I.3. Tecniche molecolari

I.3.1. Estrazione del DNA

Il DNA è estratto seguendo le procedure standard.

Si possono utilizzare i kit di estrazione del DNA disponibili in commercio che producono di solito DNA di alta qualità utilizzabile in protocolli della PCR indicati oltre.

I.3.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Sono stati elaborati e pubblicati diversi protocolli della PCR.

Si possono usare due protocolli che hanno come bersaglio la subunità piccola dell'rDNA:

- a) il primo è la PCR classica che amplifica diversi appartenenti al phylum *Haplosporidia* compresi quelli della *Bonamia* spp. I primer, indicati come Bo e Boas, sono rispettivamente 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' e 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' e amplificano un prodotto di 300 bp. Le miscele per la PCR devono contenere soluzione tampone (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 a 25 °C] e 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, miscela 0,2 mM dNTP, 1 µM di primer forward e reverse, 0,02 unità µl⁻¹ Taq DNA polimerasi e 0,2 ng µl⁻¹ di DNA stampo in un volume totale di 50 µl. I campioni sono denaturati in un termociclatore per cinque minuti a 94 °C prima di essere sottoposti a 30 cicli (94 °C per un minuto, 55 °C per un minuto, 72 °C per un minuto) seguiti da una fase finale di allungamento di 10 minuti a 72 °C.

I controlli positivi sono costituiti da DNA genomico proveniente da un ospite gravemente infetto o DNA plasmidico che comprenda la regione bersaglio.

I controlli negativi sono costituiti da DNA genomico proveniente da ospiti non infetti e soluzioni per PCR senza DNA bersaglio.

Il risultato positivo consiste in un prodotto di amplificazione della PCR della dimensione prevista (ossia 300 bp) accompagnato da negatività di tutti i controlli negativi e positività di tutti i controlli positivi.

- b) Il secondo protocollo PCR è un'analisi PCR in tempo reale al SYBR® Green. Questa consente il rilevamento specifico della *B. ostreae* (descritto di seguito) e può essere associata ad un'analisi PCR in tempo reale al SYBR® Green che permette di rilevare specificamente la *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

I primer BOSTRE-F (5'- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') e BOSTRE-R (5'- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3') amplificano un prodotto di 208 bp. Le miscele per la PCR contengono SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM di primer forward e reverse e 200 ng di DNA estratto. I campioni sono denaturati in un sistema di rilevamento in tempo reale per 10 minuti a 95 °C prima di essere sottoposti a 35 cicli (95 °C per 30 secondi, 55 °C per 45 secondi e 72 °C per un minuto). L'analisi della curva di fusione si effettua aumentando la temperatura da 55 °C a 95 °C in step di 0,5 °C e misurando l'intensità di fluorescenza ad ogni cambio di temperatura.

I controlli positivi sono costituiti da DNA genomico proveniente da un ospite gravemente infetto o DNA plasmidico che comprenda la regione bersaglio.

I controlli negativi sono costituiti da DNA genomico proveniente da ospiti non infetti e soluzioni per PCR senza DNA bersaglio.

Un risultato positivo consiste in un'amplificazione PCR positiva con un solo picco di temperatura di fusione ($78,25 \pm 0,25$ °C alle condizioni pubblicate da Ramilo et al. 2013) accompagnata da negatività di tutti i controlli negativi e positività di tutti i controlli positivi.

I.3.3. Ibridizzazione in situ (ISH)

Sono stati elaborati e pubblicati diversi protocolli di IHS.

Si usa una sonda che ha come bersaglio la subunità piccola del complesso di geni dell'rDNA, sebbene si sia riscontrata una sua reazione crociata con alcuni appartenenti al phylum *Haplosporidia*.

Sezioni di tessuti che comprendono branchie e ghiandola digestiva sono fissate per almeno 24 ore in fissativo di Davidson, poi preparate normalmente per esame istologico dopo inclusione in paraffina. Si prelevano sezioni di 5 µm che sono posate su vetrini ricoperti di amminoalchilsilano che sono poi incubati durante la notte in camera termostatica a 40 °C. Le sezioni sono ripulite con immersione per 10 minuti in xilolo. Tale operazione è ripetuta una volta e poi si elimina il solvente mediante immersione in due bagni successivi, di 10 minuti ciascuno, di etanolo assoluto. Le sezioni sono poi deidratate mediante immersione in una serie di bagni di etanolo a gradazioni diverse. Le sezioni sono trattate con proteinasi K ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) in tampone TE [Tris (50 mM), EDTA (10 mM)], a 37 °C per 30 minuti. I vetrini sono deidratati mediante immersione in una serie di bagni di etanolo a gradazioni diverse e poi asciugati all'aria. Le sezioni sono incubate con 100 µl di tampone di ibridizzazione [4 × SSC (soluzione salina di citrato), 50 % formamide, 1 × soluzione di Denhardt, $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ di tRNA di lievito, 10 % destrano solfato] contenente 20 ng (2 µl di soluzione PCR preparata come descritto al punto I.3.2 usando i primer Bo e Boas) della sonda marcata con digoxigenina. Le sezioni sono coperte con coprivetrino di plastica per ISH e poste su una piastra riscaldante a 95 °C per cinque minuti. I vetrini sono poi raffreddati su ghiaccio per un minuto prima di essere ibridizzati durante la notte a 42 °C in camera umida. Le sezioni sono lavate due volte per cinque minuti in 2 × SSC a temperatura ambiente e una volta per 10 minuti in 0,4 × SSC a 42 °C. Le fasi di rilevamento vanno effettuate secondo le istruzioni del fabbricante. I vetrini sono poi sciacquati in acqua distillata sterile (dH₂O). Alle sezioni si applica il colorante di contrasto Bruno Bismarck Y, poi queste sono sciacquate in dH₂O e si applicano i coprivetrini usando un mezzo di montaggio acquoso.

I controlli positivi e negativi sono costituiti da sezioni di ospiti per i quali sia certa l'infezione o, rispettivamente, l'assenza di infezione.

Il risultato positivo consiste in parassiti marcati all'interno degli emociti, accompagnato da negatività di tutti i controlli negativi e positività di tutti i controlli positivi

I.3.4. Sequenziamento

Il sequenziamento si esegue durante le ultime fasi per la conferma della diagnosi. Le regioni bersaglio sono la subunità piccola del rDNA e ITS1.

II. Procedure per la sorveglianza e la conferma dell'infezione da *Bonamia ostreae*

Ai fini della sorveglianza e per confermare la presenza di un'infezione da *Bonamia ostreae*, o escluderne il sospetto, in conformità alle prescrizioni dell'allegato I, parte 5, sezione II, i metodi diagnostici e le corrispondenti procedure da utilizzare sono conformi agli orientamenti indicati nella seguente tabella 5.1.

Tabella 5.1.

Orientamenti per l'uso di metodi diagnostici per i programmi di sorveglianza e per confermare o escludere l'infezione da *Bonamia ostreae*

Metodo	Sorveglianza mirata	Diagnosi presunta	Diagnosi di conferma
Impronte cardiache o delle branchie	X	X	X, oppure
Istopatologia	X		X, oppure
Ibridizzazione in situ			X, e
PCR	X	X	X, e
Sequenziamento			X

PARTE 6

METODI E PROCEDURE DIAGNOSTICI PARTICOLAREGGIATI PER LA SORVEGLIANZA E LA CONFERMA DELLA MALATTIA DEI PUNTI BIANCHI (WSD)

1. Procedure diagnostiche per il rilevamento del virus WSS

Quando si eseguono i campionamenti e gli esami di laboratorio a fini dei programmi di sorveglianza e eradicazione di cui all'allegato I, parte 6, sezione I, e quando occorre confermare la presenza di un'infezione da virus WSS o escluderne il sospetto a norma dell'articolo 57, lettera b), della direttiva 2006/88/CE utilizzando i metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 6, sezione II, si applicano i metodi e le procedure diagnostici particolareggiati di cui ai punti da 2 a 7 della presente parte.

I metodi e le procedure descritti nella presente parte dell'allegato II sono adattati in base al test accreditato secondo la norma ISO 17025 applicato dal laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le malattie dei crostacei. Si possono utilizzare approcci alternativi che si avvalgano di condizioni o di kit equivalenti prodotti da fabbricanti diversi ma che comunque presentino sensibilità e specificità equivalenti a quelli descritti nella presente parte. In tutti i casi si sequenziano prodotti amplificati mediante PCR per confermare che l'agente patogeno sospetto sia il virus della sindrome dei punti bianchi (white spot syndrome — WSS).

2. Campionamento

I tessuti (pleopodi e branchie) contenenti il virus WSS ottenuti da crostacei possono essere conservati in etanolo, RNAlater o surgelati a – 80 °C. Le fasi richieste per l'identificazione di virus WSS a partire dai campioni tissutali sono le seguenti: omogeneizzazione dei tessuti, estrazione del DNA, amplificazione specifica del DNA del WSSV mediante PCR, visualizzazione del prodotto amplificato su gel, purificazione del DNA e sequenziamento per confermare l'identità dell'agente patogeno.

3. Omogeneizzazione dei tessuti

La scomposizione dei tessuti e la preparazione di un omogeneizzato in un tampone appropriato sono realizzate utilizzando il disgregatore tissutale Fast Prep e provette Lysing matrix A (MP Biomedicals). I tessuti sono pesati, collocati in provette Lysing Matrix A, diluiti 1:10 (p/v) o secondo le istruzioni del fabbricante in un tampone appropriato [G2 e 10 µl di proteinasi K da utilizzare con il kit di estrazione del DNA tissutale (QIAGEN)] e omogeneizzati usando l'omogeneizzatore Fast Prep 24 per due minuti. I campioni omogeneizzati sono incubati a 56 °C per almeno quattro ore o per tutta una notte. I campioni sono passati al Vortex, centrifugati a 9 000 giri/m per due minuti e 50 µl di supernatante o un volume equivalente a 5 mg di tessuto (il peso ottimale per il kit di estrazione) sono aggiunti ad una provetta per estrazione del DNS e il volume portato a 200 µl usando tampone G2.

4. Estrazione del DNA

Il DNA totale è estratto usando un kit di estrazione del DNA da tessuti e il Biorobot EZ1 Advanced XL (Qiagen) secondo le istruzioni dei fabbricanti. Ogni lotto di campioni è accompagnato da un campione di controllo dell'estrazione (DNA di timo di vitello) e da un campione di controllo negativo (tampone G2). Il DNA è eluito in volume di 50 µl. Per assicurarsi che l'estrazione sia stata completata con successo si determina la concentrazione di DNA in tutti i campioni, anche quelli di controllo, usando un apparecchio Nano Drop. Il DNA estratto, se non utilizzato immediatamente, è congelato alla temperatura di - 20 °C.

5. Amplificazione del virus WSS mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il metodo da utilizzare per il rilevamento del virus WSS è il protocollo di rilevamento del virus WSS mediante *nested PCR* esposto nei paragrafi seguenti, che produce nella prima e nella seconda fase della PCR rispettivamente un amplicon da 1 447 bp e uno da 848 bp del gene che codifica per rRNA 18 s.

La reazione della prima fase della PCR è allestita in un volume di 50µl che contiene le concentrazioni finali di 1 × GoTaq Buffer (Promega), 5mM MgCl₂, 1pmol/µl di primer WSSV 146 F1, 1pmol/µl di primer WSSV 146 R1 (Tabella 1), 0,25mM dNTPs, 1,25U di Taq polimerasi e 2,5µl di DNA. Ogni campione è duplicato e associato ad controllo di estrazione negativo, ad un controllo della PCR negativo (con l'aggiunta di 2,5 µl di H₂O invece di DNA) e ad un controllo positivo. Il controllo positivo è composto di plasmide di virus WSS diluito, preparato e convalidato per l'impiego all'interno del laboratorio (disponibile presso il laboratorio di riferimento dell'Unione europea).

La reazione della seconda fase della PCR per rilevamento del virus WSS viene allestita come quella della prima fase ma con l'impiego del set di primer per virus WSS 146 F2/R2 e utilizzando un secondo controllo positivo per verificare il buon funzionamento di questa fase.

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

Sia la prima, sia la seconda fase della PCR sono effettuate usando le seguenti successioni di cicli con un termociclatore DNA Engine Tetrad 2 Peltier (o equivalente). Una fase iniziale di denaturazione a 94 °C per due minuti, seguita da 94 °C per 30 secondi, 62 °C per 30 secondi, 72 °C per 30 secondi ripetuti per 30 cicli, una fase di allungamento di 72 °C per due minuti, e mantenere il tutto a 4 °C.

6. Elettroforesi su gel

I prodotti amplificati ottenuti dalla prima e dalla seconda fase della PCR sono visualizzati su gel di agarosio al 2 % ottenuti con impiego di tampone TAE. 15 µl di ogni campione sono sottoposti ad una tensione di 120 volt per circa 20 minuti ed esaminati sotto luce UV. I campioni positivi produrranno una banda di 1 447 bp nella prima fase della PCR e di 848 bp nella seconda fase della PCR. I campioni di tali dimensioni sono ritagliati e posti in una micropipetta da centrifuga da 1,5 ml. Il DNA contenuto nelle sezioni di gel è purificato usando Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System di Promega secondo le istruzioni dei fabbricanti. La concentrazione del DNA è valutata usando un apparecchio Nano Drop. Il DNA purificato, se non utilizzato immediatamente, è congelato alla temperatura di - 20 °C.

7. Sequenziamento di prodotti della PCR

Il DNA è sequenziato usando il kit Big Dye Terminator v3,1 (Applied Biosystems). Il volume totale di ogni reazione è di 20 µl, mentre le concentrazioni finali sono 1 × Big Dye Terminator, 1 × tampone di sequenziamento, 10 pmol/µl di primer forward o reverse e 10 µl di DNA purificato (diluito a circa 10 ng/µl), cui si applica la seguente successione di cicli usando un termociclatore DNA Engine Tetrad 2 Peltier (o equivalente): 94 °C per 30 secondi seguito da 96 °C per 10 secondi, 50 °C per 10 secondi e 60 °C per quattro minuti, le ultime tre fasi sono ripetute 30 volte.

I prodotti della PCR sono precipitati usando il metodo a base di acetato di sodio, che prevede di aggiungere 20 µl di DNA a 10 µl NaAc, 70 µl di H₂O e 250 µl di etanolo, passare al Vortex e centrifugare a 13 000 giri/m per 20 minuti, il supernatante è poi rimosso e il precipitato lavato con 200 µl di etanolo assoluto centrifugando a 13 000 giri/m per cinque minuti. Il precipitato è asciugato per cinque minuti a 37 °C. Si aggiungono al precipitato 25 µl di formammide Hi-Di, si riscalda a 95 °C per due minuti e si passa accuratamente al Vortex. I campioni sono sequenziati utilizzando l'analizzatore ABI3130xl Avant Genetic secondo le istruzioni dei fabbricanti. I risultati del sequenziamento sono analizzati utilizzando il software Sequencher e le sequenze sono confrontate con la banca dati del Centro nazionale di informazioni biotecnologiche degli Stati Uniti (NCBI) usando la funzione BLAST.
