

- zdravstveni uslovi za stavljanje na tržište, uvoz i provoz životinja iz oblasti akvakulture i njihovih proizvoda;
- minimalne preventivne mjere za suzbijanje i kontrolu zaraznih bolesti kod životinja akvakulture, usmjerene na podizanje svijesti i spremnosti nadležnih organa, subjekata u poslovanju s akvakulturom i drugih subjekata vezanih za ovu industriju;
- minimalne mjere kontrole koje se primjenjuju u slučaju sumnje ili pojave određenih bolesti kod vodenih životinja.

Član 2.
(Područje primjene)

- (1) Ovaj Pravilnik ne primjenjuje se na:
- ukrasne vodene životinje koje se uzgajaju u nekomercijalnim akvarijima;
 - slobodnoživuće vodene životinje koje su sakupljene ili izlovljene u svrhu njihovog direktnog unošenja u lanac ishrane;
 - vodene životinje koje su ulovljene u svrhu proizvodnje ribljeg brašna, hrane za ribe, ribljeg ulja ili sličnih proizvoda.
- (2) Čl. 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 49., 50., 51., 52., i 53. ovog Pravilnika ne primjenjuju se na ukrasne vodene životinje koje se drže u prodavnicama kućnih ljubimaca, vrtnim centrima, vrtnim ribnjacima, komercijalnim akvarijima ili kod veletrgovaca, pod uslovom da:
- ne postoji nikakav direktan dodir s otvorenim vodama;
 - postoji sistem obrade otpadnih voda kojim se rizik od prenošenja bolesti u otvorene vode smanjuje na prihvatljiv nivo.
- (3) Ovaj Pravilnik se primjenjuje ne dovodeći u pitanje odredbe o očuvanju vrsta ili unošenju stranih životinjskih vrsta.
- (4) Ured za veterinarstvo Bosne i Hercegovine (u daljnjem tekstu: Ured) uz saglasnost nadležnih veterinarskih organa entiteta može donijeti strožije mjere u području na koje se odnosi čl. 14., 27., 28., 29., 30., 31., 32., 33., 34., 35., 36., 37., 38., 39., 40., 41., 42., i 43. ovog Pravilnika.

Član 3.
(Definicije)

- (1) Definicije koje se koriste u ovom Pravilniku imaju slijedeće značenje:
- akvakultura - uzgoj ili kultivacija vodenih organizama korištenjem tehnika čiji je cilj povećanje proizvodnje tih organizama iznad mogućnosti koje pružaju prirodni uslovi životne sredine/okoliša, pri čemu organizmi ostaju vlasništvo jedne ili više fizičkih ili pravnih lica u svim fazama uzgoja ili kultivacije uključujući sakupljanje/izlov;
 - životinja akvakulture - svaka vodena životinja u svim fazama razvoja, uključujući ikru i mliječ/gamete, koja se uzgaja u uzgajalištu ili u području uzgoja mekušaca, uključujući sve vodene životinje iz prirode koje su namijenjene unošenju u uzgajalište ili područje uzgoja mekušaca;
 - poslovanje akvakulture - svaka djelatnost, bez obzira da li se ostvaruje dobit ili ne, javna ili privatna, kojom se obavlja bilo koja aktivnost vezana uz uzgoj, držanje ili kultivaciju životinja akvakulture;
 - subjekt u poslovanju akvakulture - svako fizičko ili pravno lice odgovorno za provođenje odredbi ovog Pravilnika u poslovanju akvakulture koja je pod njegovom kontrolom;
 - vodne životinje su:
 - ribe iz nadrazreda *Agnatha* i razreda *Chondrichthyes* i *Osteichthyes*,
 - mekušci koji pripadaju koljenu *Mollusca*,
 - rakovi koji pripadaju potkoljenu *Crustacea*,
 - registrirani objekt za preradu - svaki objekt u poslovanju s hranom registriran u skladu s Odlukom o veterinarsko-zdravstvenim uslovima koje moraju ispunjavati objekti za uzgoj, proizvodnju i stavljanje u promet riba i proizvoda od riba, te rakova i proizvoda od rakova ("Službeni glasnik BiH", broj 5/04) i Odlukom o uslovima kojima moraju udovoljavati objekti za klanje životinja, obradu, preradu i uskladištenje proizvoda životinjskog porijekla ("Službeni glasnik BiH", broj 27/05), a u kojem se preraduju životinje akvakulture namijenjene za ishranu ljudi;

- subjekt koji posluje u registriranom objektu za preradu - svako fizičko ili pravno lice odgovorno za provođenje odredbi ovog Pravilnika u registriranom objektu za preradu pod njegovom kontrolom;
- uzgajalište - svaki prostor, ograničeno područje ili sistem specifičan za uzgoj vodenih životinja kojim upravlja poslovanje akvakulture i u kojem se uzgajaju vodene životinje s ciljem njihovog stavljanja na tržište, osim onih u kojima se sakupljene ili izlovljene slobodnoživuće vodene životinje, koje su namijenjene ishrani ljudi, privremeno drže prije klanja bez hranjenja;
- uzgoj - uzgoj vodenih životinja u uzgajalištu ili području za uzgoj mekušaca;
- područje za uzgoj mekušaca - proizvodno područje ili područje za ponovno polaganje na kojem se svi poslovi u proizvodnji akvakulture provode u istom biosigurnosnom sistemu;
- ukrasna vodena životinja - vodena životinja koja se drži, uzgaja ili stavlja na tržište samo u ukrasne svrhe;
- stavljanje na tržište - prodaja, uključujući i ponudu na prodaju ili bilo koji drugi oblik prijenosa, bez obzira na naknadu, kao i svaki oblik premještanja vodenih životinja;
- proizvodno područje - bilo koje slatkovodno, morsko, estuarijsko ili područje lagune u kojem se nalaze prirodna staništa mekušaca ili područja koja se koriste za uzgoj i kultivaciju mekušaca i iz kojih se mekušci sakupljaju/izlovljavaju;
- ribolovna zona/područje - ribnjak ili drugi sistem specifičan za uzgoj vodenih životinja u kojem se populacija održava samo za rekreativni ribolov putem nadomještanja životinja iz akvakulture;
- područje za ponovno polaganje - slatkovodno, morsko, područje ušća ili lagune čije su granice jasno označene plutućama, stupovima ili drugim učvršćenim oznakama, a koje se upotrebljava isključivo za prirodno pročišćavanje živih mekušaca;
- slobodnoživuća vodena životinja - vodena životinja koja nije životinja iz akvakulture;
- klanje - postupak usmrćivanja u skladu s odredbama ovog Pravilnika;
- kultivacija - uzgoj vodenih životinja u uzgajalištu ili području za uzgoj mekušaca;
- odobreni objekt - objekt koji je registriran ili odobren u skladu s Odlukom o veterinarsko-zdravstvenim uslovima koje moraju ispunjavati objekti za uzgoj, proizvodnju i stavljanje u promet riba i proizvoda od riba, te rakova i proizvoda od rakova ("Službeni glasnik BiH", broj 5/04) i Odlukom o uslovima kojima moraju udovoljavati objekti za klanje životinja, obradu, preradu i uskladištenje proizvoda životinjskog porijekla ("Službeni glasnik BiH", broj 27/05);
- odjeljak - jedno ili više uzgajališta koja djeluju u okviru zajedničkog sistema biološke sigurnosti i u kojima se nalazi populacija vodenih životinja s posebnim zdravstvenim statusom obzirom na odnosnu bolest;
- zajednički sistem biološke sigurnosti - znači da se u svrhu nadziranja zdravstvenog statusa vodenih životinja, sprječavanja i kontrole bolesti primjenjuju iste mjere;
- područje u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti - područje oko zaraženog uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca na kojem se primjenjuju mjere kontrole bolesti kako bi se spriječilo njeno širenje;
- bolest - klinička ili inaparentna infekcija vodenih životinja povezana s prisutnošću jednog ili više etioloških uzročnika bolesti;
- zone ili odjeljci slobodni od bolesti - zone ili odjeljci koji su proglašeni slobodnim od bolesti u skladu s članom 49. ili članom 50. ovog Pravilnika;
- nova bolest - novootkrivena ugrožavajuća bolest, s utvrđenim ili još uvijek neutvrđenim uzrokom, koja se

- može širiti unutar ili između populacija, npr. trgovinom vodenim životinjama i/ili proizvodima porijeklom od vodenih životinja. Označava i bolest koja se već nalazi na popisu, ali koja je utvrđena u novoj vrsti domaćinu koja još nije uvrštena na popis iz Dijela II Aneksa II ovog Pravilnika kao prijemčiva vrsta;
- dd) epidemiološka jedinica - grupa vodenih životinja koje su približno jednako izložene riziku od uzročnika bolesti unutar određenog područja. Rizik može postojati zbog toga što životinje žive u istom vodenom okruženju ili zbog načina gazdovanja koji omogućava brzo širenje uzročnika bolesti iz jedne grupe životinja u drugu;
- ee) odmor - označava postupak koji se preduzima u svrhu suzbijanja bolesti pri kojem se iz uzgajališta uklanjaju životinje akvakulture prijemčive na bolest koja se suzbija ili za koje je poznato da mogu prenositi uzročnika te bolesti, te ako je izvodljivo, i voda u kojoj su životinje živjele;
- ff) daljnja prerada - prerada životinja akvakulture prije njihove upotrebe za ishranu ljudi primjenom bilo koje vrste mjera i tehnika kojima se utiče na anatomsku cjelovitost tih životinja, kao što su iskrvarenje, uklanjanje utrobe/evisceracija, uklanjanje glave, filetiranje i rezanje na komade, pri čemu nastaje otpad ili nusproizvodi i pri čemu bi moglo doći do rizika širenja bolesti;
- gg) povećano uginuće - neobjašnjivo uginuće koje je znatno veće od onog koji se za odnosno uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca smatra normalnim u uobičajenim okolnostima. Nadležni veterinarski inspeksijski organi entiteta odlučuju o tome što se smatra povećanim uginućem;
- hh) infekcija - prisutnost uzročnika bolesti koji je u fazi umnažanja ili razvoja ili u latentnoj fazi, u ili na domaćinu;
- ii) zaražena zona ili odjeljak - zona ili odjeljak u kojem se pojavila zaraza;
- jj) karantin - držanje grupe vodenih životinja u izolaciji na način da ne dolaze u direktni ili indirektni kontakt s drugim vodenim životinjama, s ciljem da se određeno vrijeme promatraju i da se, prema potrebi, podvrgnu testiranju i liječenju, a uključuje i odgovarajuću obradu otpadnih voda;
- kk) prijemčiva vrsta - svaka vrsta kod koje se razvila infekcija uzročnikom bolesti do koje je došlo prirodnim putem ili eksperimentalnom infekcijom pri kojoj su se oponašali prirodni uslovi;
- ll) vektor - vrsta koja nije prijemčiva na bolest, ali koja može širiti infekciju prenošeći uzročnika s jednog domaćina na drugog;
- mm) zona - jasno određeno geografsko područje s homogenim hidrološkim sistemom koji obuhvata dio slivnog područja od izvora do prirodne ili vještačke prepreke koja sprječava uzvodnu migraciju vodenih životinja iz donjih dijelova slivnog područja, ili cijelo slivno područje od izvora do ušća, ili više slivnih područja, uključujući njihova ušća, koja su međusobno epidemiološki povezana preko ušća.
- nn) područje vodenog sliva - je cjelokupno područje sliva od izvora vodenog toka do njegovog ušća ili dio područja sliva od izvora vodenog toka do prirodne ili umjetne prepreke koja sprječava migracije riba preko te prepreke.
- oo) obalno područje - je dio obale ili mora ili ušća s preciznim geografskim granicama koje se sastoji od homogenog hidrodinamičkog sistema ili od niza takvih sistema.
- pp) nadležni veterinarski inspektor - je inspektor nadležan za određeno administrativno područje.
- (2) Za potrebe ovog Pravilnika, primjenjuju se i pojmovi navedeni u:
- Zakonu o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini;
 - Odluci o uslovima kojima moraju udovoljavati objekti za klanje životinja, obradu, preradu i uskladištenje proizvoda životinjskog porijekla ("Službeni glasnik BiH", broj 27/05);
 - Odluci o veterinarsko-zdravstvenim uslovima koje moraju ispunjavati objekti za uzgoj, proizvodnju i stavljanje u promet riba i proizvoda od riba, te rakova i proizvoda od rakova ("Službeni glasnik BiH", broj 5/04);
 - Odluci o načinu obavljanja veterinarsko - zdravstvenog pregleda i kontrole životinja prije klanja i proizvoda životinjskog porijekla ("Sl. glasnik BiH", broj 82/06).
- Član 4.
(Nadležni organi)
- Nadležni organi za provođenje ovog Pravilnika u Bosni i Hercegovini su:
 - Ministarsvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa Bosne i Hercegovine - Ured;
 - Nadležni organi entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine: su nadležni organi definirani Zakonom o veterinarstvu ("Službene novine Federacije BiH", broj 46/00), Zakonom o veterinarstvu u Republici Srpskoj ("Službeni glasnik RS", broj 42/08) i Zakonom o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini ("Službeni glasnik BiH", broj 34/02) u slučaju Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine (u daljnjem tekstu: nadležni veterinarski organi entiteta);
 - Nadležni veterinarski inspeksijski organi entiteta: su nadležni organi definirani Zakonom o inspekcijama FBiH ("Službene novine Federacije BiH", broj 69/05) i Zakonom o inspekcijama Republike Srpske ("Službeni glasnik RS", br. 74/10).
 - Nadležni organi iz stava (1) ovoga člana obavljaju svoje aktivnosti i izvršavaju svoje obaveze u skladu sa svojim nadležnostima, prema trenutno važećim propisima.
 - Nadležni organi iz stava (1) ovoga člana osiguravaju da se između svih organa uključenih u provođenje ovog Pravilnika i svih drugih organa koji su uključeni u sistem akvakulture, vodenih životinja, hrane i hrane za životinje porijeklom iz akvakulture, uspostavi efikasna i stalna saradnja koja se zasniva na slobodnoj razmjeni informacija.
 - Nadležni organi iz stava (1) ovoga člana moraju imati pristup odgovarajućim uslugama laboratorija i najsvremenijim znanjima i tehnologijama u području analize rizika i epidemiologije te mora biti osigurana slobodna razmjena svih informacija neophodnih za primjenu ovog Pravilnika.
- DIO DRUGI - POSLOVANJE AKVAKULTURE I ODOBRENI OBJEKTI ZA PRERADU**
- Član 5.
(Odobranje poslovanja akvakulture i objekta za preradu)
- Nadležni veterinarski organi entiteta provode postupak registracije tako da svako poslovanje akvakulture bude odobreno u skladu s važećim propisima iz oblasti veterinarstva i članom 6. ovog Pravilnika.
 - Odobranje mogu obuhvatiti više poslovanja akvakulture koje se bave proizvodnjom mekušaca u području za uzgoj mekušaca. Otpremni centri, centri za pročišćavanje ili slične djelatnosti unutar područja za uzgoj mekušaca moraju se pojedinačno odobriti.
 - Nadležni veterinarski organi entiteta moraju registrirati svaki objekt za preradu u kojem se kolju vodene životinje u svrhu kontrole bolesti u skladu s članom 33. ovog Pravilnika, a u skladu s važećim propisima iz oblasti veterinarstva i članom 6. ovog Pravilnika.
 - Nadležni veterinarski organi entiteta za svako poslovanje akvakulture i odobreni objekt za preradu određuju jedinstveni broj odobrenja (veterinarski kontrolni broj).
 - Izuzetno od odredbi iz stava (1) ovoga člana, nadležni veterinarski organi entiteta, uz provođenje propisanog veterinarsko-sanitarnog nadzora, dozvoljavaju registraciju:

- a) sistema specifičnih za uzgoj vodenih životinja, osim poslovanja akvakulture, u kojima se drže vodene životinje koje nisu namijenjene stavljanju na tržište;
 - b) ribolovnih zona/područja;
 - c) poslovanja akvakulture koja snabdijeva krajnjeg potrošača malim količinama proizvoda direktno na mjestu proizvodnje.
- (6) U slučajevima iz stava (5) ovog člana odredbe ovog Pravilnika primjenjuju se, nakon potrebnih izmjena, uzimajući u obzir prirodu, značaj i položaj sistema specifičnih za uzgoj vodenih životinja, ribolovnog područja ili djelatnosti koje se odnose na navedeno i rizik od širenja bolesti vodenih životinja na druge populacije vodenih životinja kao rezultat njihovih radnji.
- (7) U slučaju nesukladenosti s odredbama ovog Pravilnika, nadležni organi iz člana 4. ovog Pravilnika postupaju u skladu sa stavom (3) člana 32. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini.

Član 6.

(Uslovi za odobravanje)

- (1) Nadležni veterinarski organi entiteta izdaju odobrenja iz člana 5. stav (1) i (2) ovog Pravilnika ukoliko subjekt u poslovanju akvakulture ili subjekt koji posluje u odobrenom objektu za preradu, pored uslova propisanih u važećim veterinarskim propisima:
- a) ispunjava odgovarajuće uslove iz čl. 9., 10. i 11. ovog Pravilnika;
 - b) ima uspostavljen sistem koji omogućava da subjekt nadležnom veterinarskom organu entiteta pokaže da su odgovarajući uslovi ispunjeni;
 - c) je pod nadzorom nadležnih veterinarskih inspeksijskih organa entiteta.
- (2) Odobrenje se ne smije dodijeliti ako bi predmetna aktivnost mogla dovesti do neprihvatljivog rizika od širenja bolesti na uzgajališta, područja za uzgoj mekušaca ili slobodnoživuća staništa vodenih životinja u neposrednoj blizini uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca. Prije donošenja odluke o odbijanju odobrenja, treba razmotriti mjere za smanjenje rizika, uključujući i mogućnost alternativnog smještaja predmetne aktivnosti.
- (3) Subjekt u poslovanju akvakulture ili subjekt koji posluje u odobrenom objektu za preradu mora dostaviti sve odgovarajuće podatke na osnovu kojih nadležni veterinarski organi entiteta mogu ocijeniti da li su ispunjeni uslovi za odobravanje, uključujući podatke iz Aneksa I ovog Pravilnika.

Član 7.

(Upisnik/registar)

Nadležni veterinarski organi entiteta uspostavljaju, ažuriraju i čine dostupnim javnosti Upisnik/registar poslovanja akvakulture i odobrenih objekata za preradu koji sadrži najmanje podatke iz Aneksa I ovog Pravilnika.

Član 8.

(Službene kontrole)

- (1) U skladu sa Zakonom o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini, nadležni organi iz člana 4. stava (1) ovog Pravilnika obavljaju službene kontrole poslovanja akvakulture i odobrenih objekata za preradu.
- (2) Službene kontrole iz stava (1) ovog člana moraju se sastojati najmanje od redovnih inspekcija, obilazaka, revizija i, kada je odgovarajuće, uzorkovanja za svako poslovanje akvakulture, uzimajući u obzir rizik koji poslovanje akvakulture i ovlašteni objekt za preradu predstavljaju u pogledu pojave i širenja bolesti. Preporuke za učestalost kontrola, koje zavise od zdravstvenog statusa u predmetnoj zoni ili odjeljku, određene su u Dijelu B. Aneksa II ovog Pravilnika.

Član 9.

(Obaveze u odnosu na evidencije - sljedivost)

- (1) Subjekti u poslovanju s akvakulturom moraju voditi evidenciju o:
- a) svim premještanjima životinja akvakulture i njihovih proizvoda u farmu ili iz farme ili područja za uzgoj mekušaca;
 - b) uginućima u svakoj epidemiološkoj jedinici prema vrsti i kategoriji vodenih životinja;
 - c) rezultatima programa nadziranja zdravstvenog statusa koji se zasniva na procjeni rizika u skladu s članom 11. ovog Pravilnika.
- (2) Odobreni objekti za preradu moraju voditi evidenciju o svim premještanjima životinja akvakulture i njihovih proizvoda u/i z navedenih objekata.
- (3) U slučaju prijevoza vodenih životinja prijevoznici moraju voditi evidenciju o:
- a) uginućima tokom prijevoza, u mjeri u kojoj je to moguće obzirom na vrstu prijevoza i vrste koje se prevoze;
 - b) uzgajalištima, područjima za uzgoj mekušaca i objektima za preradu u koje je ulazilo prijevozno sredstvo; i
 - c) svakoj zamjeni vode tokom prijevoza, naročito o porijeklu svježe vode i mjestu ispuštanja vode.
- (4) Ne dovodeći u pitanje posebne odredbe o sljedivosti, sva premještanja životinja koja su evidentirali subjekti u poslovanju akvakulture, kako je određeno tačkom a) stav (1) ovog člana moraju biti evidentirana na način da se može garantirati utvrđivanje porijekla i određištā.
- (5) Nadležni veterinarski organi entiteta mogu podatke iz stava (4) ovog člana bilježiti u registru i podatke o njima čuvati u elektronskom obliku.

Član 10.

(Dobra higijenska praksa)

Poslovanja akvakulture i odobreni objekti za preradu moraju provoditi dobru higijensku praksu primjerenu aktivnosti koja se obavlja kako bi se spriječilo unošenje i širenje bolesti.

Član 11.

(Program nadziranja zdravlja životinja)

- (1) Sva uzgajališta i područja za uzgoj mekušaca moraju provoditi program nadziranja zdravlja životinja koji je primjeren vrsti proizvodnje.
- (2) Program nadziranja zdravlja životinja iz stava (1) ovog člana, koji se zasniva na procjeni rizika, mora imati za cilj da utvrdi:
- a) svako povećanje uginuća na svim uzgajalištima i područjima za uzgoj mekušaca, zavisno od vrste proizvodnje; i
 - b) bolesti koje su navedene u Dijelu II Aneksa III ovog Pravilnika na uzgajalištima i područjima za uzgoj mekušaca u kojima se nalaze vrste prijemčive na te bolesti.
- (3) Preporuke o učestalosti provođenja programa nadziranja zdravlja životinja, zavisno od zdravstvenog statusa predmetne zone ili odjeljka, određene su u Dijelu B Aneksa II ovog Pravilnika. Navedeni program nadziranja provodi se ne dovodeći u pitanje uzorkovanje i nadzor koji se obavlja u skladu s čl. 27., 28., 29., 30., 31., 32., 33., 34., 35., 36., 37., 38., 39., 40., 41., 42. i 43. ili stavom (4) člana 49., stavom (8) člana 50. i članom 52. ovog Pravilnika.
- (4) Program nadziranja zdravlja životinja iz stava (1) ovog člana koji se zasniva na procjeni rizika, uzima u obzir vodiče koje priprema Ured.

**DIO TREĆI - USLOVI ZDRAVLJA ŽIVOTINJA
PRILIKOM STAVLJANJA NA TRŽIŠTE ŽIVOTINJA
AKVAKULTURE I NJIHOVIH PROIZVODA****Član 12.**
(Područje primjene)

- (1) Ako nije drugačije određeno, ovaj Dio primjenjuje se jedino na bolesti i na prijemčive vrste iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika.
- (2) Ured može, pod nadzorom nadležnog veterinarskog inspektorskog organa entiteta, odobriti stavljanje na tržište u naučne svrhe životinja akvakulture i njihovih proizvoda koji ne udovoljavaju uslovima iz ovog Dijela pri čemu ne smije biti ugroženo zdravstveno stanje vodenih životinja na odredištu ili mjestima provoza obzirom na bolesti koje su navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika.

Član 13.

(Opći uslovi za stavljanje na tržište životinja akvakulture)

- (1) Stavljanje na tržište životinja i proizvoda akvakulture ne smije ugroziti zdravstveno stanje vodenih životinja na odredištu, obzirom na bolesti koje su navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika.
- (2) Detaljna pravila o premještanju životinja akvakulture navedena su u ovom Dijelu, posebno koja se odnose na premještanje između zemalja, zona i odjeljaka s različitim zdravstvenim statusima kako je određeno u Aneksu II Dijelu A ovog Pravilnika.

Član 14.

(Uslovi za sprječavanje bolesti koji se odnose na prijevoz)

- (1) Mora se osigurati da se:
 - a) sve potrebne mjere sprječavanja bolesti primjenjuju tokom prijevoza životinja akvakulture kako se ne bi promijenio zdravstveni status tih životinja tokom prijevoza i kako bi se smanjio rizik od širenja bolesti;
 - b) životinje akvakulture prevoze pod uslovima koji ne mijenjaju njihov zdravstveni status niti ugrožavaju zdravstveni status odredišta i, prema potrebi, mjesta provoza;
 - c) odredbe ovog stava primjenjuju i na bolesti i prijemčive vrste koje nisu navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika.
- (2) Mora se osigurati da se svako mijenjanje vode tokom prijevoza obavlja na takvim mjestima i pod takvim uslovima koji ne ugrožavaju zdravstveno stanje:
 - a) životinja akvakulture koje se prevoze;
 - b) vodenih životinja na mjestu mijenjanja vode;
 - c) vodenih životinja na mjestu odredišta.

Član 15.

(Potvrda zdravlja životinja/veterinarsko-zdravstveni certifikat)

- (1) Za stavljanje na tržište životinja akvakulture potrebna je potvrda zdravstvenog stanja kada se životinje unose u zemlju, zonu ili odjeljak koji je proglašen slobodan od bolesti u skladu s čl. 49. i 50. ovog Pravilnika ili u kojima se provode programi nadziranja ili iskorjenjivanja u skladu sa st. (1) ili (2) člana 44. ovog Pravilnika za:
 - a) uzgoj i poribljavanje; ili
 - b) daljnju preradu prije upotrebe za ishranu ljudi, osim ukoliko su:
 - 1) u odnosu na ribe, zaklane i eviscerirane prije otpreme,
 - 2) u odnosu na mekušce i rakove, otpremljeni kao neprerađeni ili prerađeni proizvodi.
- (2) Za stavljanje na tržište životinja akvakulture potrebna je potvrda zdravstvenog stanja kada se dopušta da životinje napuste područje na kojem se provode mjere kontrole određene u čl. 32., 33., 34., 35., 36., 37., 38., 39., 40., i 41. Dijela V ovog Pravilnika. Odredbe ovog stava primjenjuju se i na bolesti i prijemčive vrste koje nisu navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika.

Član 16.

(Opći uslovi za stavljanje na tržište životinja akvakulture za uzgoj i poribljavanje)

- (1) Životinje akvakulture koje se stavljaju na tržište za uzgoj:
 - a) moraju biti klinički zdrave;
 - b) ne smiju poticati iz uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca u kojem postoji povećano neobjašnjeno uginuće životinja.
 - c) odredbe ovog stava primjenjuju se i na bolesti i prijemčive vrste koje nisu navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika.
- (2) Izuzetno od tačke b) stava (1) ovog člana, na osnovu procjene rizika dopušteno je stavljanje na tržište, pod uslovom da odnosne životinje potiču iz dijela uzgajališta ili dijela područja za uzgoj mekušaca koji je nezavisan od epidemiološke jedinice s povećanim uginućem.
- (3) Životinje akvakulture koje su namijenjene za uništavanje ili klanje u skladu s mjerama za suzbijanje bolesti propisanim Dijelom V ovog Pravilnika ne smiju se staviti na tržište u svrhu uzgoja ili poribljavanja.
- (4) Životinje akvakulture mogu se pustiti u prirodu jedino u svrhu poribljavanja ili u ribolovna područja pod uslovom da:
 - a) ispunjavaju uslove iz stava (1) ovog člana;
 - b) potiču iz uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca čiji je zdravstveni status u skladu s Aneksom II Dijelom A, a najmanje istovjetan zdravstvenom statusu voda u koje se te životinje puštaju.
- (5) Nadležni organi iz stava (1) člana 4. ovog Pravilnika u saradnji mogu odlučiti da životinje akvakulture moraju poticati iz zone ili odjeljaka koji je proglašen slobodnim od bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika. Nadležni organi iz iz stava (1) člana 4. ovog Pravilnika u saradnji mogu odlučiti da se ovaj stav primjenjuje i na programe koji se pripremaju i primjenjuju u skladu s članom 43. ovog Pravilnika.

Član 17.

(Unošenje životinja akvakulture vrsta prijemčivih na određenu bolest u područja koja su slobodna od te bolesti)

- (1) Radi unošenja za uzgoj ili poribljavanje u zemlju, zonu ili odjeljak koji je proglašen slobodnim od određene bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika, životinje akvakulture vrsta prijemčivih na odnosnu bolest moraju poticati iz druge zemlje, zone ili odjeljaka koji je proglašen slobodnim od te bolesti.
- (2) Ako se može naučno dokazati da vrste koje su prijemčive na određenu bolest ne prenose tu bolest u određenim stadijima razvoja odredbe stava (1) ovog člana ne primjenjuje se na određene razvojne stadije.
- (3) Popis vrsta i razvojnih stadija na koje se može primjenjivati stav (2) ovog člana sastavlja Ured i, prema potrebi, mijenja i dopunjuje u odnosu na najnovija naučna i tehnološka saznanja.

Član 18.

(Unošenje živih životinja akvakulture vrsta koje su vektori u područja slobodna od bolesti)

- (1) Ako naučni podaci ili praktično iskustvo dokazuju da su vrste koje nisu navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika možda odgovorne za prijenos određene bolesti vrstama koje su vektori mora se osigurati, ako se te vrste vektora unose radi uzgoja ili poribljavanja u zemlju, zonu ili odjeljak koji je proglašen slobodnim od određene bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika, da navedeni vektori:
 - a) potiču iz druge zemlje, zone ili odjeljaka koji je proglašen slobodnim od odnosne bolesti, ili
 - b) se drže u karantinskom prostoru u vodama slobodnim od odnosnog patogena, kroz odgovarajući vremenski period, do kada na osnovu raspoloživih naučnih podataka ili praktičnog iskustva bude dokazano da je dovoljno za smanjenje rizika od prijenosa određenih bolesti do nivoa prihvatljivog za sprečavanje prijenosa odnosne bolesti.

- (2) Popis vrsta koje su vektori bolesti i razvojnih stadija tih vrsta na koje se primjenjuje ovaj član i, kada je odgovarajuće, uslovi u kojima te vrste mogu prenositi bolest, sastavlja Ured, kada je odgovarajuće, mijenja i dopunjuje u skladu s najnovijim naučnim i tehnološkim saznanjima.

Član 19.

(Životinje akvakulture i njihovi proizvodi koji se stavljaju na tržište u svrhu daljnje prerade prije upotrebe za ishranu ljudi)

- (1) Životinje akvakulture prijemčivih vrsta koje su prijemčive na jednu ili više neegzotičnih bolesti iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika, i njihovi proizvodi, mogu se staviti na tržište samo u svrhu daljnje prerade u zemlji, zoni ili odjeljku koji je proglašen slobodnim od te bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika ukoliko ispunjavaju jedan od sljedećih uslova:
- a) potiču iz zemlje, zone ili odjeljka koji je proglašen slobodnim od odnosne bolesti;
 - b) prerađeni su u ovlaštenom objektu za preradu pod uslovima koji sprječavaju širenje bolesti;
 - c) u slučaju riba, zaklane su i eviscerirane prije otpreme; ili
 - d) u slučaju mekušaca i rakova, otpremljeni su kao neprerađeni ili prerađeni proizvodi.
- (2) Žive životinje akvakulture koje pripadaju vrstama prijemčivim na jednu ili više neegzotičnih bolesti iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika, a koje se stavljaju na tržište u svrhu daljnje prerade u zemlji, zoni ili odjeljku koji je proglašen slobodnim od tih bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika mogu samo privremeno biti skladištene na mjestu prerade ukoliko:
- a) potiču iz zemlje, zone ili odjeljka koji je proglašen slobodnom od odnosne bolesti; ili
 - b) ako se privremeno drže u otpremnim centrima, centrima za pročišćavanje ili sličnim objektima koji su opremljeni sistemom za obradu otpadnih voda kojim se inaktivira odnosni patogen ili u kojima se otpadne vode obrađuju na neki drugi način kojim se opasnost od prijenosa bolesti u prirodne vode smanjuje na prihvatljiv nivo.

Član 20.

(Životinje akvakulture i njihovi proizvodi koji se stavljaju na tržište za ishranu ljudi bez daljnje prerade)

- (1) Član 19. ovog Pravilnika ne primjenjuje se kada se životinje akvakulture koje pripadaju vrstama prijemčivim na jednu ili više bolesti navedenih u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika, ili njihovi proizvodi, stavljaju na tržište za ishranu ljudi bez daljnje prerade, pod uslovom da se nalaze u pakiranjima za prodaju na malo koja udovoljavaju uslovima o pakiranju i označavanju koji su propisani Pravilnikom o obilježavanju sirovina i proizvoda životinjskog porijekla i izradi, obliku i sadržaju veterinarskih oznaka ("Sl. glasnik BiH", broj 82/09).
- (2) Živi mekušci i rakovi koji pripadaju vrstama prijemčivim na jednu ili više bolesti navedenih u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika i privremeno se polažu u vode ili unose u otpremni centar, centar za pročišćavanje ili slične objekte, moraju udovoljavati uslovima iz člana 19. stav (2) ovog Pravilnika.

Član 21.

(Puštanje slobodnoživućih vodenih životinja u zemlji, zonama ili odjeljcima koji su proglašeni slobodnim od bolesti)

- (1) Slobodnoživuće vodene životinje koje pripadaju vrstama prijemčivim na jednu ili više bolesti navedenih u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika, a koje su ulovljene u zemlji, zoni ili odjeljku koji nije proglašen slobodnim od bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika, prije puštanja u uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca smješteno u zemlji, zoni ili odjeljku koje je proglašeno slobodnim od bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika moraju biti držane u karantinu pod nadzorom nadležnih veterinarskih inspeksijskih organa entiteta u odgovarajućim prostorima sve dok se opasnost od prijenosa bolesti ne smanji na prihvatljiv nivo.

- (2) Tradicionalnu ekstenzivnu akvakulturu u lagunama bez primjene perioda karantina iz stava (1) ovog člana može se dopustiti pod uslovom da se izvrši procjena rizika i smatra se da rizik nije veći od onog koji se očekuje zbog primjene člana 1. stav (1) ovog Pravilnika.

Član 22.

(Stavljanje na tržište ukrasnih vodenih životinja)

- (1) Kod stavljanja u promet ukrasnih vodenih životinja ne smije se ugroziti zdravstveno stanje vodenih životinja u odnosu na bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika.
- (2) Odredbe ovog člana primjenjuju se i u odnosu na bolesti koje nisu navedene na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika.

DIO ČETVRTI - UVOZ ŽIVOTINJA AKVAKULTURE I NJIHOVIH PROIZVODA IZ DRUGIH ZEMALJA

Član 23.

(Opći uslovi za uvoz životinja akvakulture i njihovih proizvoda iz drugih zemalja)

Ured odobrava uvoz životinja akvakulture i njihovih proizvoda u Bosnu i Hercegovinu iz drugih zemalja ili dijelova zemalja prema važećim propisima.

Član 24.

(Popis zemalja i dijelova zemalja iz kojih je dopušten uvoz pojedinih vrsta žive ribe, njihovih jaja i gameta namijenjenih uzgoju)

Popis zemalja ili dijelova zemalja iz kojih je dozvoljen uvoz pojedinih vrsta žive ribe, njihovih jaja, i gameta namijenjenih uzgoju u Bosni i Hercegovini predlaže i donosi Ured.

Član 25.

(Dokumentacija)

- (1) Pri uvozu sve pošiljke životinja akvakulture i njihovih proizvoda mora pratiti dokumentacija koja sadrži certifikat.
- (2) Certifikat potvrđuje da pošiljka ispunjava:
- a) uslove koji su za takvu vrstu robe utvrđeni u skladu s ovim Pravilnikom, i
 - b) sve posebne uslove uvoza koji su utvrđeni u skladu s članom 26. stav (2) tačka a) ovog Pravilnika.
- (3) Dokumentacija iz stava (1) ovog člana sadržava i podatke koji se zahtijevaju drugim propisima koji se odnose na veterinarsko-javno zdravstvo i zdravlje životinja.

Član 26.

(Detaljni uslovi)

- (1) Detaljne uslove za primjenu ovog Dijela donosi Ured.
- (2) Detaljni uslovi za primjenu ovog Dijela sadržavaju:
- a) posebne uslove za uvoz za svaku zemlju, dijelove zemalja ili grupe zemalja;
 - b) kriterije za razvrstavanje drugih zemalja i dijelova drugih zemalja obzirom na bolesti vodenih životinja;
 - c) upotrebu isprava u elektronskom obliku;
 - d) modele certifikata i ostalih dokumenata; i
 - e) postupke i certificiranje za provoz.

DIO PETI - PRIJAVA BOLESTI I MINIMALNE MJERE ZA KONTROLU BOLESTI VODENIH ŽIVOTINJA

Član 27.

(Prijava bolesti)

- (1) Mora biti osigurano da:
- a) ako postoji bilo koji razlog za sumnju na postojanje bolesti navedene na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika, ili ako je potvrđena prisutnost takve bolesti u vodenim životinja, takva se sumnja i/ili potvrda mora odmah prijaviti nadležnom veterinarskom inspeksijskom organu entiteta; i
 - b) ako se pojavi povećano uginuće životinja akvakulture, takvo se uginuće mora odmah prijaviti nadležnom veterinarskom inspeksijskom organu entiteta u svrhu daljnjih ispitivanja.

- (2) Obaveza prijavljivanja događaja predviđenih stavom (1) ovog člana vrijedi za:
- a) vlasnika i sva lica koja brinu o vodenim životinjama;
 - b) sva lica koja prate životinje akvakulture tokom prijevoza;
 - c) veterinare i druge stručnjake koji su uključeni u službe za praćenje zdravlja vodenih životinja;
 - d) službene veterinare i voditelje veterinarskih ili drugih službenih ili privatnih laboratorija; i
 - e) sva druga lica čija je profesionalna aktivnost povezana s vodenim životinjama prijemčivih vrsta ili njihovim proizvodima.

Član 28.

(Obavještanje OIE, Evropske komisije i susjednih zemalja)

Ured, u skladu s članom 12. Odluke o zaraznim bolestima ("Sl. glasnik BiH", broj 44/03), mora u roku od 24 sata obavijestiti OIE, Evropsku komisiju i susjedne zemlje u slučaju potvrde:

- a) egzotične bolesti s popisa navedenog u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika,
- b) neegzotične bolesti s popisa navedenog u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika, ako su cijela zemlja, zona ili odjeljak proglašeni slobodnim od odnosne bolesti.

Član 29.

(Početne mjere kontrole bolesti)

U slučaju sumnje na egzotičnu bolest ili sumnje na neegzotičnu bolest sa popisa iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika u zemlji, zonama ili odjeljcima čiji je zdravstveni status ili u I ili III kategoriji odnosne bolesti kako je navedeno u Aneksu II Dijelu A ovog Pravilnika, nadležni inspeksijski organi entiteta provode sljedeće:

- a) uzimanje odgovarajućih uzoraka koji se pretražuju u laboratoriji određenoj u skladu s članom 56. ovog Pravilnika,
- b) do dobijanja rezultata pretraživanja iz tačke a) ovog člana:
 - 1) uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca u kojem se sumnja na prisutnost bolesti mora se staviti pod službeni nadzor i moraju se provesti odgovarajuće mjere kontrole kako bi se spriječilo širenje bolesti na druge vodene životinje,
 - 2) niti jedna životinja akvakulture ne smije napustiti niti ući u zahvaćeno uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca u kojem se sumnja na prisutnost bolesti, osim ako to odobri nadležni veterinarski inspeksijski organ entiteta,
 - 3) mora se pokrenuti epidemiološko ispitivanje iz člana 30. ovog Pravilnika.

Član 30.

(Epidemiološko ispitivanje)

- (1) Mora se osigurati provođenje epidemiološkog ispitivanja započetog u skladu s članom 29. tačka b) alineja 3) ovog Pravilnika ako ispitivanje iz člana 29. tačke a) ovog Pravilnika pokaže prisutnost:
 - a) egzotične bolesti s popisa navedenog u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika u zemlji;
 - b) neegzotične bolesti s popisa navedenog u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika u zemlji, zonama ili odjeljcima čiji je zdravstveni status ili u I ili III kategoriji odnosne bolesti kako je navedeno u Aneksu II Dijelu A ovog Pravilnika.
- (2) Cilj epidemiološkog ispitivanja iz stava (1) ovog člana je:
 - a) utvrditi moguće porijeklo i načine kontaminacije;
 - b) istražiti da li su životinje akvakulture iznesene iz uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca tokom određenog perioda prije prijavljivanja sumnje propisano stavom (1) članom 27. ovog Pravilnika;
 - c) istražiti da li su druga uzgajališta bila zaražena.
- (3) Ako epidemiološko ispitivanje propisano stavom (1) ovog člana pokaže da je bolest mogla biti unesena u jedno ili više uzgajališta, područja za uzgoj mekušaca ili u otvorene vode,

mora biti osigurano da se na tim uzgajalištima, područjima za uzgoj mekušaca ili otvorenim vodama primijene mjere propisane članom 29. ovog Pravilnika.

- (4) U slučaju većih slivnih područja ili obalnih zona, nadležni veterinarski inspeksijski organi entiteta mogu ograničiti primjenu člana 29. ovog Pravilnika na manje područje u blizini uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca za koje se sumnja da je zaraženo, ako smatra da je takvo manje područje dovoljno veliko da jamči da se bolest neće širiti.
- (5) Kada je potrebno, nadležni organi susjednih i drugih zemalja moraju biti obaviješteni o slučaju sumnje na bolest.

Član 31.

(Ukidanje ograničenja)

Nadležni veterinarski inspeksijski organ entiteta ukida ograničenja propisana članom 29. tačka b) ovog Pravilnika kada se pretraživanjem propisanim članom 29. tačka a) ne utvrdi prisutnost bolesti.

Član 32.

(Opće mjere u slučaju potvrde egzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

Nadležni veterinarski inspeksijski organi entiteta naređuju i nadziru:

- a) da uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca bude službeno proglašeno zaraženim;
- b) da se oko uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca koje je proglašeno zaraženim uspostavi područje pod ograničenjem primjereno odnosnoj bolesti, koje će uključivati zaraženo i ugroženo područje;
- c) da se ne obavlja poribljavanje te da se životinje akvakulture ne premještaju unutar ili iz područja pod ograničenjem bez odobrenja nadležnog veterinarskog inspeksijskog organa entiteta;
- d) provođenje svih dodatnih mjera koje su potrebne da se spriječi daljnje širenje bolesti.

Član 33.

(Izlovljavanje i daljnja prerada u slučaju potvrde egzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

- (1) Životinje akvakulture koje su dostigle komercijalnu veličinu i ne pokazuju kliničke znakove bolesti mogu se pod nadzorom nadležnog veterinarskog inspeksijskog organa entiteta izlovljavati za ishranu ljudi ili za daljnju preradu.
- (2) Izlovljavanje, unošenje u otpremne centre ili centre za pročišćavanje, daljnja prerada i sve druge aktivnosti povezane s pripremom životinja akvakulture za unošenje u lanac ishrane moraju se obavljati u uslovima koji sprječavaju širenje uzročnika odgovornog za nastanak bolesti.
- (3) Otpremni centri, centri za pročišćavanje ili slične djelatnosti moraju biti opremljeni sistemom za obradu otpadnih voda kojim se inaktivira uzročnik odgovoran za nastanak bolesti ili se otpadne vode moraju obrađivati na neki drugi način kojim se rizik od prenošenja bolesti u prirodne vode smanjuje na prihvatljiv nivo.
- (4) Daljnja prerada mora se obavljati u odobrenim objektima za preradu.

Član 34.

(Uklanjanje i uništavanje u slučaju potvrde egzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

- (1) Mora se osigurati da se uginula riba i rakovi, kao i živa riba i rakovi koji pokazuju kliničke znakove bolesti uklone i unište pod nadzorom nadležnog veterinarskog inspeksijskog organa entiteta u skladu s Pravilnikom o načinu neškodljivog uklanjanja životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla i o uslovima koje moraju ispunjavati objekti i oprema za sabiranje, neškodljivog uklanjanje i utvrđivanje uzroka uginuća i prevozna sredstva za transport životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla ("Sl. list SFRJ", broj 53/89) što je prije moguće, u skladu s planom hitnih mjera koji je propisan članom 47. ovog Pravilnika.

- (2) Životinje akvakulture koje nisu postigle komercijalnu veličinu i ne pokazuju kliničke znakove bolesti moraju se, u odgovarajućem vremenskom periodu uzimajući u obzir vrstu proizvodnje i rizik koju te životinje predstavljaju za daljnje širenje bolesti, ukloniti i uništiti pod nadzorom nadležnog veterinarskog inspekcijskog organa entiteta u skladu s Pravilnikom iz stava (1) ovog člana i planom hitnih mjera propisanim članom 47. ovog Pravilnika.

Član 35.

(Odmor u slučaju potvrde egzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

- (1) Kada je moguće, na zaraženim uzgajalištima ili područjima za uzgoj mekušaca u odgovarajućem periodu provodi se odmor nakon njihovog praznjenja i, kada je prikladno, čišćenje i dezinfekcija.
- (2) U slučaju uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca u kojima se uzgajaju životinje akvakulture koje nisu prijemčive na odnosnu bolest, odluke o odmoru donose se na osnovu procjene rizika.

Član 36.

(Zaštita vodenih životinja u slučaju potvrde egzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

Nadležni organi iz člana 4. stav (1) ovog Pravilnika moraju poduzeti potrebne mjere kako bi se spriječilo širenje bolesti na druge vodene životinje.

Član 37.

(Ukidanje mjera u slučaju potvrde egzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

Mjere propisane u čl. 32., 33., 34., 35. i 36. ostaju na snazi sve dok se:

- ne provedu mjere iskorjenjivanja bolesti propisane u čl. 32., 33., 34., 35. i 36.;
- u području pod ograničenjem ne provedu uzorkovanje i nadzor primjereni za odnosnu bolest i tipove poslovanja akvakulture, s negativnim rezultatima.

Član 38.

(Opće odredbe u slučaju potvrde neegzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

- (1) U slučaju potvrde neegzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika u zemlji, zoni ili odjeljku proglašenim slobodnim od odnosne bolesti, mora se:
- primijeniti mjere propisane u čl. 32., 33., 34., 35. i 36. i 37. u svrhu ponovnog sticanja statusa slobodnog od bolesti; ili
 - pripremiti program iskorjenjivanja bolesti u skladu s članom 44. stavom (2) ovog Pravilnika.
- (2) Izuzetno od propisanog članom 34. stavom (2) ovog Pravilnika, a u slučaju primjene mjera propisanih u čl. 32., 33., 34., 35. i 36. i 37., može se dopustiti da se klinički zdrave životinje uzgajaju do tržišne veličine prije klanja za ishranu ljudi ili da se premjeste u drugu zaraženu zonu ili odjeljak. U takvim slučajevima moraju se poduzeti mjere kako bi se smanjilo i, što je više moguće, spriječilo daljnje širenje bolesti.
- (3) Ako zemlja ne želi ponovno vratiti status slobodne od bolesti, primjenjuju se odredbe iz člana 39. ovog Pravilnika.

Član 39.

(Mjere za suzbijanje bolesti u slučaju potvrde neegzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II)

Kada se potvrdi prisutnost neegzotične bolesti navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika u zemlji, zoni ili odjeljku koji nisu proglašeni slobodnim od odnosne bolesti, nadležni veterinarski inspekcijski organ entiteta mora poduzeti mjere za sprječavanje širenja bolesti koje obuhvaćaju najmanje sljedeće:

- proglašavanje uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca zaraženim;
- oko uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca koje je proglašeno zaraženim uspostava područja u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti primjereno odnosnoj

bolesti, a koje će uključivati zaraženo i ugroženo područje;

- c) ograničavanje premještanja životinja akvakulture iz područja u kojem se provode mjere za suzbijanje bolesti, na način da se životinje mogu isključivo:

- unositi u uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca u skladu sa stavom (2) članom 12. ovog Pravilnika, ili
- izloviti i klati radi ishrane ljudi u skladu sa stavom (1) članom 33. ovog Pravilnika;

- d) uklanjanje i uništavanje uginulih riba i rakova, pod nadzorom nadležnog veterinarskog inspekcijskog organa entiteta u skladu s Pravilnikom o načinu neškodljivog uklanjanja životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla i o uslovima koje moraju ispunjavati objekti i oprema za sabiranje, neškodljivog uklanjanje i utvrđivanje uzroka uginuća i prevozna sredstva za transport životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla ("Sl. list SFRJ", broj 53/89), u odgovarajućem roku uzimajući u obzir vrstu proizvodnje i rizik koji te životinje predstavljaju u pogledu daljnjeg širenja bolesti.

Član 40.

(Kontrola bolesti navedenih u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika u slobodnoživućih vodenih životinja)

- Kada su slobodnoživuće vodene životinje zaražene ili se sumnja da su zaražene egzotičnim bolestima navedenim u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika, nadležni veterinarski inspekcijski organi entiteta prate situaciju i poduzimaju mjere kako bi se smanjilo i, koliko god je to moguće, spriječilo daljnje širenje bolesti.
- Kada su slobodnoživuće vodene životinje zaražene ili se sumnja da su zaražene neegzotičnim bolestima navedenim u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika u zemlji, zoni ili odjeljku koji su proglašeni slobodnim od odnosne bolesti, nadležni veterinarski inspekcijski organi entiteta prate situaciju i poduzimaju mjere kako bi se smanjilo i, koliko god je to moguće, spriječilo daljnje širenje bolesti.
- Ured obavještava OIE, Evropsku komisiju i susjedne zemalje o mjerama koje su poduzete u skladu sa st. (1) i (2) ovog člana.

Član 41.

(Mjere suzbijanja novih bolesti)

- Opće epidemijske mjere do utvrđivanja uzročnika bolesti moraju biti poduzete radi suzbijanja nove bolesti i sprječavanja njezinog širenja, ako bi nova bolest mogla ugroziti zdravstveni status vodenih životinja.
- Prema potrebi, popis naveden u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika, mijenja i nadopunjuje Ured kako bi se na njega uvrstila nova bolest ili nova vrsta koja je prijemčiva na bolest koja se već nalazi na popisu iz navedenog Aneksa.

Član 42.

(Postupak za donošenje ad hoc epidemioloških mjera za bolesti s popisa navedenih u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika)

Nadležni organi iz člana 4. stav (1) ovog Pravilnika mogu donijeti odluku kojom se u ograničenom periodu dopušta provedba ad hoc mjera pod uslovima koji su primjereni epidemiološkoj situaciji kada se:

- smatra da mjere propisane ovim Dijelom nisu prikladne za epidemiološku situaciju; ili
- bolest se i dalje širi uprkos mjerama poduzetim u skladu s ovim Dijelom.

Član 43.

(Odredbe za ograničavanje učinka bolesti koje nisu navedene na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika)

Ako bolest koja se ne nalazi na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika predstavlja značajan rizik za zdravstveno stanje životinja akvakulture ili slobodnoživućih vodenih životinja u zemlji, moraju se poduzeti mjere kako bi se spriječilo unošenje odnosne bolesti ili kako bi se bolest stavila pod kontrolu. Mjere

moraju biti odgovarajuće i ne smiju biti strožije nego što je potrebno za sprječavanje unošenja i kontrolu bolesti.

DIO ŠESTI - PROGRAMI KONTROLE BOLESTI I VAKCINACIJA

Član 44.

(Izrada i odobravanje programa nadziranja i iskorjenjivanja bolesti)

- (1) Za bolesti nepoznatog statusa, za koje zemlja, zona ili odjeljak nisu proglašeni slobodnim od jedne ili više neegzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika, kategorija III, kako je navedeno u Aneksu II Dijelu A ovog Pravilnika, Ured uz saglasnost nadležnih veterinarskih organa entiteta izrađuje program nadziranja bolesti u svrhu dobijanja statusa slobodnog od jedne ili više navedenih bolesti.
- (2) Ako zemlja ima status zaražene jednom ili više neegzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika, kategorija V, kako je navedeno u Aneksu II Dijelu A ovog Pravilnika, Ured uz saglasnost nadležnih veterinarskih organa entiteta izrađuje program iskorjenjivanja jedne ili više navedenih bolesti.
- (3) Na područja obuhvaćena programima primjenjuju se uslovi i mjere propisani odredbama čl. 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 28., 29. i 30. i člana 38. stav (1) ovog Pravilnika, a koji se odnose na područja sa statusom slobodnim od bolesti.

Član 45.

(Sadržaj programa)

Programi moraju da sadrže najmanje slijedeće:

- a) opis epidemiološkog statusa bolesti prije datuma započinjanja provedbe programa;
- b) analizu procijenjenih troškova i očekivane koristi od programa;
- c) pretpostavljeno trajanje programa i cilj koji se mora postići do njegovog okončanja; i
- d) opis i razgraničenje geografskog i upravnog područja u kojem će se program provoditi.

Član 46.

(Period primjene programa)

- (1) Programi se primjenjuju sve dok:
 - a) se ne ispune zahtjevi iz Aneksa IV ovog Pravilnika i dok se zemlja, zona ili odjeljak ne proglase slobodnim od bolesti; ili
 - b) Ured, uz saglasnost nadležnih veterinarskih organa entiteta ne ukine program zbog toga što više ne ispunjava svoju svrhu.
- (2) Ako se program ukine u skladu s odredbama stava (1) tačka b) ovog člana, od datuma ukidanja programa moraju se primjenjivati mjere za sprječavanje širenja bolesti koje su propisane članom 39. ovog Pravilnika.

Član 47.

(Plan hitnih mjera za slučaj pojave novih i egzotičnih bolesti)

- (1) Ured uz saglasnost nadležnih veterinarskih organa entiteta izrađuje plan hitnih mjera u kojem utvrđuje mjere koje su potrebne za održavanje visokog nivoa svijesti i pripravnosti te za osiguranje zaštite okoliša.
- (2) Planom hitnih mjera mora se osigurati:
 - a) ovlasti i sredstva nadležnim veterinarskim organima entiteta za pristup svim objektima, opremi, osoblju i ostalim odgovarajućim materijalima koji su potrebni za brzo i efikasno iskorjenjivanje bolesti;
 - b) koordinacija, usklađenost i saradnja sa susjednim državama; i
 - c) kada je to opravdano, precizne podatke o potrebama za vakcinom i uslovima neophodnim za provođenje hitne vakcinacije.
- (3) Pri izradi plana hitnih mjera Ured mora poštivati kriterije i zahtjeve propisane u Aneksu VI ovog Pravilnika.

- (4) Plan hitnih mjera se provodi u slučaju izbijanja novih i egzotičnih bolesti koje su navedene u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika.

Član 48.

(Vakcinacija)

- (1) Vakcinacija protiv egzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika je zabranjena, osim ako se takva vakcinacija odobri u skladu s čl. 41., 42. ili 47. ovog Pravilnika.
- (2) Vakcinacija protiv neegzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika je zabranjena u svim dijelovima zemlje koji su proglašeni slobodnim od odnosnih bolesti u skladu s čl. 49. ili 50. ovog Pravilnika ili koji su obuhvaćeni programom nadziranja koji je odobren u skladu sa stavom (1) članom 44. ovog Pravilnika.
- (3) Ured može dopustiti vakcinaciju iz stava (2) ovog člana u dijelovima zemlje koji nisu proglašeni slobodnim od odnosnih bolesti ili u kojima se vakcinacija provodi kao dio programa iskorjenjivanja bolesti koji je odobren u skladu s članom 44. stav (2) ovog Pravilnika.
- (4) Vakcine koje se koriste moraju biti odobrene u skladu sa Zakonom o lijekovima koji se upotrebljavaju u veterinarstvu ("Sl. novine Federacije BiH", broj 15/98 i 70/08) i Zakonom o veterinarskim lijekovima i veterinarsko-medicinskim proizvodima ("Sl. glasnik RS", broj 37/02 i 71/09).
- (5) St. (1) i (2) ovog člana ne primjenjuju se na naučna istraživanja koja se provode u svrhu razvoja i ispitivanja vakcine u kontroliranim uslovima.
- (6) Ured nadzire da se tokom provođenja istraživanja iz stava (5) ovog člana poduzimaju odgovarajuće mjere za zaštitu ostalih vodenih životinja od svakog štetnog djelovanja vakcinacije koja se provodi u okviru navedenih studija.

DIO SEDMI - STATUS ZEMLJE, ZONE ILI ODJELJKA SLOBODNOG OD BOLESTI

Član 49.

(Zemlja slobodna od bolesti)

- (1) Ured proglašava teritoriju Bosne i Hercegovine slobodnom od jedne ili više neegzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika ako su ispunjeni uslovi iz stava (2) ovog člana i:
 - a) ako na teritoriji nije prisutna niti jedna vrsta koja je prijemčiva na odnosnu bolest;
 - b) ako nema uslova za preživljavanje uzročnika u vodenim resursima;
 - c) ispunjava uslove utvrđene u Aneksu IV Dijelu I ovog Pravilnika.
- (2) Ako susjedne države ili slivna područja koja se dijele sa susjednim državama nisu proglašena slobodnim od bolesti, Ured mora odrediti granice zone ograničenja na teritoriji Bosne i Hercegovine.
- (3) Granice zone ograničenja moraju biti određene na način da se područja slobodna od bolesti zaštite od pasivnog unošenja bolesti.
- (4) Posebne zahtjeve u vezi nadziranja, zona ograničenja, uzorkovanja i dijagnostičkih metoda koje se koriste za proglašavanje statusa zemlje slobodne od bolesti u skladu s ovim članom određuje Ured.

Član 50.

(Zona ili odjeljak slobodan od bolesti)

- (1) Subjekt u poslovanju akvakulture, u cilju određivanja zona ili odjeljaka slobodnih od jedne ili više neegzotičnih bolesti koje se nalaze na popisu navedenom u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika, upućuju zahtjev nadležnom veterinarskom organu entiteta uz uslov da:
 - a) u toj zoni, odjeljku ili u njihovim vodenim resursima nije prisutna niti jedna vrsta koja je prijemčiva na odnosnu bolest;

- b) je poznato da uzročnik ne može preživjeti u toj zoni ili odjeljku i, kada je to potrebno, njihovim vodenim resursima;
 - c) zona ili odjeljak ispunjava uslove propisane u Aneksu IV Dijelu II ovog Pravilnika.
- (2) Subjekt u poslovanju akvakulture započinje proceduru dostavom potrebne dokumentacije iz stava (1) ovog člana.
- (3) Nadležni veterinarski organ entiteta je dužan u roku od mjesec dana od zaprimanja dokumentacije, koja se odnosi na zahtjev iz stava (1) ovog člana, razmotriti istu.
- (4) Nadležni veterinarski organ entiteta razmatranje provodi na osnovu dokumentacije navedene u stavu (1) ovog člana, a tamo gdje je potrebno, provodi inspekciju na terenu preko svog nadležnog veterinarskog inspekcijskog organa entiteta u cilju kontrole primjene mjera propisanih ovim Pravilnikom.
- (5) Nadležni veterinarski organi entiteta nakon razmatranja donose zaključak, koji dostavljaju Uredu.
- (6) Ako nadležni veterinarski inspekcijski organi entiteta utvrde nedostatke zone ili odjeljaka slobodnim od jedne ili više neegzotičnih bolesti koje se nalaze na popisu navedenom u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika, dužni su narediti mjere za otklanjanje istih i o tome pismeno izvijestiti nadležni veterinarski organ entiteta. Nadležni veterinarski organ entiteta je dužan provjeriti navode i u skladu s nalazom odlučiti o statusu zone ili odjeljaka.
- (7) U slučaju potrebe, uslove iz stava (1) ovog člana Ured, uz saglasnost nadležnih veterinarskih organa entiteta, može promijeniti ili nadopuniti, u zavisnosti od epizootičke situacije u Bosni i Hercegovini.
- (8) Posebne uslove u vezi nadziranja, zona ograničenja, uzorkovanja i dijagnostičkih metoda koje se koriste za proglašavanje statusa zone ili odjeljaka slobodnih od bolesti u skladu s ovim članom određuje Ured uz saglasnost nadležnih veterinarskih organa entiteta.

Član 51.

(Popis zona ili odjeljaka koji su slobodni od bolesti)

Ured uspostavlja i ažurira popis zona ili odjeljaka koji su proglašeni slobodnim od bolesti.

Član 52.

(Održavanje statusa slobodnih od bolesti)

- (1) Kada se proglasi status Bosne i Hercegovine slobodne od jedne ili više neegzotičnih bolesti s popisa navedenog u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika u skladu s članom 49. ovog Pravilnika, Ured može prekinuti ciljano nadziranje i proglasiti status zemlje slobodne od bolesti uz uslov da se bolest klinički ne manifestira i da se postupa u skladu s odredbama ovog Pravilnika.
- (2) Ako su samo određene zone ili odjeljci unutar Bosne i Hercegovine proglašeni slobodnim od bolesti iz stava (1) ovog člana i u svim slučajevima gdje nema jasnog kliničkog manifestiranja bolesti, ciljano nadziranje mora se nastaviti u skladu s članom 49. stav (4) ovog Pravilnika ili, ovisno od slučaja, članom 50. stav (8) ovog Pravilnika, ali na nivou koji odgovara stepenu rizika.

Član 53.

(Privremeno ukidanje i ponovno dobijanje statusa slobodnog od bolesti)

- (1) Nadležni veterinarski organi entiteta, u slučaju opravdane sumnje da se bilo koji uslov za održavanje statusa zone ili odjeljaka slobodnog od bolesti ne ispunjava, obustavlja trgovinu prijemčivim vrstama i vektorskim vrstama u druge zemlje, zone ili odjeljke koje obzirom na odnosnu bolest imaju viši zdravstveni status propisan Aneksom II Dijelom A ovog Pravilnika te mora primijeniti odredbe propisane u čl. 29., 30. i 31. ovog Pravilnika.
- (2) Ako epidemiološko ispitivanje propisano članom 30. stav (1) ovog Pravilnika potvrdi da sumnja navedena u stavu (1) ovog člana nije bila opravdana, nadležni veterinarski organi

entiteta područje, zona ili odjeljaka ponovo proglašava slobodnim od bolesti.

- (3) Ako epidemiološko ispitivanje potvrdi da postoji velika vjerovatnost da je došlo do infekcije u zoni ili odjeljku nadležni veterinarski organ entiteta ukida status slobodnog od bolesti, u skladu s postupkom prema kojem je taj status bio proglašen. Prije nego se navedeni status ponovo uspostavi moraju se ispuniti uslovi propisani u Aneksu IV ovog Pravilnika.

DIO OSMI - LABORATORIJE

Član 54.

(Referentne laboratorije Evropske unije)

Referentne laboratorije Evropske unije za bolesti vodenih životinja navedene su u Aneksu V Dijelu I ovog Pravilnika.

Član 55.

(Referentna laboratorija u Bosni i Hercegovini)

- (1) Referentna laboratorija u Bosni i Hercegovini za bolesti vodenih životinja je Veterinarski fakultet, Veterinarski institut, Odjel za akvakulturu, Ul. Zmaja od Bosne 90, Sarajevo.
- (2) Ured obavještava Evropsku komisiju o laboratoriji iz stava (1) ovog člana, kao i o svim promjenama navedenih podataka.
- (3) Referentna laboratorija za bolesti vodenih životinja u Bosni i Hercegovini mora sarađivati s referentnim laboratorijama Evropske unije navedenim u članu 54. ovog Pravilnika.
- (4) Kako bi se, u skladu s odredbama ovog Pravilnika, osiguralo efikasno pružanje dijagnostičkih usluga na cijelom području države, referentna laboratorija u Bosni i Hercegovini sarađuje s ovlaštenim dijagnostičkim laboratorijama u državi koje su određene u skladu s članom 56. ovog Pravilnika.
- (5) Referentna laboratorija mora osigurati da bude primjereno opremljena i da raspolaže s odgovarajućim brojem osposobljenog osoblja za obavljanje laboratorijskih ispitivanja koja se zahtijevaju u skladu s ovim Pravilnikom te za izvršavanje poslova i zadataka koji su propisani Aneksom V Dio II ovog Pravilnika.

Član 56.

(Dijagnostičke usluge i metode)

Mora se osigurati da:

- a) se laboratorijska pretraživanja u svrhu ovog Pravilnika obavljaju u laboratorijama koje su ovlaštene od strane nadležnih veterinarskih organa entiteta;
- b) se laboratorijska pretraživanja u slučaju sumnje i u svrhu potvrđivanja prisutnosti bolesti koje se nalaze na popisu navedenom u Aneksu III Dijelu II ovog Pravilnika provode primjenom propisanih dijagnostičkih metoda;
- c) laboratorije koje su ovlaštene za pružanje dijagnostičkih usluga u skladu s ovim članom, udovoljavaju zahtjevima propisanim Aneksom V Dijelom III ovog Pravilnika.

DIO DEVETI - INSPEKCIJSKI PREGLEDI I SANKCIJE

Član 57.

(Inspekcijski pregledi i revizije Evropske unije)

- (1) Ured pruža stručnjacima Evropske komisije svu pomoć koja im je potrebna za provedbu inspekcijskih pregleda i revizija.
- (2) Ako se tokom inspekcijskog pregleda od strane Evropske komisije utvrdi postojanje ozbiljne opasnosti za zdravlje životinja, Ured u saradnji s nadležnim veterinarskim organima iz člana 4. st. (2) i (3) mora odmah poduzeti sve potrebne mjere za zaštitu zdravlja životinja.

Član 58.

(Kaznene odredbe)

U slučaju nesukladnosti s odredbama ovog Pravilnika kazne su propisane Zakonom o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini.

DIO DESETI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Član 59.
(Aneksi)

Aneksi I do VIII čine sastavni dio ovog Pravilnika.

Član 60.
(Stavljanje propisa van snage)

Danom primjene ovog Pravilnika prestaje važiti Odluka o veterinarsko-zdravstvenim uslovima koji moraju biti ispunjeni prilikom stavljanja u promet žive ribe, rakova i mekušaca, te

proizvoda dobijenih od njih ("Službeni glasnik BiH", br. 62/05, 43/09 i 94/09).

Član 61.
(Stupanje na snagu)

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH", a primjenjuje se od 01.07.2011. godine.

VM broj 41/11
12. januara 2011. godine
Sarajevo

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr. Nikola Špirić, s. r.

ANEKS I

Podaci koje mora sadržavati Registar poslovanja akvakulture i odobrenih objekata za preradu

DIO I ODOBRENA POSLOVANJA AKVAKULTURE

(1) Evidencije koje vode nadležni veterinarski organi entiteta u skladu s članom 6. ovog Pravilnika moraju sadržavati slijedeće podatke o svakom poslovanju akvakulture:

- a) naziv i adresu poslovanja akvakulture te podatke za kontakt (telefon, telefaks, elektronska pošta);
- b) odobreni broj i pojedinosti o odobravanju (datumi posebnih odobravanja, identifikacijske oznake ili brojevi, posebni uslovi proizvodnje kao i drugi podaci bitni za odobravanje);
- c) geografski položaj uzgajališta definiran odgovarajućim sistemom koordinata svih mjesta uzgoja (koordinata GIS-a);
- d) namjenu, vrstu (vrsta uzgoja ili objekata kao što su kopneni objekti, morski kafezi, ribnjaci na kopnu) te najveći obim proizvodnje, ako je to propisano;
- e) ako se radi o uzgajalištima na kopnu, otpremnim centrima i centrima za pročišćavanje, pojedinosti o načinu snabdijevanja uzgajališta vodom i o odvodu otpadnih voda;
- f) vrste životinja akvakulture koje se uzgajaju u uzgajalištu (ako je riječ o uzgajalištima u kojima se uzgaja više vrsta ili ukrasne vrste, mora se obavezno navesti za koje je od tih vrsta poznato da su prijemčive na bolesti navedene na popisu iz Aneksa III Dijela II ovog Pravilnika ili da su vektori tih bolesti);
- g) ažurirani podaci o zdravstvenom statusu (da li je uzgajalište slobodno od bolesti, obuhvaćeno programom u svrhu postizanja takvog statusa, proglašeno zaraženim bolešću navedenom u Aneksu III ovog Pravilnika).

(2) Ako je odobrenje izdato području za uzgoj mekušaca u skladu s članom 5. st. (1) i (2) ovog Pravilnika, podaci koji se zahtijevaju u skladu s tačkom a) stava (1) ovog Dijela bilježe se za sva poslovanja akvakulture koja djeluju unutar odnosnog područja za uzgoj mekušaca. Podaci koji se zahtijevaju u skladu s tačkama b) do g) stava (1) ovog Dijela bilježe se na nivou područja za uzgoj mekušaca.

DIO II ODOBRENI OBJEKTI ZA PRERADU

Evidencije koje vode nadležni veterinarski organi entiteta u skladu s članom 6. ovog Pravilnika moraju sadržavati slijedeće podatke o svakom odobrenom objektu za preradu:

- a) naziv i adresu odobrenog objekta za preradu te podatke za kontakt (telefon, telefaks, elektronska pošta);
- b) odobreni broj i pojedinosti o odobravanju (datumi posebnih odobrenja, identifikacijske oznake ili brojevi, posebni uslovi proizvodnje kao i drugi podaci bitni za odobravanje);
- c) geografski položaj objekta za preradu definiran odgovarajućim sistemom koordinata (koordinata GIS-a);
- d) podaci o sistemu obrade otpadnih voda odobrenog objekta za preradu;
- e) vrste životinja akvakulture koje se prerađuju u odobrenom objektu za preradu.

ANEKS II

DIO I ZDRAVSTVENI STATUS ZONA ILI ODJELJKA AKVAKULTURE KOJI SE MORA UZETI U OBZIR U PRIMJENI ČLANA 13. OVOG PRAVILNIKA ŽIVOTINJE AKVAKULTURE NAMIJENJENE UZGOJU ILI PORIBLJAVANJU

Kategorija	Zdravstveni status	Dopušteno unositi životinje iz	Certifikat			Dopušteno otpremati životinje u
			Pri unošenju	Pri otpremanju		
I	Slobodan od bolesti (član 49. ili 50. ovog Pravilnika)	Jedino kategorije I	DA	NE pri otpremanju u kategoriju III ili IV DA pri otpremanju u kategoriju I, II ili IV	V;	Sve kategorije
II	Program nadziranja (stav (1) član 44. ovog Pravilnika)	Jedino kategorije I	DA	NE		Kategoriju III i V
III	Nije određen (nije poznato da je zaražen, ali nije obuhvaćen programom u svrhu postizanja statusa područja slobodnog od bolesti)	Kategorija I, II ili III	NE	NE		Kategoriju III i V
IV	Program iskorjenjivanja bolesti (stav (2) član 44. ovog Pravilnika)	Jedino kategorije I	DA	DA		Jedino kategoriju V
V	Zaražen (član 39. ovog Pravilnika)	Svih kategorija	NE	DA		Jedino kategoriju V

DIO II PREPORUČENO NADZIRANJE (engl. surveillance) I INSPEKCIJSKI PREGLEDI U UZGAJALIŠTIMA I PODRUČJIMA ZA UZGOJ MEKUŠACA

Prisutne vrste	Zdravstveni status kako je naveden u Dijelu I ovog Aneksa	Nivo rizika	Nadziranje (engl. surveillance)	Preporučena učestalost inspekcijских pregleda od strane nadležnog veterinarskog inspekcijского organa entiteta (član 8. ovog Pravilnika)	Preporučena učestalost inspekcijских pregleda od strane nadležnog veterinarskog inspekcijского organa entiteta (član 11. ovog Pravilnika)	Posebni zahtjevi za inspekcijske preglede, uzorkovanje i nadziranje potrebni za održavanje zdravstvenog statusa	Napomene
Nema vrsta koje su prijemčive na bolesti navedene na popisu iz Aneksa III ovog Pravilnika	Kategorija I Proглашен slobodnim od bolesti u skladu s tačkom a) ili b) stavom (1) člana 49. ili tačkom a) ili b) stavom (1) člana 50. ovog Pravilnika	Nizak	Pasivni	1 svake 4 godine	1 svake 4 godine	Posebni zahtjevi za održavanje statusa područja slobodnog od bolesti u skladu s članom 52. ovog Pravilnika	Preporučena učestalost inspekcijских pregleda primjenjuje se ne dovodeći u pitanje posebne zahtjeve koji su navedeni za svaki pojedini zdravstveni status. Kada je moguće, navedene inspekcijske preglede i uzorkovanja kombinirati s inspekcijским pregledima koji se zahtijevaju u skladu s čl. 8. i 11. ovog Pravilnika Cilj inspekcijских pregleda od strane nadležnog veterinarskog inspekcijского organa entiteta je provjeriti usklađenost u postupanju u skladu s članom 8. ovog Pravilnika. Cilj inspekcijских pregleda od strane nadležnog veterinarskog inspekcijского organa entiteta
		Visok	Aktivni, ciljani ili pasivni	1 na godinu	1 na godinu		
		Srednji		1 svake 2 godine	1 svake 2 godine		
Vrste koje su prijemčive na jednu ili više bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III ovog Pravilnika	Kategorija I Proглашен slobodnim od bolesti u skladu s tačkom c) stavom (1) člana 49. ili tačkom c) stavom (1) člana 50. ovog Pravilnika	Nizak		1 svake 4 godine	1 svake 2 godine	Posebni zahtjevi u skladu sa stavom (1) člana 44. ovog Pravilnika	
		Visok	Ciljani	1 na godinu	1 na godinu		
		Srednji		1 svake 2 godine	1 svake 2 godine		

	bolesti, ali je obuhvaćen programom nadziranja odobrenim u skladu sa stavom (1) člana 44. ovog Pravilnika	Nizak		1 svake 4 godine	1 svake 2 godine		je provjeriti zdravstveni status životinja, savjetovati subjekt u poslovanju akvakulture o pitanjima vezanim uz zdravlje vodenih životinja i, prema potrebi, poduzeti potrebne veterinarske mjere.
	Kategorija III Nije poznato da je zaražen, niti je obuhvaćen programom nadziranja za postizanje statusa područja slobodnog od bolesti.	Visok	Aktivni	1 na godinu	3 na godinu		
		Srednji		1 na godinu	2 na godinu		
		Nizak		1 svake 2 godine	1 na godinu		
	Kategorija IV Poznato da je zaražen, ali je obuhvaćen programom iskorjenjivanja bolesti odobrenim u skladu sa stavom (2) člana 44. ovog Pravilnika	Visok	Ciljani	1 na godinu	1 na godinu	Posebni zahtjevi u skladu sa stavom (2) člana 44. ovog Pravilnika	
		Srednji		1 svake 2 godine	1 svake 2 godine		
		Nizak		1 svake 4 godine	1 svake 2 godine		
	Kategorija V Poznato da je zaražen. Podliježe minimalnim kontrolnim mjerama koje su predviđene poglavljem V ovog Pravilnika	Visok	Pasivni	1 svake 4 godine	1 na godinu	Posebni zahtjevi u skladu sa poglavljem V ovog Pravilnika	
		Srednji		1 svake 4 godine	1 svake 2 godine		
		Nizak		1 svake 4 godine	1 svake 4 godine		

DIO III NIVO RIZIKA

(1) Visokorizično uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca je uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca:

- a) kod kojeg postoji visok nivo rizika od širenja bolesti na druga uzgajališta ili na slobodnoživuće populacije ili od unosa bolesti s drugih uzgajališta ili slobodnoživućih populacija;
- b) koje radi u uslovima uzgoja koji bi obzirom na prisutne vrste mogli povećati opasnost od izbijanja bolesti (velika biomasa, nizak kvalitet vode);
- c) koje prodaje žive vodene životinje za daljnji uzgoj ili poribljavanje.

(2) Srednjerizično uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca je ono uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca:

- a) kod kojeg postoji srednji nivo rizika od širenja bolesti na druga uzgajališta ili na slobodnoživuće populacije ili od unosa bolesti s drugih uzgajališta ili slobodnoživućih populacija;
- b) koje radi u uslovima uzgoja koji obzirom na prisutne vrste neće nužno povećati opasnost od izbijanja bolesti (srednja biomasa i srednji kvalitet vode);
- c) koje prodaje žive vodene životinje uglavnom za ishranu ljudi.

(3) Niskorizično uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca je ono uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca:

- a) kod kojeg postoji nizak nivo rizika od širenja bolesti na druga uzgajališta ili na slobodnoživuće populacije ili od unosa bolesti s drugih uzgajališta ili slobodnoživućih populacija;
- b) koje radi u uslovima uzgoja koji obzirom na prisutne vrste neće povećati opasnost od izbijanja bolesti (niska biomasa, dobar kvalitet vode);
- c) koje prodaje žive vodene životinje jedino za ishranu ljudi.

DIO IV VRSTE NADZIRANJA ZDRAVSTVENOG STATUSA (eng. surveillance)

(1) Pasivno nadziranje uključuje obavezno hitno prijavljivanje svake pojave ili sumnje na pojavu određene bolesti ili svakog povišenog uginuća. U tim se slučajevima mora provesti istraživanje u skladu s Odjeljkom 2. Aneksa IV ovog Pravilnika.

(2) Aktivno nadziranje uključuje:

- a) rutinske inspekcijske preglede koje obavlja nadležni veterinarski inspekcijski organ entiteta;
- b) pregled populacije životinja akvakulture u uzgajalištu ili području za uzgoj mekušaca kako bi se provjerilo postojanje kliničkih znakova bolesti;
- c) uzimanje uzoraka u svrhu provođenja dijagnostike u slučaju sumnje na bolest s popisa ili u slučaju povišenog uginuća uočenog tokom inspekcijskog pregleda;
- d) obavezno hitno prijavljivanje svake pojave ili sumnje na pojavu određene bolesti ili svakog povišenog uginuća.

(3) Ciljano nadziranje uključuje:

- a) rutinske inspekcijske preglede koje obavljaju nadležni veterinarski inspekcijski organi entiteta;
- b) uzimanje propisanih uzoraka životinja akvakulture i njihovo ispitivanje na jedan ili više specifičnih uzročnika pomoću utvrđenih metoda;
- c) obavezno hitno prijavljivanje svake pojave ili sumnje na pojavu određene bolesti ili svakog povišenog uginuća.

ANEKS III

Popis bolesti

DIO I USLOVI ZA UVRŠTENJE BOLESTI NA POPIS

(1) Bolest se smatra egzotičnom ukoliko:

- a) nije utvrđena u akvakulturi zemlje i nema saznanja o prisutnosti uzročnika u njenim vodama;
- b) unosom u Bosnu i Hercegovinu, može imati značajne privredne učinke uzrokujući proizvodne gubitke u akvakulturi Bosne i Hercegovine ili ograničavajući mogućnost trgovine životinjama akvakulture i njihovim proizvodima;
- c) unosom u Bosnu i Hercegovinu, može štetno djelovati na okoliš preko populacije slobodnoživućih vodenih životinja koje pripadaju vrstama koje predstavljaju bogatstvo koje vrijedi pravno zaštititi.

(2) Bolest se smatra neegzotičnom ukoliko:

- a) je više epidemioloških jedinica u zemlji slobodno od specifične bolesti;
- b) unosom u Bosnu i Hercegovinu, može imati značajne privredne učinke uzrokovanjem gubitaka u proizvodnji i godišnjih troškova vezanih uz bolest i njeno suzbijanje koji prelaze 5% vrijednosti proizvodnje prijemčivih vrsta životinja akvakulture unutar administrativnih cjelina entiteta i Brčko Distrikta, ili ograničavanjem mogućnosti za međunarodnu trgovinu životinjama akvakulture i njihovim proizvodima;
- c) unosom u Bosnu i Hercegovinu, u slučaju izbijanja bolesti može štetno djelovati na okoliš preko populacije slobodnoživućih vodenih životinja koje pripadaju vrstama koje predstavljaju bogatstvo te ih vrijedi pravno zaštititi;
- d) je teško bolest kontrolirati i suzbijati njeno širenje na uzgajalištima ili proizvodnim područjima za uzgoj mekušaca bez strogih mjera nadzora i trgovinskih ograničenja;
- e) se bolest može kontrolirati na nivou Bosne i Hercegovine, a pokazalo se da se mogu uspostaviti i održavati zone ili odjeljci slobodni od odnosne bolesti te da je to održavanje isplativo;
- f) postoji opasnost da se tokom stavljanja na tržište životinja akvakulture bolest unese u područje koje ranije nije bilo zaraženo;
- g) postoje pouzdani i jednostavni testovi za zaražene vodene životinje. Testovi moraju biti specifični i osjetljivi, a metoda testiranja mora biti usklađena na nivou Bosne i Hercegovine.

DIO II POPIS BOLESTI

EGZOTIČNE BOLESTI		
	BOLEST	PRIJEMČIVE VRSTE
RIBE	Epizootska hematopoetska nekroza	Kalifornijska pastrmka (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) i grgeč (<i>Perca fluviatilis</i>)
	Epizootski ulcerativni sindrom	Rodovi: <i>Catla</i> , <i>Channa</i> , <i>Labeo</i> , <i>Mastacembelus</i> , <i>Mugil</i> , <i>Puntius</i> i <i>Trichogaster</i>
MEKUŠCI	Infekcija s <i>Bonamia exitiosa</i>	Australijska kamenica (<i>Ostrea angasi</i>) i čileanska kamenica (<i>O. chilensis</i>)
	Infekcija s <i>Perkinsus marinus</i>	Japanska kamenica (<i>Crassostrea gigas</i>) i američka kamenica (<i>C. virginica</i>)
	Infekcija s <i>Microcytos mackini</i>	Japanska kamenica (<i>Crassostrea gigas</i>), američka kamenica (<i>C. virginica</i>), tihooceanska kamenica (<i>Ostrea conchaphila</i>) i evropska kamenica (<i>O. edulis</i>)
RAKOVI	Taurski sindrom rakova	Kožice (<i>Penaeus setiferus</i> , <i>P. stylirostris</i> , <i>P. vannamei</i>)
	Bolest žute glave rakova	Kožice (<i>Penaeus aztecus</i> , <i>P. duorarum</i> , <i>P. japonicus</i> , <i>P. monodon</i> , <i>P. setiferus</i> , <i>P. stylirostris</i> , <i>P. vannamei</i>)
NEEGZOTIČNE BOLESTI		
	BOLEST	PRIJEMČIVE VRSTE
	Virusna hemoragijska septikemija (VHS)	Haringe (<i>Clupea spp.</i>), bjelice (<i>Coregonus sp.</i>), štika (<i>Esox lucius</i>), bakalar (<i>Gadus aeglefinus</i>), pacifički bakalar (<i>G. macrocephalus</i>), atlantski bakalar (<i>G. morhua</i>), pacifički lososi (<i>Oncorhynchus spp.</i>), kalifornijska pastrmka (<i>O. mykiss</i>), rockling (<i>Onos mustelus</i>), morska pastrmka (<i>Salmo trutta</i>), veliki romb (<i>Scophthalmus maximus</i>), papalina (<i>Sprattus sprattus</i>) i lipljan (<i>Thymallus thymallus</i>)

	Zarazna hematopoetska nekroza (IHN)	kalifornijska pastirmka (<i>O. mykiss</i>) i druge vrste lososa (<i>Oncorhynchus keta</i> , <i>O. kisutch</i> , <i>O. masou</i> , <i>O. nerka</i> , <i>O. rhodurus</i> , <i>O. tshawytscha</i> , <i>Salmo salar</i>)
	Koi herpes virusa (KHV)	obični šaran i koi šaran (<i>Cyprinus carpio</i>)
	Zarazna anemija lososa (ISA)	Kalifornijska pastirmka (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), atlantski losos (<i>Salmo salar</i>), morska pastirmka (<i>S. trutta</i>).
MEKUŠCI	Infekcija s <i>Marteilia refringens</i>	Australijska kamenica (<i>Ostrea angasi</i>), čileanska kamenica (<i>O. chilensis</i>), evropska kamenica (<i>O. edulis</i>), argentinska kamenica (<i>O. puelchana</i>), obična dagnja (<i>Mytilus edulis</i>) i mediteranska dagnja (<i>M. galloprovincialis</i>)
	Infekcija s <i>Bonamia ostreae</i>	Australijska kamenica (<i>Ostrea angasi</i>), čileanska kamenica (<i>O. chilensis</i>), tihoookeanska kamenica (<i>O. conchaphila</i>), azijska kamenica (<i>O. denselamelloso</i>), evropska kamenica (<i>O. edulis</i>), i argentinska kamenica (<i>O. puelchana</i>).
RAKOVI	Bolest bijelih pjega rakova	Svi rakovi iz reda <i>Decapoda</i>

ANEKS IV**Uslovi za proglašavanje zemlje, zone ili odjeljka slobodnim od bolesti****DIO I ZEMLJA SLOBODNA OD BOLESTI**

(1) Ured za prisutne prijemčive vrste, ukoliko nije uočena pojava bolesti u periodu od najmanje 10 godina prije proglašavanja statusa zemlje slobodne od bolesti može, pored uslova koji pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, proglasiti Bosnu i Hercegovinu u cjelini slobodnom od bolesti ako:

- a) su se u periodu od najmanje 10 godina neprekidno provodile osnovne biosigurnosne mjere;
- b) se ne zna da je infekcija utvrđena u slobodnoživućoj populaciji;
- c) se pri trgovini i uvozu primjenjuju uslovi za sprječavanje unošenja bolesti u zemlju;
- d) je Bosna i Hercegovina slobodna od bolesti u skladu s članom 49. ovog Pravilnika. Status zemlje slobodne od bolesti može se proglasiti jedino u skladu sa stavom (4) ovog Dijela.

(2) Osnovne biosigurnosne mjere iz tačke a) stava (1) ovog Dijela obuhvataju najmanje slijedeće:

- a) bolest, uključujući i sumnju na bolest, obavezno se prijavljuje nadležnom veterinarskom inspekcijskom organu entiteta;
- b) da se primjenjuje sistem ranog otkrivanja bolesti na cijeloj teritoriji Bosne i Hercegovine koji nadležnom veterinarskom inspekcijskom organu entiteta omogućava efikasno istraživanje i izvještavanje o bolesti, a koji posebno osigurava:

1) brzo prepoznavanje kliničkih znakova na osnovu kojih se može posumnjati na bolest, pojavu nove bolesti ili neobjašnjivo uginuće u uzgajalištima ili područjima za uzgoj mekušaca i u prirodi;

2) brzo obavještavanje nadležnog veterinarskog inspekcijskog organa entiteta o događaju s ciljem da se u najkraćem mogućem roku započne dijagnostičko ispitivanje.

(3) Sistem ranog otkrivanja bolesti iz tačke b) stava (2) ovog Dijela uključuje najmanje slijedeće:

- a) educiranost osoblja zaposlenog u poslovanju akvakulture ili koje sudjeluje u preradi životinja akvakulture, za prepoznavanje svih znakova koji upućuju na prisutnost bolesti, a veterinari ili stručnjaci za zdravlje vodenih životinja educiraju se o otkrivanju neuobičajenih pojava bolesti i izvještavanja o njima;
- b) veterinare ili stručnjake za zdravlje vodenih životinja educirane za prepoznavanje sumnjivih pojava bolesti i izvještavanje o njima;
- c) pristup nadležnih organa iz člana 4. stav (1) ovog Pravilnika laboratorijama opremljenim za dijagnostiku i razlikovanje bolesti s popisa i novih bolesti.

(4) Na osnovu ciljanog nadziranja ukoliko se zadnji poznati klinički slučaj bolesti dogodio u periodu od 10 godina prije proglašavanja statusa zemlje slobodne od bolesti ili ako stanje infekcije prije ciljanog nadziranja nije bilo poznato, na primjer zbog nepostojanja uslova koji

pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, Bosna i Hercegovna se može smatrati slobodnom od bolesti ako:

- a) provodi osnovne mjere kontrole bolesti koje su utvrđene u stavu (2) ovog Dijela; i
- b) provodi ciljano nadziranje u skladu s metodama iz člana 49. stav (4) ovog Pravilnika najmanje dvije godine, te na uzgajalištu ili područjima za uzgoj mekušaca na kojima se uzgajaju prijemčive vrste nije otkriven uzročnik bolesti.

(5) U dijelovima Bosne i Hercegovine s ograničenim brojem uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca gdje ciljano nadziranje ne pruža dovoljno epidemioloških podataka, ali u kojima postoje slobodnoživuće populacije prijemčivih vrsta, te slobodnoživuće populacije moraju se obuhvatiti ciljanim nadziranjem.

DIO II ZONE ILI ODJELJCI SLOBODNI OD BOLESTI

(1) Zona obuhvata:

- a) cijelo slivno područje od izvora do ušća;
- b) dio slivnog područja od izvora do prirodne ili umjetne prepreke koja sprječava uzvodnu migraciju vodenih životinja iz donjih dijelova slivnog područja;
- c) više slivnih područja, uključujući njihova ušća, koja su međusobno epidemiološki povezana preko ušća.

(2) Geografske granice zone moraju biti jasno označene na karti.

(3) Ako se zona proteže kroz oba entiteta, jedan od entiteta i Brčko Distrikt ili oba entiteta i Brčko Distrikt, zona se može proglasiti slobodnom od bolesti jedino ako se na sve dijelove te zone primjenjuju uslovi navedeni u st. (4), (5) i (6) ovog Dijela. U tom slučaju, subjekti u poslovanju s akvakulturom podnose zahtjev za onaj dio zone koji se nalazi na njihovoj teritoriji.

(4) Zona u kojoj su prisutne prijemčive vrste, ali u kojoj nisu uočene pojave bolesti u periodu od najmanje 10 godina prije podnošenja zahtjeva za priznavanjem statusa zone slobodne od bolesti, može se, uprkos postojanju uslova koji pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, smatrati slobodnom od bolesti ako ispunjava uslove utvrđene u st. (1), (2) i (3) Dijela I ovog Aneksa.

(5) Zona u kojoj se zadnji poznati klinički slučaj bolesti dogodio u periodu unutar 10 godina prije podnošenja zahtjeva za priznavanje statusa područja slobodnog od bolesti ili u kojoj stanje infekcije prije ciljanog nadziranja nije bilo poznato, na primjer zbog nepostojanja uslova koji pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, može se smatrati slobodnom od bolesti ako ispunjava uslove utvrđene u stavu (4) Dijela I ovog Aneksa.

(6) Prema potrebi, uspostavlja se zona ograničenja u kojoj se provodi monitoring program. Granice zone ograničenja moraju biti određene tako da se zona koja je slobodna od bolesti zaštiti od pasivnog unošenja bolesti.

(7) Odjeljak može obuhvatati jedno ili više uzgajališta, grupu uzgajališta ili područje za uzgoj mekušaca, koji se mogu smatrati jednom epidemiološkom jedinicom zbog geografskog položaja i udaljenosti od drugih grupa uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca, pod uslovom da su sva uzgajališta u dotičnom odjeljku obuhvaćena zajedničkim sistemom

biološke sigurnosti. Geografske granice odjeljka moraju biti jasno označene na karti.

(8) Odjeljak u kojem su prisutne prijemčive vrste, ali u kojem nisu uočene pojave bolesti u periodu od najmanje 10 godina prije podnošenja zahtjeva za priznavanje statusa odjeljka slobodnog od bolesti, može se, uprkos postojanju uslova koji pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, smatrati slobodnim od bolesti ako ispunjava uslove utvrđene u st. (1), (2) i (3) Dijelu I ovog Aneksa.

(9) Odjeljak u kojem se zadnji poznati klinički slučaj bolesti dogodio u periodu od 10 godina prije podnošenja zahtjeva za priznavanje statusa odjeljka slobodnog od bolesti ili ako stanje infekcije u navedenom odjeljku ili u vodama koje okružuju taj odjeljak nije bilo poznato prije ciljanog nadziranja, npr. zbog nepostojanja uslova koji pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, može se smatrati slobodnim od bolesti ako ispunjava uslove utvrđene u stavu (4) Dijelu I ovog Aneksa.

(10) Svako uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca koje se nalazi u odjeljku podliježe dodatnim mjerama koje odredi Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta, ako se smatraju potrebnim da bi se spriječilo unošenje bolesti. Mjere mogu obuhvaćati uspostavljanje tampon zone oko odjeljka u kojem se provodi monitoring program te uvođenje dodatnih mjera zaštite od ulaska mogućih nositelja ili vektora uzročnika.

(11) Odjeljci koji se sastoje od jednog ili više pojedinačnih uzgajališta čiji zdravstveni status obzirom na određenu bolest ne zavisi od zdravstvenog statusa okolnih prirodnih voda obzirom na odnosnu bolest obuhvataju:

- a) jedno uzgajalište koje se može smatrati jednom epidemiološkom jedinicom budući da na njega ne utiče zdravstveni status životinja u okolnim vodama;
- b) više od jednog uzgajališta, pri čemu svako uzgajalište u navedenom odjeljku ispunjava kriterije utvrđene u tački a) stavu (11) i st. (12) do (16) ovog Dijela, koje se, zbog opsežnog premještanja životinja iz jednog u drugo uzgajalište, smatra jednom epidemiološkom jedinicom, pod uslovom da su sva uzgajališta obuhvaćena zajedničkim biosigurnosnim sistemom.

(12) Odjeljak se snabdijeva vodom:

- a) preko postrojenja za obradu vode u kojem se inaktivira uzročnik kako bi se opasnost od unošenja bolesti smanjila na prihvatljiv nivo;
- b) direktno iz bunara, bušotine ili izvora. Ako se izvor vode nalazi izvan prostora uzgajališta, voda se dovodi direktno do uzgajališta i potom usmjerava pomoću cijevi.

(13) Moraju postojati prirodne ili vještačke prepreke koje vodenim životinjama iz okolnih vodotokova onemogućavaju ulazak u uzgajališta u odjeljku.

(14) Odjeljak treba zaštititi od poplave i ulaska vode iz okolnih vodotokova.

(15) Odjeljak mora ispunjavati zahtjeve navedene u stavu (4) Dijelu I ovog Aneksa.

(16) Odjeljak podliježe dodatnim mjerama koje propiše Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta, ako se smatraju potrebnim da bi se spriječilo unošenje bolesti. Te mjere mogu

obuhvatati uvođenje dodatnih mjera zaštite od ulaska mogućih nositelja ili vektora uzročnika.

(17) Za pojedinačna uzgajališta koja prvi put ili ponovo počinju svoju djelatnost važe slijedeće odredbe:

- a) novo uzgajalište koje ispunjava zahtjeve navedene u tački a) stavu (11) i st. (12) do (16) ovog Dijela, ali koje započinje djelatnost koristeći životinje akvakulture koje potiču iz odjeljka koji je proglašen slobodnim od bolesti, može se smatrati slobodnim od bolesti bez obavljenog uzorkovanja koje se zahtijeva za dobijanje odobrenja;
- b) uzgajalište koje nakon određene pauze ponovo započinje svoju djelatnost koristeći životinje akvakulture koje potiču iz odjeljka koji je proglašen slobodnim od bolesti, i koje ispunjava zahtjeve navedene u tački a) stav (11) i st.(12) do (16) ovog Dijela, može se smatrati slobodnim od bolesti bez obavljenog uzorkovanja koje se zahtijeva za dobijanje odobrenja, pod uslovom da:
 - 1) su Ured i nadležni veterinarski organi entiteta upoznati sa zdravstvenim statusom uzgajališta u zadnje četiri godine njegovog rada. Ako je navedeno uzgajalište radilo manje od četiri godine, uzima se u obzir stvarni period u kojem je radilo,
 - 2) nije uzgajalište bilo podvrgnuto mjerama zdravlja životinja u odnosu na bolesti navedene na popisu iz Dijela II Aneksa III ovog Pravilnika i u njemu nisu nikada utvrđene te bolesti,
 - 3) je prije unošenja životinja, ikre ili gameta akvakulture, uzgajalište očišćeno i dezinficirano nakon čega je, prema potrebi, slijedio odmor u određenom periodu.

ANEKS V**Dužnosti laboratorija****DIO I REFERENTNE LABORATORIJE EVROPSKE ZAJEDNICE**

Referentne laboratorije Evropske zajednice za bolesti:

- a) vodenih životinja je State Serum Laboratory, Landbrugsministeriet, Høngøvej 2, 8200 Aarhus N, Denmark.
- b) školjkaša je The Infremer Laboratory, B.P. 133, 17390 La tremblade, France.

DIO II REFERENTNE LABORATORIJE BiH

- (1) Referentna laboratorija ovlaštena u skladu s članom 55. ovog Pravilnika odgovorna je za koordinaciju dijagnostičkih standarda i metoda unutar područja njihove odgovornosti u zemlji sa referentnom laboratorijom EU.
- (2) Referentna laboratorija BiH:
 - a) preuzimaju obavezu da bez odgađanja prijave Uredu svaku sumnju na bolest navedenu u Aneksu III ovog Pravilnika;
 - b) prema uputama referentne laboratorije Evropske unije, koordiniraju metode koje se u zemlji primjenjuju za dijagnosticiranje bolesti za koje su nadležni;
 - c) aktivno učestvuju u dijagnostici pojave odnosno bolesti u zemlji tako što primaju izolate uzročnika u svrhu potvrđivanja dijagnoze, identifikacije i epidemioloških proučavanja;
 - d) omogućavaju edukaciju ili usavršavanje stručnjaka u području laboratorijske dijagnostike kako bi se uskladile dijagnostičke tehnike u cijeloj zemlji;
 - e) osiguravaju potvrđivanje pozitivnih rezultata kod svih pojava egzotičnih bolesti koje su navedene na popisu iz Dijela II Aneksa III ovog Pravilnika i prvih pojava neegzotičnih bolesti koje su uvrštene na popis u navedenom Aneksu;
 - f) organiziraju redovna međulaboratorijska uporedna ispitivanja dijagnostičkih postupaka na državnom nivou u skladu s članom 56. ovog Pravilnika, u svrhu pružanja informacija o korištenim dijagnostičkim metodama i rezultatima testova provedenih u zemlji;
 - g) sarađuju s referentnom laboratorijom Evropske unije iz člana 54. ovog Pravilnika i učestvuju u uporednim provjerama koje organiziraju referentne laboratorije Evropske unije;
 - h) osiguravaju redovni i otvoreni dijalog s nadležnim organima iz stava (1) člana 4. ovog Pravilnika;
 - i) rade, ocjenjuju se i akreditiraju u skladu s normom BAS EN ISO/IEC 17025:2006 „Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i kalibracijskih laboratorija“, pri čemu se u obzir uzimaju kriteriji za različite metode ispitivanja koji su utvrđeni u ovom Pravilniku.

(2) Akreditacija i ocjenjivanje ispitnih laboratorija iz tačke i) stava (1) ovog Dijela može se odnositi na pojedinačne testove ili na grupe testova.

(3) Ured može odrediti referentne laboratorije BiH koji ne udovoljavaju zahtjevima iz tačke i) stav (1) ovog Dijela ako je u praksi teško raditi u skladu s normom BAS EN ISO/IEC 17025:2006, pod uslovom da laboratorija primjenjuje sistem osiguranja kvaliteta koji je u skladu sa smjericama u ISO 9001:2000.

(4) Ured može dopustiti referentnoj laboratoriji BiH da koristi stručno znanje i kapacitete drugih laboratorija određenih u skladu s članom 56. ovog Pravilnika, za jednu ili više bolesti u njihovoj nadležnosti, pod uslovom da te laboratorije ispunjavaju odgovarajuće zahtjeve utvrđene u ovom dijelu. U tom slučaju, referentna laboratorija BiH i dalje ostaje kontaktna tačka za referentnu laboratoriju EU.

DIO III OVLAŠTENE LABORATORIJE

(1) Ovlaštenje laboratorija za pružanje dijagnostičkih usluga vrše nadležni veterinarski organi entiteta u skladu s članom 56. ovog Pravilnika pod uslovom da laboratorije ispunjavaju slijedeće:

- a) obavezu da bez odgađanja prijave nadležnom veterinarskom organu entiteta svaku sumnju na bolest iz Aneksa III ovog Pravilnika;
- b) obavezu da učestvuju u međulaboratorijskim uporednim ispitivanjima dijagnostičkih postupaka koje organiziraju referentne laboratorije BiH;
- c) rade, ocjenjuju se i akreditiraju u skladu s normom BAS EN ISO/IEC 17025:2006 „Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i kalibracijskih laboratorija“, pri čemu se u obzir uzimaju kriteriji za različite metode ispitivanja koji su utvrđeni u ovom Pravilniku.

(2) Akreditacija i ocjenjivanje službenih laboratorija iz tačke c) stav (1) ovog Dijela može se odnositi na pojedinačne testove ili na grupe testova.

(3) Nadležni veterinarski organi entiteta mogu ovlastiti laboratorije koje ne zadovoljavaju zahtjevima iz tačke c) stav (1) ovog Dijela ako je iz praktičnih razloga otežano zadovoljiti zahtjevima norme BAS EN ISO/IEC 17025:2006, pod uslovom da laboratorija primjenjuje sistem osiguranja kvaliteta koji je u skladu sa smjericama ISO 9001:2000.

(4) Nadležni veterinarski organi entiteta ukidaju ovlaštenje ako se prestanu ispunjavati uslovi navedeni u ovom Dijelu.

ANEKS VI

Kriteriji za planove hitnih mjera

Plan hitnih mjera mora ispunjavati najmanje slijedeće:

- a) zakonske ovlasti potrebne za provođenje plana hitnih mjera te za brzo i efikasno provođenje iskorjenjivanja bolesti;
- b) osiguravanje pristupa sredstvima fondova za vanredne situacije, budžetskim sredstvima i izvorima finansiranja kako bi se pokrili svi načini suzbijanja egzotičnih bolesti navedenih u Dijelu II Aneksa III ovog Pravilnika;
- c) mora biti uspostavljen zapovjedni lanac koji osigurava brzo i efikasno donošenje odluka pri postupanju s egzotičnim bolestima navedenih u Dijelu II Aneksa III ovog Pravilnika ili s novim bolestima;
- d) zajednički centar za nadzor bolesti mora biti odgovoran za ukupno upravljanje strategijama suzbijanja bolesti;
- e) detaljne planove kako bi, u slučaju izbijanja egzotičnih bolesti navedenih u Dijelu II Aneksa III ovog Pravilnika ili novih bolesti, bilo moguće odmah uspostaviti lokalni centar za nadzor i suzbijanje bolesti te na lokalnom nivou provesti mjere suzbijanja bolesti i mjere zaštite okoliša;
- f) osigurati saradnju između nadležnih organa iz člana 4. stav (1) ovog Pravilnika i nadležnih organa za pitanja okoliša kako bi se osiguralo da veterinarske mjere i mjere zaštite okoliša budu pravilno usklađene;
- g) moraju se predvidjeti odgovarajuća sredstva, kako bi se osiguralo efikasno i brzo provođenje mjera, uključujući osoblje, opremu i laboratorijske kapacitete;
- h) na raspolaganju mora biti ažurirana verzija priručnika s detaljnim, opsežnim i praktičnim opisom svih radnji, postupaka, uputa i mjera suzbijanja bolesti koje se moraju primijeniti u vezi s egzotičnim bolestima navedenim u Dijelu II Aneksa III ovog Pravilnika ili novim bolestima;
- i) moraju biti izrađeni detaljni planovi za hitnu vakcinaciju ukoliko je odgovarajuće;
- j) osoblje mora biti redovno uključeno u edukaciju o kliničkim znakovima, epidemiološkom ispitivanju i kontroli bolesti, u vježbama simulacije te u programima osposobljavanja u području komunikacije kako bi se mogao održavati stalan nivo svijesti odgovornih organa, uzgajivača i veterinara;
- k) plan hitnih mjera mora predvidjeti sredstva koja su potrebna za kontrolu velikog broja izbijanja bolesti koja se javljaju u kratkom vremenskom periodu;
- l) ne dovodeći u pitanje veterinarske uslove utvrđene Pravilnikom o načinu neškodljivog uklanjanja životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla koje moraju ispunjavati objekti i oprema za sabiranje, neškodljivog uklanjanje i utvrđivanje uzroka uginuća i prevozna sredstva za transport životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla („Sl.list SFRJ“, broj 53/89), plan hitnih mjera mora osigurati da, u slučaju izbijanja bolesti, svako masovno uništavanje leševa vodenih životinja i njihovog otpada ne ugrožava zdravlje životinja i ljudi i da se pri tom koriste postupci i metode koje sprječavaju svaki štetni uticaj na okoliš, a posebno kojim su svedeni na najmanju moguću mjeru:

1) opasnost za zemlju, vazduh, površinske i podzemne vode, biljke i životinje;

2) smetnje zbog buke ili mirisa;

3) štetni uticaji na prirodu i na mjesta od posebnog značenja.

- m) u planovima moraju biti navedena odgovarajuća mjesta i subjekti za obradu i neškodljivo uklanjanje leševa i životinjskog otpada u slučaju izbijanja bolesti u skladu s Pravilnikom o načinu neškodljivog uklanjanja životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla koje moraju ispunjavati objekti i oprema za sabiranje, neškodljivog uklanjanje i utvrđivanje uzroka uginuća i prevozna sredstva za transport životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla („Sl.list SFRJ“, broj 53/89).

ANEKS VII

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrđivanje infektivne anemije lososa (ISA) i kriteriji za određivanje zone i za službeni nadzor nakon pojave sumnje ili potvrde prisutnosti ISA-e

UVOD I DEFINICIJE

Ovaj Aneks:

- a) daje smjernice i minimalne zahtjeve u pogledu planova uzorkovanja i dijagnostičkih metoda za otkrivanje i potvrđivanje prisutnosti ISA-e;
- b) poziva se na odredbe i definicije utvrđene ovim Pravilnikom;
- c) utvrđuju odredbe kojima je cilj ispravno dijagnosticiranje, kontrola i nadzor ISA-e u slučaju postojanja sumnje ili potvrde prisutnosti ISA-e;
- d) upućen je nadležnim organima odgovornim za kontrolu ISA-e i laboratorijskom osoblju koje izvodi testove u vezi s ovom bolešću. Naglasak je stavljen na postupke uzorkovanja, načela i primjene laboratorijskih testova i ocjenu njihovih rezultata te na detaljne laboratorijske tehnike. Međutim, kada je to primjereno, laboratorije mogu modificirati testove opisane u ovom Aneksu, ili mogu upotrijebiti druge testove pod uslovom da se dokaže da su oni jednako ili još više osjetljivi i specifični. Također su utvrđeni kriteriji za određivanje zone i službenog nadzora koji se provodi nakon sumnje ili potvrde postojanja ISA-e.

U Dijelu I utvrđuju se opća načela i kriteriji za dijagnosticiranje i potvrđivanje ISA-e te kriteriji za određivanje zone i službenog nadzora koji se provodi nakon sumnje ili potvrde postojanja ISA-e.

U Dijelu II navode se inspekcijske kontrole i uzorkovanje koji se izvode u svrhu otkrivanja prisutnosti ISA-e.

U Dijelu III utvrđuju se metode koje se koriste za virološke pretrage.

U Dijelu IV prikazan je postupak za pregled uzoraka metodom RT-PCR za otkrivanje ISA-e.

U Dijelu V opisan je protokol koji se koristi kod pregleda otisaka bubrega pomoću metode IFAT (test indirektna fluorescencije antitijela) u odnosu na ISA-u.

Dio VI sadrži metodologiju za histologiju.

Dio VII sadrži popis upotrijebljenih akronima i skraćenica.

I. Kriteriji za dijagnosticiranje ISA-e te za određivanje zona, određenih mjera kontrole i službenog nadzora

I.1. Opća načela za dijagnosticiranje ISA-e

Utemeljene osnove za sumnju da su ribe zaražene ISAV-om navedene su u Dijelu I.2. ovog Aneksa. Nadležni veterinarski inspektori, koji su nadležni za određeno administrativno područje (u daljnjem tekstu: nadležni veterinarski inspektor) moraju narediti da se nakon pojave sumnje na zarazu riba u ribogojilištu ISAV-om što je prije moguće provede službena istraga kako bi se prisutnost bolesti potvrdila ili isključila, pri čemu se koriste inspeksijski i klinički pregledi, prikupljanje i odabir uzoraka te metode za laboratorijsko ispitivanje, kako je navedeno u Dijelovima III – VI ovog Aneksa. Kako bi se službeno potvrdila prisutnost ISA-e, mora biti ispunjena bilo koja od tri grupe kriterija navedenih u Dijelu I.3 ovog Aneksa.

I.2. Sumnja na zarazu ISA-om

I.2.1. Na prisutnost ISA-e treba posumnjati kada je ispunjen najmanje jedan od slijedećih kriterija:

a) postojanje postmortem nalaza koji su u skladu s ISA-om, s kliničkim znakovima bolesti ili bez njih. Postmortem nalazi i klinički znakovi bolesti u skladu s onima navedenim u najnovijem izdanju Dijagnostičkog priručnika za bolesti vodenih životinja OIE-a;

b) izoliranje i identifikacija ISAV-a u ćelijskoj kulturi iz jednog uzorka bilo koje ribe u ribogojilištu, kako je opisano u Dijelu III;

c) utemeljeni dokaz prisutnosti ISAV-a iz dva nezavisna laboratorijska testa, kao što su RT-PCR (Dio IV) i IFAT (Dio V);

d) prijenos živih riba u ribogojilište kada postoji utemeljena sumnja da je ISA bila prisutna u vrijeme prijenosa riba;

e) kada se istraživanjem otkriju druge bitne epidemiološke poveznice s ribogojilištima za koje se sumnja ili za koje je potvrđeno da su zaražena ISA-om.

I.2.2. Sumnja na ISA-u se može isključiti kada se kontinuiranim istraživanjima, koja uključuju najmanje jedan klinički pregled mjesečno kroz period od šest mjeseci, ne otkrije nikakav daljnji značajan dokaz prisutnosti ISA-e.

I.3. Potvrđivanje ISA-e

Smatra se da je prisutnost ISA-e potvrđena ako su ispunjeni kriteriji iz tačke (a) ili tačke (b) ili tačke (c):

a) zapažanje kliničkih znakova i postmortem nalaza koji su u skladu s ISA-om, u skladu s najnovijim izdanjem Dijagnostičkog priručnika za bolesti vodenih životinja OIE-a, uključujući mrtve i slabe ribe ili ribe neuobičajenog ponašanja, znakove anemije, druge postmortem nalaze i patološke promjene te otkrivanje ISAV-a upotrebom jedne ili više slijedećih metoda:

(i) izoliranje i identifikacija ISAV-a u ćelijskoj kulturi iz najmanje jednog uzorka bilo koje ribe u ribogojilištu, kako je opisano u Dijelu III,

(ii) otkrivanje ISAV-a pomoću RT-PCR, metodama opisanim u Dijelu IV,

(iii) otkrivanje ISAV-a u tkivima ili preparatima tkiva pomoću specifičnih antitijela protiv ISAV-a (npr. IFAT na bubrežnim otiscima kako je opisano u Dijelu V);

b) izoliranje i identifikacija ISAV-a u dva uzorka uzeta od jedne ili više riba u različitim prilikama, upotrebom metode opisane u Dijelu III;

c) izoliranje i identifikacija ISAV-a u najmanje jednom uzorku uzetom od bilo koje ribe u ribogojilištu upotrebom metode opisane u Dijelu III, s potkrepljujućim dokazom ISAV-a u preparatima tkiva bilo koje ribe u ribogojilištu, upotrebom RT-PCR-a (Dio IV) ili IFAT-a (Dio V).

I.4. Kriteriji za određivanje i opoziv zona za kontrolu i službeni nadzor nakon sumnje ili potvrde prisutnosti ISA-e

I.4.1. Radi uspostave službenog programa nadzora na osnovu rizika, Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH mora odrediti odgovarajuće zone kontrole i službenog nadzora u blizini ribogojilišta za koje se službeno sumnja ili za koje je potvrđeno da je zaraženo ISA-om.

I.4.2. Zone koje se određuju moraju se definirati na osnovu pojedinačne analize rizika za daljnje širenje bolesti. U skladu s epizootiološkom situacijom predmetno područje vodenog sliva ili obalno područje:

- definira se kao zona kontrole, ili
- može se, kod velikog vodenog sliva ili obalnog područja, podijeliti na zonu kontrole i zonu nadzora, ukoliko nije ugrožena zaštita od širenja ISA-e.

Osim toga, ako se pokaže potrebnim, mogu se uspostaviti dodatne zone nadzora izvan područja vodenog sliva ili obalnog područja.

I.4.3. Glavni faktori koji se moraju uzeti u razmatranje pri određivanju gore navedenih zona su oni faktori koji utiču na rizike širenja bolesti na ribe u ribogojilištima i slobodnoživuće ribe, kao što su: broj, stopa i distribucija pomora ribe u ribogojilištu za koje se sumnja ili za koje je potvrđeno da je zaraženo ISAV-om; uzrok pomora na predmetnom ribogojilištu; udaljenost susjednih ribogojilišta i njihova gustoća; ribogojilišta u dodiru s predmetnim ribogojilištem; vrste koje su prisutne u ribogojilištu; upravljanje koje se primjenjuje na predmetno i na susjedna ribogojilišta; hidrodinamični uslovi i drugi faktori od epidemiološkog značaja.

I.4.4. Pri određivanju zona/područja, primjenjuju se slijedeći minimalni kriteriji.

I.4.4.1. Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH uspostavlja zaraženo područje u najbližoj okolini ribogojilišta za koje je potvrđeno da je zaraženo ISAV-om na slijedeći način:

- u obalnim područjima:

područje kruga s radijusom koji je jednak najmanje jednom plimnom dosegu ili najmanje 5 km, sa središtem u ribogojilištu na kojem je potvrđena zaraza ISAV-om, ili ekvivalentno područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičnim ili epidemiološkim podacima, ili

- u kopnenim područjima:

cjelokupno područje vodenog sliva ribogojilišta na kojem je potvrđena zaraza ISAV-om; kod velikih površina vodenog sliva Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta

BiH može ograničiti opseg zone na dijelove površine vodenog sliva pod uslovom da se time ne ugrožava sprječavanje širenja ISA-e.

I.4.4.2. U slučaju sumnje na prisutnost ISA-e, može se uspostaviti privremeno zaraženo područje na osnovu istih kriterija koji su navedeni za zaraženo područje.

I.4.4.3. Ako je potrebno, Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH uspostavlja ugroženo područje izvan zaraženog područja, na područjima za koje se smatra da je dovoljan manje intenzivan nadzor i ona obuhvata:

- u obalnim područjima: područje koje okružuje zaraženo područje prekrivajućih zona plimnog doseg, područje koje okružuje zaraženo područje i koje se nalazi unutar radijusa od 10 km od središta u zaraženom području ili ekvivalentno područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičnim ili epidemiološkim podacima, ili

- u kopnenim područjima: ako je potrebno, kao prošireno područje izvan utvrđenog zaraženog područja.

I.5. Mirovanje i opoziv uspostavljenih zona/područja

I.5.1. Nadležni veterinarski inspektor naređuje da se za sva ribogojilišta unutar zaraženog područja uvede odgovarajući period mirovanja, nakon što se iz njih isprazni riba i nakon što se po potrebi dezinficiraju. Period mirovanja na ribogojilištima na kojima je potvrđena zaraza ISA-om ne smije biti kraći od šest mjeseci. Trajanje mirovanja za druga ribogojilišta u zaraženim područjima određuje Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH, a na prijedlog nadležnog veterinarskog inspektora na osnovu ocjene rizika za svaki pojedinačni slučaj. Kada se isprazne sva ribogojilišta u zoni kontrole, primjenjuje se najmanje šest sedmica sinhroniziranog mirovanja.

Osim toga, nadležnih veterinarski inspektor može odlučiti o uvođenju perioda mirovanja za ribogojilišta koja se nalaze u utvrđenim zonama nadzora.

I.5.2. Utvrđene zone kontrole se ne mogu opozvati i ponovo nastaniti ribom dok riba svih farmi u tim zonama nije ispražnjena, po potrebi dezinficirane i podvrgnute mirovanju u skladu s tačkom I.5.1. Kod ponovnog napučivanja ovih zona, zone kontrole se pretvaraju u zone nadzora, kako je utvrđeno tačkom I.4.4.3.

I.5.3. Uspostavljene privremene zone kontrole se ne mogu opozvati dok se ne isključi sumnja na ISA-u u skladu s Dijelom I.2.2. ovog Aneksa. Ukoliko se ISA potvrdi u skladu s Dijelom I.3. ovog Aneksa, privremena zona kontrole se pretvara u zonu kontrole.

I.5.4. Utvrđene zone nadzora se ne mogu opozvati prije nego što protekne dvije godine od opoziva zone kontrole.

I.6. Službeni nadzor nakon što se pojavi sumnja ili nakon što se potvrdi ISA.

I.6.1. Kako bi se utvrdila raširenost i razvoj bolesti nakon sumnje ili potvrde ISA-e na ribogojilištu, nadležni veterinarski inspektor mora u svim ribogojilištima smještenim u uspostavljenim zonama provesti program službenog nadzora koji se temelji na riziku.

I.6.2. U svrhu primjene ovakvog programa službenog nadzora, nadležni veterinarski inspektor mora narediti, ako je potrebno inspekcijsku kontrolu na licu mjesta, identificirati sva ribogojilišta u utvrđenim zonama te izraditi službeni popis vrsta, kategorija i broja riba koje se nalaze na ribogojilištima, uključujući podatke o mortalitetu.

I.6.3. Nakon prvobitnog službenog popisa, ribogojilišta unutar uspostavljenih privremenih zona kontrole na kojima se uzgaja atlantski losos (*Salmo salar*) ili bilo koja druga vrsta koja je u najnovijem izdanju OIE-ovog Kodeksa o zdravlju vodenih životinja navedena kao prijemčiva na ISA-u ili kao potencijalni nositelj ISA-e, moraju nadležnom veterinarskom inspektoru svakih 14 dana slati izvještaj o mortalitetu. Izvještaji o povećanoj smrtnosti dostavljaju se za svaki dan i za svaki kafez. Nadležni veterinarski inspektor istražuje svaki značajan porast mortaliteta na ribogojilištu.

Ukoliko se sumnja potvrdi, sva ribogojilišta u uspostavljenoj zoni kontrole dostavljaju nadležnom veterinarskom inspektoru sedmične izvještaje o mortalitetu koji sadrže podatke za svaki kafez, svakodnevno.

Ribogojilišta u zonama nadzora dostavljaju nadležnom veterinarskom inspektoru izvještaji o mortalitetu svakih 14 dana.

Osim toga, u uspostavljenim zonama se provodi redovna inspekcijska kontrola tokom cijele godine, učestalošću prikazanom u Tabeli 1. ovog Aneksa. Međutim, kada su tokom određenih dijelova godine ovakvi inspekcijski pregledi onemogućeni radi klimatskih prilika, Ured u saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta BiH može odrediti drugačiju učestalost inspekcija u planu mjera za nepredviđene okolnosti.

Tabela 1.

Program službenog nadzora

Smještaj ribogojilišta	Minimalan broj inspekcija tokom godine	Minimalan broj inspekcija tokom godine nakon opoziva zone kontrole
Zona kontrole	12	
Zona kontrole	6	6
Privremena zona kontrole	6	

Program nadzora se provodi do opoziva zona.

I.6.4. Inspekcijski pregledi, kao i izbor, prikupljanje, priprema i otprema uzoraka obavljaju se kako je određeno u Dijelovima II.1. do II.4. ovog Aneksa. Pregled uzoraka obavlja se u skladu s Dijelovima III do VI ovog Aneksa.

II. Inspekcijski pregled i uzorkovanje

II.1. Inspekcijski pregled, izbor i prikupljanje uzoraka na ribogojilištu za koje se sumnja na prisutnost ISA-e.

II.1.1. Pri redovnim inspekcijskim pregledima koji se obavljaju u okviru službenog programa nadzora navedenog u Dijelu I.6. ovog Aneksa i u ribogojilištima za koja se sumnja da su zaražena ISA-om, svi se objekti ribogojilišta (kafezi, bazeni, ribnjaci) podvrgavaju inspekcijom pregledu kako bi se utvrdila prisutnost uginulih i slabih riba ili riba s

neuobičajenim ponašanjem. Kada je moguće, nedavno uginule (još neraspadnute) ribe te slabe ribe ili ribe neuobičajenog ponašanja podvrgavaju se pregledu radi utvrđivanja kliničkih znakova ili postmortem nalaza koji odgovaraju ISA-i, kako je opisano u najnovijem izdanju OIE-ovog Dijagnostičkog priručnika za bolesti vodenih životinja.

II.1.2. Ukoliko se zapaze nedavni klinički znakovi koji odgovaraju ISA-i ili ako nadležni veterinarski inspektor ima bilo kakav drugi razlog za sumnju da su ribe možda zaražene, uzima se uzorak od najmanje 10 riba. Ako je to moguće, uzorak se uzima od nedavno uginulih i slabih riba ili od riba koje pokazuju neuobičajeno ponašanje. Ukoliko nema dovoljno klinički promijenjenih riba, tada se potreban broj riba u uzorku dobija nadopunjavanjem uzorcima uzetim od zdravih riba odabranih iz kafeza, bazena ili ribnjaka u kojima je najveći broj uginulih riba ili riba koje pokazuju kliničke znakove bolesti.

II.1.3. Ukoliko se zapaze nedavno uginule ili slabe ribe ili ribe neuobičajenog ponašanja a klinički znakovi i postmortem nalazi ne odgovaraju ISA-i, uzorkovanje nije obavezno, iako nadležni veterinarski inspektor može odlučiti da se takvi uzorci uzmu ukoliko su potrebni za postavljanje diferencijalne dijagnoze.

II.1.4. Kada se sumnja da su slobodnoživuće ribe zaražene ISA-om, nadležni veterinarski inspektor naređuje i nadzire uzimanje i pregled odgovarajućih uzoraka primjenom odgovarajućih kliničkih i laboratorijskih metoda navedenih u Dijelu II do VI ovog Aneksa kako bi se isključila ili potvrdila prisutnost ISA-e i kako bi se ocijenilo da li prisutnost bolesti predstavlja značajnu prijetnju ribama u ribogojilištima.

II.2. Priprema uzoraka uzetih od riba.

II.2.1. Uzorci za histološki pregled uzimaju se samo od svježe usmrćenih riba koje pokazuju kliničke znakove ili postmortem nalaze koji su u skladu s prisutnošću bolesti. Od svake pojedine ribe uzima se pomoću skalpela uzorak svake vanjske ili unutrašnje lezije, a u svakom slučaju uzorci jetre, središnjeg dijela bubrega, srca i slezene, koji se stavljaju u 8 – 10 % (vol/vol) puferirani soni rastvor formalina. Omjer između fiksira i tkiva mora biti najmanje 20:1 kako bi se osiguralo zadovoljavajuće očuvanje tkiva.

II.2.2. Tkiva za virološko ispitivanje uzimaju se od svih uzorkovanih riba. Radi potvrđivanja nalaza, uzimaju se dvojni uzorci. Komadići jetre, prednjeg dijela bubrega, srca i slezene uzimaju se sterilnim instrumentom i prenose u plastične epruvete koje sadrže 9 ml transportnog rastvora, tj. medij kulture ćelija s antibioticima. Kombinacija 12,5 µg ml⁻¹ fungizona, 200 IU ml⁻¹ polimiksina B i 200 µg ml⁻¹ kanamicina je prikladna, ali se mogu upotrijebiti i druge kombinacije s dokazanom efikasnošću. Tkiva od najviše pet riba mogu se sakupiti u jednu epruvetu koja sadrži transportni rastvor, što čini jedan grupni uzorak. Težina tkiva u jednom uzorku treba iznositi 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3. Za IFAT test uzimaju se otisci bubrega samo od svježe usmrćenih riba, tj. unutar dva sata od smrti. Od ribe se sterilnim instrumentom uzima komadić središnjeg dijela bubrega. S tkiva se upijajućim papirom otkloni suvišna krv, a zatim se tkivo višekratno pritiska na objektno stakalce obloženo poli-L-lizinom. Pojedinačni otisci moraju biti jedan uz drugi, ali se ne smiju preklapati kako bi se dobio kontinuirani jedinstveni sloj ćelija. Krv i tkivna tečnost nisu odgovarajući materijal za ovaj test. Treba izbjegavati ostavljanje uzorka bubrega na upijajućem papiru kako bi se 'iscijedio' jer to može rezultirati zgrušavanjem krvi što uzrokuje taloženje velikih količina serumskih proteina na objektnom stakalcu. Otisci se osuše na vazduhu i zatim se spremne na hladno i suho mjesto, ukoliko ih ne treba odmah fiksirati.

Fiksiranje otisaka se mora obaviti u roku od 72 sata od uzorkovanja ribe. Otisci se nakon sušenja na zraku također mogu i zamrznuti te pohraniti do mjesec dana na -20°C prije fiksiranja.

II.2.4. Riba koje pokazuju znakove anemije mogu se omamiti te se od njih mogu odmah uzeti heparinizirani uzorci krvi za hematološki pregled, kao što je mjerenje hematokrita.

II.2.5. Tkivo za RT-PCR analizu uzima se od svih uzorkovanih riba. Upotrebom sterilnog instrumenta uzima se komadić prednjeg ili srednjeg dijela bubrega te se prenosi u cijev mikrocentrifuge koja sadrži 1 ml dokazano efikasnog rastvora za očuvanje RNA. Tkivo uzeto od najviše pet riba može se sakupiti u jednu epruvetu koja sadrži rastvor za konzerviranje, što čini jedan grupni uzorak. Težina tkiva u jednom uzorku treba iznositi približno 0,5 g. Kada je riba premala da bi se dobio uzorak potrebne težine, uzimaju se komadići bubrega, srca, slezene, jetre ili piloričnih cekuma, upravo navedenim redoslijedom, dok se ne postigne težina od 0,5 g.

II.3. Prijevoz uzoraka uzetih od riba.

II.3.1. Uzorci krvi i epruvete koje sadrže tkivo riba namijenjeno za virološki pregled ili RT-PCR analizu stavljaju se u izolirane posude (npr. kutije od polistirena s debelim stjenkama) zajedno s dovoljnom količinom leda ili 'rashladnih blokova' kako bi se osiguralo rashlađivanje uzoraka tokom prijevoza u laboratoriji. Treba izbjegavati zamrzavanje, a pri dolasku na određite u kutijama za prijevoz još uvijek mora biti leda ili jedan ili više 'rashladnih blokova' moraju još uvijek biti djelimično ili potpuno zamrznuti. U izuzetnim okolnostima uzorci za RT-PCR analizu ili za virološki pregled mogu se naglo zamrznuti i transportovati u laboratoriji pri temperaturi od -20°C ili nižoj.

II.3.2. Objektna stakalca za IFAT šalju se u spremnicima za objektna stakalca sa dovoljno sredstva za isušivanje kako bi otisci ostali suhi i rashlađeni, kako je gore opisano.

II.3.3. Ako se tkiva šalju u fiksiru za histološki pregled, treba ih slati u zatvorenim epruvetama u ambalaži otpornoj na vanjske uticaje, kao što su kutije od polistirena s debelim stjenkama.

II.3.4. Osim u slučaju kada su uzorci zamrznuti, virološki pregled mora započeti što je prije moguće a ne kasnije od 72 sata nakon uzimanja uzoraka. Uzorak za dodatnu kontrolnu analizu pohranjuje se po dolasku u laboratoriju na temperaturu od -20°C .

II.3.5. U laboratoriju se mogu dopremiti i cijele ribe ukoliko su tokom prijevoza ispunjeni temperaturi zahtjevi, kako je opisani u tački II.3.1. ovog Aneksa. Cijela se riba omota u upijajući papir i šalje u plastičnoj vrećici, rashlađena na gore opisani način.

II.3.6. Može se također poslati i živa riba, ali samo pod nadzorom nadležnog veterinarskog inspektora.

II.3.7. Za RT-PCR analizu tkiva pohranjenih u *RNAlater*, ekstrakcija RNA se mora obaviti unutar određenog vremenskog perioda u zavisnosti od toga na kojoj su temperaturi uzorci pohranjeni. Ti vremenski periodi su sljedeći:

-37°C	jedan dan
-35°C	jedna sedmica

– 4 °C
– 20 °C

jedan mjesec
neograničeno

II.3.8. Pakiranje i označavanje se mora obaviti u skladu s odgovarajućim propisima koji su na snazi u BiH kao i važećim međunarodnim propisima o prijevozu.

II.4. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Uz saglasnost dijagnostičke laboratorije, mogu se prikupiti i pripremiti i druga tkiva riba za dodatne preglede.

III. Virološko ispitivanje

III.1. Priprema uzoraka

III.1.1. Kada dođe do praktičnih poteškoća koje onemogućavaju inokulaciju ćelija unutar roka od 72 sata nakon prikupljanja uzoraka tkiva, prihvatljivo je zamrzavanje tkiva na – 80 °C tokom 28 dana. Tkivo se prije virološkog ispitivanja smije zamrznuti i odmrznuti samo jedanput.

III.1.2. Svaki uzorak (grupno tkivo u transportnom rastvoru) mora se potpuno homogenizirati upotrebom aparata 'stomacher', mješalice ili mužara i drobilice, centrifugiranjem pri 2 000 do 4 000 x g 15 minuta na temperaturi od 0 do 6 °C, nakon čega se površinska tečnost filtrira (0,45 µm) i inkubira s jednakim volumenom odgovarajuće razrijeđenih grupnih antiseruma protiv autohtonih serotipova IPNV-a. Titar antiseruma mora biti najmanje 1:2 000 pri testu neutralizacije plaka 50 %. Mješavina se inkubira jedan sat pri temperaturi od 15 °C. To predstavlja inokulaciju.

Tretiranje svih materijala za inokulaciju antiserumima protiv virusa IPN-a (virus koji se u nekim dijelovima Evrope pojavljuje u 50 % ribljih uzoraka) ima za cilj sprječavanje razvoja CPE-a u inokuliranim ćelijskim kulturama radi virusa IPN-a. Time se skraćuje trajanje virološkog ispitivanja te se smanjuje broj slučajeva u kojima bi se pojava CPE-a morala smatrati kao moguća indikacija ISAV-a.

Kada uzorci dolaze iz proizvodnih jedinica za koje se smatra da u njima nema IPN-a, može se izostaviti tretiranje materijala za inokulaciju antiserumom protiv virusa IPN-a.

III.2. Inokulacija ćelijskih kultura.

III.2.1. Ćelije SHK-1 (pasaža 80 ili manje) ili ćelije TO uzgajaju se u mediju L-15 koji sadrži 5 % fetalni govedi serum, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin i 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptoetanol, na pločama s 12 ili 24 rupice. Mogu se upotrijebiti i druge ćelijske linije s dokazanom djelotvornošću i osjetljivošću pri izoliranju ISAV-a, uvažavajući varijabilnost sojeva i sposobnosti različitih sojeva da se umnožavaju u različitim ćelijskim linijama. Suspenzija tkiva organa obrađena antiserumom inokulira se u mlade ćelijske kulture u fazi aktivnog rasta kako bi se dobio konačno razrijeđeni materijal tkiva u hranljivoj podlozi u odnosu od 1 : 1 000. Za svaku suspenziju organa dodaje se 40 µl materijala za inokulaciju u jednu rupicu koja sadrži 2 ml hranljive podloge. Kako bi se smanjio rizik međusobne kontaminacije preporučuje se da se upotrebljavaju posebne ploče s 12 ili 24 rupice za uzorke iz različitih ribogojilišta.

III.2.2. Jedna ploča se ostavlja neinokulirana da bi služila kao negativna kontrola. Posebna ploča se inokulira referentnim izolatom ISAV-a kao pozitivna kontrola, na slijedeći način. Sto μ l standardnog preparata ISAV-a (minimalni titar 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹) inokulira se u prvu rupicu i dobro promiješa. Određeni dio materijala iz prve rupice prenosi se u drugu rupicu da bi se dobio rastvor s omjerom 1:10 i dobro se promiješa. Ovaj se postupak ponavlja kroz cijelu ploču da bi se dobilo šest deseterostrukih rastvora. Standardni ISAV se može pohraniti na -80°C najmanje dvije godine, ali kada se jednom odmrzne mora se upotrijebiti u roku od tri dana.

Napomena: treba paziti da ne dode do međusobne kontaminacije ploča za testiranje s pozitivnim kontrolnim materijalom. Kako bi se izbjegao ovaj rizik, pozitivne kontrole se pripremaju i njima se rukuje odvojeno od ploča za testiranje.

III.2.3. Uzorci se inkubiraju pri $14 \pm 2^{\circ}\text{C}$ kroz period do 15 dana.

III.3. Mikroskopiranje

Ćelijske kulture se dva puta mikroskopski pregledavaju na pojavu CPE-a, između petog i sedmog i između 12. i 14. dana nakon inokulacije. Ako bilo koji grupni uzorak pokaže CPE, mora se odmah započeti s postupcima identifikacije virusa (III.6.). Ako se do 14. dana ne zapazi CPE, izvodi se test hemadsorpcije (III.4.).

III.4. Hemadsorpcija

Umnožavanje ISAV-a u ćelijskim kulturama ne rezultira uvijek CPE-om. Stoga se svaka rupica podvrgava testu hemadsorpcije, kako je dolje opisano ili se alternativno svaka rupica podvrgava IF testu, kako je opisano u III.6.1. ovog Aneksa.

III.4.1. Hranljiva podloga ćelijske kulture uklanja se iz svake rupice, uključujući one koje se koriste za pozitivnu i negativnu kontrolu, te se stavljaju u obilježene sterilne epruvete. 500 μ l 0,2 % (v/v) suspenzije ispranih crvenih krvnih zrnaca kunića ili konja ili 0,05 % (v/v) suspenzije ispranih crvenih krvnih zrnaca kalifornijske pastrve ili atlantskog lososa dodaje se u svaku rupicu i inkubira 45 minuta na sobnoj temperaturi. Crvena krvna zrnca se odstrane i svaka se rupica dva puta ispere medijem L-15. Svaka se rupica mikroskopski pregleda.

III.4.2. Postojanje nakupina ćelija crvenih krvnih zrnaca pričvršćenih uz površinu SHK-1 ili TO ćelija ukazuje na vjerovatnu zarazu ortomiksovirusom. Ako je test hemadsorpcije pozitivan, treba odmah izvesti test identifikacije virusa (III.6.).

III.5. Subkultiviranje ili pasaža

III.5.1. Subkultiviranje se izvodi između 13. i 15. dana. Dvjesto dvadeset pet μ l površinske tečnosti kulture dodaje se u rupice koje sadrže svježe ćelije SHK-1 u fazi aktivnog rasta, na ploči s 12 rupica, te se do 18 dana inkubira na temperaturi od $14 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Ćelijska kultura se dva puta mikroskopski pregleda na pojavu CPE-a, i to između petog i sedmog i između 14. i 15. dana nakon inokulacije. Ako bilo koji grupni uzorak pokaže CPE, treba odmah izvesti test identifikacije virusa (III.6.). Ako se između 14. i 18. dana ne zapazi CPE, treba izvesti test hemadsorpcije (III.4.).

III.5.2. Ako se tokom prvih sedam dana inkubacije pojavi citotoksičnost, u toj fazi treba obaviti subkultivaciju i ćelije treba inkubirati 14 do 18 dana, nakon čega se ponovo provodi subkultivacija i daljnje inkubiranje tokom 14 do 18 dana. Ako se citotoksičnost pojavi nakon sedam dana, subkultivacija se obavlja jedanput, a ćelije se inkubiraju na način da se postigne ukupno 28 do 36 dana inkubacije od prvobitne inokulacije.

III.5.3. Ukoliko se u prvobitnoj kulturi pojavi bakterijska kontaminacija, treba ponovo pripremiti test upotrebom homogenata tkiva pohranjenog na -80°C . Prije inokulacije, homogenat tkiva se centrifugira pri $4\,000 \times g$ kroz 30 minuta na temperaturi 0 do 6°C , a površinska tečnost se filtrira pri $0,22\,\mu\text{m}$. Ukoliko se bakterijska kontaminacija pojavi tokom faze subkultivacije, površinska tečnost se filtrira pri $0,22\,\mu\text{m}$, inokulira u svježe ćelije i inkubira daljnjih 14 do 18 dana.

III.6. Testovi identifikacije virusa

Ako se u bilo kojoj fazi opaze dokazi CPE-a ili ako je test hemadsorpcije pozitivan, obavlja se identifikacija virusa. Metode izbora za identifikaciju ISAV-a su IF (III.6.1.) i RT-PCR (Dio IV). Ako se smatra da mogu biti prisutni i drugi virusi, preporučuje se izvođenje dodatnih testova za identifikaciju virusa. Ako ti testovi ne omoguće konačnu identifikaciju virusa u roku od sedam dana, površinska tečnost se mora dostaviti EU/OIE referentnoj laboratoriji za bolesti riba radi hitne identifikacije.

III.6.1. IF

III.6.1.1. Ćelije SHK-1 (pasaža 80 ili manje) ili ćelije TO uzgajaju se u mediju L-15 koji sadrži 5 % fetalni govedi serum, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin i 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptotanol, na pločama s 24 ili 96 rupica i upotrebljavaju se pri konfluenciji većoj od 50 %. Mogu se upotrijebiti i druge ćelijske linije i hranjive podloge s dokazanom djelotvornošću. Dvjesto dvadeset pet μl površinske tečnosti kulture, za koju se smatra da je zaražena virusom, dodaje se u svaku od dviju rupica, pomiješa se i 225 μl prenosi u dvije slijedeće rupice, pri razrjeđenju 1:5. Dvije dodatne rupice ostavljaju se neinokulirane i služe kao kontrola. Za uzorke iz različitih ribogojilišta koriste se posebne ploče kao i kontrole virusa. Za kontrolu virusa koristi se referentni izolat ISAV-a.

III.6.1.2. Ploče se inkubiraju na $14 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i mikroskopski pregledavaju tokom sedam dana. Kada se zapazi rani CPE ili se u roku od sedam dana CPE uopće ne zapazi, slijedeći korak je fiksiranje. U ovoj se fazi rupice ispiru PBS-om i fiksiraju inkubiranjem s 80 % acetonom na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta. Ploče se suše na vazduhu i odmah boje ili se pohranjuju na temperaturi od 0 do 6°C najviše 24 sata prije bojenja.

III.6.1.3. Umnožene rupice se boje monoklonskim antitijelom 3H6F8 protiv ISAV-a ili nekim drugim monoklonskim antitijelom koje ima dokazanu djelotvornost i specifičnost, razrjeđuju u PBS-u i inkubiraju 30 minuta pri temperaturi od $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$. Monoklonsko antitijelo se odstranjuje, a ploče se ispiru tri puta 0.05 % rastvorom Tween 20 u PBS-u. U svaku rupicu se dodaje anti-mišji IgG FITC konjugat razrijeđen u PBS-u, te se inkubira 30 minuta pri temperaturi od $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$. Napomena: Svaka laboratorija optimizira razrjeđevine različitih serija monoklonskog antitijela i konjugata FITC-a. Antitijelo se odstranjuje, a ploče se tri puta ispiru 0.05 % rastvorom Tween 20 u PBS-u.

III.6.1.4. Rupice treba odmah pregledati upotrebom invertiranog mikroskopa podešenog za fluorescentnu mikroskopiju s prikladnim filterom za ekscitaciju FITC-a. Test se smatra pozitivnim ukoliko se opaze fluorescentne ćelije. Da bi test bio valjan, rezultati pozitivne kontrole moraju biti pozitivni, a rezultati negativne kontrole negativni.

IV. Pregled uzoraka metodom RT-PCR

IV.1. U ovom su odjeljku opisani postupci koji su potrebni za amplifikaciju dijela segmenta 8 genoma ISAV-a pomoću metode PCR, što se može izvoditi na tkivu ribe ili na ISAV-u u kulturi.

IV.1.1. Ekstrakcija RNA

a) Iz svakog uzorka se odstranjuje *RNA* *latrer*. U svaku epruvetu se dodaje 1 ml dH₂O obrađene DEPC-om, te se epruvete centrifugiraju pet minuta pri 13 000 okretaja u minuti na 0 do 6 °C.

b) Iz svakog uzorka se uklanja površinska tečnost te se svakom uzorku i kontrolnoj epruveti koja sadrži prikladan kontrolni materijal (400 µl dH₂O ili homogenat bubrega riba koje nemaju specifikirani uzročnik bolesti) dodaje 800 µl *TRIzol* (Invitrogen), ili nekog drugog reagensa za koji je dokazano da ima jednaku ili veću djelotvornost. Ako je potrebno, tkivo se cijepa ponovljenim pipetiranjem. Epruvete se inkubiraju pet minuta na sobnoj temperaturi. Svako epruveti se doda 160 µl hloroforma te se epruvete tri minute snažno tresu, a zatim petnaest minuta centrifugiraju pri 13 000 okretaja u minuti na 0 do 6 °C.

c) Gornji vodeni sloj se uklanja i stavlja u označenu cjevčicu mikrocentrifuge zapremine 1,5 ml koja sadrži 500 µl izopropanola te se zatim epruvete 10 minuta inkubiraju na sobnoj temperaturi, nakon čega se 15 minuta centrifugiraju pri 6 500 okretaja u minuti na 0 do 6 °C.

d) Odstrani se površinska tečnost i talogu RNA se doda 1 ml 75 % etanola. Epruvete se zatim pet minuta centrifugiraju pri 6 500 okretaja u minuti na 0 do 6 °C.

e) Odstranjuje se površinska tečnost i epruvete se oko tri minute ostavljaju otvorene kako bi ishlapio preostali etanol. Dodaje se 15 µl dH₂O obrađene DEPC-om kako bi se talog ponovo suspendirao te se po potrebi kratko vrtložno protrese.

f) Za izračunavanje koncentracije RNA i čistoće uzorka koristi se spektrofotometar. Optička gustoća se mjeri pri 260 i 280 nm.

g) RNA koja će se koristiti odmah (isti dan), može se privremeno pohraniti na 0 do 6 °C. RNA koja se neće odmah koristiti pohranjuje se na - 80 °C.

IV.1.2. RT

a) Dva µl RNA se razrjeđuju u dH₂O obrađenoj DEPC-om u epruveti mikrocentrifuge od 1,5 ml. Ako je koncentracija uzorka premala da bi se u RT reakciji mogle upotrijebiti 2 µl, koristi se najveća moguća količina RNA. Razrijeđena RNA se inkubira 10 minuta na 55 do 60 °C.

b) Zatim se epruvete koje sadrže RNA stavljaju na led, te se dodaju RT reagensi da bi se dobile konačne slijedeće koncentracije: 1 x pufer, 1 mM dNTP, 100 ng nasumični heksamiri, 20 U RNase inhibitor i 200 U MMLV-RT u ukupnom volumenu od 20 µl.

c) Epruvete se jedan sat inkubiraju na 37 °C.

d) DNA se pohranjuje pri temperaturi od 0 do 6 °C dok je potrebno te se što je prije moguće koristi u PCR-u.

IV.1.3. PCR

a) Pet μ l cDNA se dodaje u 45 μ l PCR mješavine da bi se dobile slijedeće konačne koncentracije: 1 x pufer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM svakog dNTP, 25 pmol svake starter-molekule i 1U Taq polimeraze. Starter molekule su ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (početna starter-molekula) i ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (reverzna starter-molekula). Treba uključiti negativne kontrole za ekstrakciju iz faza RT-a i PCR-a.

b) Epruvete se stavljaju na pet minuta u termocikler programiran na 94 °C, nakon čega slijedi 35 ciklusa na 94 °C jednu minutu, na 55 °C jednu minutu i na 72 °C jednu minutu, s konačnom inkubacijom na 72 °C u trajanju od pet minuta.

c) Rezultati PCR-a se ocjenjuju nakon elektroforeze upotrebom 2 % agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom, uključujući markere veličine duž uzoraka i negativne kontrole iz faza RT-a i PCR-a. Smatra se da je jedan produkt PCR-a od 155 bp indikativan za prisutnost RNA ISAV-a. Za uzorke koji sadrže jedan dodatan produkt od 310 bp, također se smatra da sadrže RNA ISAV-a. Uzorci koji daju više produkata PCR-a, uključujući najmanje jedan od približno 155 bp, mogu sadržavati RNA ISAV-a. Oni se mogu dalje istraživati upotrebom DNA sonde ili sekvencioniranjem nukleotida.

IV.1.4. Potvrđivanje izolacije ISAV-a u kulturi tkiva pomoću PCR-a

Ako se u SHK-1 ćelijama tokom virološkog pregleda uzoraka tkiva pojavi potpuni CPE, iz rupice treba odstraniti 400 μ l površinske tečnosti i staviti je u sterilnu epruvetu veličine 1,5 ml. Iz ovog se uzorka ekstrahira RNA, kako je navedeno u III 1., te se izvodi RT-PCR. Ukoliko se upotrebljavaju kulture bez potpunog CPE, uklanja se površinska tečnost, ćelije se sastružu s površine rupice ili bočice i stave se u sterilnu epruvetu od 1,5 ml radi ekstrahiranja RNA i provođenja RT-PCR.

IV.1.5. Potvrđivanje produkata PCR-a pomoću DNA sonde

a) Specifičnost produkta PCR-a od 155 bp ocjenjuje se sondiranjem pomoću oligonukleotida koji se hibridizira na području produkta PCR-a unutar starter-molekula. Produkti PCR-a se podvrgavaju elektroforezi u 1 % agaroznom gelu uključujući markere veličine, te pozitivnu kontrolu i negativne kontrole iz faza RT-a i PCR-a.

b) DNA se podvrgava Southern blot analizi prenošenjem na membranu, te se označeni oligonukleotid (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') inkubira s membranom nakon odgovarajućih postupaka pred-hibridizacije.

c) Nepovezane i nespecifično povezane sonde ispiru se s membrane, te se povezane sonde vizualiziraju.

d) Sonde povezane s fragmentom od 155 bp (i 310 bp, ako je prisutan) predstavljaju dokaz za specifičnost PCR-a i pokazuju da je u uzorku prisutna RNA ISAV-a.

IV.1.6. Nukleotidno sekvencioniranje produkata PCR-a

Specifičnost PCR-a se može ocijeniti pregledom nukleotidnog slijeda produkta PCR-a od 155 bp.

- a) Produkt PCR-a se očisti od agaroznog gela ili rastvora.
- b) Fragment se sekvencionira upotrebom istih starter-molekula koje su upotrijebljene u PCR-u ili vektorskih starter-molekula ukoliko su bile klonirane u vektoru prije sekvencioniranja.
- c) Nukleotidno sekvencioniranje se upoređuje s onim za segment 8 ISAV-a koji je stavljen na raspolaganje u EMBL bazi podataka nukleotidnog sekvencioniranja (pristupni brojevi su Y10404, AJ012285, AJ242016).
- d) Postojanje slijeda koji odgovara onom za segment 8 ISAV-a predstavlja dokaz da uzorak sadrži RNA ISAV-a.

V. Pregled otisaka bubrega metodom IFAT

V.1. Za pregled otisaka bubrega metodom IFAT uspostavljen je slijedeći protokol

V.2. Priprema i bojenje otisaka

V.2.1. Objektna stakalca se tri minute fiksiraju u acetonu ili metanolu/acetonu (1:1) i zatim osuše na zraku. Prije bojenja pregleda se svako objektno stakalce i odgovarajuća područja se zaokruže pomoću olovke ImmEdge™ ili na sličan način, te se ostavi da se osuši na zraku. Objektna stakalca se zatim stave u rastvor za blokiranje (6 % obrano mlijeko u PBS-u koji sadrži 0.2 % Tween 20), te se 30 minuta inkubiraju na sobnoj temperaturi uz lagano protresanje. Svako takvo stakalce se osuši i spremi vodoravno u kutiju za objektna stakalca koja sadrži vlažnu maramicu za održavanje vlažne atmosfere.

V.2.2. Svaki otisak se prelije rastvorom monoklonskog antitijela 3H6F8 protiv ISAV-a (ili nekog drugog antitijela dokazane specifičnosti i djelotvornosti), nakon čega se kutija s objektnim stakalcima zatvori i 60 minuta inkubiraju na sobnoj temperaturi uz protresanje. Antitijelo se obično razrjeđuje u omjeru 1:10 do 1:100 u 1 % obranom mlijeku, ali se stvarni omjer razrjeđenja mora odrediti za svaku pojedinačnu seriju. Stakalca se ispiru tri puta po dvije minute u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Svaki se otisak prekriva rastvorom koji sadrži FITC kozi anti-mišji konjugat razrijeđen u omjeru 1:1 000 u 1 % obranom mlijeku i 60 minuta inkubiraju u vlažnom okolišu na sobnoj temperaturi. Stakalca se ispiru tri puta po dvije minute u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Svako stakalce se prekriva rastvorom CITIFLUOR™ (500 µl CITIFLUOR™ pomiješano s 1,5 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 u PBS-u) ili drugim prikladnim zaštitnim medijem tokom 10 minuta. Stakalca se ispiru tri puta u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Ako je potrebno dvostruko bojenje, svaki se otisak može prekriti propidijevim jodidom (0.01 mg/ml) u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20 i inkubirati tri minute na sobnoj temperaturi. Stakalca se ispiru tri puta po dvije minute u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Stakalca se osuše i stave u CITIFLUOR™ ili neki drugi odgovarajući medij. Prije mikroskopskog pregleda, stakalca se pohrane na tamno mjesto pri temperaturi od 4 °C.

V.3. Pregled upotrebom fluorescentne mikroskopije

Svako se stakalce pregleda mikroskopom prikladnim za epi-fluorescentno osvjetljenje, upotrebom odgovarajućeg filtra koji pobuđuje FITC na emitiranje karakteristične zelene fluorescencije. Sva polja unutar područja označenog pomoću olovke ImmEdge™ pregledavaju se pod objektivima x10 i x20, a sumnjiva područja (ona koja pokazuju zelenu fluorescenciju) dodatno se pregledavaju pod objektivom x40 i fazno/fluorescentnim osvjetljenjem kako bi bili sigurni da je fluorescentna obojenost povezana sa ćelijama. Fazne

koordinate sumnjivih područja treba zabilježiti radi kasnijeg potvrđivanja prirode fluorescencije koje obavlja drugi ispitivač. Nakon pregleda koji obavi prvi ispitivač, stakalca koja su pozitivna ili sumnjiva ponovno pregledava drugi ispitivač i potvrđuje rezultate.

V.4. Kontrole

V.4.1. Za svaku seriju stakalaca obojenih za IFAT, moraju biti uključena tri tipa kontrole:

- otisak bubrega od nezaraženog atlantskog lososa (negativna kontrola),
- nezaražena čelijska kultura SHK-1 ili druga prijemčiva čelijska kultura (negativna kontrola),
- čelijska kultura SHK-1 ili druga prijemčiva čelijska kultura zaražena ISAV-om (pozitivna kontrola).

V.4.2. Kao dodatna pozitivna kontrola, preporučuje se otisak bubrega od atlantskog lososa zaraženog ISAV-om.

V.4.3. Ako se s bilo kojom od negativnih kontrola dobije pozitivan rezultat, test se smatra nevaljalim za sva stakalca u toj seriji. Ako se za sva stakalca u seriji, uključujući pozitivne kontrole, dobije negativan rezultat, test se smatra nevaljalim za sva stakalca u toj seriji. U slučaju kada nevaljale kontrole obezvrijede cijelu seriju stakalaca, ta se stakalca moraju uništiti te se izvodi ponovno testiranje upotrebom dupliciranih otisaka.

V.5. Pregled drugih tkiva

Ova se tehnika može primijeniti na druga tkiva ribe, kao što su jetra, slezena i srce, pod uslovom da se na stakalce može prenijeti dovoljna količina endotelnih čelija, leukocita ili limfocita. Postupak bojenja ostaje isti za sva tkiva, iako je kod nekih tkiva bolje izostaviti bojenje propidijevim jodidom, očekujući da će se tipovi čelija prisutni u otisku identificirati faznim osvjetljenjem.

VI. HISTOLOGIJA

Djelici preparirani parafinom režu se na veličinu od 5 µm i boje upotrebom hematoksilina i eozina. Histološke promjene povezane s ISA-om opisane su u najnovijem izdanju OIE-ovog Dijagnostičkog priručnika za bolesti vodenih životinja.

VII. Akronimi i skraćenice

cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CPE	citopatski efekt
DEPC	dietilpirokarbonat
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
FITC	fluorescin izotiocianat
IF	imunofluorescencija
IFAT	indirektna imunofluorescencija
OIE	međunarodni ureda za epizootije
IPN(V)	infektivna nekroza pankreasa (virus)
ISA(V)	infektivna anemija lososa (virus)
PBS	solni rastvor s fosfatnim puferom
RNA	ribonukleinska kiselina
RT-(PCR)	reverzna transkriptaza (lančana reakcija polimeraze)
SHK-1	čelije iz prednjeg dijela bubrega lososa
TCID50	infektivna doza tkivne kulture pri 50 % ciljnog učinka

ANEKS VIII

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrđivanje prisutnosti virusne hemoragijske septikemije (VHS) i zarazne hematopoetske nekroze (IHN)

UVOD

Ovaj Prilog:

(a) daje smjernice i utvrđuje minimalne zahtjeve u vezi s planovima uzorkovanja i dijagnostičkim metodama za otkrivanje i potvrđivanje prisutnosti virusne hemoragijske septikemije (VHS) i zarazne hematopoetske nekroze (IHN);

(b) uključuje odredbe Aneksa IV dijelova I i II ovog Pravilnika za odobravanje i održavanje statusa zona i uzgajališta u neodobrenim zonama;

(c) utvrđuje odredbe čiji je cilj pravilna dijagnoza VHS-a i IHN-a te službeno priznavanje statusa zona i uzgajališta u neodobrenim zonama u skladu s članom 50. ovog Pravilnika;

(d) namijenjen je organima koji su nadležni za nadzor VHS-a i IHN-a te laboratorijskom osoblju koje obavlja ispitivanja vezana uz te bolesti. U skladu s tim, naglasak je stavljen na postupke uzorkovanja, načela te primjenu laboratorijskih testova i ocjenjivanje njihovih rezultata kao i na detaljne laboratorijske tehnike. Prema potrebi, laboratorije mogu unijeti izmjene u testove opisane u ovom Aneksu ili koristiti drugačije testove, pod uslovom da se može dokazati jednaka osjetljivost i specifičnost.

Dio I uključuje planove uzorkovanja i dijagnostičke metode za nadzor VHS-a i IHN-a kako bi se dobio i održao status odobrene zone ili odobrenog uzgajališta u neodobrenoj zoni.

U dijelu II se opisuju dijagnostički postupci za potvrđivanje prisutnosti VHS-a i IHN-a u slučaju sumnje.

U dijelu III se utvrđuju kriteriji i smjernice za program službenih veterinarsko-zdravstvenih kontrola kojim se potvrđuje odsutnost VHS-a i/ili IHN-a u prošlosti.

U dijelu IV se daju preporuke za postupak titracije virusa VHS-a i IHN-a kako bi se provjerila osjetljivost ćelijskih kultura na infekciju.

Akronimi i skraćenice navedeni su u dijelu V.

DIO I

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za nadzor VHS-a i IHN-a radi dobijanja i održavanja statusa odobrene zone ili uzgajališta u neodobrenoj zoni

I Pregledi i uzorkovanje

1. Opće odredbe o kliničkim zdravstvenim pregledima, sakupljanju i odabiru uzoraka za nadzor zona ili uzgajališta u neodobrenim zonama radi dobijanja ili održavanja statusa odobrene zone ili uzgajališta obzirom na VHS i/ili IHN

U tabelama 1A, 1B i 1C ovog Aneksa daje se sažeti prikaz kliničkih zdravstvenih pregleda i uzorkovanja tkiva riba i/ili ovarijalne tečnosti koji se moraju obaviti u zonama ili uzgajalištima u neodobrenim zonama kako bi se dobio ili održao status odobrene zone ili uzgajališta obzirom na VHS i IHN u skladu s Aneksom II, dijelom II ovog Pravilnika. Precizniji podaci navedeni su u dijelovima I.I.2. do I.I.4. Tabele 1A i 1B ovog Aneksa ne primjenjuju se na nova uzgajališta i uzgajališta koja ponovo započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili odobrenog uzgajališta smještenog u neodobrenoj zoni, pod uslovom da udovoljavaju zahtjevima koji su utvrđeni Aneksom II, dijelom I ovog Pravilnika.

Kliničke preglede treba obaviti u periodu od oktobra do juna ili kad god temperatura vode padne ispod 14 °C. U onim uzgajalištima u kojima se klinički pregledi trebaju obaviti dva puta godišnje, vremenski razmak između pregleda mora iznositi najmanje četiri mjeseca. Sve se proizvodne jedinice (ribnjaci, bazeni, mrežasti kafezi itd.) moraju pregledati kako bi se utvrdila prisutnost mrtvih ili slabih riba ili riba s neuobičajenim ponašanjem. Posebnu pažnju treba obratiti na područje oticanja vode gdje se zbog vodene struje obično sakupljaju slabe ribe.

Ribe za uzorkovanje biraju se na slijedeći način:

– ako je među njima kalifornijska pastrmka, samo ribe te vrste biraju se za uzorkovanje. Ako kalifornijska pastrmka nije prisutna, uzorak se mora sastojati od riba svih drugih prisutnih vrsta kad god su te vrste osjetljive na VHS i/ili IHN (kao što je navedeno u Aneksu III dio II ovog Pravilnika). Te vrste moraju biti razmjerno zastupljene u uzorku;

– ako se za proizvodnju riba koristi više izvora vode, uzorak se mora sastojati od riba iz svih izvora vode;

– ako su prisutne slabe ribe, ribe s neuobičajenim ponašanjem ili netom uginule ribe (koje još nisu u stanju raspadanja), one se prve uzimaju za uzorkovanje. Ako nema takvih riba, odabrane ribe moraju uključivati zdrave ribe normalnog izgleda koje treba sakupiti tako da u uzorku budu srazmjerno zastupljeni svi dijelovi uzgajališta kao i sve starosne grupe.

2. Posebne odredbe, uključujući sakupljanje uzoraka, za nadzor zona ili uzgajališta u neodobrenim zonama u svrhu dobijanja ili održavanja odobrenog statusa obzirom na VHS i/ili IHN

1. Zona ili uzgajalište u neodobrenoj zoni, koje je pod nadzorom nadležnog veterinarskog inspektora može dobiti status odobrene zone odnosno uzgajališta obzirom na VHS i/ili IHN prema jednom od slijedećih modela:

(a) Model A – dvogodišnji program nadzora

Nakon najmanje dvogodišnje odsutnosti svih kliničkih ili drugih znakova VHS-a i/ili IHN-a, sva uzgajališta u zoni ili svako uzgajalište u neodobroj zoni, koji će biti odobreni, moraju tokom dvije godine biti podvrgnuti zdravstvenom pregledu dva puta godišnje. U tom dvogodišnjem kontrolnom periodu prije dobijanja statusa odobrene zone ili uzgajališta odsutnost kliničkih ili drugih znakova VHS-a i/ili IHN-a mora biti stalna i moraju se sakupljati uzorci za ispitivanje u skladu s tabelom I.A. ovog Aneksa. Nadalje, uzorci se moraju birati, pripremati i ispitivati kako je opisano u dijelu I.I. do I.IV. ovog Aneksa, a laboratorijska ispitivanja moraju dati negativne rezultate obzirom na VHS i/ili IHN; ili

(b) Model B – dvogodišnji program nadzora sa smanjenom veličinom uzorka

Nakon provedenog programa službenih veterinarsko-zdravstvenih kontrola kojim je dokazano nepostojanje VHS-a i/ili IHN-a tokom najmanje četiri prehodne godine, sva uzgajališta u zoni ili svako uzgajalište u neodobroj zoni koji će se odobriti moraju tokom dvije godine biti podvrgnuti zdravstvenom pregledu dva puta godišnje. U tom dvogodišnjem kontrolnom periodu prije dobijanja statusa odobrene zone ili uzgajališta odsutnost kliničkih ili drugih znakova VHS-a i/ili IHN-a mora biti stalna i moraju se sakupljati uzorci za ispitivanje u skladu s tabelom I.B. ovog Aneksa. Nadalje, uzorci se moraju birati, pripremati i ispitivati kako je opisano u dijelu I.I. do I.IV. ovog Aneksa, a laboratorijska ispitivanja moraju dati negativne rezultate obzirom na VHS i/ili IHN. Program zdravstvenih kontrola za dokazivanje odsutnosti VHS-a i/ili IHN-a mora ispunjavati kriterije i smjernice iz dijela III ovog Aneksa.

2. Posebne odredbe za odobrenje novih uzgajališta i uzgajališta koja ponovo započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili iz odobrenog uzgajališta smještenog u neodobroj zoni.

Nova uzgajališta i uzgajališta koja ponovo započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili iz odobrenog uzgajališta smještenog u neodobroj zoni mogu steći status u skladu s uslovima utvrđenim članom 50. i Aneksom II, dio I ovog Pravilnika. U skladu s tim, na ta se uzgajališta ne primjenjuju odredbe o uzorkovanju koje su utvrđene u gore navedenom modelu A i B (dijelovi I.I.2.1.a i I.I.2.1.b) ovog Aneksa.

3. Program nadzora za održavanje odobrenog statusa obzirom na VHS i/ili IHN

Da bi zona ili uzgajalište u neodobroj zoni zadržali odobreni status obzirom na VHS i/ili IHN, kontrole i uzimanje uzoraka za ispitivanje moraju se obavljati u skladu s tabelom IC ovog Aneksa. Uzorci se moraju birati, pripremati i ispitivati kako je opisano u dijelovima I.I. do I.IV. ovog Aneksa, a laboratorijska ispitivanja moraju dati negativne rezultate obzirom na uzročnike VHS-a i/ili IHN-a.

3. Pripremanje i slanje uzoraka ribe

Prije slanja ili prijenosa u laboratoriju, dijelovi organa koji će se ispitivati moraju se ukloniti iz ribe pomoću sterilnog pribora za disekciju te prenijeti u sterilne plastične epruvete koje sadrže transportnu podlogu tj. čelijsku kulturu s 10 % telećeg seruma i antibioticima. Može se preporučiti kombinacija od 200 iu penicilina, 200 µg streptomcina i 200 µg kanamicina na mililitar (ml), ali se mogu koristiti i drugi antibiotici dokazane djelotvornosti. Tkivni materijal koji će se ispitivati je slezena, prednji bubreg i pored toga, ili srce ili mozak. U nekim se

slučajevima može ispitivati ovarijalna tečnost (tabele 1A do C ovog Aneksa).

Ovarijalna tečnost ili dijelovi organa od najviše 10 riba (tabele 1A do C ovog Aneksa) mogu se sakupiti u jednu sterilnu epruvetu koja sadrži najmanje 4 ml transportne podloge i koja predstavlja jedan zbirni uzorak. Tkivo u svakom uzorku treba težiti najmanje 0,5 grama (g).

Epruvete treba staviti u izolirane posude (recimo polistirenske kutije debelih stijenki) zajedno s dovoljnom količinom leda ili ledenih blokova koji će osigurati hlađenje uzoraka tokom prijevoza do laboratorija. Treba spriječiti zamrzavanje. Temperatura uzorka tokom prijevoza ne smije premašiti 10 °C, a pri njegovom prijemu led mora još uvijek biti prisutan u transportnoj kutiji odnosno jedan ili više ledenih blokova moraju još uvijek biti djelimično ili u cjelosti zamrznuti.

Virološke pretrage moraju započeti što je moguće prije, a najkasnije 48 sati nakon uzimanja uzoraka. U izuzetnim slučajevima (npr. ako se ribe uzorkuju u veoma udaljenim područjima i ne mogu se svakodnevno slati) virološke pretrage mogu započeti najkasnije 72 sata nakon prikupljanja materijala, pod uslovom da je materijal koji će se ispitivati zaštićen transportnom podlogom i da se mogu ispuniti zahtjevi u pogledu temperature tokom prijevoza (dio I.1.3. stav 3. ovog Aneksa)

U laboratoriji se mogu poslati cijele ribe pod uslovom da se mogu ispuniti zahtjevi u pogledu temperature tokom prijevoza. Cijele se ribe mogu umotati u upijajući papir i potom poslati u plastičnim vrećicama ohlađenim kako je gore navedeno. Mogu se slati i žive ribe.

Pakiranje i označavanje mora biti u skladu s odgovarajućim propisima koji su na snazi u BiH kao i važećim međunarodnim propisima o prijevozu.

4. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

U dogovoru s uključenom dijagnostičkom laboratorijom mogu se uzeti i pripremiti za dopunska ispitivanja i druga tkiva riba.

II Pripremanje uzoraka za virološke pretrage

1. Zamrzavanje u izuzetnim slučajevima

Ako je zbog praktičnih poteškoća (npr. loši vremenski uslovi, neradni dani, laboratorijski problemi itd.) nemoguće nasaditi ćelije u roku od 48 sati nakon uzimanja uzoraka tkiva, uzorci tkiva se mogu zamrznuti u podlozi od ćelijske kulture pri temperaturi od – 20 °C ili nižoj, a virološke pretrage obaviti u roku od 14 dana. Tkivo se može zamrznuti i odmrznuti samo jednom prije ispitivanja. Mora se voditi evidencija sa svim podacima o razlozima za svako zamrzavanje uzoraka tkiva (kao što je oluja, odumiranje ćelijskih linija itd.)

2. Homogenizacija organa

U laboratoriji se tkivo u epruvetama mora potpuno homogenizirati (u homogenizatoru Stomacher, mješalici ili tarioniku sa sterilnim pijeskom) i potom suspendirati u izvornoj transportnoj podlozi.

Ako uzorak čine cijele ribe kraće od 4 cm, one se moraju usitniti sterilnim makazama ili skalpelom nakon što se ukloni stražnji dio tijela iza crijevnog otvora. Ako uzorak čine cijele

ribe dužine tijela od 4 do 6 cm, uzima se utroba uključujući bubrege. Ako uzorak čine cijele ribe duže od 6 cm, uzimaju se uzorci tkiva kako je opisano u dijelu I.I.3. ovog Aneksa. Uzroke tkiva treba usitniti sterilnim makazama ili skalpelom, homogenizirati kako je gore opisano i suspendirati u transportnoj podlozi.

Konačni omjer tkiva i transportne podloge mora se uskladiti u laboratoriji tako da iznosi 1:10.

3. Centrifugiranje homogenata

Homogenat se centrifugira na 2 000 do 4 000 x g 15 minuta u centrifugi ohlađenoj na 2 do 5°C te se supernatant odlije i tretira antibioticima četiri sata na 15 °C ili preko noći na 4 °C; u ovoj fazi može biti koristan gentamicin 1 mg/ml.

Ako je uzorak poslan u transportnoj podlozi (tj. izložen antibioticima), može se izostaviti tretiranje supernatanta antibioticima.

Svrha tretiranja antibioticima je suzbijanje bakterijske kontaminacije uzorka, tako da nije potrebna filtracija kroz membranske filtre.

Ako se prikupljeni supernatant čuva na – 80 °C 48 sati nakon uzorkovanja, može se još samo jednom ponovo upotrijebiti za virološke pretrage.

Ako je zbog praktičnih poteškoća (npr. kvar inkubatora, problemi sa ćelijskim kulturama itd.) nemoguće nasaditi ćelije u roku od 48 sati nakon uzimanja uzoraka tkiva, supernatant se može zamrznuti pri temperaturi od – 80 °C, a virološke pretrage obaviti u roku od 14 dana.

Prije inokulacije ćelija, supernatant se pomiješa s jednakim dijelovima odgovarajuće razrijeđenih grupa antiseruma za domaće serotipove virusa IPN te se s njima inkubira najmanje jedan sat na 15 °C ili najviše 18 sati na 4 °C. Titar antiseruma mora biti najmanje 1/2000 u testu neutralizacije plaka za 50 %.

Svrha tretiranja svih inokuluma antiserumom za virus IPN (virus koji se u nekim dijelovima Evrope javlja u 50 % uzoraka ribe) je spriječiti da u inokuliranim ćelijskim kulturama dođe do citopatogenog učinka (CPE) zbog virusa IPN. To će skratiti trajanje viroloških pretraga i smanjiti broj slučajeva u kojima bi se nastanak CPE-a morao smatrati potencijalnim znakom prisustva virusa VHS-a ili IHN-a.

Ako uzorci potiču iz proizvodnih jedinica koje se smatraju slobodnim od IPN-a, može se izostaviti tretiranje inokuluma antiserumom za virus IPN.

III Virološke pretrage

1. Ćelijske kulture i podloge

Ćelije BF-2 ili RTG-2 te EPC ili FHM uzgajaju se na temperaturi od 20 do 30 °C na odgovarajućoj podlozi, npr. Eaglovom MEM-u (ili njegovim modifikacijama), obogaćenju s 10 % fetalnog govedeg seruma i antibioticima u standardnim koncentracijama.

Ako se ćelije uzgajaju u zatvorenim staklenkama, preporučuje se puferiranje podloge bikarbonatom. Podloga koja se koristi za kulturu ćelija u otvorenim jedinicama može se puferirati Tris-HCL-om (23 mM) i Na-bikarbonatom (6 mM). Ph mora biti $7,6 \pm 0,2$.

Ćelijske kulture koje će se koristiti za inokuliranje s tkivnim materijalom trebaju biti mlade (stare 4 do 48 sati) i pri inokuliranju moraju aktivno rasti (bez združivanja).

2. Inokulacija ćelijskih kultura

Suspenzija organa tretirana antibioticima inokulira se u ćelijske kulture u dva razrjeđenja, tj. osnovnom razrjeđenju i, pored toga, njegovom razrjeđenju 1:10, što dovodi do konačnih razrjeđenja tkivnog materijala u ćelijskoj kulturi 1:100 odnosno 1:1 000 (kako bi se spriječila homologna interferencija). Moraju se inokulirati najmanje dvije ćelijske linije (vidi dio I. III.1). Omjer veličine inokuluma i količine ćelijske kulture treba biti 1:10.

Za svako razrjeđenje i svaku ćelijsku liniju mora se upotrijebiti najmanje oko 2 cm² ćelijske površine, što odgovara jednoj jažici na plitici s 24 jažice za ćelijsku kulturu. Preporučuje se korištenje plitica za ćelijsku kulturu, ali su prihvatljive i druge jedinice sa sličnim ili većim površinama za rast.

3. Inkubacija ćelijskih kultura

Inokulirane ćelijske kulture inkubiraju se 10 dana na 15 °C. Ako se boja podloge za ćelijsku kulturu promijeni s crvene u žutu, što ukazuje na zakiseljenje podloge, mora se prilagoditi pH pomoću sterilnog rastvora bikarbonata ili istovrijednim supstancama kako bi se osigurala osjetljivost ćelija na virusnu infekciju.

Najmanje svakih šest mjeseci ili ako se sumnja na smanjenu osjetljivost ćelija, obavlja se titracija zamrznutih zaliha virusa VHS-a i IHN-a kako bi se provjerila osjetljivost ćelijskih kultura na infekciju. Preporučeni postupak opisan je u dijelu IV.

4. Mikroskopiranje

Inokulirane ćelijske kulture moraju se redovno pregledavati (najmanje tri puta sedmično), uz povećanje od 40 do 150 puta, kako bi se provjerilo je li došlo do citopatogenog učinka (CPE). Ako se opazi očiti citopatogeni učinak (CPE), odmah treba početi s postupkom identifikacije virusa u skladu s dijelom I.IV. ovog Aneksa.

5. Supkultiviranje

Ako nakon 7 do 10 dana primarne inkubacije ne dođe do citopatogenog učinka (CPE), obavlja se supkultiviranje sa svježim ćelijskim kulturama, pri čemu se koristi ćelijska površina slična površini primarne kulture.

Alikvoti hranjive podloge (supernatant) svih kultura/jažica, koje čine primarnu kulturu, spoje se prema ćelijskoj liniji 7 do 10 dana nakon inokulacije. Tako dobijeni zbrini uzorci inokuliraju se u homologne ćelijske kulture, nerazrijeđene i razrijeđene 1:10 (pri čemu se dobiju razrjeđenja supernatanta u omjeru 1:10 odnosno 1:100), kako je opisano u dijelu I.III.2. ovog Aneksa. Druga je mogućnost da se alikvoti 10 % hranjive podloge koja čini primarnu kulturu inokuliraju direktno u jažicu sa svježom ćelijskom kulturom (supkultiviranje iz jažice u jažicu). Prije inokulacije razrjeđenja se mogu inkubirati s antiserumom za virus IPN u odgovarajućem razrjeđenju kako je opisano u dijelu I.II.3. ovog Aneksa.

Inokulirane kulture se potom inkubiraju 7 do 10 dana na 15 °C i promatraju kako je opisano u dijelu I.III.4. ovog Aneksa.

Ako se tokom prva tri dana inkubacije javi toksični CPE, u toj fazi može se obaviti supkultivacija, ali se ćelije potom moraju inkubirati sedam dana i ponovo supkultivirati uz dodatnih sedam dana inkubacije. Ako se toksični CPE javi nakon tri dana, ćelije se mogu jednom presaditi i inkubirati dok ne prode ukupno 14 dana od prve inokulacije. U zadnjih sedam dana inkubacije ne smiju se javiti znaci toksičnosti.

Ako uprkos obradi antibioticima dođe do bakterijske kontaminacije, prije supkultivacije treba obaviti centrifugiranje na 2 000 do 4 000 x g kroz 15 do 30 minuta na 2 do 5 °C i/ili filtriranje supernatanta kroz filter od 0,45 µm (membrana s niskom apsorpcijom proteina). Pored toga, postupak supkultivacije isti je kao i za toksični CPE.

IV Identifikacija virusa

1. Testovi za identifikaciju virusa

Ako se u ćelijskoj kulturi uoči postojanje CPE-a, podloga (supernatant) se izdvoji i pretraži korištenjem jedne ili više slijedećih metoda: neutralizacija, IF, ELISA. Ako se ovim testovima ne može sa sigurnošću identificirati virus u roku od jedne sedmice, supernatant se mora poslati u EU/OIE referentnu laboratoriju za bolesti riba kako bi se virus odmah identificirao.

2. Neutralizacija

Iz izdvojenog supernatanta uklonite ćelije centrifugiranjem (2 000 do 4 000 x g) ili filtriranjem kroz membranu (0,45 µm) s niskom apsorpcijom proteina te razrijedite supernatant 1:100 i 1:10 000 u podlozi za ćelijsku kulturu.

Alikvoti dva razrjeđenja supernatanta se pomiješaju i odvojeno inkubiraju 60 minuta na 15°C s jednakim dijelovima slijedećih reagenasa (ili kako odredi referentna laboratorija obzirom na moguću citotoksičnost antiseruma):

- serum koji sadrži grupu specifičnih antitijela za virus VHS u razrjeđenju 1:50 (vol:vol)
- serum koji sadrži grupu specifičnih antitijela za virus IHN u razrjeđenju 1:50 (vol:vol)
- grupni uzorak antiseruma za domaće serotipove virusa IPN u razrjeđenju 1:50 (vol:vol)
- sama hranjiva podloga (pozitivna kontrola).

Najmanje dvije ćelijske kulture inokuliraju se svaka s 50 µl mješavine supernatanta i seruma te se inkubiraju na 15 °C. Razvoj citopategenog učinka (CPE) provjerava se kako je opisano u dijelu I.III.4. ovog Aneksa.

Neki sojevi virusa VHS ne reagiraju u neutralizacijskom testu. Takvi se izolati moraju identificirati metodom IF ili ELISA.

Mogu se primijeniti i drugi neutralizacijski testovi dokazane djelotvornosti.

3. IF

Za svaki izolat virusa koji treba identificirati, najmanje osam pokrivnih stakalaca ili njihovih ekvivalenata ćelijama treba nasaditi uz gustoću tako da dođe do približno 60 do 90 %-tne konfluencije 24 sata nakon nasadivanja. U tu se svrhu preporučuju ćelije EPC jer one snažno prijanjaju za staklenu površinu, ali se mogu koristiti i druge ćelijske linije kao što su BF-2, RTG-2 ili FHM.

Nakon što se ćelije natalože na staklenu površinu (otprilike jedan sat nakon nasadivanja) ili nakon inkubiranja kultura do 24 sata, inokulira se virus koji treba identificirati. Četiri kulture se inokuliraju u volumnom omjeru 1:10, a četiri kulture u omjeru 1:1 000. One se potom inkubiraju 20 do 30 sati na 15 °C.

Nakon inkubacije, kulture se dva puta ispiru u Eagleovom MEM-u bez seruma, fiksiraju u 80 %-tnom ledeno hladnom acetonu i potom boje dvoslojnim IFAT-om. Prvi sloj reagensa sastoji se od poliklonskih ili monoklonskih antitijela referentnog kvaliteta. Drugi sloj reagensa je fluorokromom konjugirani antiserum za imunoglobulin korišten u prvom sloju. Za svaki pretraživani antiserum mora se obojiti najmanje jedna kultura inokulirana visokom dozom i jedna kultura inokulirana niskom dozom. U test se moraju uključiti i odgovarajuće negativne i pozitivne kontrole. Preporučuju se fluorokromi kao što su FITC i TRITC.

Na obojene kulture nanesite fiziološki rastvor s dodatkom glicerola. Pregledajte ih pod ulaznim ultraljubičastim svjetlom. Koristite okulare s povećanjem od 10 ili 12 puta te objektivne s povećanjem od 25 ili 40 puta, s numeričkim otvorima > 0,7 odnosno 1,3.

Gore opisani postupak imunofluorescencije (IF) naveden je kao primjer. Umjesto njega mogu se koristiti i drugi postupci imunofluorescencije (obzirom na ćelijske kulture, fiksiranje i antitijela referentnog kvaliteta) dokazane efikasnosti.

4. ELISA

Jažice na mikrotitarskoj pločici oblože se preko noći preporučenim razrjeđenjima pročišćenih frakcija imunoglobulina antitijela referentnog kvaliteta.

Nakon ispiranja jažica puferom PBS-Tween-20, u njih se dodaje virus koji treba identificirati, i to u serijama dvostrukog ili četverostrukog razrjeđenja, te se ostavi da reagira s adsorbiranim antitijelom 60 minuta na 37 °C. Nakon ispiranja puferom PBS-Tween-20, dodaju se biotinom obilježena antitijela čija specifičnost odgovara specifičnosti adsorbiranih antitijela te se ostave da reagiraju 60 minuta na 20 °C. Nakon još jednog ispiranja kao što je gore opisano, dodaje se streptavidin konjugiran s peroksidazom hrena (HRP) te se ostavi da reagira jedan sat na 20°C. Nakon zadnjeg ispiranja, vezani enzim se vizualizira upotrebom odgovarajućih supstrata ELISA (OPD ili drugi).

Gore opisana verzija metode ELISA, koja se temelji na primjeni biotina i avidina, navedena je samo kao primjer. Umjesto nje mogu se koristiti i druge verzije metode ELISA dokazane efikasnosti.

TABELA 1A

Program pregleda i uzorkovanja za zone i za uzgajališta u neodobrenim zonama za dvogodišnji kontrolni period prije dobijanja odobrenog statusa obzirom na VHS i/ili IHN

(u skladu s Aneksom II, dio II ovog Pravilnika i odredbama dijela I ovog Aneksa)

	Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj laboratorijskih pretraga na godinu (dvije godine)	Laboratorijsko pretraživanje na prisutnost virusa ¹	
			Broj riba u razvoju (organski materijal)	Broj matičnih riba (ovarijalna tečnost)
Kontinentalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	120 (prvi pregled) ² 150 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ³ 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta samo s matičnim ribama	2	1	0	150 (prvi ili drugi pregled) ³
(c) Uzgajališta bez matičnih riba	2	2	150 (prvi i drugi pregled)	0
Obalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	120 (prvi pregled) 150 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ³ 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta salmonida bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled) ⁴	0
(c) Uzgajališta bez salmonida i bez matičnih riba	2	2	150 (prvi i drugi pregled)	0

Najveći broj riba po zbirnom uzorku: 10

¹ Može se koristiti i manja veličina uzorka kao što je navedeno u tabeli 1B ako su ispunjeni uslovi navedeni u dijelu II.1., I.1.2.1.b. i III ovog Aneksa.

² Klinički pregledi.

³ U izuzetnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tečnost, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

TABELA 1B

**Program pregleda i uzorkovanja za dvogodišnji kontrolni period prije dobijanja
odobrenog statusa obzirom na VHS i/ili IHN u zonama i uzgajalištima u neodobrenim
zonama za koje je službeno priznata odsutnost ovih bolesti u prošlosti**

(u skladu s Aneksom II, dio II ovog Pravilnika i odredbama dijela I i III ovog Aneksa)

	Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj laboratorijskih pretraga na godinu (dvije godine)	Laboratorijsko pretraživanje na prisutnost virusa	
			Broj riba u razvoju (organski materijal)	Broj matičnih riba (ovarijalna tečnost)
Kontinentalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	0 (prvi pregled) ¹ 30 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ² 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta samo s matičnim ribama	2	1	0	30 (prvi ili drugi pregled) ²
(c) Uzgajališta bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled)	0
Obalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	0 (prvi pregled) 30 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ² 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta salmonida bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled) ³	0
(c) Uzgajališta bez salmonida i bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled)	0

Najveći broj riba po zbirnom uzorku: 10

1 Klinički pregledi.

2 U izuzetnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tečnost, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

3 Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri sedmice od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

4. Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri sedmice od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu

TABELA 1C

Program pregleda i uzorkovanja za zone i uzgajališta u neodobrenim zonama koji se provode u svrhu održavanja statusa odobrene zone odnosno uzgajališta obzirom na VHS i/ili IHN

(u skladu s Aneksom II, dio II ovog Pravilnika i odredbama dijela I ovog Aneksa)

	Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj riba u uzorku za laboratorijsko pretraživanje ¹	
		Broj riba u razvoju (organski materijal)	Broj matičnih riba (ovarijalna tečnost)
Kontinentalne zone i uzgajališta			
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	20 (prvi ili drugi pregled)	10 (prvi ili drugi pregled) ²
(b) Uzgajališta samo s matičnim ribama	2	0	30 (prvi ili drugi pregled) ²
(c) Uzgajališta bez matičnih riba	2	30	0
Obalne zone i uzgajališta			
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	20 (prvi ili drugi pregled)	10 (prvi ili drugi pregled) ²
(b) Uzgajališta bez matičnih riba	1	30 ³	0

Najveći broj riba po zbirkom uzorku: 10

1 U odobrenim zonama uzorke treba uzimati naizmjenice samo u 50 % uzgajališta godišnje. U odobrenim uzgajalištima smještenim u neodobrenim zonama uzorci se uzimaju svake godine.

2 U izuzetnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tečnost, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

3 Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri sedmice od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

DIO II

Dijagnostički postupci za potvrđivanje VHS-a i IHN-a u slučaju sumnje na pojavu bolesti

Za dijagnosticiranje VHS-a i IHN-a primjenjuje se jedna ili više slijedećih metoda:

- A. Konvencionalna izolacija virusa nakon koje slijedi serološka identifikacija virusa
- B. Izolacija virusa uz istovremenu serološku identifikaciju virusa
- C. Ostale dijagnostičke metode (IFAT, ELISA)

Potvrđivanje prvog slučaja VHS-a i/ili IHN-a u uzgajalištima smještenim u odobrenim zonama ne smije se zasnivati isključivo na metodi C. Treba primijeniti i metodu A ili B.

U nekim će se slučajevima, uz tkivni materijal za virološko pretraživanje morati priložiti i dodatni materijal za bakteriološko, parazitološko, histološko i drugo pretraživanje kako bi se mogla postaviti diferencijalna dijagnoza.

A. Konvencionalna izolacija virusa nakon koje slijedi serološka identifikacija virusa

I.1. Odabir uzoraka

Za pretraživanje treba uzeti najmanje 10 riba koje pokazuju tipične znakove IHN-a ili VHS-a.

I.2. Pripremanje i slanje uzoraka riba

Kako je propisano u dijelu I.1.3. ovog Aneksa

I.3. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Kako je propisano u dijelu I.1.4. ovog Aneksa

II. Pripremanje uzoraka za virološke pretrage

Kako je propisano u dijelu I.1.1. ovog Aneksa

III. Virološke pretrage

Kako je propisano u dijelu I.1.1. ovog Aneksa

IV. Identifikacija virusa

Kako je propisano u dijelu I.1.1. ovog Aneksa

B. Izolacija virusa uz istovremenu serološku identifikaciju virusa

I.1. Odabi uzoraka

Kako je propisano u dijelu II.1.1. ovog Aneksa

I.2. Pripremanje i slanje uzoraka riba

Kako je propisano u dijelu I.1.3. ovog Aneksa

I.3. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Kako je propisano u dijelu I.1.4. ovog Aneksa

II.1. Homogenizacija organa

Kako je propisano u dijelu I.1.2. ovog Aneksa

II.2. Centrifugiranje homogenata

Homogenat se centrifugira na 2000 do 4000 x g 15 minuta u centrifugi ohlađenoj na 2 do 5 °C te se supernatant odlije i tretira antibioticima, npr. gentamicinom 1 mg/ml, četiri sata na 15 °C ili se filtrira kroz membranu (0,45 µm) s niskom apsorpcijom proteina.

II.3. Obrada supernatanta dijagnostičkim antiserumom

Suspenzija organa obrađena antibioticima ili filtrirana kroz membranski filter razrjeđuje se u omjeru 1:10 i 1:1000 u podlozi sa ćelijskom kulturom te se alikvoti pomiješaju i inkubiraju 60 minuta na 15 °C s jednakim dijelovima reagensa navedenih u dijelu I.1.2. ovog Aneksa.

III.1. Ćelijske kulture i podloge

Kako je propisano u dijelu I.1.1. ovog Aneksa;

III.2. Inokulacija ćelijskih kultura

Iz svake smjese virusa i seruma (pripremljene kako je propisano u dijelu II.B.II.3. ovog Aneksa) inokuliraju se najmanje dvije ćelijske kulture po ćelijskoj liniji, svaka s 50 µl.

III.3. Inkubacija ćelijskih kultura

Kako je propisano u dijelu I.III.1. ovog Aneksa;

III.4. Mikroskopiranje

Inokulirane ćelijske kulture svakodnevno se pregledavaju, uz povećanje od 40 do 150 puta, kako bi se provjerilo je li došlo do citopatogenog učinka (CPE). Ako jedan od korištenih antiseruma spriječi nastanak citopatogenog učinka (CPE), može se smatrati da je virus identificiran.

III.5. Supkultiviranje

Ako nakon 7 do 10 dana ne dođe do citopatogenog učinka (CPE), mora se obaviti supkultiviranje s kulturama inokuliranim sa supernatantom i podlogom (dio II.B.II.3. ovog Aneksa) u skladu s dijelom I.III.5. ovog Aneksa;

C. Ostale dijagnostičke metode

Supernatant pripremljen kako je opisano u dijelu I.II.2. ovog Aneksa, može se pregledati metodom IFAT ili ELISA u skladu s dijelom I.IV.3. ovog Aneksa odnosno dijelom I.IV.4. ovog Aneksa. Ove se brze metode trebaju dopuniti i virološkim pretraživanjem u skladu s tačkom A ili B u roku od 48 sati od uzorkovanja ako:

- (a) se dobije negativan rezultat ili
- (b) se dobije pozitivan rezultat s materijalom koji predstavlja prvi slučaj IHN-a ili VHS-a u odobrenoj zoni.

Tkivni se materijal može pregledati drugim dijagnostičkim metodama, kao što su RT-PCR, IF analiza zamrznutih dijelova tkiva ili imunohistohemijska analiza tkivnog materijala fiksiranog u formalinu. Ovi se postupci moraju uvijek dopuniti inokulacijom nefiksiranog tkivnog materijala na ćelijskim kulturama.

DIO III

Dokaz da u zonama ili u uzgajalištima smještenim u neodobrenim zonama ranije nije bilo pojave VHS-a i/ili IHN-a

Smjernice i kriteriji za program službenih veterinarsko-zdravstvenih kontrola

1. Program veterinarsko-zdravstvenih kontrola može se početi provoditi jedino:

- nakon što se provede službeno priznati programa iskorjenjivanja virusa VHS-a i/ili IHN-a, u okviru kojega se uklonila sva riba iz uzgajališta, obavilo čišćenje, dezinfekcija i obustavio uzgoj ribe prije unošenja ribe porijeklom iz odobrenih uzgajališta, ili
- u uzgajalištima u kojima u prošlosti nije zabilježena zaraza virusom VHS-a ili IHN-a.

2. Program veterinarsko-zdravstvenih kontrola mora se zasnivati i na kliničkim pregledima i na laboratorijskim pretragama.

3. Program mora uključivati dva godišnja veterinarsko-zdravstvena pregleda u skladu sa smjernicama koje su navedene u dijelu I ovog Aneksa.
4. Pri najmanje jednom od pregleda koji se obavljaju svake godine, na svakom se uzgajalištu mora uzeti 30 uzoraka ribljih tkiva i/ili ovarijalne tečnosti. Uzroci se biraju, pripremaju i laboratorijski pretražuju u skladu s dijelom I, II i IV ovog Aneksa.
5. Program veterinarsko-zdravstvenih kontrola provodi se najmanje četiri godine na svim uzgajalištima u zoni odnosno na uzgajalištu (smještenom u neodobrenoj zoni) koje će se odobriti.
6. Da bi program bio službeno priznat, ne smije se pojaviti ni otkriti niti jedan slučaj VHS-a ili IHN-a (niti klinička infekcija niti izolacija virusa).

DIO IV

Postupak titracije za provjeru osjetljivosti ćelijskih kultura na infekciju

U daljnjem se tekstu navodi preporučeni postupak titracije o kojem se govori u dijelu I III.3. ovog Aneksa.

Treba koristiti najmanje dva izolata virusa VHS-a i jedan izolat virusa IHN-a. Izolati trebaju predstavljati glavnu grupu virusa unutar BiH npr. za VHS treba odabrati jedan patogeni izolat koji potiče od kalifornijske pastrmke iz slatke vode i jedan morski izolat koji je patogen za romba, a za IHN treba odabrati jedan evropski soj koji je patogen za kalifornijsku pastrmku. Treba koristiti dobro definirane izolate po mogućnosti porijeklom iz Bosne i Hercegovine. Referentni izolati mogu se dobiti od EU/OIE referentne laboratorije za bolesti riba.

Serije virusa s malim brojem pasaža u ćelijskim kulturama razmnožavaju se u staklenkama s ćelijskom kulturom na ćelijama BF-2 ili RTG-2 za virus VHS i na ćelijama EPC ili FHM za virus IHN. Treba koristiti podlogu sa ćelijskom kulturom s najmanje 10 % seruma. Za inokulaciju treba koristiti niski MOI (< 1).

Kod punog citopatogenog učinka (CPE), virus se dobija centrifugiranjem supernatanta ćelijske kulture na $2\,000 \times g$ 15 minuta, sterilizira se filtriranjem kroz membranski filter od $0,45 \mu m$ te raspodijeli u označene epruvete za zamrzavanje. Virus se drži na $-80\text{ }^{\circ}C$.

Sedam dana nakon zamrzavanja, pod mlazom hladne vode odmrznu se po tri epruvete svakog virusa te se titriraju na svojim odgovarajućim ćelijskim linijama. Svaki izolat virusa se odmrzava i titrira najmanje svakih šest mjeseci ili ako se posumnja da se osjetljivost ćelijske linije smanjila.

Titracijski se postupci moraju detaljno opisati i svaki se put mora primijeniti isti postupak.

Titracija sa razrjeđenjem do završne tačke treba uključivati najmanje šest ponavljanja u svakoj fazi razrjeđenja. Titri se upoređuju s prethodno dobijenim titrima. Ako titar bilo kojeg od tri izolata virusa padne za faktor od 2 log ili više, u odnosu na početni titar, ćelijska se linija ne bi trebala više koristiti u svrhe nadzora.

Ako se u laboratoriji drže različite ćelijske linije, svaku bi liniju trebalo ispitivati odvojeno. Evidencija se čuva najmanje 10 godina.

DIO V

Akronimi i skraćenice

BF-2	Mlad ribe <i>Lepomis macrochirus</i> (ćelijska linija)
CPE	Citopatogeni učinak
CRL	EU/OIE referentna laboratorija za bolesti riba
ELISA	Imunoenzimski test (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (ćelijska linija)
FHM	Pimephales promelas (ćelijska linija)
FITC	Fluorescein izotiocijanat
Hepes	N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etan sulfonska kiselina
HRP	Peroksidaza hrena
IF	Imunofluorescencija
IFAT	Metoda indirektne fluorescencije za dokazivanje antitijela
IHN(V)	Zarazna hematopoetska nekroza (virus)
IPN	Zarazna nekroza gušterače (virus)
MEM	Minimalni esencijalni medij
MOI	Višestrukost infekcije (omjer između broja dodanih čestica infektivnog virusa i poznatog broja ćelija u kulturi)
OPD	Orto-fenilendiamin
PBS	Fiziološki rastvor puferiran fosfatnim puferom
RTG-2	Gonade kalifornijske pastrve (ćelijska linija)

RT-PCR	Lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju
Tris-HCl	Tris-(hidroksimetil)-aminometan – HCl
TRITC	Tetrametil-rodamin-izotiocijanat
VHS(V)	Virusna hemoragijska septikemija