

Na temelju članka 15. stavak 2. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini ("Službeni glasnik BiH", broj 34/02) i članka 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Ureda za veterinarstvo Bosne i Hercegovine, na 141. sjednici održanoj 12. siječnja 2011. godine, donijelo je

PRAVILNIK

O UVJETIMA ZDRAVLJA ŽIVOTINJA KOJI SE PRIMJENJUJU NA ŽIVOTINJE AKVAKULTURE I NJIHOVE PROIZVODE TE SPREČAVANJU I SUZBIJANJU ODREĐENIH BOLESTI VODENIH ŽIVOTINJA

DIO PRVI - PREDMET, PODRUČJE PRIMJENE, DEFINICIJE, MJERODAVNA TIJELA

Članak 1.

(Predmet)

Ovim Pravilnikom se utvrđuju:

- zdravstveni uvjeti 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 mjerodavnih tijela, 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.

Članak 2.

(Područje primjene)

- Ovaj Pravilnik se ne primjenjuje na:

- ukrasne vodene životinje koje se uzgajaju u nekomercijalnim akvarijima;
- slobodnoživuće vodene životinje koje su sakupljene ili izlovljene u svrhu njihovog izravnog unošenja u lanac prehrane;
- vodene životinje koje su ulovljene u svrhu proizvodnje ribljeg brašna, hrane za ribe, ribljeg ulja ili sličnih proizvoda.

- Čl. 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 49., 50., 51., 52., i 53. ovoga Pravilnika ne primjenjuju se na ukrasne vodene životinje koje se drže u prodavaonicama kućnih ljubimaca, vrtnim centrima, vrtnim ribnjacima, komercijalnim akvarijima ili kod veletrgovaca, pod uvjetom da:

- ne postoji nikakav izravan dodir s otvorenim vodama;
- postoji sustav obrade otpadnih voda kojim se rizik od prenošenja bolesti u otvorene vode smanjuje na prihvatljivu razinu.

- Ovaj Pravilnik se primjenjuje ne dovodeći u pitanje odredbe o očuvanju vrsta ili unošenju stranih životinjskih vrsta.

- Ured za veterinarstvo Bosne i Hercegovine (u daljnjem tekstu: Ured) uz suglasnost mjerodavnih veterinarskih tijela 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. ovoga Pravilnika.

Članak 3.

(Definicije)

- 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 uvjeti životne sredine/okoliša, pri čemu organizmi ostaju vlasništvo jedne ili više fizičkih ili pravnih osoba u svim

fazama uzgoja ili kultivacije uključujući sakupljanje/izlov;

- životinja akvakulture - svaka vodena životinja u svim fazama razvitka, 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 - svaka fizička ili pravna osoba odgovorna za provođenje odredbi ovoga Pravilnika u poslovanju akvakulture koja je pod njegovom kontrolom;
- vodene 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 sukladno Odluci o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima 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 uvjetima kojima moraju udovoljavati objekti za klanje životinja, obradu, preradu i uskladištenje proizvoda životinjskog podrijetla ("Službeni glasnik BiH", broj 27/05), a u kojem se preraduju životinje akvakulture namijenjene za prehranu ljudi;
- subjekt koji posluje u registriranom objektu za preradu - svaka fizička ili pravna osoba odgovorna za provođenje odredbi ovoga Pravilnika u registriranom objektu za preradu pod njegovom kontrolom;
- uzgajalište - svaki prostor, ograničeno područje ili sustav 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 prehrani 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 sustavu;
- 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 kojemu 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 sustav specifičan za uzgoj vodenih životinja u kojemu 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 plutačama, 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;

- r) klanje - postupak usmrćivanja sukladno odredbama ovoga Pravilnika;
 - s) kultivacija - uzgoj vodenih životinja u uzgajalištu ili području za uzgoj mekušaca;
 - t) odobreni objekt - objekt koji je registriran ili odobren sukladno Odluci o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima 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 uvjetima kojima moraju udovoljavati objekti za klanje životinja, obradu, preradu i uskladištenje proizvoda životinjskog podrijetla ("Službeni glasnik BiH", broj 27/05);
 - u) odjeljak - jedno ili više uzgajališta koja djeluju u okviru zajedničkog sustava biološke sigurnosti i u kojima se nalazi populacija vodenih životinja s posebnim zdravstvenim statusom obzirom na odnosnu bolest;
 - v) zajednički sustav biološke sigurnosti - znači da se u svrhu nadziranja zdravstvenog statusa vodenih životinja, sprečavanja i kontrole bolesti primjenjuju iste mjere;
 - z) područje u kojemu se provode mjere za suzbijanje bolesti - područje oko zaraženog uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca na kojemu se primjenjuju mjere kontrole bolesti kako bi se spriječilo njeno širenje;
 - aa) bolest - klinička ili inaparentna infekcija vodenih životinja povezana s prisutnošću jednog ili više etioloških uzročnika bolesti;
 - bb) zone ili odjelci slobodni od bolesti - zone ili odjelci koji su proglašeni slobodnim od bolesti sukladno članku 49. ili članku 50. ovoga Pravilnika;
 - cc) 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 podrijetlom 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. ovoga Pravilnika kao prijemljiva vrsta;
 - dd) epidemiološka jedinica - skupina 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 gospodarenja koji omogućava brzo širenje uzročnika bolesti iz jedne skupine životinja u drugu;
 - ee) odmor - označava postupak koji se poduzima u svrhu suzbijanja bolesti pri kojem se iz uzgajališta uklanjaju životinje akvakulture prijemljive na bolest koja se suzbija ili za koje je poznato da mogu prenositi uzročnika te bolesti, te ako je izvodivo, i voda u kojoj su životinje živjele;
 - ff) daljnja prerada - prerada životinja akvakulture prije njihove uporabe za prehranu ljudi primjenom bilo koje vrste mjera i tehnika kojima se utječe na anatomske 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. Mjerodavna veterinarska inspeksijska tijela entiteta odlučuju o tome što se smatra povećanim uginućem;
 - hh) infekcija - prisutnost uzročnika bolesti koji je u fazi umnažanja ili razvitka ili u latentnoj fazi, u ili na domaćinu;
 - ii) zaražena zona ili odjeljak - zona ili odjeljak u kojem se pojavila zaraza;
 - jj) karanten- držanje skupine vodenih životinja u izolaciji na način da ne dolaze u izravni ili neizravni 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) prijemljiva 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 uvjeti;
 - ll) vektor - vrsta koja nije prijemljiva na bolest, ali koja može širiti infekciju prenoseći uzročnika s jednog domaćina na drugog;
 - mm) zona - jasno određeno zemljopisno područje s homogenim hidrološkim sustavom koji obuhvata dio slivnog područja od izvora do prirodne ili vještačke prepreke koja sprečava 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 zapreke koja sprečava migracije riba preko te zapreke.
 - oo) obalno područje - je dio obale ili mora ili ušća s preciznim zemljopisnim granicama koje se sastoji od homogenog hidrodinamičkog sustava ili od niza takvih sustava.
 - pp) mjerodavni veterinarski inspektor - je inspektor mjerodavan za određeno administrativno područje.
- (2) Za potrebe ovoga Pravilnika, primjenjuju se i pojmovi navedeni u:
- a) Zakonu o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini;
 - b) Odluci o uvjetima kojima moraju udovoljavati objekti za klanje životinja, obradu, preradu i uskladištenje proizvoda životinjskog podrijetla ("Službeni glasnik BiH", broj 27/05);
 - c) Odluci o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima 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);
 - d) Odluci o načinu obavljanja veterinarsko - zdravstvenog pregleda i kontrole životinja prije klanja i proizvoda životinjskog podrijetla ("Službeni glasnik BiH", broj 82/06).
- Članak 4.
(Mjerodavna tijela)
- (1) Mjerodavna tijela za provođenje ovoga Pravilnika u Bosni i Hercegovini su:
- a) Ministarstvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa Bosne i Hercegovine - Ured;
 - b) Mjerodavna tijela entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine: su mjerodavna tijela definirana 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: mjerodavna veterinarska tijela entiteta);
 - c) Mjerodavna veterinarska inspeksijska tijela entiteta: su mjerodavna tijela definirana Zakonom o inspekcijama FBiH ("Službene novine Federacije BiH", broj 69/05) i Zakonom o inspekcijama Republike Srpske ("Službeni glasnik RS", br. 74/10).
- (2) Mjerodavna tijela iz stavka (1) ovog članka obavljaju svoje aktivnosti i izvršavaju svoje obveze sukladno svojim mjerodavnostima, prema trenutačno važećim propisima.
- (3) Mjerodavna tijela iz stavka (1) ovog članka osiguravaju da se između svih tijela uključenih u provođenje ovoga Pravilnika i svih drugih tijela koja su uključena u sustav akvakulture, vodenih životinja, hrane i hrane za životinje

- podrijetlom iz akvakulture, uspostavi efikasna i stalna suradnja koja se temelji na slobodnoj razmjeni informacija.
- (4) Mjerodavna tijela iz stavka (1) ovog članka moraju imati pristup odgovarajućim uslugama laboratorija i najsavremenijim znanjima i tehnologijama u području analize rizika i epidemiologije te mora biti osigurana slobodna razmjena svih informacija neophodnih za primjenu ovoga Pravilnika.

DIO DRUGI - POSLOVANJE AKVAKULTURE I ODOBRENI OBJEKTI ZA PRERADU

Članak 5.

(Odobranje poslovanja akvakulture i objekta za preradu)

- (1) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta provode postupak registracije tako da svako poslovanje akvakulture bude odobreno sukladno važećim propisima iz oblasti veterinarstva i člankom 6. ovoga Pravilnika.
- (2) Odobranja mogu obuhvatati 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.
- (3) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta moraju registrirati svaki objekt za preradu u kojem se kolju vodene životinje u svrhu kontrole bolesti sukladno članku 33. ovoga Pravilnika, a sukladno važećim propisima iz oblasti veterinarstva i člankom 6. ovoga Pravilnika.
- (4) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta za svako poslovanje akvakulture i odobreni objekt za preradu određuju jedinstveni broj odobrenja (veterinarski kontrolni broj).
- (5) Iznimno od odredbi iz stavka (1) ovog članka, mjerodavna veterinarska tijela entiteta, uz provođenje propisanog veterinarsko-sanitarnog nadzora, dozvoljavaju registraciju:
- sustava specifičnih za uzgoj vodenih životinja, osim poslovanja akvakulture, u kojima se drže vodene životinje koje nisu namijenjene stavljanju na tržište;
 - ribolovnih zona/područja;
 - poslovanja akvakulture koja opskrbljuju krajnjeg potrošača malim količinama proizvoda izravno na mjestu proizvodnje.
- (6) U slučajevima iz stavka (5) ovog članka odredbe ovoga Pravilnika primjenjuju se, nakon potrebitih izmjena, uzimajući u obzir prirodu, značaj i položaj sustava 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 nesukladnosti s odredbama ovoga Pravilnika, mjerodavna tijela iz članka 4. ovoga Pravilnika postupaju sukladno stavku (3) članka 32. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini.

Članak 6.

(Uvjeti za odobranje)

- (1) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta izdaju odobrenja iz članka 5. stavak (1) i (2) ovoga Pravilnika ukoliko subjekt u poslovanju akvakulture ili subjekt koji posluje u odobrenom objektu za preradu, pored uvjeta propisanih u važećim veterinarskim propisima:
- ispunjava odgovarajuće uvjete iz čl. 9., 10. i 11. ovoga Pravilnika;
 - ima uspostavljen sustav koji omogućava da subjekt mjerodavnom veterinarskom tijelu entiteta pokaže da su odgovarajući uvjeti ispunjeni;
 - je pod nadzorom mjerodavnih veterinarskih inspeksijskih tijela 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 temelju kojih mjerodavna veterinarska tijela entiteta mogu ocijeniti da li su ispunjeni uvjeti za odobranje, uključujući podatke iz Aneksa I. ovoga Pravilnika.

Članak 7.

(Upisnik/registar)

Mjerodavna veterinarska tijela entiteta uspostavljaju, ažuriraju i čine dostupnim javnosti Upisnik/registar poslovanja akvakulture i odobrenih objekata za preradu koji sadrži najmanje podatke iz Aneksa I. ovoga Pravilnika.

Članak 8.

(Službene kontrole)

- (1) Sukladno Zakonu o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini, mjerodavna tijela iz članka 4. stavka (1) ovoga Pravilnika obavljaju službene kontrole poslovanja akvakulture i odobrenih objekata za preradu.
- (2) Službene kontrole iz stavka (1) ovog članka moraju se sastojati najmanje od redovitih 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 glede pojave i širenja bolesti. Preporuke za učestalost kontrola, koje ovise o zdravstvenom statusu u predmetnoj zoni ili odjeljku, određene su u Dijelu B. Aneksa II. ovoga Pravilnika.

Članak 9.

(Obveze u odnosu na evidenciju - sljedivost)

- (1) Subjekti u poslovanju s akvakulturom moraju voditi evidenciju o:
- svim premještanjima životinja akvakulture i njihovih proizvoda u posjed ili iz posjeda ili područja za uzgoj mekušaca;
 - uginućima u svakoj epidemiološkoj jedinici prema vrsti i kategoriji vodenih životinja;
 - rezultatima programa nadziranja zdravstvenog statusa koji se temelji na procjeni rizika sukladno članku 11. ovoga Pravilnika.
- (2) Odobreni objekti za preradu moraju voditi evidenciju o svim premještanjima životinja akvakulture i njihovih proizvoda u/iz navedenih objekata.
- (3) U slučaju prijevoza vodenih životinja prijevoznici moraju voditi evidenciju o:
- uginućima tijekom prijevoza, u mjeri u kojoj je to moguće obzirom na vrstu prijevoza i vrste koje se prevoze;
 - uzgajalištima, područjima za uzgoj mekušaca i objektima za preradu u koje je ulazilo prijevozno sredstvo; i
 - svakoj zamjeni vode tijekom prijevoza, naručito o podrijetlu 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 točkom a) stavak (1) ovog članka moraju biti evidentirana na način da se može garantirati utvrđivanje podrijetla i odredišta.
- (5) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta mogu podatke iz stavka (4) ovog članka bilježiti u upisniku i podatke o njima čuvati u elektronskom obliku.

Članak 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.

Članak 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 stavka (1) ovog članka, koji se temelji na procjeni rizika, mora imati za cilj da utvrdi:
 - a) svako povećanje uginuća na svim uzgajalištima i područjima za uzgoj mekušaca, ovisno o vrsti proizvodnje; i
 - b) bolesti koje su navedene u Dijelu II. Aneksa III. ovoga Pravilnika na uzgajalištima i područjima za uzgoj mekušaca u kojima se nalaze vrste prijemljive na te bolesti.
- (3) Preporuke o učestalosti provođenja programa nadziranja zdravlja životinja, ovisno o zdravstvenom statusu predmetne zone ili odjeljka, određene su u Dijelu B. Aneksa II. ovoga Pravilnika. Navedeni program nadziranja provodi se ne dovodeći u pitanje uzorkovanje i nadzor koji se obavlja sukladno čl. 27., 28., 29., 30., 31., 32., 33., 34., 35., 36., 37., 38., 39., 40., 41., 42. i 43. ili stavku (4) članka 49., stavku (8) članka 50. i člankom 52. ovoga Pravilnika.
- (4) Program nadziranja zdravlja životinja iz stavka (1) ovog članka koji se temelji na procjeni rizika, uzima u obzir vodiče koje priprema Ured.

DIO TREĆI - UVJETI ZDRAVLJA ŽIVOTINJA PRILIKOM STAVLJANJA NA TRŽIŠTE ŽIVOTINJA AKVAKULTURE I NJIHOVIH PROIZVODA

Članak 12.

(Područje primjene)

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

Članak 13.

(Opći uvjeti za stavljanje na tržište životinja akvakulture)

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

Članak 14.

(Uvjeti za sprečavanje bolesti koji se odnose na prijevoz)

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

- a) životinja akvakulture koje se prevoze;
- b) vodenih životinja na mjestu mijenjanja vode;
- c) vodenih životinja na mjestu odredišta.

Članak 15.

(Potvrda zdravlja životinja/veterinarsko-zdravstveni certifikat)

- (1) Za stavljanje na tržište životinja akvakulture potrebna je potvrda zdravstvenog stanja ako se životinje unose u zemlju, zonu ili odjeljak koji je proglašen slobodan od bolesti sukladno čl. 49. i 50. ovoga Pravilnika ili u kojima se provode programi nadziranja ili iskorjenjivanja sukladno st. (1) ili (2) članka 44. ovoga Pravilnika za:
 - a) uzgoj i poribljavanje; ili
 - b) daljnju preradu prije uporabe za prehranu 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. ovoga Pravilnika. Odredbe ovog stavka primjenjuju se i na bolesti i prijemljive vrste koje nisu navedene u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika.

Članak 16.

(Opći uvjeti 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 potjecati iz uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca u kojemu postoji povećano neobjašnjeno uginuće životinja,
 - c) odredbe ovog stavka primjenjuju se i na bolesti i prijemljive vrste koje nisu navedene u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika.
- (2) Iznimno od točke b) stavka (1) ovog članka, na temelju procjene rizika dopušteno je stavljanje na tržište, pod uvjetom da odnosne životinje potječu iz dijela uzgajališta ili dijela područja za uzgoj mekušaca koji je neovisan o epidemiološkoj jedinici s povećanim uginućem.
- (3) Životinje akvakulture koje su namijenjene za uništavanje ili klanje sukladno mjerama za suzbijanje bolesti propisanim Dijelom V. ovoga 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 uvjetom da:
 - a) ispunjavaju uvjete iz stavka (1) ovog članka;
 - b) potječu iz uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca čiji je zdravstveni status sukladan Aneksu II. Dijelu A, a najmanje istovjetan zdravstvenom statusu voda u koje se te životinje puštaju.
- (5) Mjerodavna tijela iz stavka (1) članka 4. ovoga Pravilnika u suradnji mogu odlučiti da životinje akvakulture moraju potjecati iz zone ili odjeljaka koji je proglašen slobodnim od bolesti sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika. Mjerodavna tijela iz stavka (1) članka 4. ovoga Pravilnika u suradnji mogu odlučiti da se ovaj stavak primjenjuje i na programe koji se pripremaju i primjenjuju sukladno članku 43. ovoga Pravilnika.

Članak 17.

(Unošenje životinja akvakulture vrsta prijemljivih 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 sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika, životinje akvakulture vrsta prijemljivih na odnosnu bolest moraju potjecati iz druge zemlje, zone ili odjeljka koji je proglašen slobodnim od te bolesti.

- (2) Ako se može znanstveno dokazati da vrste koje su prijemljive na određenu bolest ne prenose tu bolest u određenim stadijima razvoja odredbe stavka (1) ovog članka ne primjenjuje se na određene razvojne stadije.
- (3) Popis vrsta i razvojnih stadija na koje se može primjenjivati stavak (2) ovog članka sastavlja Ured i, prema potrebi, mijenja i dopunjuje u odnosu na najnovija znanstvena i tehnološka saznanja.

Članak 18.

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

- (1) Ako znanstveni podaci ili praktično iskustvo dokazuju da su vrste koje nisu navedene u Aneksu III. Dijelu II. ovoga 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 sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika, da navedeni vektori:
- a) potječu iz druge zemlje, zone ili odjeljaka koji je proglašen slobodnim od odnosne bolesti, ili
 - b) se drže u karantenskom prostoru u vodama slobodnim od odnosnog patogena, kroz odgovarajuće vremensko razdoblje, do kada na temelju raspoloživih znanstvenih podataka ili praktičnog iskustva bude dokazano da je dovoljno za smanjenje rizika od prijenosa određenih bolesti do razine prihvatljive za sprječavanje prijenosa odnosne bolesti.
- (2) Popis vrsta koje su vektori bolesti i razvojnih stadija tih vrsta na koje se primjenjuje ovaj članak i, kada je odgovarajuće, uvjeti u kojima te vrste mogu prenositi bolest, sastavlja Ured, kada je odgovarajuće, mijenja i dopunjuje sukladno najnovijim znanstvenim i tehnološkim saznanjima.

Članak 19.

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

- (1) Životinje akvakulture prijemljivih vrsta koje su prijemljive na jednu ili više neegzotičnih bolesti iz Aneksa III. Dijela II. ovoga 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 sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika ukoliko ispunjavaju jedan od sljedećih uvjeta:
- a) potječu iz zemlje, zone ili odjeljka koji je proglašen slobodnim od odnosne bolesti;
 - b) prerađeni su u ovlaštenom objektu za preradu pod uvjetima koji sprečavaju 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 prijemljivim na jednu ili više neegzotičnih bolesti iz Aneksa III. Dijela II. ovoga Pravilnika, a koje se stavljaju na tržište u svrhu daljnje prerade u zemlji, zoni ili odjeljku koji je proglašen slobodnim od tih bolesti sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika mogu samo privremeno biti skladištene na mjestu prerade ukoliko:
- a) potječu iz zemlje, zone ili odjeljka koji je proglašen slobodnim od odnosne bolesti; ili
 - b) ako se privremeno drže u otpremnim centrima, centrima za pročišćavanje ili sličnim objektima koji su opremljeni sustavom 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 prihvatljivu razinu.

Članak 20.

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

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

Članak 21.

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

- (1) Slobodnoživuće vodene životinje koje pripadaju vrstama prijemljivim na jednu ili više bolesti navedenih u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika, a koje su ulovljene u zemlji, zoni ili odjeljku koji nije proglašen slobodnim od bolesti sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika, prije puštanja u uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca smješteno u zemlji, zoni ili odjeljku koje je proglašeno slobodnim od bolesti sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika moraju biti držane u karanteni pod nadzorom mjerodavnih veterinarskih inspeksijskih tijela entiteta u odgovarajućim prostorima sve dok se opasnost od prijenosa bolesti ne smanji na prihvatljivu razinu.
- (2) Tradicionalnu ekstenzivnu akvakulturu u lagunama bez primjene razdoblja karantene iz stavka (1) ovog članka može se dopustiti pod uvjetom da se izvrši procjena rizika i smatra se da rizik nije veći od onog koji se očekuje zbog primjene članka 1. stavak (1) ovoga Pravilnika.

Članak 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. ovoga Pravilnika.
- (2) Odredbe ovog članka primjenjuju se i u odnosu na bolesti koje nisu navedene na popisu iz Aneksa III. Dijela II. ovoga Pravilnika.

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

Članak 23.

(Opći uvjeti 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.

Članak 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.

Članak 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) uvjete koji su za takvu vrstu robe utvrđeni sukladno ovom Pravilniku, i
 - b) sve posebne uvjete uvoza koji su utvrđeni sukladno članku 26. stavak (2) točka a) ovoga Pravilnika.
- (3) Dokumentacija iz stavka (1) ovog članka sadržava i podatke koji se zahtijevaju drugim propisima koji se odnose na veterinarsko - javno zdravstvo i zdravlje životinja.

Članak 26.

(Detaljni uvjeti)

- (1) Detaljne uvjete za primjenu ovog Dijela donosi Ured.
- (2) Detaljni uvjeti za primjenu ovog Dijela sadržavaju:
 - a) posebne uvjete za uvoz za svaku zemlju, dijelove zemalja ili skupine zemalja;
 - b) kriterije za razvrstavanje drugih zemalja i dijelova drugih zemalja obzirom na bolesti vodenih životinja;
 - c) uporabu 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

Članak 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. ovoga Pravilnika, ili ako je potvrđena prisutnost takve bolesti u vodenim životinjama, takva se sumnja i/ili potvrda mora odmah prijaviti mjerodavnom veterinarskom inspekcijском tijelu entiteta; i
 - b) ako se pojavi povećano uginuće životinja akvakulture, takvo se uginuće mora odmah prijaviti mjerodavnom veterinarskom inspekcijском tijelu entiteta u svrhu daljnjih ispitivanja.
- (2) Obveza prijavljivanja događaja predviđenih stavkom (1) ovog članka vrijedi za:
 - a) vlasnika i sve osobe koje brinu o vodenim životinjama;
 - b) sve osobe koje prate životinje akvakulture tijekom 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) sve druge osobe čija je profesionalna aktivnost povezana s vodenim životinjama prijemljivih vrsta ili njihovim proizvodima.

Članak 28.

(Obavješćavanje OIE, Europske komisije i susjednih zemalja)

Ured, sukladno članku 12. Odluke o zaraznim bolestima ("Službeni glasnik BiH", broj 44/03), mora u roku od 24 sata obavijestiti OIE, Europsku komisiju i susjedne zemalje u slučaju potvrde:

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

Članak 29.

(Početne mjere kontrole bolesti)

U slučaju sumnje na egzotičnu bolest ili sumnje na neegzotičnu bolest s popisa iz Aneksa III. Dijela II. ovoga 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 ovoga Pravilnika, mjerodavna inspekcijска tijela entiteta provode slijedeće:

- a) uzimanje odgovarajućih uzoraka koji se pretražuju u laboratoriju određenom sukladno članku 56. ovoga Pravilnika,

- b) do dobivanja rezultata pretraživanja iz točke a) ovog članka:

- 1) uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca u kojemu 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 kojemu se sumnja na prisutnost bolesti, osim ako to odobri mjerodavna veterinarsko inspekcijска tijelo entiteta,
- 3) mora se pokrenuti epidemiološko ispitivanje iz članka 30. ovoga Pravilnika.

Članak 30.

(Epidemiološko ispitivanje)

- (1) Mora se osigurati provođenje epidemiološkog ispitivanje započetog sukladno članku 29. točka b) alineja 3) ovoga Pravilnika ako ispitivanje iz članka 29. točke a) ovoga Pravilnika pokaže prisutnost:
 - a) egzotične bolesti s popisa navedenog u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika u zemlji;
 - b) neegzotične bolesti s popisa navedenog u Aneksu III. Dijelu II. ovoga 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 ovoga Pravilnika.
- (2) Cilj epidemiološkog ispitivanja iz stavka (1) ovog članka je:
 - a) utvrditi moguće podrijetlo i načine kontaminacije;
 - b) istražiti da li su životinje akvakulture iznesene iz uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca tijekom određenog razdoblja prije prijavljivanja sumnje propisano stavkom (1) člankom 27. ovoga Pravilnika;
 - c) istražiti da li su druga uzgajališta bila zaražena.
- (3) Ako epidemiološko ispitivanje propisano stavkom (1) ovog članka 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 člankom 29. ovoga Pravilnika.
- (4) U slučaju većih slivnih područja ili obalnih zona, mjerodavna veterinarska inspekcijска tijela entiteta mogu ograničiti primjenu članka 29. ovoga 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, mjerodavna tijela susjednih i drugih zemalja moraju biti obaviješteni o slučaju sumnje na bolest.

Članak 31.

(Ukidanje ograničenja)

Mjerodavnosti veterinarski inspekcijска tijela entiteta ukida ograničenja propisana člankom 29. točka b) ovoga Pravilnika kada se pretraživanjem propisanim člankom 29. točka a) ne utvrdi prisutnost bolesti.

Članak 32.

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

Mjerodavna veterinarska inspekcijска tijela 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 mjerodavnog veterinarskog inspekcijсkog tijela entiteta;

- d) provođenje svih dodatnih mjera koje su potrebite da se spriječi daljnje širenje bolesti.

Članak 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 mjerodavnog veterinarskog inspeksijskog tijela entiteta izlovljavati za prehranu 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 prehrane moraju se obavljati u uvjetima koji sprečavaju širenje uzročnika odgovornog za nastanak bolesti.
- (3) Otpremni centri, centri za pročišćavanje ili slične djelatnosti moraju biti opremljeni sustavom za obradu otpadnih voda kojima 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 prihvatljivu razinu.
- (4) Daljnja prerada mora se obavljati u odobrenim objektima za preradu.

Članak 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 mjerodavnog veterinarskog inspeksijskog tijela entiteta sukladno Pravilniku 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 ("Službeni list SFRJ", broj 53/89) što je prije moguće, sukladno planu žurnih mjera koji je propisan člankom 47. ovoga Pravilnika.
- (2) Životinje akvakulture koje nisu postigle komercijalnu veličinu i ne pokazuju kliničke znakove bolesti moraju se, u odgovarajućem vremenskom razdoblju uzimajući u obzir vrstu proizvodnje i rizik koju te životinje predstavljaju za daljnje širenje bolesti, ukloniti i uništiti pod nadzorom mjerodavnog veterinarskog inspeksijskog tijela entiteta sukladno Pravilniku iz stavka (1) ovog članka i planom žurnih mjera propisanim člankom 47. ovoga Pravilnika.

Članak 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 razdoblju 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 prijemljive na odnosnu bolest, odluke o odmoru donose se na temelju procjene rizika.

Članak 36.

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

Mjerodavna tijela iz članka 4. stavak (1) ovoga Pravilnika moraju poduzeti potrebite mjere kako bi se spriječilo širenje bolesti na druge vodene životinje.

Članak 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:

- a) ne provedu mjere iskorjenjivanja bolesti propisane u čl. 32., 33., 34., 35. i 36.;

- b) u području pod ograničenjem ne provedu uzorkovanje i nadzor primjereni za odnosnu bolest i tipove poslovanja akvakulture, s negativnim rezultatima.

Članak 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. ovoga Pravilnika u zemlji, zoni ili odjeljku proglašenim slobodnim od odnosne bolesti, mora se:
 - a) primijeniti mjere propisane u čl. 32., 33., 34., 35., 36. i 37. u svrhu ponovnog stjecanja statusa slobodnog od bolesti; ili
 - b) pripremiti program iskorjenjivanja bolesti sukladno članku 44. stavku (2) ovoga Pravilnika.
- (2) Iznimno od propisanog člankom 34. stavkom (2) ovoga Pravilnika, a u slučaju primjene mjera propisanih u čl. 32., 33., 34., 35., 36. i 37., može se dopustiti da se klinički zdrave životinje uzgajaju do tržišne veličine prije klanja za prehranu 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 članka 39. ovoga Pravilnika.

Članak 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. ovoga Pravilnika u zemlji, zoni ili odjeljku koji nisu proglašeni slobodnim od odnosne bolesti, mjerodavno veterinarsko inspeksijsko tijelo entiteta mora poduzeti mjere za sprečavanje širenja bolesti koje obuhvaćaju najmanje slijedeće:

- a) proglašavanje uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca zaraženim;
- b) 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:
 - 1) unositi u uzgajalište ili područje za uzgoj mekušaca sukladno stavku (2) članku 12. ovoga Pravilnika, ili
 - 2) izloviti i klati radi prehrane ljudi sukladno stavku (1) članku 33. ovoga Pravilnika;
- d) uklanjanje i uništavanje uginulih riba i rakova, pod nadzorom mjerodavnog veterinarskog inspeksijskog tijela entiteta sukladno Pravilniku o načinu neškodljivog uklanjanja životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla i o uslovima koje moraju da ispunjavaju objekti i oprema za sabiranje, neškodljivog uklanjanje i utvrđivanje uzroka uginuća i prevozna sredstva za transport životinjskih leševa i otpadaka životinjskog porijekla ("Službeni list SFRJ", broj 53/89), u odgovarajućem roku uzimajući u obzir vrstu proizvodnje i rizik koji te životinje predstavljaju glede daljnjeg širenja bolesti.

Članak 40.

(Kontrola bolesti navedenih u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika u slobodnoživućih vodenih životinjama)

- (1) Kada su slobodnoživuće vodene životinje zaražene ili se sumnja da su zaražene egzotičnim bolestima navedenim u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika, mjerodavna veterinarska inspeksijska tijela entiteta prate situaciju i poduzimaju mjere kako bi se smanjilo i, koliko god je to moguće, spriječilo daljnje širenje bolesti.
- (2) Kada su slobodnoživuće vodene životinje zaražene ili se sumnja da su zaražene neegzotičnim bolestima navedenim u

Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika u zemlji, zoni ili odjeljku koji su proglašeni slobodnim od odnosne bolesti, mjerodavna veterinarska inspeksijska tijela entiteta prate situaciju i poduzimaju mjere kako bi se smanjilo i, koliko god je to moguće, spriječilo daljnje širenje bolesti.

- (3) Ured obavještava OIE, Europsku komisiju i susjedne zemlje o mjerama koje su poduzete sukladno st. (1) i (2) ovog članka.

Članak 41.

(Mjere suzbijanja novih bolesti)

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

Članak 42.

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

Mjerodavna tijela iz članka 4. stavak (1) ovoga Pravilnika mogu donijeti odluku kojom se u ograničenom razdoblju dopušta provedba ad hoc mjera pod uvjetima koji su primjereni epidemiološkoj situaciji kada se:

- smatra da mjere propisane ovim Dijelom nisu prikladne za epidemiološku situaciju; ili
- bolest se i dalje širi unatoč mjerama poduzetim sukladno ovom Dijelu.

Članak 43.

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

Ako bolest koja se ne nalazi na popisu iz Aneksa III. Dijela II. ovoga 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 sprečavanje unošenja i kontrolu bolesti.

DIO ŠESTI - PROGRAMI KONTROLE BOLESTI I VAKCINACIJA

Članak 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. ovoga Pravilnika, kategorija III, kako je navedeno u Aneksu II. Dijelu A ovoga Pravilnika, Ured uz suglasnost mjerodavnih veterinarskih tijela entiteta izrađuje program nadziranja bolesti u svrhu dobivanja 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. ovoga Pravilnika, kategorija V, kako je navedeno u Aneksu II. Dijelu A ovoga Pravilnika, Ured uz suglasnost mjerodavnih veterinarskih tijela entiteta izrađuje program iskorjenjivanja jedne ili više navedenih bolesti.
- (3) Na područja obuhvaćena programima primjenjuju se uvjeti i mjere propisani odredbama čl. 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 28., 29. i 30. i članka 38. stavak (1) ovoga Pravilnika, a koji se odnose na područja sa statusom slobodnim od bolesti.

Članak 45.

(Sadržaj programa)

Programi moraju sadržati najmanje slijedeće:

- opis epidemiološkog statusa bolesti prije nadnevkava započinjanja provedbe programa;

- analizu procijenjenih troškova i očekivane koristi od programa;
- pretpostavljeno trajanje programa i cilj koji se mora postići do njegovog okončanja; i
- opis i razgraničenje zemljopisnog i upravnog područja u kojemu će se program provoditi.

Članak 46.

(Razdoblje primjene programa)

- (1) Programi se primjenjuju sve dok:
- se ne ispune zahtjevi iz Aneksa IV. ovoga Pravilnika i dok se zemlja, zona ili odjeljak ne proglase slobodnim od bolesti; ili
 - Ured, uz suglasnost mjerodavnih veterinarskih tijela entiteta ne ukine program zbog toga što više ne ispunjava svoju svrhu.
- (2) Ako se program ukine sukladno odredbama stavka (1) točka b) ovog članka, od nadnevkava ukidanja programa moraju se primjenjivati mjere za sprečavanje širenja bolesti koje su propisane člankom 39. ovoga Pravilnika.

Članak 47.

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

- (1) Ured uz suglasnost mjerodavnih veterinarskih tijela entiteta izrađuje plan žurnih mjera u kojem utvrđuje mjere koje su potrebite za održavanje visoke razine svijesti i pripravnosti te za osiguranje zaštite okoliša.
- (2) Planom žurnih mjera mora se osigurati:
- ovlasti i sredstva mjerodavnim veterinarskim tijelima entiteta za pristup svim objektima, opremi, osoblju i ostalim odgovarajućim materijalima koji su potrebiti za brzo i efikasno iskorjenjivanje bolesti;
 - koordinacija, uskladenost i suradnja sa susjednim državama; i
 - kada je to opravdano, precizne podatke o potrebama za vakcinom i uvjetima neophodnim za provođenje žurne vakcinacije.
- (3) Pri izradi plana žurnih mjera Ured mora poštivati kriterije i zahtjeve propisane u Aneksu VI. ovoga Pravilnika.
- (4) Plan žurnih mjera se provodi u slučaju izbijanja novih i egzotičnih bolesti koje su navedene u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika.

Članak 48.

(Vakcinacija)

- (1) Vakcinacija protiv egzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III. Dijela II. ovoga Pravilnika je zabranjena, osim ako se takva vakcinacija odobri sukladno čl. 41., 42. ili 47. ovoga Pravilnika.
- (2) Vakcinacija protiv neegzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III. Dijela II. ovoga Pravilnika je zabranjena u svim dijelovima zemlje koji su proglašeni slobodnim od odnosnih bolesti sukladno čl. 49. ili 50. ovoga Pravilnika ili koji su obuhvaćeni programom nadziranja koji je odobren sukladno stavku (1) članku 44. ovoga Pravilnika.
- (3) Ured može dopustiti vakcinaciju iz stavka (2) ovog članka u dijelovima zemlje koji nisu proglašeni slobodnim od odnosnih bolesti ili u kojima se vakcinacija provodi kao dio programa iskorjenjivanja bolesti koji je odobren sukladno članku 44. stavak (2) ovoga Pravilnika.
- (4) Vakcine koje se koriste moraju biti odobrene sukladno Zakonu o lijekovima koji se uporabljavaju u veterinarstvu ("Službene novine FBiH", broj 15/98 i 70/08) i Zakonom o veterinarskim lijekovima i veterinarsko-medicinskim proizvodima ("Službeni glasnik RS", broj 37/02 i 71/09).
- (5) St. (1) i (2) ovog članka ne primjenjuju se na znanstvena istraživanja koja se provode u svrhu razvitka i ispitivanja vakcine u kontroliranim uvjetima.
- (6) Ured nadzire da se tijekom provođenja istraživanja iz stavka (5) ovog članka 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**Članak 49.**

(Zemlja slobodna od bolesti)

- (1) Ured proglašava teritorij Bosne i Hercegovine slobodnim od jedne ili više neegzotičnih bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III. Dijela II. ovoga Pravilnika ako su ispunjeni uvjeti iz stavka (2) ovog članka i:
 - a) ako na teritoriju nije prisutna niti jedna vrsta koja je prijemljiva na odnosnu bolest;
 - b) ako nema uvjeta za preživljavanje uzročnika u vodenim resursima;
 - c) ispunjava uvjete utvrđene u Aneksu IV. Dijelu I. ovoga 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 teritoriju 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 svezi nadziranja, zona ograničenja, uzorkovanja i dijagnostičkih metoda koje se koriste za proglašavanje statusa zemlje slobodne od bolesti sukladno ovom članku određuje Ured.

Članak 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. ovoga Pravilnika, upućuju zahtjev mjerodavnom veterinarskom tijelu entiteta uz uvjet da:
 - a) u toj zoni, odjeljku ili u njihovim vodenim resursima nije prisutna niti jedna vrsta koja je prijemljiva 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 uvjete propisane u Aneksu IV. Dijelu II. ovoga Pravilnika.
- (2) Subjekt u poslovanju akvakulture započinje proceduru dostavom potrebite dokumentacije iz stavka (1) ovog članka.
- (3) Mjerodavno veterinarsko tijelo entiteta je dužno u roku od mjesec dana od primitka dokumentacije, koja se odnosi na zahtjev iz stavka (1) ovog članka, razmotriti istu.
- (4) Mjerodavno veterinarsko tijelo entiteta razmatranje provodi na temelju dokumentacije navedene u stavku (1) ovog članka, a tamo gdje je potrebno, provodi inspekciju na terenu preko svog mjerodavnog veterinarskog inspeksijskog tijela entiteta u cilju kontrole primjene mjera propisanih ovim Pravilnikom.
- (5) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta nakon razmatranja donose zaključak, koji dostavljaju Uredu.
- (6) Ako mjerodavna veterinarska inspeksijska tijela entiteta utvrde nedostatke zone ili odjeljaka slobodnim od jedne ili više neegzotičnih bolesti koje se nalaze na popisu navedenom u Aneksu III. Dijelu II. ovoga Pravilnika, dužni su narediti mjere za otklanjanje istih i o tome pismeno izvijestiti mjerodavno veterinarsko tijelo entiteta. Mjerodavno veterinarsko tijelo entiteta je dužno provjeriti navode i sukladno nalazu odlučiti o statusu zone ili odjeljka.
- (7) U slučaju potrebe, uvjete iz stavka (1) ovog članka Ured, uz suglasnost mjerodavnih veterinarskih tijela entiteta, može promijeniti ili nadopuniti, u ovisnosti o epizootičnoj situaciji u Bosni i Hercegovini.
- (8) Posebne uvjete u svezi nadziranja, zona ograničenja, uzorkovanja i dijagnostičkih metoda koje se koriste za proglašavanje statusa zone ili odjeljaka slobodnih od bolesti

sukladno ovom članku određuje Ured uz suglasnost mjerodavnih veterinarskih tijela entiteta.

Članak 51.

(Popis zona ili odjeljaka koji su slobodni od bolesti)

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

Članak 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. ovoga Pravilnika sukladno članku 49. ovoga Pravilnika, Ured može prekinuti ciljano nadziranje i proglasiti status zemlje slobodne od bolesti uz uvjet da se bolest klinički ne manifestira i da se postupa sukladno odredbama ovoga Pravilnika.
- (2) Ako su samo određene zone ili odjeljci unutar Bosne i Hercegovine proglašeni slobodnim od bolesti iz stavka (1) ovog članka i u svim slučajevima gdje nema jasnog kliničkog manifestiranja bolesti, ciljano nadziranje mora se nastaviti sukladno članku 49. stavak (4) ovoga Pravilnika ili, ovisno o slučaju, članku 50. stavak (8) ovoga Pravilnika, ali na razini koja odgovara stupnju rizika.

Članak 53.

(Privremeno ukidanje i ponovno dobivanje statusa slobodnog od bolesti)

- (1) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta, u slučaju opravdane sumnje da se bilo koji uvjet za održavanje statusa zone ili odjeljaka slobodnog od bolesti ne ispunjava, obustavlja trgovinu prijemljivim vrstama i vektorskim vrstama u druge zemlje, zone ili odjeljke koje obzirom na odnosnu bolest imaju viši zdravstveni status propisan Aneksom II. Dijelom A ovoga Pravilnika te mora primijeniti odredbe propisane u čl. 29., 30. i 31. ovoga Pravilnika.
- (2) Ako epidemiološko ispitivanje propisano člankom 30. stavak (1) ovoga Pravilnika potvrdi da sumnja navedena u stavku (1) ovog članka nije bila opravdana, mjerodavna veterinarska tijela entiteta područje, zona ili odjeljaka ponovno proglašava slobodnim od bolesti.
- (3) Ako epidemiološko ispitivanje potvrdi da postoji velika vjerojatnost da je došlo do infekcije u zoni ili odjeljku mjerodavno veterinarsko tijelo entiteta ukida status slobodnog od bolesti, sukladno postupku prema kojemu je taj status bio proglašen. Prije nego se navedeni status ponovno uspostavi moraju se ispuniti uvjeti propisani u Aneksu IV. ovoga Pravilnika.

DIO OSMI - LABORATORIJI**Članak 54.**

(Referentni laboratoriji Europske unije)

Referentni laboratoriji Europske unije za bolesti vodenih životinja navedene su u Aneksu V. Dijelu I. ovoga Pravilnika.

Članak 55.

(Referentni laboratorij u Bosni i Hercegovini)

- (1) Referentni laboratorij 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 Europsku komisiju o laboratoriju iz stavka (1) ovog članka, kao i o svim promjenama navedenih podataka.
- (3) Referentni laboratorij za bolesti vodenih životinja u Bosni i Hercegovini mora surađivati s referentnim laboratorijima Europske unije navedenim u članku 54. ovoga Pravilnika.
- (4) Kako bi se, sukladno odredbama ovoga Pravilnika, osiguralo efikasno pružanje dijagnostičkih usluga na cijelom području države, referentni laboratorij u Bosni i Hercegovini surađuje s ovlaštenim dijagnostičkim laboratorijima u državi koji su određeni sukladno članku 56. ovoga Pravilnika.

- (5) Referentni laboratorij mora osigurati da bude primjereno opremljen i da raspolaže s odgovarajućim brojem osposobljenog osoblja za obavljanje laboratorijskih ispitivanja koja se zahtijevaju sukladno ovom Pravilniku te za izvršavanje poslova i zadataka koji su propisani Aneksom V. Dio II. ovoga Pravilnika.

Članak 56.

(Dijagnostičke usluge i metode)

Mora se osigurati da:

- a) se laboratorijska pretraživanja u svrhu ovoga Pravilnika obavljaju u laboratorijima koji su ovlašteni od strane mjerodavnih veterinarskih tijela 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. ovoga Pravilnika provode primjenom propisanih dijagnostičkih metoda;
- c) laboratoriji koji su ovlašteni za pružanje dijagnostičkih usluga sukladno ovom članku, udovoljavaju zahtjevima propisanim Aneksom V. Dijelom III. ovoga Pravilnika.

DIO DEVETI - INSPEKCIJSKI PREGLEDI I SANKCIJE

Članak 57.

(Inspeksijski pregledi i revizije Europske unije)

- (1) Ured pruža stručnjacima Europske komisije svu pomoć koja im je potrebna za provedbu inspeksijskih pregleda i revizija.
- (2) Ako se tijekom inspeksijskog pregleda od strane Europske komisije utvrdi postojanje ozbiljne opasnosti za zdravlje životinja, Ured u suradnji s mjerodavnim veterinarskim

tijelima iz članka 4. st. (2) i (3) mora odmah poduzeti sve potrebne mjere za zaštitu zdravlja životinja.

Članak 58.

(Kaznene odredbe)

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

DIO DESETI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 59.

(Aneksi)

Aneksi I. do VIII. čine sastavni dio ovoga Pravilnika.

Članak 60.

(Stavljanje propisa van snage)

Danom primjene ovoga Pravilnika prestaje važiti Odluka o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima koji moraju biti ispunjeni prilikom stavljanja u promet žive ribe, rakova i mekušaca, te proizvoda dobivenih od njih ("Službeni glasnik BiH", br. 62/05, 43/09 i 94/09).

Članak 61.

(Stupanje na snagu)

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

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

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Dr. Nikola Špirić, v. r.

ANEKS I.

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

DIO I. ODOBRENA POSLOVANJA AKVAKULTURE

(1) Evidencije koje vode mjerodavna veterinarska tijela entiteta sukladno članku 6. ovoga 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 (nadnevci posebnih odobravanja, identifikacijske oznake ili brojevi, posebni uvjeti proizvodnje kao i drugi podaci bitni za odobravanje);
- c) zemljopisni položaj uzgajališta definiran odgovarajućim sustavom koordinata svih mjesta uzgoja (koordinata ZIS-a);
- d) namjenu, vrstu (vrsta uzgoja ili objekata kao što su kopneni objekti, morski kavezi, ribnjaci na kopnu) te najveći opseg proizvodnje, ako je to propisano;
- e) ako se radi o uzgajalištima na kopnu, otpremnim centrima i centrima za pročišćavanje, pojedinosti o načinu opskrbe 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 obvezno navesti za koje je od tih vrsta poznato da su prijemljive na bolesti navedene na popisu iz Aneksa III. Dijela II. ovoga 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. ovoga Pravilnika).

(2) Ako je odobrenje izdano području za uzgoj mekušaca sukladno članku 5. st. (1) i (2) ovoga Pravilnika, podaci koji se zahtijevaju sukladno točki a) stavka (1) ovog Dijela bilježe se za sva poslovanja akvakulture koja djeluju unutar odnosnog područja za uzgoj mekušaca. Podaci koji se zahtijevaju sukladno točkama b) do g) stavka (1) ovog Dijela bilježe se na razini područja za uzgoj mekušaca.

DIO II. ODOBRENI OBJEKTI ZA PRERADU

Evidencije koje vode mjerodavna veterinarska tijela entiteta sukladno članku 6. ovoga 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 (nadnevci posebnih odobrenja, identifikacijske oznake ili brojevi, posebni uvjeti proizvodnje kao i drugi podaci bitni za odobravanje);
- c) zemljopisni položaj objekta za preradu definiran odgovarajućim sustavom koordinata (koordinata ZIS-a);
- d) podaci o sustavu obrade otpadnih voda odobrenog objekta za preradu;
- e) vrste životinja akvakulture koje se preraduju u odobrenom objektu za preradu.

ANEKS II.

DIO I. ZDRAVSTVENI STATUS ZONA ILI ODJELJKA AKVAKULTURE KOJI SE MORA UZETI U OBZIR U PRIMJENI ČLANKA 13. OVOGA 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 (članak 49. ili 50. ovoga Pravilnika)	Jedino kategorije I	DA	NE pri otpremanju u kategoriju III ili DA pri otpremanju u kategoriju I, II ili IV	V; Sve kategorije
II	Program nadziranja (stavak (1) članak 44. ovoga 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 (stavak (2) članak 44. ovoga Pravilnika)	Jedino kategorije I	DA	DA	Jedino kategoriju V
V	Zaražen (članak 39. ovoga Pravilnika)	Svih kategorija	NE	DA	Jedino kategoriju V

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

Pristutne vrste	Zdravstveni status kako je naveden u Dijelu I. ovog Aneksa	Razina rizika	Nadziranje (engl. surveillance)	Preporučena učestalost inspeksijskih pregleda od strane mjerodavnog inspeksijskog tijela entiteta (članak 8. ovoga Pravilnika)	Preporučena učestalost inspeksijskih pregleda od strane mjerodavnog veterinarskog inspeksijskog tijela entiteta (članak 11. ovoga Pravilnika)	Posebni zahtjevi za inspeksijske preglede, uzorkovanje i nadziranje potrebni za održavanje zdravstvenog statusa	Napomene
Nema vrsta koje su prijemljive na bolesti navedene na popisu iz Aneksa III. ovoga Pravilnika	Kategorija I Proглаšen slobodnim od bolesti sukladno točki a) ili b) stavku (1) članka 49. ili točki a) ili b) stavku (1) članka 50. ovoga Pravilnika	Nizak	Pasivni	1 svake 4 godine	1 svake 4 godine	Posebni zahtjevi za održavanje statusa područja slobodnog od bolesti sukladno članku 52. ovoga Pravilnika	Preporučena učestalost inspeksijskih pregleda primjenjuje se ne dovodeći u pitanje posebne zahtjeve koji su navedeni za svaki pojedini zdravstveni status. Kada je moguće, navedene inspeksijske preglede i uzorkovanja kombinirati s inspeksijskim pregledima koji se zahtijevaju sukladno čl. 8. i 11. ovoga Pravilnika
		Visok	Aktivni, cilijani ili pasivni	1 na godinu	1 na godinu	Cilij inspeksijskih pregleda od strane mjerodavnog veterinarskog inspeksijskog tijela entiteta je provjeriti usklađenost u postupanju sukladno članku 8. ovoga Pravilnika. Cilij inspeksijskih pregleda od strane mjerodavnog	
		Srednji		1 svake 2 godine	1 svake 2 godine		
Vrste koje su prijemljive na jednu ili više bolesti navedenih na popisu iz Aneksa III. ovoga Pravilnika	Kategorija I Proглаšen slobodnim od bolesti sukladno točki e) stavku (1) članka 49. ili točki e) stavku (1) članka 50. ovoga Pravilnika	Nizak	Cilijani	1 svake 4 godine	1 svake 2 godine		
		Visok		1 na godinu	1 na godinu	Posebni zahtjevi sukladno stavku (1) članka 44.	

slobodnim od bolesti, ali je obuhvaćen programom nadziranja	Srednji	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine	ovoga Pravilnika	veterinarskog inspekcijaskog tijela entiteta je provjeriti zdravstveni status životinja, savjetovati subjekt u poslovanju akvakulture o pitanjima vezanim uz zdravlje vođenih životinja i, prema potrebi, poduzeti potrebite veterinarske mjere.
Kategorija III Nije poznato da je zaražen, niti je obuhvaćen programom nadziranja za postizanje statusa područja slobodnog od bolesti.	Nizak	1 svake 4 godine	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine		
	Visok	1 na godinu	3 na godinu			
	Srednji	1 na godinu	2 na godinu			
Kategorija IV Poznato da je zaražen, ali je obuhvaćen programom iskorjenjivanja bolesti odobrenim sukladno stavku (2) članka 44. ovoga Pravilnika	Nizak	1 svake 2 godine	1 na godinu		Posebni zahtjevi sukladno stavku (2) članka 44. ovoga Pravilnika	
	Visok	1 na godinu	1 na godinu			
	Srednji	1 svake 2 godine	1 svake 2 godine			
Kategorija V Poznato da je zaražen. Podliježe minimalnim kontrolnim mjerama koje su predviđene poglavljem V. ovoga Pravilnika	Nizak	1 svake 4 godine	1 svake 2 godine			
	Visok	1 svake 4 godine	1 na godinu		Posebni zahtjevi sukladno poglavljem V. ovoga Pravilnika	
	Srednji	1 svake 4 godine	1 svake 2 godine			

DIO III. RAZINA RIZIKA

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

- a) kod kojeg postoji visoka razina 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 uvjetima uzgoja koji bi obzirom na prisutne vrste mogli povećati opasnost od izbijanja bolesti (velika biomasa, niska kvaliteta 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 srednja razina 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 uvjetima uzgoja koji obzirom na prisutne vrste neće nužno povećati opasnost od izbijanja bolesti (srednja biomasa i srednja kvaliteta vode);
- c) koje prodaje žive vodene životinje uglavnom za prehranu ljudi.

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

- a) kod kojeg postoji niska razina 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 uvjetima uzgoja koji obzirom na prisutne vrste neće povećati opasnost od izbijanja bolesti (niska biomasa, dobra kvaliteta vode);
- c) koje prodaje žive vodene životinje jedino za prehranu ljudi.

DIO IV. VRSTE NADZIRANJA ZDRAVSTVENOG STATUSA (eng. surveillance)

(1) Pasivno nadziranje uključuje obvezno žurno prijavljivanje svake pojave ili sumnje na pojavu određene bolesti ili svakog povišenog uginuća. U tim se slučajevima mora provesti istraživanje sukladno Odjeljku 2. Aneksa IV. ovoga Pravilnika.

(2) Aktivno nadziranje uključuje:

- a) rutinske inspekcijske preglede koje obavlja mjerodavno veterinarsko inspekcijsko tijelo 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 tijekom inspekcijskog pregleda;
- d) obvezno žurno prijavljivanje svake pojave ili sumnje na pojavu određene bolesti ili svakog povišenog uginuća.

(3) Ciljano nadziranje uključuje:

- a) rutinske inspekcijske preglede koje obavljaju mjerodavna veterinarska inspekcijska tijela entiteta;
- b) uzimanje propisanih uzoraka životinja akvakulture i njihovo ispitivanje na jedan ili više specifičnih uzročnika pomoću utvrđenih metoda;
- c) obvezno žurno prijavljivanje svake pojave ili sumnje na pojavu određene bolesti ili svakog povišenog uginuća.

ANEKS III.**Popis bolesti****DIO I. UVJETI 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 gospodarske 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 gospodarske učinke uzrokovanjem gubitaka u proizvodnji i godišnjih troškova vezanih uz bolest i njeno suzbijanje koji prelaze 5% vrijednosti proizvodnje prijemljivih 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 razini 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 tijekom 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 uskladena na razini Bosne i Hercegovine.

DIO II. POPIS BOLESTI

EGZOTIČNE BOLESTI		
	BOLEST	PRIJEMLJIVE 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>	Australaska 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 europska kamenica (<i>O. edulis</i>)
RAKOVI	Taurski sindrom rakova	Kozice (<i>Penaeus setiferus</i> , <i>P. stylirostris</i> , <i>P. vannamei</i>)
	Bolest žute glave rakova	Kozice (<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	PRIJEMLJIVE VRSTE
	Virusna hemoragijska septikemija (VHS)	Haringe (<i>Clupea spp.</i>), bjelice (<i>Coregonus sp.</i>), štika (<i>Esox lucius</i>), bakalari (<i>Gadus aeglefinus</i>), pacifički bakalari (<i>G. macrocephalus</i>), atlantski bakalari (<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 lipijan (<i>Thymallus thymallus</i>)

	Zarazna hematopoetska nekroza (IHN)	kalifornijska pastrmka (<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. ishawytscha</i> , <i>Salmo salar</i>)
	Koi herpes virusa (KHV)	obični šaran i koi šaran (<i>Cyprinus carpio</i>)
	Zarazna anemija lososa (ISA)	Kalifornijska pastrmka (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), atlantski losos (<i>Salmo salar</i>), morska pastrmka (<i>S. trutta</i>).
MEKUŠCI	Infekcija s Marteilia refringens	Australaska kamenica (<i>Ostrea angasi</i>), čileanska kamenica (<i>O. chilensis</i>), europska 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 Bonamia ostreae	Australaska kamenica (<i>Ostrea angasi</i>), čileanska kamenica (<i>O. chilensis</i>), tihooceanska kamenica (<i>O. conchaphila</i>), azijska kamenica (<i>O. denselamelloso</i>), europska kamenica (<i>O. edulis</i>), i argentinska kamenica (<i>O. puelchana</i>).
RAKOVI	Bolest bijelih pjega rakova	Svi rakovi iz reda Decapoda

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

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

- a) su se u razdoblju 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 uvjeti za sprečavanje unošenja bolesti u zemlju;
- d) je Bosna i Hercegovina slobodna od bolesti sukladno članku 49. ovoga Pravilnika. Status zemlje slobodne od bolesti može se proglasiti jedino sukladno stavku (4) ovoga Dijela.

(2) Osnovne biosigurnosne mjere iz točke a) stavka (1) ovog Dijela obuhvataju najmanje sljedeće:

- a) bolest, uključujući i sumnju na bolest, obvezno se prijavljuje mjerodavnom veterinarskom inspekcijskom tijelu entiteta;
- b) da se primjenjuje sustav ranog otkrivanja bolesti na cijelom teritoriju Bosne i Hercegovine koji mjerodavnom veterinarskom inspekcijskom tijelu entiteta omogućava učinkovito istraživanje i izvještavanje o bolesti, a koji posebice osigurava:
 - 1) brzo prepoznavanje kliničkih znakova na temelju 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 mjerodavnog veterinarskog inspekcijskog tijela entiteta o događaju s ciljem da se u najkraćem mogućem roku započne dijagnostičko ispitivanje.

(3) Sustav ranog otkrivanja bolesti iz točke b) stavka (2) ovoga Dijela uključuje najmanje sljedeće:

- a) educiranost osoblja uposlenog 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 mjerodavnih tijela iz članka 4. stavak (1) ovoga Pravilnika laboratorijima opremljenima za dijagnostiku i razlikovanje bolesti s popisa i novih bolesti.

(4) Na temelju ciljanog nadziranja ukoliko se zadnji poznati klinički slučaj bolesti dogodio u razdoblju od 10 godina prije proglašavanja statusa zemlje slobodne od bolesti ili ako stanje

infekcije prije ciljanog nadziranja nije bilo poznato, na primjer zbog nepostojanja uvjeta 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 stavku (2) ovoga Dijela; i
- b) provodi ciljano nadziranje sukladno metodama iz članka 49. stavak (4) ovoga Pravilnika najmanje dvije godine, te na uzgajalištu ili područjima za uzgoj mekušaca na kojima se uzgajaju prijemljive 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 prijemljivih 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 sprečava uzvodnu migraciju vodenih životinja iz donjih dijelova slivnog područja;
- c) više slivnih područja, uključujući njihova ušća, koja su međusobno epidemiološki povezana preko ušća.

(2) Zemljopisne 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 uvjeti navedeni u st. (4), (5) i (6) ovoga Dijela. U tom slučaju, subjekti u poslovanju s akvakulturom podnose zahtjev za onaj dio zone koji se nalazi na njihovom teritoriju.

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

(5) Zona u kojoj se zadnji poznati klinički slučaj bolesti dogodio u razdoblju unutar 10 godina prije podnošenja zahtjeva za priznavanje statusa područja slobodnog od bolesti ili u kojoj stanje infekcije prije ciljanog nadziranja nije bilo poznato, npr. zbog nepostojanja uvjeta koji pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, može se smatrati slobodnom od bolesti ako ispunjava uvjete utvrđene u stavku (4) Dijelu 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 zaštititi od pasivnog unošenja bolesti.

(7) Odjeljak može obuhvatati jedno ili više uzgajališta, skupinu uzgajališta ili područje za uzgoj mekušaca, koji se mogu smatrati jednom epidemiološkom jedinicom zbog zemljopisnog položaja i udaljenosti od drugih skupina uzgajališta ili područja za uzgoj mekušaca, pod uvjetom da su sva uzgajališta u dotičnom odjeljku obuhvaćena zajedničkim sustavom biološke sigurnosti. Zemljopisne granice odjeljka moraju biti jasno označene na karti.

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

(9) Odjeljak u kojemu se zadnji poznati klinički slučaj bolesti dogodio u razdoblju 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 uvjeta koji pogoduju kliničkoj manifestaciji bolesti, može se smatrati slobodnim od bolesti ako ispunjava uvjete utvrđene u stavku (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 suglasnost mjerodavnih tijela entiteta, ako se smatraju potrebitim da bi se spriječilo unošenje bolesti. Mjere mogu obuhvatati uspostavu 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 ovisi o zdravstvenom statusu okolnih prirodnih voda obzirom na odnosnu bolest obuhvataju:

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

(12) Odjeljak se opskrbljuje vodom:

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

(13) Moraju postojati prirodne ili vještačke zapreke 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 stavku (4) Dijelu I. ovog Aneksa.

(16) Odjeljak podliježe dodatnim mjerama koje propiše Ured uz suglasnost mjerodavnih tijela entiteta, ako se smatraju potrebitim 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 točki a) stavku (11) i st. (12) do (16) ovog Dijela, ali koje započinje djelatnost koristeći životinje akvakulture koje potječu iz odjeljka koji je proglašen slobodnim od bolesti, može se smatrati slobodnim od bolesti bez obavljenog uzorkovanja koje se zahtijeva za dobivanje odobrenja;
- b) uzgajalište koje nakon određene stanke ponovno započinje svoju djelatnost koristeći životinje akvakulture koje potječu iz odjeljka koji je proglašen slobodnim od bolesti, i koje ispunjava zahtjeve navedene u točki a) stavak (11) i st.(12) do (16) ovog Dijela, može se smatrati slobodnim od bolesti bez obavljenog uzorkovanja koje se zahtijeva za dobivanje odobrenja, pod uvjetom da:
 - 1) su Ured i mjerodavna veterinarska tijela 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 stvamo razdoblje u kojemu je radilo,
 - 2) nije uzgajalište bilo podvrgnuto mjerama zdravlja životinja u odnosu na bolesti navedene na popisu iz Dijela II. Aneksa III. ovoga 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 razdoblju.

ANEKS V.**Dužnosti laboratorija****DIO I. REFERENTNI LABORATORIJI EUROPSKE ZAJEDNICE**

Referentni laboratorij Europske zajednice za bolesti:

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

DIO II. REFERENTNI LABORATORIJI BiH

- (1) Referentni laboratorij ovlašten sukladno članku 55. ovoga Pravilnika odgovoran je za koordinaciju dijagnostičkih standarda i metoda unutar područja njihove odgovornosti u zemlji s referentnim laboratorijem EU.
- (2) Referentni laboratoriji BiH:
 - a) preuzimaju obvezu da bez odgađanja prijave Uredu svaku sumnju na bolest navedenu u Aneksu III. ovoga Pravilnika;
 - b) prema uputama referentnog laboratorija Europske unije, koordiniraju metode koje se u zemlji primjenjuju za dijagnosticiranje bolesti za koje su mjerodavni;
 - c) aktivno sudjeluju 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. ovoga Pravilnika i prvih pojava neegzotičnih bolesti koje su uvrštene na popis u navedenom Aneksu;
 - f) organiziraju redovita međulaboratorijska usporedna ispitivanja dijagnostičkih postupaka na državnoj razini sukladno članku 56. ovoga Pravilnika, u svrhu pružanja informacija o korištenim dijagnostičkim metodama i rezultatima testova provedenih u zemlji;
 - g) surađuju s referentnim laboratorijem Europske unije iz članka 54. ovoga Pravilnika i učestvuju u usporednim provjerama koje organiziraju referentni laboratoriji Europske unije;
 - h) osiguravaju redovni i otvoreni dijalog s mjerodavnim tijelima iz stavka (1) članka 4. ovoga Pravilnika;
 - i) rade, ocjenjuju se i akreditiraju sukladno normi BAS EN ISO/IEC 17025:2006 „Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i kalibracionih 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 točke i) stavka (1) ovoga Dijela može se odnositi na pojedinačne testove ili na skupine testova.

(3) Ured može odrediti referentne laboratorije BiH koje ne udovoljavaju zahtjevima iz točke i) stavak (1) ovoga Dijela ako je u praksi teško raditi sukladno normi BAS EN ISO/IEC 17025:2006, pod uvjetom da laboratorij primjenjuje sustav osiguranja kvalitete koji je sukladan smjernicama u ISO 9001:2000.

(4) Ured može dopustiti referentnom laboratoriju BiH da koristi stručno znanje i kapacitete drugih laboratorija određenih sukladno članku 56. ovoga Pravilnika, za jednu ili više bolesti u njihovoj mjerodavnosti, pod uvjetom da ti laboratoriji ispunjavaju odgovarajuće zahtjeve utvrđene u ovom dijelu. U tom slučaju, referentni laboratorij BiH i dalje ostaje kontaktna točka za referentni laboratorij EU.

DIO III. OVLAŠTENI LABORATORIJI

(1) Ovlaštenje laboratorija za pružanje dijagnostičkih usluga vrše mjerodavna veterinarska tijela entiteta sukladno članku 56. ovoga Pravilnika pod uvjetom da laboratorije ispunjavaju sljedeće:

- a) obvezu da bez odgađanja prijave mjerodavnom veterinarskom tijelu entiteta svaku sumnju na bolest iz Aneksa III. ovoga Pravilnika;
- b) obvezu da učestvuju u međulaboratorijskim usporednim ispitivanjima dijagnostičkih postupaka koje organiziraju referentni laboratoriji BiH;
- c) rade, ocjenjuju se i akreditiraju sukladno normi 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 točke c) stavak (1) ovog Dijela može se odnositi na pojedinačne testove ili na skupine testova.

(3) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta mogu ovlastiti laboratorije koje ne zadovoljavaju zahtjevima iz točke c) stavak (1) ovog Dijela ako je iz praktičnih razloga otežano zadovoljiti zahtjevima norme BAS EN ISO/IEC 17025:2006, pod uvjetom da laboratorij primjenjuje sustav osiguranja kvalitete koji je sukladan smjernicama ISO 9001:2000.

(4) Mjerodavna veterinarska tijela entiteta ukidaju ovlaštenje ako se prestanu ispunjavati uvjeti navedeni u ovom Dijelu.

ANEKS VI.

Kriteriji za planove žurnih mjera

Plan žurnih mjera mora ispunjavati najmanje slijedeće:

- a) zakonske ovlasti potrebite za provođenje plana žurnih mjera te za brzo i efikasno provođenje iskorjenjivanja bolesti;
- b) osiguravanje pristupa sredstvima fondova za vanredne situacije, proračunskim sredstvima i izvorima financiranja kako bi se pokrili svi načini suzbijanja egzotičnih bolesti navedenih u Dijelu II. Aneksa III. ovoga 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. ovoga 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. ovoga Pravilnika ili novih bolesti, bilo moguće odmah uspostaviti lokalni centar za nadzor i suzbijanje bolesti te na lokalnoj razini provesti mjere suzbijanja bolesti i mjere zaštite okoliša;
- f) osigurati suradnju između mjerodavnih tijela iz članka 4. stavak (1) ovoga Pravilnika i mjerodavnih tijela 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 svezi s egzotičnim bolestima navedenim u Dijelu II. Aneksa III. ovoga Pravilnika ili novim bolestima;
- i) moraju biti izrađeni detaljni planovi za žurnu vakcinaciju ukoliko je odgovarajuće;
- j) osoblje mora biti redovito 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 stalnu razinu svijesti odgovornih tijela, uzgajivača i veterinara;
- k) plan žurnih mjera mora predvidjeti sredstva koja su potrebna za kontrolu velikog broja izbijanja bolesti koja se javljaju u kratkom vremenskom razdoblju;
- 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 žurnih 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 sprečavaju svaki štetni utjecaj na okoliš, a posebice kojim su svedeni na najmanju mogućnu mjeru:

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

2) smetnje zbog buke ili mirisa;

3) štetni utjecaji 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 sukladno Pravilniku 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 glede 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 mjerodavnim tijelima odgovornim za kontrolu ISA-e i laboratorijskom osoblju koje izvodi testove u svezi 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, laboratoriji mogu modificirati testove opisane u ovom Aneksu, ili mogu uporabiti druge testove pod uvjetom 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 neizravne fluorescencije protutijela) u odnosu na ISA-u.

Dio VI. sadrži metodologiju za histologiju.

Dio VII. sadrži popis uporabljenih akronima i kratica.

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. Mjerodavni veterinarski inspektori, koji su mjerodavni za određeno administrativno područje (u daljnjem tekstu: mjerodavni 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 inspekcijski 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 ispunjen bilo koji od tri skupa 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 sukladni ISA-u, s kliničkim znakovima bolesti ili bez njih. Postmortem nalazi i klinički znakovi bolesti sukladni onima navedenim u najnovijem izdanju Dijagnostičkog priručnika za bolesti vodenih životinja OIE-a;
- b) izoliranje i identifikacija ISAV-a u staničnoj kulturi iz jednog uzorka bilo koje ribe u ribogojilištu, kako je opisano u Dijelu III.;
- c) utemeljeni dokaz prisutnosti ISAV-a iz dvaju neovisnih laboratorijskih testova, 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 razdoblje 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 točke (a) ili točke (b) ili točke (c):

- a) zapažanje kliničkih znakova i postmortem nalaza koji su sukladni ISA-i, sukladno najnovijem izdanju 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 uporabom jedne ili više slijedećih metoda:
 - (i) izoliranje i identifikacija ISAV-a u staničnoj 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 protutijela 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, uporabom metode opisane u Dijelu III.;

c) izoliranje i identifikacija ISAV-a u najmanje jednom uzorku uzetom od bilo koje ribe u ribogojilištu uporabom metode opisane u Dijelu III., s potkrepljujućim dokazom ISAV-a u preparatima tkiva bilo koje ribe u ribogojilištu, uporabom 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 temelju rizika, Ured uz suglasnost mjerodavnih tijela 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 temelju pojedinačne analize rizika za daljnje širenje bolesti. Sukladno epizootiološkoj situaciji 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 potrebitim, 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 utječu 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 doticaju s predmetnim ribogojilištem; vrste koje su prisutne u ribogojilištu; upravljanje koje se primjenjuje na predmetno i na susjedna ribogojilišta; hidrodinamični uvjeti i drugi faktori od epidemiološkog značaja.

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

I.4.4.1. Ured uz suglasnost mjerodavnih tijela 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 dosegom ili najmanje 5 km, sa središtem u ribogojilištu na kojemu je potvrđena zaraza ISAV-om, ili ekvivalentno područje određeno sukladno odgovarajućim hidrodinamičnim ili epidemiološkim podacima, ili

- u kopnenim područjima:

cjelokupno područje vodenog sliva ribogojilišta na kojemu je potvrđena zaraza ISAV-om; kod velikih površina vodenog sliva Ured uz suglasnost mjerodavnih tijela entiteta i Brčko

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

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

I.4.4.3. Ako je potrebno, Ured uz suglasnost mjerodavnih tijela 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 sukladno 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. Mjerodavni veterinarski inspektor naređuje da se za sva ribogojilišta unutar zaraženog područja uvede odgovarajuće razdoblje mirovanja, nakon što se iz njih isprazni riba i nakon što se po potrebi dezinficiraju. Razdoblje mirovanja na ribogojilištima na kojima je potvrđena zaraza ISA-om ne smije biti kraće od šest mjeseci. Trajanje mirovanja za druga ribogojilišta u zaraženim područjima određuje Ured uz suglasnost mjerodavnih tijela entiteta i Brčko Distrikta BiH, a na prijedlog mjerodavnog veterinarskog inspektora na temelju ocjene rizika za svaki pojedinačni slučaj. Kada se isprazne sva ribogojilišta u zoni kontrole, primjenjuje se najmanje šest tjedana sinkroniziranog mirovanja.

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

I.5.2. Utvrđene zone kontrole se ne mogu opozvati i ponovno nastaniti ribom dok riba svih posjeda u tim zonama nije ispražnjena, po potrebi dezinficirane i podvrgnute mirovanju sukladno točki I.5.1. Kod ponovnog napućivanja ovih zona, zone kontrole se pretvaraju u zone nadzora, kako je utvrđeno točkom I.4.4.3.

I.5.3. Uspostavljene privremene zone kontrole se ne mogu opozvati dok se ne isključi sumnja na ISA-u sukladno Dijelu I.2.2. ovog Aneksa. Ukoliko se ISA potvrdi sukladno Dijelu 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 razvitak bolesti nakon sumnje ili potvrde ISA-e na ribogojilištu, mjerodavni 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, mjerodavni 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 prvotnog 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 prijemljiva na ISA-u ili kao potencijalni nositelj ISA-e, moraju mjerodavnom veterinarskom inspektoru svakih 14 dana slati izvješće o mortalitetu. Izvješća o povećanoj smrtnosti dostavljaju se za svaki dan i za svaki kavez. Mjerodavni veterinarski inspektor istražuje svaki značajan porast mortaliteta na ribogojilištu.

Ukoliko se sumnja potvrdi, sva ribogojilišta u uspostavljenoj zoni kontrole dostavljaju mjerodavnom veterinarskom inspektoru tjedna izvješća o mortalitetu koja sadrže podatke za svaki kavez, svakodnevno.

Ribogojilišta u zonama nadzora dostavljaju mjerodavnom veterinarskom inspektoru izvješća o mortalitetu svakih 14 dana.

Osim toga, u uspostavljenim zonama se provodi redovita inspekcijska kontrola tijekom cijele godine, učestalošću prikazanom u Tabeli 1. ovog Aneksa. Međutim, kada su tijekom određenih dijelova godine ovakvi inspekcijski pregledi onemogućeni radi klimatskih prilika, Ured u suradnji s mjerodavnim tijelima 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 tijekom godine	Minimalan broj inspekcija tijekom 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 sukladno 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 (kavezi, 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 mjerodavni 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 potrebit broj riba u uzorku dobiva nadopunjavanjem uzorcima uzetim od zdravih riba odabranih iz kaveza, 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 obvezno, iako mjerodavni veterinarski inspektor može odlučiti da se takvi uzorci uzmu ukoliko su potrebiti za postavljanje diferencijalne dijagnoze.

II.1.4. Kada se sumnja da su slobodnoživuće ribe zaražene ISA-om, mjerodavni 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 sukladni prisutnošću bolesti. Od svake pojedine ribe uzima se pomoću skalpela uzorak svake vanjske ili unutarnje lezije, a u svakom slučaju uzorci jetre, središnjeg dijela bubrega, srca i slezene, koji se stavljaju u 8 – 10 % (vol/vol) puferiranu solnu otopinu 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 transportne otopine, tj. medij kulture stanica 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 uporabiti i druge kombinacije s dokazanom učinkovitošću. Tkiva od najviše pet riba mogu se sakupiti u jednu epruvetu koja sadrži transportnu otopinu, što čini jedan skupni 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 stanica. Krv i tkivna tekućina 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 zraku i zatim se sprema 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. Uporabom sterilnog instrumenta uzima se komadić prednjeg ili srednjeg dijela bubrega te se prenosi u cijev mikrocentrifuge koja sadrži 1 ml dokazano učinkovite otopine za očuvanje RNA. Tkivo uzeto od najviše pet riba može se sakupiti u jednu epruvetu koja sadrži otopinu za konzerviranje, što čini jedan skupni uzorak. Težina tkiva u jednom uzorku treba iznositi približno 0,5 g. Kada je riba premala da bi se dobio uzorak potrebite 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 tijekom prijevoza u laboratorij. 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 djelomično ili potpuno zamrznuti. U iznimnim okolnostima uzorci za RT-PCR analizu ili za virološki pregled mogu se naglo zamrznuti i transportovati u laboratorij pri temperaturi od -20°C ili nižoj.

II.3.2. Objektne stakalca za IFAT šalju se u spremnicima za objektne stakalca s 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 utjecaje, 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 laboratorij na temperaturu od -20°C .

II.3.5. U laboratorij se mogu dopremiti i cijele ribe ukoliko su tijekom prijevoza ispunjeni temperaturni zahtjevi, kako je opisani u točki 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 mjerodavnog veterinarskog inspektora.

II.3.7. Za RT-PCR analizu tkiva pohranjenih u *RNA later*, ekstrakcija RNA se mora obaviti unutar određenog vremenskog razdoblja ovisno o tome na kojoj su temperaturi uzorci pohranjeni. Ta vremenska razdoblja su sljedeća:

-37°C	jedan dan
-35°C	jedan tjedan

– 4 °C
– 20 °C

jedan mjesec
neograničeno

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

II.4. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Uz suglasnost dijagnostičkog laboratorija, mogu se prikupiti i pripremiti i druga tkiva riba za dodatne preglede.

III. Virološko ispitivanje

III.1. Priprema uzoraka

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

III.1.2. Svaki uzorak (skupno tkivo u transportnoj otopini) mora se potpuno homogenizirati uporabom 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 tekućina filtrira (0,45 µm) i inkubira s jednakim volumenom odgovarajuće razrijeđenih skupnih 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 Europe pojavljuje u 50 % ribljih uzoraka) ima za cilj sprečavanje razvitka CPE-a u inokuliranim staničnim 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 mogućna 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 staničnih kultura

III.2.1. Stanice SHK-1 (pasaža 80 ili manje) ili stanice TO uzgajaju se u mediju L-15 koji sadrži 5 % fetalni goveđi 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 uporabiti i druge stanične linije s dokazanom djelotvornošću i osjetljivošću pri izoliranju ISAV-a, uvažavajući varijabilnost sojeva i sposobnosti različitih sojeva da se umnožavaju u različitim staničnim linijama. Suspenzija tkiva organa obrađena antiserumom inokulira se u mlade stanične 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 preporuča se da se uporabljavaju 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 pripravka 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 dobila otopina s omjerom 1:10 i dobro se promiješa. Ovaj se postupak ponavlja kroz cijelu ploču da bi se dobilo šest deseterostrukih otopina. Standardni ISAV se može pohraniti na - 80 °C najmanje dvije godine, ali kada se jednom odmrzne mora se uporabiti u roku od tri dana.

Napomena: treba paziti da ne dođe 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 ± 2 °C kroz razdoblje do 15 dana.

III.3. Mikroskopiranje

Stanične 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 skupni 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 staničnim 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 stanične 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 stanica crvenih krvnih zrnaca pričvršćenih uz površinu SHK-1 ili TO stanica ukazuje na vjerojatnu 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 tekućine kulture dodaje se u rupice koje sadrže svježe stanice SHK-1 u fazi aktivnog rasta, na ploči s 12 rupica, te se do 18 dana inkubira na temperaturi od 14 ± 2 °C. Stanična 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 skupni 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 tijekom prvih sedam dana inkubacije pojavi citotoksičnost, u toj fazi treba obaviti subkultivaciju i stanice treba inkubirati 14 do 18 dana, nakon čega se ponovno provodi subkultivacija i daljnje inkubiranje tijekom 14 do 18 dana. Ako se citotoksičnost pojavi nakon sedam dana, subkultivacija se obavlja jedanput, a stanice 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 ponovno pripremiti test uporabom 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 tekućina se filtrira pri $0,22\ \mu\text{m}$. Ukoliko se bakterijska kontaminacija pojavi tijekom faze subkultivacije, površinska tekućina se filtrira pri $0,22\ \mu\text{m}$, inokulira u svježe stanice 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, preporuča se izvođenje dodatnih testova za identifikaciju virusa. Ako ti testovi ne omoguće konačnu identifikaciju virusa u roku od sedam dana, površinska tekućina se mora dostaviti EU/OIE referentnom laboratoriju za bolesti riba radi žurne identifikacije.

III.6.1. IF

III.6.1.1. Stanice SHK-1 (pasaža 80 ili manje) ili stanice TO uzgajaju se u mediju L-15 koji sadrži 5 % fetalni goveđi serum, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin i 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptoetanol, na pločama s 24 ili 96 rupica i upotrebljavaju se pri konfluenciji većoj od 50%. Mogu se uporabiti i druge stanične linije i hranjive podloge s dokazanom djelotvornošću. Dvjesto dvadeset pet μl površinske tekućine 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 tijekom 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 tijekom 20 minuta. Ploče se suše na zraku 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 protutijelom 3H6F8 protiv ISAV-a ili nekim drugim monoklonskim protutijelom koje ima dokazanu djelotvornost i specifičnost, razrjeđuju u PBS-u i inkubiraju 30 minuta pri temperaturi od $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$. Monoklonsko protutijelo se odstranjuje, a ploče se ispiru tri puta 0.05 % otopinom 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: Svaki laboratorij optimizira razrjeđevine različitih serija monoklonskog protutijela i konjugata FITC-a. Protutijelo se odstranjuje, a ploče se tri puta ispiru 0.05 % otopinom Tween 20 u PBS-u.

III.6.1.4. Rupice treba odmah pregledati uporabom invertiranog mikroskopa podešenog za fluorescentnu mikroskopiju s prikladnim filterom za ekscitaciju FITC-a. Test se smatra pozitivnim ukoliko se opaze fluorescentne stanice. 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 tekućina te se svakom uzorku i kontrolnoj epruveti koja sadrži prikladan kontrolni materijal (400 µl dH₂O ili homogenat bubrega riba koje nemaju specifični 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. Svakoj epruveti se doda 160 µl kloroforma 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 tekućina 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 tekućina 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 ponovno 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 uporabiti 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 uporabom 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 uporabom DNA sonde ili sekvencioniranjem nukleotida.

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

Ako se u SHK-1 stanicama tijekom virološkog pregleda uzoraka tkiva pojavi potpuni CPE, iz rupice treba odstraniti 400 μ l površinske tekućine 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 uporabljavaju kulture bez potpunog CPE, uklanja se površinska tekućina, stanice 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 otopine.

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 uspoređuje 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 bojanje otisaka

V.2.1. Objektna stakalca se tri minute fiksiraju u acetonu ili metanolu/acetonu (1:1) i zatim osuše na zraku. Prije bojanja 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 otopinu 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 otopinom monoklonskog protutijela 3H6F8 protiv ISAV-a (ili nekog drugog protutijela dokazane specifičnosti i djelotvornosti), nakon čega se kutija s objektnim stakalcima zatvori i 60 minuta inkubiraju na sobnoj temperaturi uz protresanje. Protutijelo 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 otopinom koja sadrži FITC kozji 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 otopinom CITIFLUOR™ (500 µl CITIFLUOR™ pomiješano s 1,5 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 u PBS-u) ili drugim prikladnim zaštitnim medijem tijekom 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 uporabom fluorescentne mikroskopije

Svako se stakalce pregleda mikroskopom prikladnim za epi-fluorescentno osvjetljenje, uporabom 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 stanicama. 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 stanična kultura SHK-1 ili druga prijemljiva stanična kultura (negativna kontrola),
- stanična kultura SHK-1 ili druga prijemljiva stanična kultura zaražena ISAV-om (pozitivna kontrola).

V.4.2. Kao dodatna pozitivna kontrola, preporuča 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 uporabom dupliciranih otisaka.

V.5. Pregled drugih tkiva

Ova se tehnika može primijeniti na druga tkiva ribe, kao što su jetra, slezena i srce, pod uvjetom da se na stakalce može prenijeti dovoljna količina endotelnih stanica, 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 stanica prisutni u otisku identificirati faznim osvjtljenjem.

VI. HISTOLOGIJA

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

VII. Akronimi i kratice

cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CPE	citopatski efekt
DEPC	dietilpirokarbonat
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
FITC	fluorescein izotiocianat
IF	imunofluorescencija
IFAT	neizravna imunofluorescencija
OIE	međunarodni ureda za epizootije
IPN(V)	infektivna nekroza pankreasa (virus)
ISA(V)	infektivna anemija lososa (virus)
PBS	solna otopina s fosfatnim puferom
RNA	ribonukleinska kiselina
RT-(PCR)	reverzna transkriptaza (lančana reakcija polimeraze)

SHK-1	stanice 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 svezi 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. ovoga 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 sukladno članku 50. ovoga Pravilnika;

(d) namijenjen je tijelima koja su mjerodavna za nadzor VHS-a i IHN-a te laboratorijskom osoblju koje obavlja ispitivanja vezana uz te bolesti. Sukladno tom, naglasak je stavljen na postupke uzorkovanja, načela te primjenu laboratorijskih testova i ocjenjivanje njihovih rezultata kao i na detaljne laboratorijske tehnike. Prema potrebi, laboratoriji mogu unijeti izmjene u testove opisane u ovom Aneksu ili koristiti drugačije testove, pod uvjetom 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 staničnih kultura na infekciju.

Akronimi i kratice navedeni su u dijelu V.

DIO I.

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za nadzor VHS-a i IHN-a radi dobivanja 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 dobivanja 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 tekućine 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 sukladno Aneksu II., dijelu II. ovoga Pravilnika. Precizniji podaci navedeni su u dijelovima I.1.2. do I.1.4. Tabele 1A i 1B ovog Aneksa ne primjenjuju se na nova uzgajališta i uzgajališta koja ponovno započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili odobrenog uzgajališta smještenog u neodobrenoj zoni, pod uvjetom da udovoljavaju zahtjevima koji su utvrđeni Aneksom II., dijelom I. ovoga Pravilnika.

Kliničke preglede treba obaviti u razdoblju od listopada do lipnja 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 kavezi itd.) moraju pregledati kako bi se utvrdila prisutnost mrtvih ili slabih riba ili riba s neuobičajenim ponašanjem. Posebnu pažnju treba obratiti na područje otjecanja 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. ovoga 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 razmjerno zastupljeni svi dijelovi uzgajališta kao i sve dobne skupine.

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

1. Zona ili uzgajalište u neodobrenoj zoni, koje je pod nadzorom mjerodavnog 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 neodobrenoj zoni, koji će biti odobreni, moraju tijekom dvije godine biti podvrgnuti zdravstvenom pregledu dva puta godišnje. U tom dvogodišnjem kontrolnom razdoblju prije dobivanja 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 sukladno tabeli 1.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 tijekom najmanje četiri prethodne godine, sva uzgajališta u zoni ili svako uzgajalište u neodobrenoj zoni koji će se odobriti moraju tijekom dvije godine biti podvrgnuti zdravstvenom pregledu dva puta godišnje. U tom dvogodišnjem kontrolnom razdoblju prije dobivanja 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 sukladno tabeli 1.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 ponovno započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili iz odobrenog uzgajališta smještenog u neodobrenoj zoni.

Nova uzgajališta i uzgajališta koja ponovno započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili iz odobrenog uzgajališta smještenog u neodobrenoj zoni mogu steći status sukladno uvjetima utvrđenim člankom 50. i Aneksom II., dio I ovoga Pravilnika. Sukladno tome, 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 neodobrenoj zoni zadržali odobreni status obzirom na VHS i/ili IHN, kontrole i uzimanje uzoraka za ispitivanje moraju se obavljati sukladno tabeli 1C 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 laboratorij, 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. staničnu kulturu s 10 % telećeg seruma i antibioticima. Može se preporučiti kombinacija od 200 iu penicilina, 200 µg streptomicina 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 tekućina (tabele 1A do C ovog Aneksa).

Ovarijalna tekućina 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 zbimi 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 tijekom prijevoza do laboratorija. Treba spriječiti zamrzavanje. Temperatura uzorka tijekom 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 djelomično ili u cjelosti zamrznuti.

Virološke pretrage moraju započeti što je moguće prije, a najkasnije 48 sati nakon uzimanja uzoraka. U iznimnim 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 uvjetom da je materijal koji će se ispitivati zaštićen transportnom podlogom i da se mogu ispuniti zahtjevi glede temperature tijekom prijevoza (dio I.I.3. stav 3. ovog Aneksa)

U laboratoriju se mogu poslati cijele ribe pod uvjetom da se mogu ispuniti zahtjevi glede temperature tijekom 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 sukladno odgovarajućim propisima koji su na snazi u BiH kao i važećim međunarodnim propisima o prijevozu.

4. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

U dogovoru s uključenim dijagnostičkim laboratorijem mogu se uzeti i pripremiti za dopunska ispitivanja i druga tkiva riba.

II. Pripremanje uzoraka za virološke pretrage

1. Zamrzavanje u iznimnim slučajevima

Ako je zbog praktičnih poteškoća (npr. loši vremenski uvjeti, neradni dani, laboratorijski problemi itd.) nemoguće nasaditi stanice u roku od 48 sati nakon uzimanja uzoraka tkiva, uzorci tkiva se mogu zamrznuti u podlozi od stanične 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 staničnih linija itd.)

2. Homogenizacija organa

U laboratoriju 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 škarama ili skalpelom nakon što se ukloni stražnji dio tijela iza crijevnog otvora. Ako uzorak čine cijele

ribe duljine tijela od 4 do 6 cm, uzima se utroba uključujući bubrege. Ako uzorak čine cijele ribe dulje 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 laboratoriju 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 ponovno uporabiti za virološke pretrage.

Ako je zbog praktičnih poteškoća (npr. kvar inkubatora, problemi sa staničnim kulturama itd.) nemoguće nasaditi stanice 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 stanica, supernatant se pomiješa s jednakim dijelovima odgovarajuće razrijeđenih skupina 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 Europe javlja u 50 % uzoraka ribe) je spriječiti da u inokuliranim staničnim 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 potječu iz proizvodnih jedinica koje se smatraju slobodnim od IPN-a, može se izostaviti tretiranje inokuluma antiserumom za virus IPN.

III. Virološke pretrage

1. Stanične kulture i podloge

Stanice 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), obogaćenoj s 10 % fetalnog govedeg seruma i antibioticima u standardnim koncentracijama.

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

Stanične 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 staničnih kultura

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

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

3. Inkubacija staničnih kultura

Inokulirane stanične kulture inkubiraju se 10 dana na 15 °C. Ako se boja podloge za staničnu kulturu promijeni s crvene u žutu, što ukazuje na zakiseljenje podloge, mora se prilagoditi pH pomoću sterilne otopine bikarbonata ili istovrijednim tvarima kako bi se osigurala osjetljivost stanica na virusnu infekciju.

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

4. Mikroskopiranje

Inokulirane stanične kulture moraju se redovito pregledavati (najmanje tri puta tjedno), 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 sukladno dijelu 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 staničnim kulturama, pri čemu se koristi stanična površina slična površini primarne kulture.

Alikvoti hranjive podloge (supernatant) svih kultura/jažica, koje čine primarnu kulturu, spoje se prema staničnoj liniji 7 do 10 dana nakon inokulacije. Tako dobiveni zbrini uzorci inokuliraju se u homologne stanične 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 izravno u jažicu sa svježom staničnom 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 tijekom prva tri dana inkubacije javi toksični CPE, u toj fazi može se obaviti supkultivacija, ali se stanice potom moraju inkubirati sedam dana i ponovno supkultivirati uz dodatnih sedam dana inkubacije. Ako se toksični CPE javi nakon tri dana, stanice 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 unatoč 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 staničnoj 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 jednog tjedna, supernatant se mora poslati u EU/OIE referentni laboratorij za bolesti riba kako bi se virus odmah identificirao.

2. Neutralizacija

Iz izdvojenog supernatanta uklonite stanice 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 staničnu kulturu.

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

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

Najmanje dvije stanične kulture inokuliraju se svaka s 50 µl mješavine supernatanta i seruma te se inkubiraju na 15 °C. Razvitak 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 stanicama treba nasaditi uz gustoću tako da dođe do približno 60 do 90 %-tne konfluencije 24 sata nakon nasadivanja. U tu se svrhu preporučaju stanice EPC jer one snažno prijanjaju za staklenu površinu, ali se mogu koristiti i druge stanične linije kao što su BF-2, RTG-2 ili FHM.

Nakon što se stanice 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 protutijela referentne kvalitete. 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. Preporučaju se fluorokromi kao što su FITC i TRITC.

Na obojene kulture nanosite fiziološku otopinu 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 stanične kulture, fiksiranje i protutijela referentne kvalitete) dokazane učinkovitosti.

4. ELISA

Jažice na mikrotitarskoj pločici oblože se preko noći preporučenim razrjeđenjima pročišćenih frakcija imunoglobulina protutijela referentne kvalitete.

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 protutijelom 60 minuta na 37 °C. Nakon ispiranja puferom PBS-Tween-20, dodaju se biotinom obilježena protutijela čija specifičnost odgovara specifičnosti adsorbiranih protutijela 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 uporabom 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 učinkovitosti.

TABELA 1A

Program pregleda i uzorkovanja za zone i za uzgajališta u neodobrenim zonama za dvogodišnje kontrolno razdoblje prije dobivanja odobrenog statusa obzirom na VHS i/ili IHN

(sukladno Aneksu II., dio II. ovoga 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 tekućina)
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 uvjeti navedeni u dijelu II.1., I.1.2.1.b. i III. ovog Aneksa.

² Klinički pregledi.

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

TABELA 1B

**Program pregleda i uzorkovanja za dvogodišnje kontrolno razdoblje prije dobivanja
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**

(sukladno Aneksu II., dio II. ovoga 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 tekućina)
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 iznimnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tekućinu, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

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

4. Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri tjedna 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

(sukladno Aneksu II., dio II. ovoga 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 tekućina)
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 zbirnom 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 iznimnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tekućinu, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

3 Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri tjedna 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 istodobnu 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 temeljiti 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.I.3. ovog Aneksa

I.3. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Kako je propisano u dijelu I.I.4. ovog Aneksa

II. Pripremanje uzoraka za virološke pretrage

Kako je propisano u dijelu I.II. ovog Aneksa

III. Virološke pretrage

Kako je propisano u dijelu I.III. ovog Aneksa

IV. Identifikacija virusa

Kako je propisano u dijelu I.IV. ovog Aneksa

B. Izolacija virusa uz istodobnu serološku identifikaciju virusa

I.1. Odabi uzoraka

Kako je propisano u dijelu II.A.I.1. ovog Aneksa

I.2. Pripremanje i slanje uzoraka riba

Kako je propisano u dijelu I.I.3. ovog Aneksa

I.3. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Kako je propisano u dijelu I.I.4. ovog Aneksa

II.1. Homogenizacija organa

Kako je propisano u dijelu I.II.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 staničnom kulturom te se alikvoti pomiješaju i inkubiraju 60 minuta na 15 °C s jednakim dijelovima reagensa navedenih u dijelu I.IV.2. ovog Aneksa.

III.1. Stanične kulture i podloge

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

III.2. Inokulacija staničnih kultura

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

III.3. Inkubacija staničnih kultura

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

III.4. Mikroskopiranje

Inokulirane stanične 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 dode do citopatogenog učinka (CPE), mora se obaviti supkultiviranje s kulturama inokuliranim sa supernatantom i podlogom (dio II.B.II.3. ovog Aneksa) sukladno dijelu 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 sukladno dijelu I.IV.3. ovog Aneksa odnosno dijelu I.IV.4. ovog Aneksa. Ove se brze metode trebaju dopuniti i virološkim pretraživanjem sukladno točki 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 imunohistokemijska analiza tkivnog materijala fiksiranog u formalinu. Ovi se postupci moraju uvijek dopuniti inokulacijom nefiksiranog tkivnog materijala na staničnim 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 podrijetlom 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 temeljiti i na kliničkim pregledima i na laboratorijskim pretragama.

3. Program mora uključivati dva godišnja veterinarsko-zdravstvena pregleda sukladno 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 tekućine. Uzroci se biraju, pripremaju i laboratorijski pretražuju sukladno dijelu 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 staničnih kultura na infekciju

U daljnjem se tekstu navodi preporučeni postupak titracije o kojemu 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 skupinu virusa unutar BiH npr. za VHS treba odabrati jedan patogeni izolat koji potječe od kalifornijske pastrmke iz slatke vode i jedan morski izolat koji je patogen za romba, a za IHN treba odabrati jedan europski soj koji je patogen za kalifornijsku pastrmku. Treba koristiti dobro definirane izolate po mogućnosti podrijetlom iz Bosne i Hercegovine. Referentni izolati mogu se dobiti od EU/OIE referentnog laboratorija za bolesti riba.

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

Kod punog citopatogenog učinka (CPE), virus se dobiva centrifugiranjem supernatanta stanične 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 staničnim linijama. Svaki izolat virusa se odmrzava i titrira najmanje svakih šest mjeseci ili ako se posumnja da se osjetljivost stanične linije smanjila.

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

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

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

DIO V.**Akronimi i kratice**

BF-2	Mlad ribe <i>Lepomis macrochirus</i> (stanična linija)
CPE	Citopatogeni učinak
CRL	EU/OIE referentni laboratorij za bolesti riba
ELISA	Imunoenzimski test (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (stanična linija)
FHM	Pimephales promelas (stanična linija)
FITC	Fluorescein izotiocijanat
Hepes	N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etan sulfonska kiselina
HRP	Peroksidaza hrena
IF	Imunofluorescencija
IFAT	Metoda neizravne fluorescencije za dokazivanje protutijela
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 stanica u kulturi)
OPD	Orto-fenilendiamin
PBS	Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom
RTG-2	Gonade kalifornijske pastrve (stanična linija)
RT-PCR	Lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju
Tris-HCl	Tris-(hidroksimetil)-aminometan – HCl

TRITC	Tetrametil-rodamin-izotiocijanat
VHS(V)	Virusna hemoragijska septikemija

На основу члана 15. став 2. Закона о ветеринарству у Босни и Херцеговини ("Службени гласник БиХ", број 34/02) и члана 17. Закона о Савјету министара Босне и Херцеговине ("Службени гласник БиХ", бр. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 и 24/08), Савјет министара Босне и Херцеговине, на приједлог Канцеларије за ветеринарство Босне и Херцеговине, на 141. сједници одржаној 12. јануара 2011. године, донио је

ПРАВИЛНИК

О УСЛОВИМА ЗДРАВЉА ЖИВОТИЊА КОЈИ СЕ ПРИМЈЕЊУЈУ НА ЖИВОТИЊЕ АКВАКУЛТУРЕ И ЊИХОВЕ ПРОИЗВОДЕ ТЕ СПРЕЧАВАЊУ И СУЗБИЈАЊУ ОДРЕЂЕНИХ БОЛЕСТИ ВОДЕНИХ ЖИВОТИЊА

ДИО ПРВИ - ПРЕДМЕТ, ПОДРУЧЈЕ ПРИМЈЕНЕ, ДЕФИНИЦИЈЕ, НАДЛЕЖНИ ОРГАНИ

Члан 1.

(Предмет)

Овим Правилником се утврђују:

- а) здравствени услови за стављање на тржиште, увоз и провоз животиња из области аквакултуре и њихових производа;
- б) минималне превентивне мјере за сузбијање и контролу заразних болести код животиња аквакултуре, усмјерене на подизање свијести и спремности надлежних органа, субјеката у пословању са аквакултуром и других субјеката везаних за ову индустрију;
- ц) минималне мјере контроле које се примјењују у случају сумње или појаве одређених болести код водених животиња.

Члан 2.

(Подручје примјене)

- (1) Овај Правилник се не примјењује на:
 - а) украсне водене животиње које се узгајају у некомерцијалним акваријумима;
 - б) слободноживуће водене животиње које су сакупљене или изловљене у сврху њиховог директног уношења у ланац исхране;
 - ц) водене животиње које су уловљене у сврху производње рибљег брашна, хране за рибе, рибљег уља или сличних производа.
- (2) Чл. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 49, 50, 51, 52, и 53. овог Правилника не примјењују се на украсне водене животиње које се држе у продавницама кућних љубимаца, вртним центрима, вртним рибањацима, комерцијалним акваријумима или код велетрговаца, под условом да:
 - а) не постоји никакав директан додир са отвореним водама;
 - б) постоји систем обраде отпадних вода којима се ризик од преношења болести у отворене воде смањује на прихватљив ниво.
- (3) Овај Правилник се примјењује не доводећи у питање одредбе о очувању врста или уношењу страних животињских врста.
- (4) Канцеларија за ветеринарство Босне и Херцеговине (у даљњем тексту: Канцеларија) уз сагласност надлежних ветеринарских органа ентитета може да донесе строжије мјере у подручју на које се односи чл. 14, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, и 43. овог Правилника.

Члан 3.

(Дефиниције)

- (1) Дефиниције које се користе у овом Правилнику имају следеће значење:
 - а) аквакултура - узгој или култивација водених организама кориштењем техника чији је циљ повећање производње тих организама изнад могућности које пружају природни услови животне средине/околине, при чему организми

остају власништво једне или више физичких или правних лица у свим фазама узгоја или култивације укључујући сакупљање/излов;

- б) животиња аквакултуре - свака водена животиња у свим фазама развоја, укључујући икру и млијеч/гамете, која се узгаја у узгајалишту или у подручју узгоја мекушаца, укључујући све водене животиње из природе које су намијењене уношењу у узгајалиште или подручје узгоја мекушаца;
- ц) пословање аквакултуре - свака дјелатност, без обзира да ли се остварује добит или не, јавна или приватна, којом се обавља било која активност везана уз узгој, држање или култивацију животиња аквакултуре;
- д) субјекат у пословању аквакултуре - свако физичко или правно лице одговорно за спровођење одредби овог Правилника у пословању аквакултуре која је под његовом контролом;
- е) водене животиње су:
 - 1) рибе из надразреда *Agnatha* и разреда *Chondrichthyes* и *Osteichthyes*,
 - 2) мекушци који припадају кољену *Mollusca*,
 - 3) ракови који припадају поткољену *Crustacea*,
- ф) регистровани објекат за прераду - сваки објекат у пословању са храном регистрован у складу са Одлуком о ветеринарско-здравственим условима које морају да испуњавају објекти за узгој, производњу и стављање у промет риба и производа од риба, те ракова и производа од ракова ("Службени гласник БиХ", број 5/04) и Одлуком о условима којима морају да удовољавају објекти за клање животиња, обраду, прераду и ускладиштење производа животињског поријекла ("Службени гласник БиХ, број 27/05), а у којем се прерађују животиње аквакултуре намијењене за исхрану људи;
- г) субјекат који послује у регистрованом објекту за прераду - свако физичко или правно лице одговорно за спровођење одредби овог Правилника у регистрованом објекту за прераду под његовом контролом;
- х) узгајалиште - сваки простор, ограничено подручје или систем специфичан за узгој водених животиња којим управља пословање аквакултуре и у којем се узгајају водене животиње с циљем њиховог стављања на тржиште, осим оних у којима се сакупљене или изловљене слободноживуће водене животиње, које су намијењене исхрани људи, привремено држе прије клања без храњења;
- и) узгој - узгој водених животиња у узгајалишту или подручју за узгој мекушаца;
- ј) подручје за узгој мекушаца - производно подручје или подручје за поновно полагање на којем се сви послови у производњи аквакултуре спроводе у истом биосигурносном систему;
- к) украсна водена животиња - водена животиња која се држи, узгаја или ставља на тржиште само у украсне сврхе;
- л) стављање на тржиште - продаја, укључујући и понуду на продају или било који други облик преноса, без обзира на накнаду, као и сваки облик премјештања водених животиња;
- м) производно подручје - било које слатководно, морско, естуаријско или подручје лагуне у којем се налазе природна станишта мекушаца или подручја која се користе за узгој и култивацију мекушаца и из којих се мекушци сакупљају/изловљавају;
- н) риболовна зона/подручје - рибањак или други систем специфичан за узгој водених животиња у којем се популација одржава само за рекреативни риболов путем надомјештања животиња из аквакултуре;
- о) подручје за поновно полагање - слатководно, морско, подручје ушћа или лагуне чије су границе јасно означене плутамама, ступовима или другим учвршћеним ознакама, а које се употребљава искључиво за природно прочишћавање живих мекушаца;