



# MONITORUL OFICIAL

## AL

### ROMÂNIEI

Anul 174 (XVIII) — Nr. 327

PARTEA I  
LEGI, DECRETE, HOTĂRÂRI ȘI ALTE ACTE

Marti, 11 aprilie 2006

#### SUMAR

<u>Nr.</u>	<u>Pagina</u>	<u>Nr.</u>	<u>Pagina</u>		
<b>LEGI ȘI DECRETE</b>		<b>ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE</b>			
84.	— Lege pentru aprobarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 152/2005 privind prevenirea și controlul integrat al poluării .....	2-3	75.	— Ordin al președintelui Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor privind aprobarea Normei sanitare veterinare ce stabilește criteriile pentru zonare și supraveghere oficială ca urmare a suspiciunii sau confirmării anemiei infecțioase a somonului .....	7-15
379.	— Decret privind promulgarea Legii pentru aprobarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 152/2005 privind prevenirea și controlul integrat al poluării .....	4	232.	— Ordin al ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale privind completarea anexei la Ordinul ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale nr. 149/2005 pentru aprobarea Listei cuprinzând agențiile autorizate de clasificare a carcaselor de porcine, bovine și ovine, cu completările ulterioare .....	16
<b>DECIZII ALE CURȚII CONSTITUȚIONALE</b>					
Decizia nr. 214 din 7 martie 2006 referitoare la excepția de neconstituționalitate a prevederilor art. 83 alin. (3) fraza finală, ale art. 84 alin. (2) fraza finală și ale art. 85 alin. (1) prima frază și a doua din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 privind regimul străinilor în România		4-6	★ Rectificări .....	16	

# LEGI ȘI DECRETE

## PARLAMENTUL ROMÂNIEI

CAMERA DEPUTAȚILOR

SENATUL

### LEGE

#### pentru aprobarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 152/2005 privind prevenirea și controlul integrat al poluării

Parlamentul României adoptă prezenta lege.

**Articol unic.** — Se aprobă Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 152 din 10 noiembrie 2005 privind prevenirea și controlul integrat al poluării, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 1.078 din 30 noiembrie 2005, cu următoarele modificări și completări:

1. La articolul 2 alineatul (1), literele c), l) și p) vor avea următorul cuprins:

„c) *cele mai bune tehnici disponibile* — stadiul de dezvoltare cel mai avansat și eficient, înregistrat în dezvoltarea unei activități și a modurilor de exploatare, care demonstrează posibilitatea practică a tehnicilor specifice de a constitui referința pentru stabilirea valorilor limită de emisie în scopul prevenirii poluării, iar în cazul în care acest fapt nu este posibil, pentru a reduce în ansamblu emisiile și impactul asupra mediului în întregul său:

— *tehnicele* se referă deopotrivă la tehnologia utilizată și la modul în care instalația este proiectată, construită, întreținută, exploatată, precum și la scoaterea din funcțiune a acesteia și remedierea amplasamentului, potrivit legislației în vigoare;

— *disponibile* se referă la acele tehnici care au înregistrat un stadiu de dezvoltare ce permite aplicarea lor în sectorul industrial respectiv, în condiții economice și tehnice viabile, luându-se în considerare costurile și beneficiile, indiferent dacă aceste tehnici sunt sau nu utilizate ori realizate la nivel național, cu condiția ca aceste tehnici să fie accesibile operatorului;

— *cele mai bune* se referă la cele mai eficiente tehnici pentru atingerea în ansamblu a unui nivel ridicat de protecție a mediului în întregul său. În determinarea celor mai bune tehnici disponibile trebuie luate în considerare, în special, elementele prevăzute în anexa nr. 3;

l) *modificarea în exploatare* — o schimbare a caracteristicilor sau a funcționării instalației ori o extindere a acesteia, care poate avea efecte asupra mediului;

p) *valorile limită de emisie (VLE)* — masa, exprimată prin parametrii specifici, concentrația și/sau nivelul unei emisii care nu trebuie depășite în cursul uneia sau mai multor perioade de timp.

Valorile limită de emisie mai pot fi stabilite și pentru anumite grupe, familii sau categorii de substanțe, în special pentru cele menționate în anexa nr. 2. Valorile limită de

emisie pentru substanțe se aplică, în mod normal, în punctul în care emisia părăsește instalația, la această determinare neluându-se în considerare nici o diluție. La stabilirea valorilor limită de emisie ale instalației pentru evacuările indirecte în apă se poate lua în considerare efectul unei stații de epurare a apelor uzate, cu condiția garantării unui nivel echivalent de protecție a mediului ca un întreg și acest fapt să nu determine niveluri mai ridicate de poluare a mediului, cu respectarea prevederilor privind evacuarea de substanțe periculoase în apă și a altor prevederi legale în vigoare;“.

2. La articolul 3, alineatul (1) va avea următorul cuprins:

„Art. 3. — (1) Autoritatea competentă ia toate măsurile pentru ca în exploatarea instalației operatorul să respecte principiile generale de bază, astfel încât:

a) să se prevină poluarea în special prin aplicarea celor mai bune tehnici disponibile;

b) să nu se producă nici o poluare semnificativă;

c) să fie evitată producerea de deșeuri, potrivit prevederilor legale în vigoare; în cazul în care se produc deșeuri, ele sunt valorificate, iar dacă acest lucru este imposibil tehnic sau economic, sunt eliminate, astfel încât să se evite sau să se reducă orice impact asupra mediului;

d) să se utilizeze eficient energia;

e) să fie luate măsurile necesare pentru prevenirea accidentelor și limitarea consecințelor acestora;

f) să fie luate măsurile necesare pentru ca în cazul încetării definitive a activității să se evite orice risc de poluare și să se readucă amplasamentul la o stare satisfăcătoare.“

3. După articolul 4 se introduce un nou articol, articolul 4<sup>1</sup>, cu următorul cuprins:

„Art. 4<sup>1</sup>. — (1) Autoritatea competentă emite autorizația integrată de mediu, care conține condiții ce garantează respectarea prevederilor prezentei ordonanțe de urgență și a celorlalte prevederi legale, în caz contrar trebuie să refuze emiterea autorizației integrate de mediu.

(2) Autorizațiile integrate de mediu emise, precum și cele revizuite trebuie să cuprindă detalii cu privire la măsurile adoptate pentru protecția aerului, apei și solului, potrivit prevederilor prezentei ordonanțe de urgență.“

**4. La articolul 9, alineatele (5) și (6) vor avea următorul cuprins:**

„(5) Dacă este cazul, valorile limită de emisie prevăzute la alin. (3) pot fi suplimentate sau înlocuite prin parametri sau măsuri tehnice echivalente.

(6) Pentru instalațiile în care se desfășoară activitățile prevăzute în anexa nr. 1 la pct. 6.6, valorile limită de emisie prevăzute la alin. (3)—(5) iau în considerare aspectele practice caracteristice acestor categorii de instalații.“

**5. Articolul 16 va avea următorul cuprins:**

„Art. 16. — Autoritatea publică centrală pentru protecția mediului poate stabili, după caz, pentru anumite categorii de instalații, cerințe speciale, ca reguli general obligatorii, fără a mai fi necesară includerea acestora în autorizațiile integrate de mediu, în condițiile garantării unei abordări integrate și asigurării unui nivel ridicat echivalent de protecție a mediului în întregul său.“

**6. La articolul 25, literele a) și b) vor avea următorul cuprins:**

„a) poluarea produsă de instalație este semnificativă, astfel încât necesită revizuirea valorilor limită de emisie existente sau includerea de noi astfel de valori limită de emisie în autorizația integrată de mediu;

b) schimbările substanțiale ale celor mai bune tehnici disponibile fac posibilă reducerea semnificativă a emisiilor fără a impune costuri excesive;“

**7. La articolul 26, alineatul (2) va avea următorul cuprins:**

„(2) În situația prevăzută la alin. (1) autoritatea competentă revizuieste, după caz, autorizația integrată de mediu sau condițiile prevăzute în aceasta.“

**8. La articolul 29, alineatul (1) va avea următorul cuprins:**

„Art. 29. — (1) Raportarea implementării prevederilor prezentei ordonanțe de urgență și eficacitatea sa comparată efectiv cu alte instrumente pentru protecția mediului se stabilesc potrivit prevederilor legislației naționale în vigoare.“

**9. La articolul 32, alineatul (4) va avea următorul cuprins:**

„(4) Accesul publicului la informație, prevăzut la alin. (1)—(3) și la art. 33, se realizează potrivit prevederilor Legii nr. 86/2000 pentru ratificarea Convenției privind accesul la informație, participarea publicului la luarea deciziei și accesul la justiție în probleme de mediu,

*Această lege a fost adoptată de Parlamentul României, cu respectarea prevederilor art. 75 și ale art. 76 alin. (1) din Constituția României, republicată.*

p. PREȘEDINTELE CAMEREI DEPUTAȚILOR,  
**LUCIAN AUGUSTIN BOLCAȘ**

PREȘEDINTELE SENATULUI  
**NICOLAE VĂCĂROIU**

semnată la Aarhus la 25 iunie 1998, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 224 din 22 mai 2000, și cu respectarea prevederilor art. 11 alin. (1) lit. b)—e), art. 12, 14 și ale art. 15 alin. (1) din Hotărârea Guvernului nr. 878/2005 privind accesul publicului la informația privind mediul, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 760 din 22 august 2005.“

**10. Articolul 33 va avea următorul cuprins:**

„Art. 33. — Autoritatea competentă informează publicul, conform procedurilor specifice, asupra deciziei luate și pune la dispoziție acestuia următoarele informații:

a) conținutul deciziei și o copie a autorizației integrate de mediu, precum și orice condiții sau modificări aduse autorizației integrate de mediu;

b) motivele și considerațiile pe care se întemeiază decizia, în urma examinării opiniilor și comentariilor exprimate de publicul interesat, incluzând și informațiile referitoare la procedura de participare a publicului;

c) procedura de revizuire prevăzută la art. 34 și 35.“

**11. La articolul 34, alineatele (1) și (3) vor avea următorul cuprins:**

„Art. 34. — (1) Orice persoană care face parte din publicul interesat și care are un interes legitim sau se consideră lezată într-un drept al său se poate adresa instanței de contencios administrativ competente pentru a contesta, din punct de vedere procedural sau substanțial, deciziile, actele sau omisiunile care fac obiectul participării publicului, prevăzute de prezenta ordonanță de urgență, cu respectarea dispozițiilor Legii contenciosului administrativ nr. 554/2004, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 1.154 din 7 decembrie 2004, cu modificările ulterioare.

.....  
(3) Soluționarea cererii se face potrivit dispozițiilor Legii nr. 554/2004, cu modificările ulterioare.“

**12. La articolul 36, litera b) a alineatului (1) și alineatul (2) vor avea următorul cuprins:**

„b) obligația operatorului de a întocmi un plan de acțiuni, în vederea obținerii autorizației integrate de mediu;

.....  
(2) Faptele prevăzute la alin. (1) lit. c)—e) se sancționează și cu suspendarea autorizației integrate de mediu potrivit Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 195/2005 privind protecția mediului, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 1.196 din 30 decembrie 2005.“

## PREȘEDINTELE ROMÂNIEI

## D E C R E T

**privind promulgarea Legii pentru aprobarea Ordonanței  
de urgență a Guvernului nr. 152/2005 privind prevenirea  
și controlul integrat al poluării**

În temeiul prevederilor art. 77 alin. (1) și ale art. 100 alin. (1) din Constituția României, republicată,

**Președintele României d e c r e t e a z ă:**

Articol unic. — Se promulgă Legea pentru aprobarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 152/2005 privind prevenirea și controlul integrat al poluării și se dispune publicarea acestei legi în Monitorul Oficial al României, Partea I.

PREȘEDINTELE ROMÂNIEI  
**TRAIAN BĂSESCU**

București, 3 aprilie 2006.  
Nr. 379.

# D E C I Z I I A L E C U R Ţ I I C O N S T I T U Ţ I O N A L E

## CURTEA CONSTITUȚIONALĂ

### D E C I Z I A Nr. 214 din 7 martie 2006

**referitoare la excepția de neconstituționalitate a prevederilor art. 83 alin. (3) fraza finală,  
ale art. 84 alin. (2) fraza finală și ale art. 85 alin. (1) prima frază și a doua din Ordonanța de urgență  
a Guvernului nr. 194/2002 privind regimul străinilor în România**

Ioan Vida	— președinte
Nicolae Cochinescu	— judecător
Aspazia Cojocaru	— judecător
Constantin Doldur	— judecător
Acsinte Gaspar	— judecător
Kozsokár Gábor	— judecător
Petre Ninosu	— judecător
Ion Predescu	— judecător
Șerban Viorel Stănoiu	— judecător
Ion Tiucă	— procuror
Valentina Bărbățeanu	— magistrat-asistent

Pe rol se află soluționarea excepției de neconstituționalitate a prevederilor art. 83 alin. (3) fraza finală, ale art. 84 alin. (2) fraza finală și ale art. 85 alin. (1) prima frază și a doua din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 privind regimul străinilor în România, excepție ridicată de Kenan Kaya în Dosarul nr. 3.357/2005 al Curții de Apel

București — Secția a VIII-a de contencios administrativ și fiscal.

La apelul nominal se constată lipsa părților, față de care procedura de citare a fost legal îndeplinită.

Cauza aflându-se în stare de judecată, Curtea acordă cuvântul reprezentantului Ministerului Public, care pune concluzii de respingere ca neîntemeiată a excepției de neconstituționalitate.

C U R T E A,

având în vedere actele și lucrările dosarului, constată următoarele:

Prin Încheierea din 1 noiembrie 2005, pronunțată în Dosarul nr. 3.357/2005, **Curtea de Apel București — Secția a VIII-a de contencios administrativ și fiscal a sesizat Curtea Constituțională cu excepția de neconstituționalitate a prevederilor art. 83 alin. (3), ale art. 84 alin. (2) și ale art. 85 alin. (1) din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 privind regimul străinilor în România.**

Excepția de neconstituționalitate a fost invocată de Kenan Kaya într-o cauză de contencios administrativ având ca obiect soluționarea plângerii împotriva măsurii de declarare ca indezirabil a acestuia.

**În motivarea excepției de neconstituționalitate** se susține că prevederile art. 83 alin. (3) fraza finală și ale art. 84 alin. (2) din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 contravin, în principal, dispozițiilor art. 21 și celor ale art. 126 din Constituție, precum și celor ale art. 8 și 13 din Convenția pentru apărarea drepturilor omului și a libertăților fundamentale, iar subsecvent prevederilor constituționale ale art. 18, 22, 23 și 24 și celor convenționale ale art. 2, 3 și 5. De asemenea, se consideră că prevederile de lege criticate încalcă și dispozițiile constituționale ale art. 16 alin. (1) și pe cele ale art. 14 din convenția amintită, întrucât instituie o discriminare pe criteriul cetățeniei în exercitarea și apărarea drepturilor consacrate de art. 21, 24 și 126 alin. (6) din Constituție și de art. 6, 8 și 13 din Convenția pentru apărarea drepturilor omului și a libertăților fundamentale. În ceea ce privește dispozițiile art. 85 alin. (1) prima frază și a doua din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002, autorul excepției susține că sunt contrare prevederilor constituționale ale art. 11, 18, 21 și 24, prin raportare la cele ale art. 22, 23, 24 și 53 din Constituție, precum și dispozițiilor art. 1, 5, 6 și 13 din Convenția pentru apărarea drepturilor omului și a libertăților fundamentale, prin raportare la cele ale art. 2, 3, 5, 8 și 14 din aceeași convenție.

**Curtea de Apel București — Secția a VIII-a de contencios administrativ și fiscal** apreciază că excepția de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 83 alin. (3) fraza finală și ale art. 85 alin. (1) din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 este neîntemeiată. Referitor la prevederile art. 84 alin. (2) din ordonanță consideră că, „în măsura în care judecătorul investit cu soluționarea cererii nu are acces la datele și informațiile care constituie motivele ordonanței de declarare a străinului ca indezirabil și la dovezile relevante, liberul acces la justiție ar putea fi golit de conținut“.

Potrivit prevederilor art. 30 alin. (1) din Legea nr. 47/1992, încheierea de sesizare a fost comunicată președinților celor două Camere ale Parlamentului, Guvernului și Avocatului Poporului, pentru a-și exprima punctele de vedere asupra excepției de neconstituționalitate.

**Guvernul** susține că excepția de neconstituționalitate nu este întemeiată, invocând considerentele reținute de Curtea Constituțională în motivarea Deciziei nr. 342 din 16 septembrie 2003, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 755 din 28 octombrie 2003. Totodată, arată că prin Hotărârea din 5 octombrie 2000, pronunțată în Cauza *Maaouia împotriva Franței*, Curtea Europeană a Drepturilor Omului a statuat că „deciziile privind intrarea, șederea și expulzarea străinilor nu privesc drepturile și obligațiile civile ale reclamantului și nici acuzații de natură penală, în sensul art. 6 paragraful 1 din

Convenție, în consecință, art. 6 paragraful 1 nu este aplicabil cauzei“.

**Avocatul Poporului** apreciază că excepția este neîntemeiată. Arată că textele de lege criticate sunt conforme atât prevederilor constituționale, cât și celor convenționale invocate de autorul excepției, precizând însă că prevederile art. 52 alin. (2) din Constituție nu au incidență în cauză.

**Președinții celor două Camere ale Parlamentului** nu au comunicat punctele lor de vedere asupra excepției de neconstituționalitate ridicate.

#### CURTEA,

examinând încheierea de sesizare, punctele de vedere ale Guvernului și Avocatului Poporului, raportul întocmit de judecătorul-raportor, concluziile procurorului, dispozițiile legale criticate, raportate la prevederile Constituției, precum și Legea nr. 47/1992, reține următoarele:

Curtea Constituțională a fost legal sesizată și este competentă, potrivit dispozițiilor art. 146 lit. d) din Constituție și ale art. 1 alin. (2), ale art. 2, 3, 10 și 29 din Legea nr. 47/1992, să soluționeze excepția de neconstituționalitate.

Obiectul excepției de neconstituționalitate îl constituie prevederile art. 83 alin. (3) fraza finală, ale art. 84 alin. (2) fraza finală și ale art. 85 alin. (1) prima frază și a doua din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 privind regimul străinilor în România, republicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 201 din 8 martie 2004. Prevederile de lege criticate au următorul conținut:

— Art. 83 alin. (3) fraza finală: „[...] *Atunci când declararea străinului ca indezirabil se întemeiază pe rațiuni de siguranță națională, în conținutul ordonanței nu vor fi menționate motivele care stau la baza acestei decizii.*“;

— Art. 84 alin. (2) fraza finală: „[...] *Asemenea date și informații nu pot fi, sub nici o formă, direct sau indirect, aduse la cunoștința străinului declarat indezirabil.*“;

— Art. 85 alin. (1) prima frază și a doua: „*Ordonanța de declarare ca indezirabil poate fi atacată de străinul împotriva căruia a fost dispusă, în termen de 5 zile lucrătoare de la data comunicării, la Curtea de Apel București. Instanța se pronunță în termen de 3 zile de la data primirii cererii. [...]*“

În opinia autorului excepției de neconstituționalitate textele de lege criticate contravin prevederilor constituționale ale art. 11 — „*Dreptul internațional și dreptul intern*“, ale art. 16 alin. (1) referitor la egalitatea cetățenilor în fața legii și a autorităților publice, ale art. 18 — „*Cetățenii străini și apatrizii*“, ale art. 21 — „*Accesul liber la justiție*“, ale art. 22 — „*Dreptul la viață și la integritate fizică și psihică*“, ale art. 23 — „*Libertatea individuală*“, ale art. 24 — „*Dreptul la apărare*“, ale art. 53 — „*Restrângerea exercițiului unor drepturi și libertăți*“ și ale art. 126 alin. (6) privind controlul judecătoresc asupra actelor administrative ale autorităților publice.

De asemenea, autorul excepției de neconstituționalitate consideră că textele de lege criticate contravin și

următoarelor prevederi din Convenția pentru apărarea drepturilor omului și a libertăților fundamentale: art. 1 — „*Obligația de a respecta drepturile omului*“, art. 2 — „*Dreptul la viață*“, art. 3 — „*Interzicerea torturii*“, art. 5 — „*Dreptul la libertate și la siguranță*“, art. 6 — „*Dreptul la un proces echitabil*“, art. 8 — „*Dreptul la respectarea vieții private și de familie*“, art. 13 — „*Dreptul la un recurs efectiv*“ și art. 14 — „*Interzicerea discriminării*“.

Examinând excepția de neconstituționalitate, Curtea constată că dispozițiile art. 84 alin. (2) fraza finală din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 impun interdicția aducerii la cunoștința străinului a datelor și informațiilor care constituie motivele ce au stat la baza deciziei de declarare a sa ca indezirabil, în cazul în care acestea aveau în vedere rațiuni de siguranță națională. Textul de lege criticat a mai fost supus controlului de constituționalitate și, prin Decizia nr. 342 din 16 septembrie 2003, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 755 din 28 octombrie 2003, excepția a fost respinsă ca neîntemeiată. Curtea Constituțională a statuat că „interdicția stabilită de legiuitor pentru cetățenii străini declarați indezirabili, de a nu li se aduce la cunoștință datele și informațiile pe baza cărora s-a luat o astfel de decizie, este în concordanță cu dispozițiile constituționale ale art. 31 alin. (3), potrivit cărora dreptul la informație nu trebuie să prejudicieze siguranța națională“, iar judecătorul care analizează plângerea împotriva măsurii de declarare ca indezirabil trebuie să respecte legea care dă prioritate intereselor privind siguranța națională a României. De asemenea, Curtea a reținut cu acel prilej că situația străinilor declarați indezirabili în scopul apărării siguranței naționale și protejării informațiilor clasificate este diferită de cea a celorlalți cetățeni străini, astfel că legiuitorul poate stabili drepturi diferite pentru aceste două categorii de

cetățeni străini, fără ca prin aceasta să se încalce principiul egalității. În plus, textul de lege criticat nu oprește părțile interesate de a apela la instanțele judecătorești, de a fi apărate și de a se prevala de toate garanțiile procesuale care condiționează într-o societate democratică procesul echitabil.

Pentru identitate de rațiune, argumentele care au condus la respingerea excepției de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 84 alin. (2) din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 prin decizia menționată își mențin relevanța și în ceea ce privește constituționalitatea prevederilor art. 83 alin. (3) fraza finală din aceeași ordonanță, întrucât acestea din urmă prevăd că în cuprinsul ordonanței de declarare a indezirabilității străinului nu vor fi menționate motivele pe baza cărora a fost luată această decizie.

În continuare, Curtea observă că prin Decizia nr. 505 din 4 octombrie 2005, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 984 dn 7 noiembrie 2005, s-a pronunțat asupra excepției de neconstituționalitate a prevederilor art. 85 din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002, constatând constituționalitatea acestora, considerentele deciziei menționate menținându-și valabilitatea și în prezenta cauză.

Curtea constată totodată că dispozițiile art. 22 — „*Dreptul la viață și la integritate fizică și psihică*“ și cele ale art. 23 — „*Libertatea individuală*“ din Constituție, precum și cele ale art. 2 — „*Dreptul la viață*“, art. 3 — „*Interzicerea torturii*“, art. 5 — „*Dreptul la libertate și la siguranță*“, art. 8 — „*Dreptul la respectarea vieții private și de familie*“ din Convenția pentru apărarea drepturilor omului și a libertăților fundamentale nu au relevanță în soluționarea prezentei excepții de neconstituționalitate.

Pentru considerentele expuse, în temeiul art. 146 lit. d) și al art. 147 alin. (4) din Constituție, precum și al art. 1—3, al art. 11 alin. (1) lit. A.d) și al art. 29 din Legea nr. 47/1992,

## CURTEA CONSTITUȚIONALĂ

În numele legii

DECIDE:

Respinge excepția de neconstituționalitate a prevederilor art. 83 alin. (3) fraza finală, ale art. 84 alin. (2) fraza finală și ale art. 85 alin. (1) prima frază și a doua din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 194/2002 privind regimul străinilor în România, excepție ridicată de Kenan Kaya în Dosarul nr. 3.357/2005 al Curții de Apel București — Secția a VIII-a de contencios administrativ și fiscal.

Definitivă și general obligatorie.

Pronunțată în ședința publică din data de 7 martie 2006.

PREȘEDINTELE CURȚII CONSTITUȚIONALE,  
prof. univ. dr. **IOAN VIDA**

Magistrat-asistent,  
**Valentina Bărbățeanu**

# ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE

AUTORITATEA NAȚIONALĂ SANITARĂ VETERINARĂ  
ȘI PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR

## ORDIN

### privind aprobarea Normei sanitare veterinare ce stabilește criteriile pentru zonare și supraveghere oficială ca urmare a suspiciunii sau confirmării anemiei infecțioase a somonului

Văzând Referatul de aprobare nr. 21.280 din 20 februarie 2006, întocmit de Direcția de integrare europeană și relații internaționale din cadrul Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor,

având în vedere prevederile art. 10 lit. b) din Ordonanța Guvernului nr. 42/2004 privind organizarea activității sanitar-veterinare și pentru siguranța alimentelor, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 215/2004, cu modificările și completările ulterioare,

în temeiul art. 3 alin. (3) și al art. 4 alin. (3) din Hotărârea Guvernului nr. 130/2006 privind organizarea și funcționarea Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor și a unităților din subordinea acesteia,

**președintele Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor** emite următorul ordin:

Art. 1. — Se aprobă Norma sanitară veterinară ce stabilește criteriile pentru zonare și supraveghere oficială ca urmare a suspiciunii sau confirmării anemiei infecțioase a somonului, prevăzută în anexa care face parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 2. — Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor, institutele veterinare centrale și direcțiile sanitar-veterinare și pentru siguranța alimentelor județene și a municipiului București vor duce la îndeplinire prevederile prezentului ordin.

Art. 3. — La data intrării în vigoare a prezentului ordin se abrogă orice alte dispoziții contrare.

Art. 4. — Prezentul ordin constituie transpunerea Deciziei Comisiei 2003/466/CE ce stabilește criteriile pentru zonare și supraveghere oficială ca urmare a suspiciunii sau confirmării anemiei infecțioase a somonului, publicată în Jurnalul Oficial al Comunităților Europene (JOCE) nr. L 156 din 25 iunie 2003, p. 61.

Art. 5. — Prezentul ordin va fi publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, și va intra în vigoare la 15 zile de la publicare.

Președintele Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor,  
**Ion Agafitei**

București, 21 martie 2006.  
Nr. 75.

ANEXĂ

### NORMA SANITARĂ VETERINARĂ ce stabilește criteriile pentru zonare și supraveghere oficială ca urmare a suspiciunii sau confirmării anemiei infecțioase a somonului

Articol unic. — Planurile de recoltare a probelor și metodele de diagnostic pentru depistarea și confirmarea anemiei infecțioase a somonului, care va fi denumită în continuare *AIS*, precum și criteriile de zonare și

supraveghere oficială ce urmează suspiciunii sau confirmării *AIS* sunt prevăzute în anexa care face parte integrantă din prezenta normă sanitară veterinară.

ANEXĂ  
la norma sanitară veterinară

#### PLANURI

#### de prelevare a probelor și metode de diagnostic pentru depistarea și confirmarea AIS și criteriile pentru zonare și supraveghere oficială ce urmează suspiciunii sau confirmării AIS

##### Introducere și definiții

Prezenta anexă:

a) furnizează liniile directe și cerințele minime pentru planurile de prelevare a probelor și metodele de diagnostic pentru depistarea și confirmarea prezenței AIS;

b) integrează prevederile și definițiile stabilite de Norma sanitară veterinară privind condițiile de sănătate a

animalelor, care reglementează punerea pe piață a animalelor și a produselor de acvacultură, aprobată prin Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 494/2001, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 191 din 21 martie 2002, ce transpune Directiva Consiliului 91/67/CEE, și de Norma sanitară veterinară cu privire la măsurile minime pentru controlul anumitor boli ale peștilor,

aprobată prin Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 241/2002, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 813 din 8 noiembrie 2002, ce transpune Directiva Consiliului 93/53/CEE;

c) stabilește prevederile având ca scop punerea unui diagnostic corect, controlul și supravegherea AIS, în caz de suspiciune sau confirmare a AIS;

d) se adresează atât autorităților responsabile pentru controlul AIS, cât și personalului laboratorului ce efectuează testări cu privire la această boală. Se bazează pe procedurile de prelevare a probelor, principiile și aplicațiile testelor de laborator și evaluarea rezultatelor acestora, precum și pe tehnicile detaliate de laborator. Cu toate acestea, atunci când este adecvat, laboratoarele pot aplica modificări ale testelor descrise în prezenta anexă sau pot utiliza teste diferite, cu condiția să se demonstreze că au o sensibilitate și specificitate echivalente sau superioare. În plus, sunt stabilite criteriile pentru stabilirea zonării și supravegherii oficiale ca urmare a suspiciunii sau confirmării AIS.

Pentru scopul prezentei anexe, se vor aplica următoarele definiții suplimentare:

a) *zonă de captare a apei* — întreaga zonă de captare, începând de la sursa cursului de apă până la estuar, sau o parte a acestei zone, începând de la sursa de apă până la o barieră naturală ori artificială care previne migrarea peștelui de la această barieră;

b) *zonă de coastă* — o parte a coastei sau a apei mării ori a unui estuar, cu o delimitare geografică precisă, ce constă într-un sistem hidrologic omogen sau într-o serie de asemenea sisteme.

## **I. Criteriile pentru diagnosticarea AIS și pentru stabilirea zonelor, anumite măsuri de control și supraveghere oficială**

### **I.1. Principii generale pentru diagnosticul AIS**

Motivele rezonabile pentru ca peștii să fie suspectați ca fiind infectați cu virusul AIS sunt enumerate la pct. 1.2. Statele membre ale Uniunii Europene trebuie să se asigure că în urma unei suspiciuni la o fermă cu pești infectați cu virusul AIS se va efectua cât mai curând posibil o anchetă oficială pentru a confirma sau a infirma prezența bolii prin inspecție și examinare clinică, precum și prin recoltarea și selectarea probelor și a metodelor de examinare la laborator, așa cum sunt stabilite la pct. III și IV. În scopul confirmării oficiale a prezenței AIS trebuie să fie îndeplinit oricare dintre cele trei seturi de criterii stabilite la pct. I.3:

### **I.2. Suspiciunea infecției cu AIS**

I.2.1. Prezența AIS trebuie suspectată dacă se îndeplinește cel puțin unul dintre următoarele criterii:

a) prezența unor constatări post-mortem compatibile cu prezența AIS, cu sau fără semne clinice de boală. Constatările post-mortem și semnele clinice de boală trebuie să fie în conformitate cu cele stabilite de ediția curentă a Manualului Organizației Internaționale a Epizootiilor (O.I.E.) de diagnostic pentru bolile animalelor acvatice;

b) izolarea și identificarea virusului AIS în culturi celulare de la o singură probă prelevată de la orice pește din ferma descrisă la pct. III;

c) o probă rezonabilă a prezenței AIS în cel puțin două teste independente de laborator, cum ar fi: PCR-RT (pct. IV) și testul IAF (pct. V);

d) transferul peștilor vii într-o exploatație unde există motive serioase de a suspecta prezența AIS în momentul transferului peștilor;

e) acolo unde o investigație prezintă alte elemente epidemiologice substanțiale care să conducă la AIS — ferme suspecte sau confirmate.

I.2.2. Suspiciunea de AIS poate fi exclusă dacă investigațiile, implicând cel puțin o inspecție clinică pe lună pe o perioadă de 6 luni, nu mai evidențiază semnificativ prezența AIS.

### **I.3. Confirmarea AIS**

Prezența AIS trebuie considerată ca și confirmată dacă este îndeplinit unul dintre criteriile de la lit. a), b) sau c):

a) semne clinice și constatări post-mortem compatibile cu AIS, în conformitate cu ediția curentă a Manualului O.I.E. de diagnostic pentru bolile animalelor acvatice, incluzând: moartea, slăbirea sau comportamentul anormal al peștelui, semne de anemie sau dacă sunt observate alte constatări post-mortem și schimbări patologice, iar virusul AIS este detectat după una dintre următoarele metode sau mai multe:

- (i) izolarea și identificarea virusului AIS în cultură celulară de la cel puțin o probă prelevată de la orice pește din ferma descrisă la pct. III;
- (ii) detectarea virusului AIS prin metodele PCR-RT descrise la pct. IV;
- (iii) detectarea virusului AIS în țesuturi sau în preparate tisulare prin intermediul anticorpilor specifici împotriva virusului AIS (de exemplu: testul indirect cu anticorpi fluorescenți sau amprente renale descrise la pct. V);

b) izolarea și identificarea virusului AIS în două probe de la unul sau mai mulți pești, din ferma testată în diferite ocazii, folosindu-se metodele descrise la pct. III;

c) izolarea și identificarea virusului AIS din cel puțin o probă prelevată de la orice pește din fermă, folosindu-se metodele descrise la pct. III, cu confirmarea existenței virusului AIS în preparate tisulare provenite de la orice pește din fermă, folosindu-se fie PCR-RT (pct. IV), fie testul IAF (pct. V).

### **I.4. Criterii pentru stabilirea și revocarea zonelor pentru control și supraveghere oficială ca urmare a suspiciunii și confirmării AIS**

I.4.1. În scopul stabilirii unui program de supraveghere oficială bazat pe risc, statele membre ale Uniunii Europene trebuie să stabilească controale corespunzătoare și zone de supraveghere în vecinătatea unei exploatații a cărei infectare cu AIS este suspectată sau confirmată oficial.



1.4.2. Zonele pentru control și supraveghere oficială stabilite trebuie să fie definite pe baza unei analize de la caz la caz a riscului răspândirii ulterioare a bolii. În conformitate cu situația epizootică, zona de captare a apei sau zona de coastă:

(i) trebuie să fie definită ca zonă de control; sau

(ii) se poate ca zonele de coastă și zonele de captare a apei extinse să fie divizate în zonă de control și zonă de supraveghere, dacă împiedicarea răspândirii AIS nu este compromisă.

În plus, supravegherea adițională a zonelor poate să fie, după cum este necesar, stabilită în afara zonei de captare a apei sau a zonei de coastă.

1.4.3. Factorii principali de luat în considerare pentru stabilirea zonelor de mai sus sunt cei care influențează riscurile de răspândire a bolii la peștii din ferme sau la cei sălbatici, precum: numărul, rata și distribuția mortalității peștilor din ferma suspectată sau în care s-a confirmat infectarea cu virusul AIS; cauza mortalității din ferma respectivă; distanța până la fermele din vecinătate și densitatea acestora; fermele de contact; speciile prezente în fermă; managementul care se aplică în fermele afectate și în cele învecinate; condițiile hidro dinamice și alți factori semnificativi epidemiologic, identificați în cadrul investigațiilor epizootice efectuate în conformitate cu art. 5 alin. (2) și art. 8 din Norma sanitară veterinară aprobată prin Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 241/2002.

1.4.4 Pentru stabilirea zonelor pentru control și supraveghere oficială se vor aplica următoarele criterii minime:

1.4.4.1. Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor trebuie să stabilească o zonă de control în vecinătatea imediată a fermelor în care s-a confirmat prezența virusului AIS, după cum urmează:

— în zonele de coastă: zona inclusă într-un cerc cu raza egală cu cel puțin lungimea unei deplasări a mării sau cu o lungime de cel puțin 5 km, cu centrul în ferma în care s-a confirmat existența virusului AIS, sau o zonă echivalentă determinată în conformitate cu datele hidro dinamice și epidemiologice corespunzătoare; sau

— în zonele interioare: întreaga zonă de captare a apei din ferma în care s-a confirmat infectarea cu virusul AIS; în zonele extinse de captare a apei Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor poate să limiteze extinderea zonei la părți ale zonei de captare, cu condiția de a nu compromite împiedicarea răspândirii AIS.

1.4.4.2. O zonă temporară de control trebuie stabilită, în cazul suspiciunii prezenței virusului AIS, pe baza acelorași criterii care au fost trasate pentru zona de control.

1.4.4.3. O zonă de supraveghere trebuie stabilită, dacă este necesar, de către Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor în afara zonei de control în sectoare în care este considerată suficientă o supraveghere mai puțin intensă și trebuie să corespundă cu:

— în zonele de coastă: o suprafață care în jurul zonei de control se suprapune zonei ce acoperă distanța deplasării mării sau o suprafață care înconjoară zona de control și este cuprinsă într-un cerc cu raza de 10 km pornind din centrul zonei de control ori o zonă echivalentă, determinată în conformitate cu datele hidro dinamice și epidemiologice; sau

— în zonele interioare: dacă este necesar, cu o zonă extinsă, situată în afara zonei de control stabilite.

#### 1.5. Vid sanitar și suprimarea zonelor stabilite

1.5.1. Autoritatea competentă din România se va asigura că toate fermele din cadrul zonelor de control fac obiectul unei perioade corespunzătoare de vid sanitar după ce au fost golite de pește și dezinfectate după cum este necesar.

Durata perioadei de vid sanitar în ferma în care s-a confirmat infectarea cu AIS trebuie să fie de cel puțin 6 luni. Durata perioadei de vid sanitar pentru alte ferme aflate în zone de control va fi determinată de autoritatea competentă, evaluându-se riscul fiecărui caz.

Atunci când toate fermele din zona de control sunt golite, se vor aplica cel puțin 6 săptămâni de vid sanitar sincronizat.

În plus, autoritatea competentă poate decide asupra instituirii vidului sanitar în fermele din zonele de supraveghere stabilite.

1.5.2. Zonele de control stabilite nu pot fi suprimate și repopulate până când toate fermele situate în aceste zone nu au fost golite de pește, dezinfectate după cum este necesar și supuse vidului sanitar în conformitate cu pct. 1.5.1. Când este efectuată repopularea zonelor, zonele de control trebuie transformate în zone de supraveghere, așa cum este stabilit la pct. 1.4.4.3.

1.5.3. Zonele temporare de control stabilite nu pot fi suprimate până când nu a fost exclusă suspiciunea de AIS în conformitate cu pct. 1.2.2. În cazul confirmării AIS în conformitate cu pct. 1.3, zona temporară de control va fi transformată în zonă de control.

1.5.4. Zonele de supraveghere stabilite nu pot fi suprimate decât după 2 ani de la suprimarea zonei de control.

#### 1.6. Supravegherea oficială ca urmare a suspiciunii sau confirmării AIS

1.6.1. Cu referire la art. 5 alin. (2) și la art. 6 din Norma sanitară veterinară, aprobată prin Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 241/2002, ce transpune Directiva 93/53/CEE, și pentru a stabili distribuția și evoluția bolii ca urmare a suspiciunii sau confirmării AIS într-o fermă, un program oficial de supraveghere bazat pe risc trebuie efectuat de autoritatea competentă ori de serviciile calificate de sănătate a peștilor în toate fermele situate în zona stabilită, cu consultarea și sub controlul autorității competente.

I.6.2. Pentru scopul aplicării unui astfel de program de supraveghere oficială, autoritatea competentă trebuie, dacă este necesar, printr-o inspecție la fața locului, să identifice toate fermele din zonele stabilite și să facă un recensământ oficial al tuturor speciilor, categoriilor și numărului peștilor care sunt ținuti în ferme, incluzând și cifrele de mortalitate.

I.6.3. În urma recensământului oficial inițial, fermele din cadrul zonelor de control temporare stabilite, care conțin somonul de Atlantic (*Salmo salar*) sau orice altă specie la care cea mai recentă ediție a Codului O.I.E. de sănătate a animalelor acvatice se referă ca fiind susceptibilă sau potențial purtătoare de AIS, trebuie să raporteze autorității competente, la fiecare 14 zile, date asupra mortalității. Mortalitatea crescută trebuie raportată zilnic și pe cușcă.

Autoritatea competentă trebuie să investigheze orice creștere semnificativă a mortalității într-o fermă.

Dacă suspiciunea este confirmată, toate fermele din zonele de control stabilite trebuie să raporteze săptămânal autorității competente asupra mortalității, în fiecare zi și pe fiecare cușcă.

Fermele care se află în zonele de supraveghere vor raporta rata mortalității autorității competente la fiecare 14 zile.

În plus, inspecțiile se vor efectua regulat timp de un an în zonele prestabilite și cu frecvența precizată în tabelul nr. 1. Cu toate acestea, când condițiile climatice fac ca aceste inspecții să nu fie posibile o perioadă din an, Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor poate stabili în planul de contingență altă frecvență pentru inspecții.

### Programul de supraveghere oficială

— Tabelul nr. 1 —

Localizarea fermei	Numărul minim de inspecții într-un an	Numărul minim de inspecții într-un an după ce zona a fost suprimată
Zonă de control	12	
Zonă de supraveghere	6	6
Zonă temporară de control	6	

Programul de supraveghere va fi continuat până când zona va fi suprimată.

I.6.4. Inspecțiile, precum și selecția, colectarea, prepararea și expedierea probelor trebuie efectuate potrivit pct. II.1, II.2, II.3 și II.4. Examinarea probelor trebuie făcută în conformitate cu pct. III și IV.

#### II. Inspecția și prelevarea probelor

II.1. *Inspeția, selecția și colectarea probelor la o fermă unde se suspectează prezența AIS*

II.1.1. La inspecțiile obișnuite efectuate în cadrul programului de supraveghere oficială descris la pct. I.6 și în fermele suspecte de infectarea cu anemia infecțioasă a somonului, toate echipamentele fermelor (cuști, rezervoare sau lacuri artificiale) vor fi inspectate pentru a se detecta prezența eventualelor cazuri de pești morți, slăbiți sau care au un comportament anormal. Pe cât posibil, peștii morți de curând (nedescompuși), slăbiți sau cu comportament anormal vor fi examinați pentru a detecta semnele clinice sau pentru a efectua constatarea post-mortem a prezenței anemiei infecțioase a somonului, așa cum este descrisă în actuala ediție a Manualului O.I.E. pentru diagnosticul bolilor animalelor acvatice.

II.1.2. Dacă sunt observate semne clinice recente, compatibile cu cele ale anemiei infecțioase a somonului, sau un inspector ori un medic veterinar are un alt motiv să

suspecteze faptul că peștele ar putea fi infectat, se va colecta un număr de cel puțin 10 pești pentru examenul de laborator. Pe cât posibil, probele se vor preleva din rândul cazurilor recente de mortalitate și al celor slăbite sau cu un comportament anormal. Dacă nu sunt suficienți pești care să prezinte semne clinice, atunci numărul de probe va fi completat cu pești sănătoși, selectați din cuști, rezervoare sau lacuri artificiale care prezintă cel mai mare nivel de mortalitate sau de pești care arată semne clinice de boală.

II.1.3. Dacă se observă cazuri recente de mortalitate, slăbire sau de comportament anormal, însă semnele clinice, împreună cu constatările post-mortem, nu sunt compatibile cu semnele anemiei infecțioase a somonului, recoltarea probelor nu este obligatorie, deși aceste recoltări pot fi cerute de inspectorul sau medicul veterinar pentru efectuarea diagnosticului diferențiat.

II.1.4. Acolo unde peștii proveniți din ape naturale sunt suspectați ca fiind infectați cu anemia infecțioasă a somonului, Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor se va asigura că probele corespunzătoare sunt prelevate și examinate prin metodele clinice și de laborator adecvate, după cum este stabilit la pct. II—VI, pentru a exclude sau a confirma prezența

anemiei infecțioase a somonului și pentru a aprecia dacă apariția bolii prezintă o amenințare semnificativă pentru ferma piscicolă.

## II.2. Pregătirea probelor provenite de la pești

II.2.1. Probele pentru examinarea histologică trebuie prelevate doar de la pești care au fost uciși de curând, care aveau semnele clinice sau constatările post-mortem compatibile cu prezența bolii. Se vor preleva probe din orice leziune internă sau externă și, în orice caz, probe de ficat, de rinichi median, inimă și splină vor fi prelevate de la fiecare pește, folosindu-se un bisturiu, și vor fi transferate într-o soluție salină de formol, tamponată cu o concentrație cuprinsă între 8 și 10% (vol./vol.). Proporția dintre fixator și țesut trebuie să fie de cel puțin 20:1 pentru asigurarea unei conservări satisfăcătoare a țesutului.

II.2.2. Țesuturile pentru examinarea virusologică vor fi prelevate de la toți peștii din eșantion. Probele vor fi recoltate în dublu exemplar pentru reconfirmarea rezultatelor. Bucăți de ficat, rinichi anterior, inimă și splină vor fi prelevate de la pești, folosindu-se un instrument steril, și vor fi transferate într-un tub de plastic conținând 9 ml soluție de transport, adică un mediu de cultură celulară cu antibiotic. Este potrivită o combinație de  $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  fungizonă,  $200 \text{ U.I. ml}^{-1}$  polimixină B și  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicină, dar se pot folosi și alte combinații a căror eficiență a fost demonstrată. Țesuturile prelevate de la cel mult 5 pești pot fi colectate într-un singur tub conținând soluție de transport și reprezentate pe un singur eșantion. Greutatea unei probe de țesut va fi de  $1,0 \pm 0,5 \text{ g}$ .

II.2.3. Ampretele renale vor fi prelevate pentru testul indirect cu anticorpi fluorescenți doar de la pești care au fost uciși de curând, adică la cel mult două ore de la moarte. O bucată de rinichi median va fi prelevată de la pește, folosindu-se instrumente sterile. Țesutul va fi tamponat cu hârtie absorbantă pentru a îndepărta sângele în exces, apoi se va presa în mod repetat pe o lamelă acoperită cu poli-L-lizină. Ampretele individuale vor fi alăturate, dar nu se vor suprapune, pentru a da o continuitate câmpului celular. Sângele și lichidul tisular nu reprezintă un material relevant pentru acest test. Trebuie să se evite „scurgerea” ampretei renale pe hârtia absorbantă pentru că acest lucru poate produce coagularea sângelui, fapt ce ar produce o mare cantitate de ser proteic pe lamela pentru testare. Ampretele vor fi uscate prin expunere la aer, apoi vor fi păstrate reci și uscate, dacă nu sunt fixate imediat. Fixarea trebuie să se facă în termen de 72 de ore din momentul amprentării. Alternativ, ampretele pot fi congelate și depozitate pentru maximum o lună la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  înainte de fixare.

II.2.4. Peștii care prezintă semne de anemie pot fi asomați și imediat li se vor recolta probe de sânge heparinat pentru examenul hematologic, precum și pentru măsurarea hematocritului.

II.2.5. Țesuturile pentru analizele PCR-RT vor fi prelevate de la toți peștii din eșantion. Se va preleva de la pește o bucată din rinichiul anterior sau median și,

folosindu-se un instrument steril, se va transfera într-un microtub care conține 1 ml soluție pentru conservarea ARN a cărei eficacitate e dovedită. Țesuturile care provin de la cel mult 5 pești pot fi colectate într-un singur tub cu soluție conservantă, reprezentând o singură probă. Greutatea unei singure probe de țesut nu va avea mai mult de 0,5 g. Când peștele este prea mic pentru a se putea obține o probă din greutatea cerută, bucățile de rinichi, inimă, splină, ficat sau cecumuri pilorice pot fi prelevate, în această ordine, pentru a obține o probă de 0,5 g.

## II.3. Expedierea probelor prelevate de la pește

II.3.1. Probele de sânge și tuburile care conțin țesuturi de la pește pentru examinarea virusologică sau pentru analizele PCR-RT vor fi plasate în containere izolate (de exemplu, cutii cu perete gros de polistiren), cu o cantitate suficientă de gheață sau de baterii de refrigerare pentru a asigura răcirea probelor pe timpul transportului către laborator. Se va evita congelarea, iar la momentul recepției trebuie să mai existe încă gheață în cutia de transport a recipientului sau una ori mai multe baterii de refrigerare trebuie să fie încă, parțial sau complet, înghețate. În circumstanțe excepționale, probele destinate analizelor PCR-RT și cele destinate examinării virusologice pot fi congelate și transportate la laborator la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  sau mai scăzută.

II.3.2. Lamelele pentru testul indirect cu anticorpi fluorescenți trebuie să fie expediate în suporturi pentru lamele împreună cu o cantitate suficientă de substanță desicatoare pentru a păstra ampretele uscate și reci după cum se indică mai sus.

II.3.3. Dacă țesuturile peștelui sunt transportate într-o substanță fixatoare pentru examenul histologic, acestea trebuie să fie expediate într-un tub etanș plasat într-un recipient rezistent la șocuri, ca de exemplu în cutii de polistiren cu pereții groși.

II.3.4. În afara cazului când probele au fost congelate, examinarea virusologică trebuie să înceapă cât mai curând posibil și nu mai târziu de 72 de ore de la colectarea probelor. Probele pentru analizele de confirmare vor fi stocate la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  sau mai puțin la sosirea la laborator.

II.3.5. Peștii întregi pot fi transportați la laborator dacă în timpul transportului sunt îndeplinite toate cerințele de temperatură descrise la pct. II.3.1. Peștele întreg va fi învelit în hârtie absorbantă și expedit în pungă de plastic la temperatură scăzută, după cum s-a menționat mai sus.

II.3.6. Peștele viu poate fi, de asemenea, expedit, dar numai sub supravegherea unui serviciu oficial.

II.3.7. Pentru analizele PCR-RT ale țesutului conservat în *ARNlater*, extractul de ARN trebuie transportat într-un anumit timp în funcție de temperatura la care este stocat. Aceste perioade sunt prezentate mai jos:

$-37^{\circ}\text{C}$	o zi;
$-25^{\circ}\text{C}$	o săptămână;

—4°C o lună;  
sub —20°C nedefinit.

II.3.8. Toate ambalările și etichetările trebuie să fie executate în conformitate cu prezentele reglementări naționale și internaționale de transport, după cum este adecvat.

#### II.4. *Colectarea unui material de diagnostic suplimentar*

Cu acordul laboratorului de diagnostic pot fi recoltate alte țesuturi de la pește și pregătite pentru examinare suplimentară.

### III. **Examinarea virusologică**

#### III.1. *Pregătirea probelor*

III.1.1. Atunci când apar dificultăți practice care fac imposibilă inocularea celulelor în 72 de ore de la colectarea probelor de țesuturi, este acceptată o congelare a țesuturilor la temperatura de —80°C cel mult 28 de zile. Țesutul trebuie congelat și decongelat doar o singură dată înaintea examinării.

III.1.2. Fiecare probă (țesuturi inundate în soluție de transport) trebuie complet omogenizată, folosindu-se un mixer, blender sau un mojar cu pistil, centrifugată la o turație de la 2.000 la 4.000 x g timp de 15 minute la o temperatură cuprinsă între 0°C și 6°C, iar supernatantul va fi filtrat (0,45 μm) și incubat împreună cu un volum egal de amestec diluant corespunzător de antiser contra serotipurilor indigene ale virusului necrozei pancreatice infecțioase, denumită în continuare *NPI*. Titrul antiserului trebuie să fie de cel puțin 1:2.000 într-un test de neutralizare pe lamă de 50%. Amestecul va fi incubat timp de o oră la temperatura de 15°C. Acesta reprezintă *inoculumul*.

Tratarea tuturor *inocula* cu ser antivirus contra *NPI* (un virus care într-o mare parte din Europa este prezent în 50% din probele de la pește) are ca scop prevenirea apariției, pe culturi celulare inoculate, a efectului citopatic, denumit în continuare *ECP*, prin dezvoltarea virusului *NPI* în culturile celulare inoculate. Acest lucru va reduce durata examinărilor virusologice, precum și numărul de cazuri în care apariția *ECP* va trebui considerată ca indicatoare potențială de virus AIS.

Atunci când probele provin de la unitățile de producție care sunt considerate libere de *NPI*, tratamentul aplicat la *inocula* serului antivirusului de *NPI* nu este necesar.

#### III.2. *Inocularea culturilor celulare*

III.2.1. Celulele de SHK-1 (80 pasaje sau mai puțin) ori celulele de TO vor fi cultivate într-un mediu de L-15, care conține 5% ser de fetus bovin, 2% (v/v) 200 mM de L-glutamină și 0,08% (v/v) de 2-mercaptoetanol la 50 mM, pe lame de cultură cu 12 sau 24 de godeuri. Celelalte tulpini celulare ale căror eficacitate și sensibilitate sunt dovedite pentru izolarea virusului AIS pot fi folosite, luându-se în considerare variațiile și abilitatea acestor linii de a se reproduce în diferite tulpini celulare. Suspensia de organe tratată cu antiser trebuie inoculată într-o cultură celulară tânără aflată în faza de creștere activă, pentru a da o

diluție finală de material tisular într-un mediu de cultură la 1:1.000. Pentru fiecare suspensie de organe se vor adăuga 40 μl inoculat într-un godeu ce conține 2 ml de mediu de cultură. Pentru a reduce riscul contaminării încrucișate este recomandat să se folosească lame separate de 12 sau 24 de godeuri pentru probele provenite de la diferite locații de ferme piscicole.

III.2.2. O lamă trebuie lăsată neinoculată pentru a servi drept martor negativ. O altă lamă va fi inoculată cu un izolat de referință al virusului AIS ca martor pozitiv, după cum urmează: se vor inocula 100 μl de preparat al virusului AIS (titrat minim 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) în primul godeu și se amestecă bine. Un volum din acest material va fi transferat din primul godeu pe cel de-al doilea pentru a se obține o diluție de 1:10 bine amestecată. Această operație se va repeta pe toate plăcile pentru a se obține 6 diluții 1:10. Stocul (preparația mamă) de virus AIS poate fi păstrat la temperatura de —80°C pentru cel mult 2 ani, dar în momentul decongelării trebuie folosit în cel mult 3 zile. **Notă:** se va avea grijă să se prevină contaminarea încrucișată a probelor cu materialul martorului pozitiv. Pentru evitarea acestui risc, martorii pozitivi se vor așeza separat și se vor manipula separat de lamele de testat.

III.2.3. Probele trebuie incubate la temperatura de 14 ± 2°C pentru cel mult 15 zile.

#### III.3. *Examenul microscopic*

Folosindu-se un microscop, se vor examina de două ori culturi celulare pentru decelarea *ECP*, prima dată între a 5-a și a 7-a zi și apoi între a 12-a și a 14-a zi după inoculare. Dacă un amestec prezintă *ECP*, se va iniția imediat procedura de identificare a virusului, după cum se arată la pct. III.6. Dacă nu se observă nici o urmă de *ECP* în a 14-a zi, se va executa un test de hemabsorbție menționat la pct. III.4.

#### III.4. *Hemabsorbția*

Reproducerea virusului AIS în culturi celulare nu are întotdeauna ca rezultat apariția *ECP*. De aceea, fiecare godeu va face obiectul testului hemabsorbției descris mai jos sau, alternativ, fiecare godeu va face subiectul unui test I.F. descris, menționat la pct. III.6.1.

III.4.1. Mediul de cultură celulară va fi prelevat din fiecare godeu, inclusiv martorii pozitivi și negativi, și fiecare prelevare va fi pusă într-un tub steril etichetat. Se vor adăuga în fiecare godeu 500 μl 0,2% (v/v) suspensie de globule roșii spălate din sânge de iepure sau cal ori o suspensie de 0,05% (v/v) de globule roșii spălate din sânge de păstrăv-curcubeu sau de somon de Atlantic și se lasă la incubat la temperatura camerei timp de 45 de minute. Celulele roșii vor fi îndepărtate și fiecare godeu va fi spălat de câte două ori cu mediul L-15. Fiecare godeu va fi examinat la microscop.

III.4.2. Prezența ciorchinului de globule roșii aderând la suprafața celulelor de SHK-1 sau TO va indica prezența probabilă a infecției cu ortomyxovirus. Dacă testul hemabsorbției este pozitiv, se va executa imediat un test de identificare cu virus, după cum este menționat la pct. III.6.

### III.5. *Subcultivare sau reînsămânțare*

III.5.1. Subcultivarea se va efectua între a 13-a și a 15-a zi. Se vor adăuga 225  $\mu$ l supernatant de cultură în godeurile care conțin celule proaspete de SHK-1 în faza activă de creștere, pe lame de 12 godeuri, apoi se lasă la incubat, la temperatura de  $14 \pm 2^\circ\text{C}$  cel mult 18 zile. Folosindu-se un microscop, culturile celulare se vor examina de două ori pentru ECP, între cea de-a 5-a și cea de-a 7-a zi și între cea de-a 14-a și cea de-a 18-a zi după inoculare. Dacă vreun amestec prezintă ECP, imediat va fi inițiată procedura de identificare a virusului menționată la pct. III.6. Dacă nu se observă prezența ECP între cea de-a 14-a și cea de-a 18-a zi, se va executa un test de hemabsorbție, după cum se prevede la pct. III.4.

III.5.2. Dacă se produce un efect citotoxic în primele 7 zile de incubare, subcultivarea se va executa în acest stadiu și celulele trebuie incubate 14–18 zile și subcultivate din nou cu încă o incubare de 14–18 zile. Dacă efectul citotoxic apare după 7 zile, subcultivarea se va mai executa o singură dată și celulele vor fi incubate pentru a se obține un total de 28–36 de zile de incubare de la prima inoculare.

III.5.3. Dacă apare contaminarea bacteriană în cultura primară, testul trebuie reluat folosindu-se omogenatul de țesut stocat la temperatura de  $-80^\circ\text{C}$ . Înaintea inoculării omogenatul de țesut este centrifugat la 4.000 x g timp de 30 de minute la o temperatură cuprinsă între 0 și  $6^\circ\text{C}$  și supernatantul este filtrat la 0,22  $\mu\text{m}$ . Dacă contaminarea bacteriană apare în timpul subcultivării, supernatantul va fi filtrat la 0,22  $\mu\text{m}$ , inoculat pe celule proaspete și incubat încă 14–18 zile.

### III.6. *Testele de identificare a virusului*

Dacă se observă ECP în orice stadiu sau dacă testul hemabsorbției este pozitiv, se va efectua identificarea virusului. Metodele de identificare a virusului AIS disponibile sunt: testul imunofluorescenței IF, menționat la pct. III.6.1, și testul PCR-RT, menționat la pct. IV. Dacă se consideră că pot fi prezente alte virusuri se recomandă efectuarea unor teste suplimentare pentru identificarea acestora. Dacă aceste teste nu permit identificarea cu precizie a virusului în mai puțin de o săptămână, supernatantul trebuie expediat către un laborator național de referință sau către un laborator de referință al Uniunii Europene specializat în bolile peștelui pentru a se identifica imediat virusul.

#### III.6.1. Imunofluorescența (IF)

III.6.1.1. Celulele SHK-1 (80 pasaje sau mai puțin) sau celulele de TO vor fi cultivate într-un mediu L-15 care conține: 5% ser de fetus bovin, 2% (v/v) de L-glutamină la 200 mM și 0,08% (v/v) de 2-mercaptoetanol la 50 mM în 24 sau 96 godeuri, cu o densitate care să producă o confluență mai mare de 50%. Pot fi, de asemenea, folosite alte linii celulare sau medii de creștere cu eficacitate dovedită. Se vor adăuga 225  $\mu$ l de supernatant de cultură ce se presupune a fi infectată cu virus în fiecare din cele două godeuri, se amestecă și se transferă 225  $\mu$ l pe

următoarele două godeuri la o diluție de 1:5. Două godeuri suplimentare vor fi lăsate neinoculate pentru a servi drept martor. Probele de la fiecare fermă piscicolă vor fi lucrate pe lame separate, la fel și cele care servesc drept martori. Virusul se controlează folosindu-se un izolat de referință al virusului AIS.

III.6.1.2. Lamelele vor fi incubate la  $14 \pm 2^\circ\text{C}$  și examinate microscopic în timp de cel mult 7 zile. Dacă se observă ECP într-un stadiu incipient sau dacă acest lucru nu apare în timpul celor 7 zile, următoarea etapă va fi fixarea. Pentru aceasta, godeurile vor fi spălate cu PBS și fixate prin incubare cu acetonă 80% timp de 20 de minute la temperatura camerei. Lamelele vor fi uscate la aer și colorate imediat sau stocate la o temperatură cuprinsă între 0 și  $6^\circ\text{C}$  pentru maximum 24 de ore înainte de colorare.

III.6.1.3. Duplicatale godeurilor vor fi colorate cu anticorpi monoclonali 3H6F8 de virusul AIS sau orice alt anticorp monoclonal ale cărui eficacitate și specificitate au fost dovedite, diluate în PBS și incubate la temperatura de  $37 \pm 4^\circ\text{C}$  timp de 30 de minute. Anticorpii monoclonali vor fi îndepărtați și lamelele vor fi spălate de trei ori cu Tween 20 0,05% în PBS. Conjugatul IgG marcat cu FITC (izotiocianat de fluoresceină) antișoarece diluat în PBS trebuie adăugat în fiecare godeu și incubat la temperatura de  $37 \pm 4^\circ\text{C}$  timp de 30 de minute. Notă: diluțiile de la loturi diferite de anticorpi monoclonali și conjugatul FITC trebuie optimizate în fiecare laborator.

III.6.1.4. Godeurile trebuie examinate imediat, folosindu-se un microscop inversat, echipat pentru examinarea fluorescenței cu un filtru corespunzător pentru stimularea FITC. Un test este considerat pozitiv dacă se observă celule fluorescente. Pentru ca un test să fie valid trebuie ca martorii pozitivi să dea un rezultat pozitiv, iar cei negativi rezultat negativ.

### IV. **Examinarea probelor prin PCR-RT**

IV.1. Această secțiune descrie procedura cerută pentru amplificarea PCR a unei părți a segmentului 8 al genomului virusului AIS care poate fi efectuată pe țesut de pește sau în cultura de virus AIS.

#### IV.1.1. Extracția ARN

a) Se îndepărtează ARN-ul de pe fiecare probă. Se adaugă 1 ml de apă distilată tratată cu DEPC în fiecare tub, iar apoi toate tuburile vor fi centrifugate la 13.000 rpm timp de 5 minute la o temperatură cuprinsă între 0 și  $6^\circ\text{C}$ .

b) Se va îndepărta supernatantul de pe fiecare probă, apoi se vor adăuga 800  $\mu$ l TRIzol (Invitrogen) sau un alt reactiv, care s-a dovedit a fi echivalent sau mai eficient, pe fiecare probă și într-un tub conținând material de control corespunzător (400  $\mu$ l de apă distilată sau omogenat de rinichi prelevat de la peștii indemni de organisme patogene). Dacă este necesar, țesuturile vor fi dissociate prin pipetări repetate. Tuburile vor fi incubate la temperatura camerei timp de 5 minute. Se vor adăuga în fiecare tub câte 160  $\mu$ l de cloroform, acestea vor fi foarte bine agitate timp de 3 minute, apoi vor fi centrifugate la

13.000 rpm timp de 15 minute, la o temperatură cuprinsă între 0 și 6°C.

c) Stratul apos superior va fi transferat într-un microtub de 1,5 ml etichetat, conținând 500  $\mu$ l izopropanol, și tuburile vor fi incubate timp de 10 minute la temperatura camerei, apoi centrifugate la 6.500 rpm timp de 15 minute la o temperatură cuprinsă între 0 și 6°C.

d) Supernatantul va fi îndepărtat și se va adăuga 1 ml etanol 75% pe tableta de ARN. Tuburile vor fi apoi centrifugate la 6.500 rpm timp de 15 minute, la o temperatură cuprinsă între 0 și 6°C.

e) Supernatantul se îndepărtează, iar tuburile vor fi lăsate deschise aproximativ 3 minute pentru a permite etanolului rezidual să se evapore. Se vor adăuga 15  $\mu$ l de apă distilată tratată cu DEPC pentru a suspenda din nou granula și, dacă este necesar, se supune unei scurte centrifugări.

f) Se va folosi un spectrofotometru pentru a se calcula concentrația de ARN, precum și gradul de puritate al probelor. Densitățile optice se măsoară la 260 și 290 nm.

g) ARN-ul care trebuie folosit imediat (în aceeași zi) poate fi totuși stocat temporar la o temperatură cuprinsă între 0 și 6°C. ARN care nu este utilizat imediat va fi stocat la temperatura de -80°C.

#### IV.1.2. Transcripția inversă (RT)

a) Vor fi diluate 2  $\mu$ g de ARN în apă distilată tratată cu DEPC într-un tub de 1,5 ml. Când concentrația de ARN a unei probe este prea mare pentru a permite utilizarea a 2  $\mu$ g în reacția RT, se va utiliza cantitatea maximă posibilă de ARN. ARN diluat va fi incubat la o temperatură cuprinsă între 55 și 60°C timp de 10 minute.

b) Tuburile care conțin ARN vor fi plasate pe gheață și se vor adăuga reactivi RT pentru a da concentrația finală de 1 xtampon, 1 mM dNTPs, 100 ng hexamer aleatoriu, 20 U RNase inhibitor și 200 U MMLV-TR în volum total de 20  $\mu$ l.

c) Tuburile vor fi incubate la temperatura de 37°C timp de o oră.

d) ADNc va fi stocat la o temperatură cuprinsă între 0 și 6°C atâta timp cât este necesar și va fi utilizat în PCR cât de curând este posibil.

#### IV.1.3. PCR

a) Se vor adăuga 5  $\mu$ l de ADNc la 45  $\mu$ l amestec PCR pentru a da concentrația finală de 1 xtampon 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM pentru fiecare dNTP, 25 pmol pentru fiecare primer și 1 U de Taq polimerază. Primerii sunt: ISA+(5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (primerul sens) și ISA-(5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (primerul contrasens). Controalele negative pentru extragerea RT și PCR trebuie să fie realizate.

b) Tuburile vor fi plasate într-un termociclu programat la temperatura de 94°C timp de 5 minute, urmând apoi 35 de cicluri la 94°C timp de un minut, la 55°C timp de un minut, la 72°C timp de un minut, cu o incubare finală la 72°C timp de 5 minute.

c) Rezultatul PCR va fi evaluat în urma electroforezei, folosindu-se un gel de agar 2% colorat cu bromură de etidium și incluzând semne paralele marcate de-a lungul probelor și controlul negativ pentru etapele RT și PCR. Un singur produs de PCR de 155 pb va fi considerat un indicativ pentru prezența ARN al virusului AIS. Probele care conțin un produs suplimentar de 310 pb vor fi, de asemenea, considerate a conține ARN al V virusului AIS. Probele care produc produse multiple PCR, incluzând cel puțin unul de aproximativ 155 pb, pot conține ARN al virusului AIS. Acestea pot fi investigate în continuare, folosindu-se probele de ADN sau secvența nucleotidelor.

IV.1.4. Confirmarea prin PCR a virusului AIS izolat în cultură tisulară

Dacă un efect citopatic (ECP) complet a fost observat în cursul examinării virusologice a probelor de țesut în celulele SHK-1, se vor îndepărta 400  $\mu$ l de supernatant de pe godeu și vor fi puse într-un tub steril de 1,5 ml. Se va extrage ARN din această probă, după cum s-a arătat la pct. III.1, și se va efectua testul PCR-RT. Dacă sunt folosite culturi fără CPE complet, supernatantul va fi îndepărtat, celulele vor fi răzuite de pe suprafața godeului sau flaconului și plasate într-un tub steril de 1,5 ml pentru a se extrage ARN și a se efectua un test PCR-RT.

IV.1.5. Confirmarea produselor de PCR cu ajutorul probelor ADN

a) Specificitatea unui produs PCR de 155 pb poate fi evaluată prin probarea unei oligonucleotide care hibridează într-o regiune a produsului PCR, excluzându-se. Produsele PCR vor face obiectul electroforezei în gel de agar 1%, în paralel cu marcarea mărimii și cu un control pozitiv și unul negativ pentru etapele RT și PCR.

b) ADN va fi supus reacției Southern-blot pe o membrană și oligonucleotidele marcate (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') vor fi incubate cu membrană, după etapele corespunzătoare prehibridării.

c) Probele nefixate și cele fixate nespecific vor fi spălate de pe membrană, iar probele fixate vor fi vizualizate.

d) Probele fixate pe un fragment de 155 pb (și 310 pb dacă este prezent) vor fi evidențiate pentru specificitatea PCR și indică faptul că ARN virusul AIS a fost prezent în probă.

#### IV.1.6. Secvențierea nucleotidică a produselor PCR

Specificitatea produselor de PCR poate fi evaluată prin examinarea secvenței nucleotidelor din produsul PCR de 155 pb.

a) Produsul PCR va fi curățat de gel de agar sau de soluție.

b) Fragmentul va fi secvențiat, folosind aceiași primeri ca cei utilizați pentru reacția PCR sau primeri vectori, dacă fragmentul a fost clonat într-un vector înaintea secvențierii.

c) Secvența nucleotidelor va fi comparată cu cea a segmentului 8 al virusului AIS, disponibilă în baza de date

EMBL pentru secvențe nucleotidice (la numerele de acces Y10404, AJ012285, AJ242016).

d) Prezența secvenței corespunzătoare celei a segmentului 8 al virusului AIS este o dovadă a faptului că proba conține ARN al virusului AIS.

#### V. Examinarea amprentelor renale prin testul IAF

V.1. *Următorul protocol a fost stabilit pentru examinarea amprentelor renale prin testul IAF*

##### V.2. Prepararea și colorarea amprentelor

V.2.1. Lamelele vor fi fixate în acetona sau în metanol/acetona (1:1) timp de 3 minute și apoi uscate în aer. Înainte de colorare fiecare lamelă va fi examinată, iar zonele corespunzătoare ale fiecărei lamele vor fi încercuite cu ajutorul unui creion ImmEdge™ sau cu unul similar acestuia și lăsate să se usuce în aer. Lamelele vor fi apoi plasate într-o soluție de blocare (lapte smântânit 6% în PBS conținând Tween 20 0,2%) și incubate împreună cu o agitare ușoară timp de 30 de minute la temperatura camerei. Fiecare lamelă va fi uscată și plasată orizontal într-o cutie glisieră care conține hârtie umedă pentru a menține o atmosferă umedă.

V.2.2. Fiecare amprentă va fi acoperită cu o soluție de anticorp monoclonal 3H6F8 contra virusului AIS (sau orice alt anticorp cu eficacitate și specificitate dovedite) și cutia glisieră va fi închisă și incubată cu agitare timp de 60 de minute la temperatura camerei. În mod normal, anticorpul va fi diluat 1:10 și 1:100 în lapte smântânit 1%, însă diluția reală trebuie determinată pentru fiecare lot. Lamelele vor fi spălate de câte 3 ori timp de două minute în PBS conținând 0,1% Tween 20. Fiecare amprentă va fi acoperită cu o soluție conținând conjugat de capră antișoarece colorat FITC, diluat 1:1.000 în lapte smântânit 1%, și incubată într-o atmosferă umedă timp de 60 de minute la temperatura camerei. Lamelele vor fi spălate de câte 3 ori timp de două minute în PBS conținând 0,1% Tween 20. Fiecare lamelă va fi acoperită cu o soluție de Citifluortm [500 μl Citifluortm amestecat cu 1,5 ml de Tween 20 0,1% (v/v) în PBS] sau cu orice alt mediu de fixare potrivit, timp de 10 minute. Lamelele vor fi spălate de 3 ori în PBS conținând 0,1% Tween 20. Dacă este necesară o contracolorație, fiecare amprentă poate fi acoperită cu iodură de propidium (0,01 mg/ml) în PBS conținând 0,1% Tween 20 și incubată timp de 3 minute la temperatura camerei. Lamelele vor fi spălate de 3 ori câte două minute în PBS conținând 0,1% Tween 20. Lamelele vor fi uscate și fixate în Citifluortm sau în orice alt mediu de fixare potrivit. Lamelele vor fi stocate în întuneric la temperatura de 4°C înainte de examinarea la microscop.

##### V.3. Examinarea la microscop folosind fluorescența

Fiecare lamelă va fi examinată la un microscop adecvat pentru epifluorescență, folosindu-se un filtru potrivit care va excita FITC producând un verde caracteristic, fluorescent. Toate câmpurile din zonele definite de creionul ImmEdge™ vor fi examinate sub obiective x 10 și x 20 și zonele suspecte (cele care prezintă un verde fluorescent) vor fi în continuare examinate sub un obiectiv x 40 și cu iluminare fluorescentă/fază pentru a se asigura că fluorescența este

bine localizată în celule. Coordonatele zonelor suspecte vor fi înregistrate pentru o confirmare ulterioară a naturii fluorescenței de către un al doilea examinator. După citirea primului examinator, lamelele care sunt pozitive sau cele suspecte vor fi reexaminare de un al doilea examinator și rezultatele confirmate.

##### V.4. Controlul

V.4.1. Trebuie efectuate 3 tipuri de controale pentru fiecare lot de lamele colorate pentru TIAF:

- amprente renale de la somonul de Atlantic neinfestat (control negativ);
- culturile celulare SHK-1 neinfestate sau orice alte culturi celulare sensibile (control negativ);
- culturile celulare SHK-1 afectate de virusul AIS sau orice alte culturi celulare sensibile (control pozitiv).

V.4.2. Dacă este posibil, se recomandă ca o amprentă renală de la un somon de Atlantic infestat cu virusul AIS să fie supusă unui control pozitiv suplimentar.

V.4.3. Dacă un rezultat pozitiv este obținut în orice control negativ, testul este considerat invalid pentru toate lamelele care compun acel lot. Dacă toate lamelele din lot, supuse unui control pozitiv, sunt negative, testul este considerat invalid pentru toate lamelele care compun lotul respectiv. În cazul nereușitei controlului unui lot de lamele, acesta va fi distrus și se va efectua o retestare folosindu-se duplicatele de amprente.

##### V.5. Examinarea altor țesuturi

Această tehnică poate fi aplicată altor țesuturi de pește, cum ar fi ficatul, splina și inima, cu condiția ca o cantitate corespunzătoare de celule endoteliale, leucocite sau limfocite să poată fi depozitată pe lamelă. Procedura standard rămâne aceeași pentru fiecare țesut, deși pentru unele țesuturi este de preferat omiterea colorației cu iodură de propidium recurgând la iluminarea în faze pentru identificarea tipului de celule prezente pe amprentă.

#### VI. Histologia

Secțiunile incluse în parafină vor fi tăiate la 5 μm și colorate, folosindu-se hematoxilină și eosină. Schimbările histologice asociate cu AIS sunt descrise în ediția curentă a „Manualului OIE de diagnostic al bolilor animalelor acvatice“.

#### VII. Acronime și abrevieri

ADNc	Acid deoxiribinucleic complementar
ECP	Efect citopatic
DEPC	Dietilpropocarbonat
dNTP	Deoxinucleotidă trifosfat
IF	Imunofluorescență
TIAF	Testul indirect cu anticorpi fluorescenți
OIE	Oficiul Internațional de Epizootii
VNPI	Virusul necrozei pancreatice infecțioase
PBS	Tampon fosfat salin
ARN	Acid ribonucleic
PCR-RT	Reacția lanțului polimeric (transcripția reversibilă)
SHK-1	Celulele de rinichi anterior de somon
TCID50	Doza infectantă pentru 50% din culturile celulare

MINISTERUL AGRICULTURII, PĂDURILOR ȘI DEZVOLTĂRII RURALE

**ORDIN****privind completarea anexei la Ordinul ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale nr. 149/2005 pentru aprobarea Listei cuprinzând agențiile autorizate de clasificare a carcaselor de porcine, bovine și ovine, cu completările ulterioare**

Având în vedere prevederile art. 9 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 267/2004 privind instituirea Sistemului de clasificare a carcaselor de porcine, bovine și ovine, cu modificările și completările ulterioare, văzând propunerile privind agențiile de clasificare, făcute de Comisia de clasificare a carcaselor de porcine, bovine și ovine și transmise prin Procesul-verbal nr. 44/2006, precum și Referatul de aprobare nr. 100.460 din 5 aprilie 2006, în temeiul Hotărârii Guvernului nr. 155/2005 privind organizarea și funcționarea Ministerului Agriculturii, Pădurilor și Dezvoltării Rurale, cu modificările și completările ulterioare,

**ministrul agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale** emite următorul ordin:

**Art. I.** — Anexa la Ordinul ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale nr. 149/2005 pentru aprobarea Listei cuprinzând agențiile autorizate de clasificare a carcaselor de porcine, bovine și ovine, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 214 din 14 martie 2005, cu completările ulterioare, se completează cu trei noi poziții, pozițiile 15, 16 și 17, cu următorul cuprins:

„15. Societatea Comercială MATEMAR ZOOTECH CLAS — S.R.L.	18464798	Pitești, Str. Gârlei bl. P16A, sc. A, ap. 3, județul Argeș
16. Societatea Comercială ZOO EXPERT — S.R.L.	17384089	Satul Ucea de Jos nr. 1A, corpul A, ap. 1, comuna Ucea, județul Brașov
17. Societatea Comercială RALEX CONCEPT — S.R.L.	18429596	București, Str. Lăstărișului nr. 28, bl. B2, sc. C, et. 8, ap. 123, sectorul 1 <sup>a</sup>

**Art. II.** — Prezentul ordin se publică în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Ministrul agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale,  
**Gheorghe Flutur**

București, 5 aprilie 2006.  
Nr. 232.

★

**RECTIFICĂRI**

În Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 220 bis din 10 martie 2006 se face următoarea rectificare (care aparține Redacției „Monitorul Oficial, Partea I”):

— *Procedura de implementare a Programului de dezvoltare și modernizare a activităților de comercializare a produselor și serviciilor de piață, anexă la Ordinul președintelui Agenției Naționale pentru Întreprinderi Mici și Mijlocii și Cooperatie nr. 54/2006, se va citi ca anexă la Ordinul președintelui Agenției Naționale pentru Întreprinderi Mici și Mijlocii și Cooperatie nr. 55/2006, iar Procedura de implementare a Programului național multianual pe perioada 2006—2009 pentru susținerea accesului microîntreprinderilor și a întreprinderilor mici la servicii de instruire și consultanță, anexă la Ordinul nr. 55/2006, se va citi ca anexă la Ordinul nr. 54/2006.*

**EDITOR: PARLAMENTUL ROMÂNIEI — CAMERA DEPUTAȚILOR**

Regia Autonomă „Monitorul Oficial”, Str. Parcului nr. 65, sectorul 1, București; C.U.I. 427282; Atribut fiscal R, IBAN: RO75RNCB5101000000120001 Banca Comercială Română — S.A. — Sucursala „Unirea” București și IBAN: RO12TREZ7005069XXX000531 Direcția de Trezorerie și Contabilitate Publică a Municipiului București (alocat numai persoanelor juridice bugetare)

Tel. 318.51.29/150, fax 318.51.15, E-mail: marketing@ramo.ro, Internet: www.monitoruloficial.ro

Adresa pentru publicitate: Centrul pentru relații cu publicul, București, șos. Panduri nr. 1, bloc P33, parter, sectorul 5, tel. 411.58.33 și 410.47.30, tel./fax 410.77.36 și 410.47.23

Tiparul: Regia Autonomă „Monitorul Oficial”



5 948368 115033