II

(Neleģislatīvi akti)

LĒMUMI

KOMISIJAS ĪSTENOŠANAS LĒMUMS (ES) 2015/1554

(2015. gada 11. septembris),

ar ko nosaka noteikumus Direktīvas 2006/88/EK piemērošanai attiecībā uz uzraudzībai un diagnostikas metodēm izvirzītajām prasībām

(izziņots ar dokumenta numuru C(2015) 6188)

(Dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Padomes 2006. gada 24. oktobra Direktīvu 2006/88/EK par akvakultūras dzīvniekiem un to produktiem izvirzītajām dzīvnieku veselības prasībām, kā arī par konkrētu ūdensdzīvnieku slimību profilaksi un kontroli ([1]) un jo īpaši tās 49. panta 3. punktu, 50. panta 4. punktu, 57. panta b) punktu un 61. panta 3. punktu,

tā kā:

(1) Direktīva 2006/88/EK nosaka minimālos profilaktiskos pasākumus attiecībā uz šīs direktīvas IV pielikumā minēto sarakstā iekļauto slimību ("sarakstā iekļautās slimības") uzraudzību un agrīnu konstatēšanu ūdensdzīvnieku organismos un kontroles pasākumus, kas jāizmanto gadījumos, kur ir aizdomas par sarakstā iekļautajām slimībām vai to uzliesmojums. Tā nosaka arī prasības attiecībā uz statusa "slimības neskarts" iegūšanu dalībvalstīm vai to zonām vai iecirkņiem.

(2) Sarakstā iekļauto slimību izskaušanai un statusa "slimības neskarts" iegūšanai attiecībā uz dalībvalsti, zonu vai nodalījumu būtu jānotiek, visā Savienībā balstoties uz vieniem un tiem pašiem principiem un vienu un to pašu zinātnisko pieeju. Minētā iemesla dēļ ir nepieciešams Savienības līmenī noteikt specifiskas prasības attiecībā uz izskaušanas un uzraudzības shēmām un paraugu ņemšanas un diagnostikas metodēm, kas dalībvalstīm jāizmanto, lai visai dalībvalstij vai tās zonai vai iecirknim iegūtu statusu "slimības neskarts".

(3) Laboratoriskiem izmeklējumiem, kas jāveic gadījumā, kur ir aizdomas par sarakstā iekļauto slimību klātbūtni vai tās ir apstiprinātas, Savienības līmenī vajadzētu būt vienādiem un tajos būtu jāievēro vieni un tie paši zinātniskie standarti un protokoli. Saskaņā ar Direktīvu 2006/88/EK ir nepieciešams noteikt specifiskas diagnostikas metodes un procedūras, kas jāizmanto laboratorijām, kuras šim nolūkam izraudzījusi dalībvalsts kompetentā iestāde.

(4) Pasaules Dzīvnieku veselības organizācijas (*OIE*) pieņemtajā Ūdensdzīvnieku veselības kodeksā ir noteikti standarti, kuru nolūks ir visā pasaulē uzlabot ūdensdzīvnieku veselību un saimniecībās audzēto zivju labturību, to vidū arī standarti, kas reglamentē ūdensdzīvnieku un to produktu drošu starptautisku tirdzniecību. Vairākās Ūdensdzīvnieku veselības kodeksa nodaļās ir ieteikumi par noteiktu diagnostisku testu lietošanu. Šādi *OIE* testi ir aprakstīti *OIE* Ūdensdzīvnieku slimību diagnostikas rokasgrāmatā ("Ūdensdzīvnieku diagnostikas rokasgrāmatā"). Lai nodrošinātu, ka Savienības prasības attiecībā uz ūdensdzīvnieku slimību diagnosticēšanu atbilst starptautiskajiem standartiem, šajā lēmumā noteiktajos noteikumos būtu jāņem vērā Ūdensdzīvnieku veselības kodeksa standarti un ieteikumi.

([1]) OV L 328, 24.11.2006., 14. lpp.

(5) Jāmin, ka attiecībā uz daudzām sarakstā iekļautajām slimībām Ūdensdzīvnieku diagnostikas rokasgrāmatā ir sniegti vairāki laboratoriskos izmeklējumos izmantojami testi un procedūras. Lai Savienības līmenī attiecībā uz sarakstā iekļautajām slimībām unificētu diagostiskā darba zinātnisko bāzi, nepieciešams izvēlēties diagnostikas testus un procedūras no *OIE* ieteiktajiem un norādīt, kuriem vajadzētu būt obligātajiem testiem attiecībā uz to, lai veiktu laboratoriskus izmeklējumus uzraudzības programmās un izslēgtu vai apstiprinātu aizdomas par sarakstā iekļauto slimību klātbūtni. Lai gan dažos gadījumos būs nepieciešamas alternatīvas metodes un procedūras, būtu jāsniedz apraksti un daži zinātniski paskaidrojumi par to, kad un kā šīs alternatīvās metodes varētu izmantot. Īpaši nepieciešams tas varētu būt attiecībā uz detalizētākajām diagnostikas procedūrām.

(6) Lai iegūtu precīzus un atkārtojamus diagnostiskus rezultātus, ir svarīgi, lai izmantojamās detalizētās procedūras un protokoli būtu validēti saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK VI pielikuma I daļā minētajiem attiecīgajiem kvalitātes standartiem. Attiecībā uz daudzām šajā lēmumā paredzētajām diagnostikas metodēm diagnostikas protokolos noteikti jāizmanto tirdzniecībā pieejami testēšanas komplekti, ko Eiropas references laboratorijas (*EURL*) ir validējušas attiecīgajām slimībām paredzētos akreditētos testos. Juridiskās noteiktības labad šajā lēmumā būtu jāmin šo validēto tirdzniecībā pieejamo testēšanas komplektu tirdzniecības nosaukumi.

(7) Dažām dalībvalstīm var būt sarežģīti vienas vai vairāku sarakstā iekļauto slimību sakarā iegūt statusu "slimības neskarts" attiecībā uz visu savu teritoriju vai savām zonām vai iecirkņiem. Šādās situācijās dalībvalsts varbūt izvēlēsies attiecībā uz šīm sarakstā iekļautajām slimībām statusu "slimības neskarts" neiegūt vai neatgūt. Gadījumos, kur attiecīgā dalībvalsts nevēlas iegūt vai atgūt statusu "slimības neskarts", Savienības līmenī būtu jāpiemēro šiem gadījumiem paredzēti vienādi minimālie kontroles pasākumi, un tajos būtu jāvadās pēc vieniem un tiem pašiem kritērijiem. Tāpēc ir nepieciešams saskaņā ar Direktīvu 2006/88/EK noteikt detalizētus noteikumus šo sarakstā iekļauto slimību ierobežošanai un minimālās prasības šo ierobežošanas pasākumu atcelšanai.

(8) Komisijas Lēmums 2001/183/EK ([1]) nosaka prasības attiecībā uz paraugu ņemšanas plāniem un diagnostikas metodēm, kas paredzēti sarakstā iekļauto slimību infekciozās hematopoētiskās nekrozes un virusālās hemorāģiskās septicēmijas konstatēšanai un apstiprināšanai. Komisijas Lēmums 2003/466/EK ([2]) nosaka prasības attiecībā uz paraugu ņemšanas plāniem un diagnostikas metodēm, kas paredzēti lašu infekciozās anēmijas konstatēšanai, kā arī zonēšanas un oficiālās uzraudzības kritērijus gadījumos, kur ir aizdomas par minētās slimības klātbūtni, vai kur tā apstiprināta. Komisijas Lēmums 2002/878/EK ([3]) nosaka prasības attiecībā uz paraugu ņemšanas plāniem un diagnostikas metodēm, kas paredzēti gliemeņu slimību bonamiozes un marteiliozes konstatēšanai un apstiprināšanai. Lai šīs prasības atjauninātu, minētie trīs lēmumi būtu jāaizstāj ar šo Lēmumu. Attiecīgi Lēmums 2001/183/EK, Lēmums 2002/878/EK un Lēmums 2003/466/EK būtu jāatceļ.

(9) Dažām dalībvalstīm ir vajadzīgs laiks savu valsts references laboratoriju atjaunināšanai tā, lai varētu pildīt šajā lēmumā noteiktās prasības, tāpēc tas būtu jāpiemēro no 2016. gada 1. aprīļa.

(10) Šajā lēmumā noteiktie pasākumi ir saskaņā ar Augu, dzīvnieku, pārtikas aprites un dzīvnieku barības pastāvīgās komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO LĒMUMU.

1. pants

Priekšmets

Šis lēmums nosaka noteikumus par:

a) uzraudzību, buferzonām, paraugu ņemšanas un diagnostikas metodēm, kas dalībvalstīm jāizmanto attiecībā uz dalībvalstu vai to zonu vai iecirkņu slimības statusu Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļas sarakstā iekļauto neeksotisko ūdensdzīvnieku slimību sakarā ("sarakstā iekļautās slimības");

([1]) Komisijas 2001. gada 22. februāra Lēmums 2001/183/EK, ar ko nosaka paraugu ņemšanas plānus un diagnostikas metodes dažu zivju slimību atklāšanai un apstiprināšanai un ar ko atceļ Lēmumu 92/532/EEK (OV L 67, 9.3.2001., 65. lpp.).

([2]) Komisijas 2003. gada 13. jūnija Lēmums 2003/466/EK par zonēšanas un valsts uzraudzības kritērijiem, rodoties aizdomām par saslimšanu ar lašu infekciozo anēmiju (*ISA*) vai gūstot tam apstiprinājumu (OV L 156, 25.6.2003., 61. lpp.).

([3]) Komisijas 2002. gada 6. novembra Lēmums 2002/878/EK, ar ko nosaka paraugu ņemšanas plānus un diagnostikas metodes gliemju slimību bonamiozes (*Bonamia ostreae*) un marteiliozes (*Marteilia refringens*) noteikšanai un apstiprināšanai (OV L 305, 7.11.2002., 57. lpp.).

b) diagnostikas metodēm, kas jāizmanto laboratoriskos izmeklējumos, ja ir aizdomas par sarakstā iekļautu slimību klātbūtni vai tā jāapstiprina; un

c) minimālajiem kontroles pasākumiem, kas jāpiemēro, ja dalībvalstī, zonā vai iecirknī, kurš nav deklarēts par brīvu no kādas sarakstā iekļautas slimības, rodas aizdomas par šo slimību vai tā tiek apstiprināta.

2. pants

Definīcijas

Šajā lēmumā izmanto šādas definīcijas:

a) "virusālā hemorāģiskā septicēmija" ("*VHS*") ir slimība, ko izraisa virusālās hemorāģiskās septicēmijas vīruss (*VHSV*), pazīstams arī kā Egtveda vīruss, kurš pieder pie *Rhabdoviridae* dzimtas *Novirhabdovirus* ģints;

b) "infekciozā hematopoētiskā nekroze" ("*IHN*") ir slimība, ko izraisa pie *Rhabdoviridae* dzimtas *Novirhabdovirus* ģints piederošais infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīruss (*IHNV*);

c) "koiju herpesvīrusa slimība" ("*KHVD*") ir slimība, ko izraisa pie *Alloherpesviridae* dzimtas piederošais koiju herpesvīruss (*KHV*). Zinātniskais nosaukums ir karpu dzimtas sugu herpesvīruss 3 (*CyHV*-3);

d) "lašu infekciozā anēmija" ("*ISA*") ir slimība, ko izraisa inficēšanās ar lašu anēmijas vīrusu ar genotipu "īpaši polimorfais reģions (*HPR*) deletēts" (*ISAV*), kurš pieder pie *Orthomyxoviridae* dzimtas *Isavirus* ģints;

e) "inficēšanās ar *Marteilia refringens*" ir slimība, ko izraisa inficēšanās ar paramikseju protozoju *Marteilia refringens*;

f) "inficēšanās ar *Bonamia ostreae*" ir slimība, ko izraisa inficēšanās ar haplosporīdu protozoju *Bonamia ostreae*;

g) "balto plankumu slimība" ("*WSD*") ir slimība, ko izraisa balto plankumu sindroma vīruss (*WSSV*), kuram ir DNS dubultspirāle un kurš pieder pie *Nimaviridae* dzimtas *Whispovirus* ģints.

3. pants

Minimālās prasības attiecībā uz izskaušanas un uzraudzības programmām

Ja attiecībā uz vienu vai vairākām sarakstā iekļautajām slimībām dalībvalstij, tās zonai vai iecirknim ir jāpiešķir, jāatceļ vai jāatjauno statuss "slimības neskarts", dalībvalstis nodrošina, lai tiktu ievēroti I pielikumā noteiktie noteikumi par uzraudzības un izskaušanas programmām, buferzonām, paraugu ņemšanas metodēm un diagnostikas metodēm un II pielikumā noteiktās specifiskās metodes un detalizētās procedūras.

4. pants

Minimālās prasības attiecībā uz diagnostikas metodēm un specifiskajām procedūrām

Dalībvalstis nodrošina, ka laboratoriskos izmeklējumos ar nolūku apstiprināt vai izslēgt kādas sarakstā iekļautas slimības klātbūtni tiek izmantotas I pielikumā aprakstītās kontroles metodes un II pielikumā aprakstītās specifiskās diagnostikas metodes un detalizētās procedūras.

5. pants

Minimālie kontroles pasākumi attiecībā uz sarakstā iekļauto slimību ierobežošanu un minimālās prasības attiecībā uz ierobežošanas pasākumu atcelšanu dalībvalstīs, zonās vai iecirkņos, kas nav deklarēti par sarakstā iekļauto slimību neskartiem

Dalībvalstis nodrošina, ka, attiecībā uz vienu vai vairākām sarakstā iekļautajām slimībām dalībvalstī, tās zonā vai iecirknī, kurš nav deklarēts par minēto sarakstā iekļauto slimību neskartu, īstenojot šo slimību kontroles pasākumus un atceļot to ierobežošanas pasākumus, tiek izpildīti I pielikumā aprakstītie minimālie kontroles pasākumi un minimālās prasības attiecībā uz ierobežošanas pasākumu atcelšanu.

6. pants

Atcelšana

Lēmums 2001/183/EK, Lēmums 2002/878/EK un Lēmums 2003/466/EK tiek atcelti.

7. pants

Piemērošanas datums

Šo lēmumu piemēro no 2016. gada 1. aprīļa.

8. pants

Adresāti

Šis lēmums ir adresēts dalībvalstīm.

Briselē, 2015. gada 11. septembrī

Komisijas vārdā –
Komisijas loceklis
Vytenis ANDRIUKAITIS

I PIELIKUMS

UZRAUDZĪBAS UN KONTROLES METODES

I. **Ievads**

Šajā pielikumā aprakstītas:

a) prasības attiecībā uz Direktīvas 2006/88/EK 44. pantā paredzētajām izskaušanas un uzraudzības programmām un attiecībā uz paraugu ņemšanas un diagnostikas metodēm, kas jāizmanto, lai, kā paredzēts šīs direktīvas VII nodaļā, deklarētu, ka dalībvalstu, to zonu vai iecirkņu statuss ir "slimības neskarts";

b) paraugu ņemšanas un diagnostikas metodes, kas jāizmanto laboratoriskos izmeklējumos, kurus, kā paredzēts Direktīvas 2006/88/EK 28. panta a) punktā un 57. panta b) punktā, veic, ja ir aizdomas par minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītajām neeksotiskajām slimībām ("sarakstā iekļautās slimības"), un ar kuriem apstiprina to klātbūtni;

c) Direktīvas 2006/88/EK 39. pantā paredzētie ierobežošanas pasākumi, kas jāveic, ja tiek apstiprināta kādas sarakstā iekļautās slimības klātbūtne, un pasākumi, kas jāveic, lai dalībvalstij, zonai vai iecirknim, kuram ir V kategorijas veselības statuss, iegūtu III kategorijas veselības statusu.

Šā pielikuma prasības attiecas uz šādām sarakstā iekļautajām slimībām:

1.	Virusālā hemorāģiskā septicēmija (*VHS*)	1. daļa
2.	Infekciozā hematopoētiskā nekroze (*IHN*)	1. daļa
3.	Koiju herpesvīruss (*KHV*)	2. daļa
4.	Lašu infekciozā anēmija (*ISA*)	3. daļa
5.	*Marteilia refringens* infekcija	4. daļa
6.	*Bonamia ostreae* infekcija	5. daļa
7.	Balto plankumu slimība (*WSD*)	6. daļa

II. **Definīcijas**

Regulas I un II pielikumā izmanto šādas definīcijas:

a) "kontinentāls iecirknis" ir viena vai vairākas saimniecības, kuras atrodas vienas vai vairāku dalībvalstu kontinentālajā daļā, uz kurām attiecas kopīga biodrošības sistēma, un kurās ir ūdensdzīvnieku populācija ar savu noteiktu veselības statusu attiecībā uz kādu konkrētu slimību;

b) "kontinentāla saimniecība" ir saimniecība, kurā tur ūdensdzīvniekus un kura atrodas kādas dalībvalsts teritorijas kontinentālajā daļā;

c) "kontinentāla zona" ir vienas vai vairāku dalībvalstu kontinentālajā daļā esoša ģeogrāfiski precīza teritorija ar homogēnu hidroloģisko sistēmu, kas aptver ūdens sateces teritorijas daļas no iztekas(-ām) līdz dabiskam vai mākslīgam šķērslim, kurš nepieļauj ūdensdzīvnieku augšupēju migrēšanu no zemākiem ūdens sateces teritorijas posmiem, vai visu ūdens sateces teritoriju no iztekas(-ām) līdz grīvai, vai arī vairākas ūdens sateces teritorijas kopā ar to grīvām (jo grīva rada epidemioloģisku saikni starp sateces teritorijām);

d) "oficiāli deklarēta inficēta saimniecība" ir tāda ūdensdzīvniekus turoša saimniecība, kurā kompetentā iestāde saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 28. panta a) punktu, 29. pantu un 57. panta b) punktu ir apstiprinājusi vienu vai vairākas sarakstā iekļautās slimības;

e) "saskarē esoša saimniecība" ir saimniecība, kur tur ūdensdzīvniekus, par kuriem jebkādā veidā ir pierādīts vai ir spēcīgas aizdomas, ka tie ir kontaminēti ar infekciozu materiālu no saimniecības, kas oficiāli deklarēta par inficētu.

I DAĻA

UZRAUDZĪBAS UN KONTROLES METODES ATTIECĪBĀ UZ VIRUSĀLO HEMORĀĢISKO SEPTICĒMIJU (*VHS*) UN INFEKCIOZO HEMATOPOĒTISKO NEKROZI (*IHN*)

I. **Uzraudzības un izskaušanas programmām izvirzītās prasības, kas jāievēro, lai iegūtu un saglabātu veselības statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *VHS* un *IHN*, un ierobežošanas pasākumi attiecībā uz šīm sarakstā iekļautajām slimībām**

I.1. Vispārīgas prasības veselības pārbaudēm un paraugu ņemšanai attiecībā uz *VHS* un *IHN*:

a) veselības pārbaudes un attiecīgā gadījumā paraugu ņemšanu veic tādā gada laikā, kad ūdens temperatūra ir zem 14 °C, vai arī jebkurā laikā, kad ir varbūtīgi, ka ūdens temperatūra sasniegs gada zemākās vērtības;

b) ja saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu ir vajadzīga mērķorientēta savvaļas populāciju uzraudzība, paraugu ņemšanas punktu skaitu un ģeogrāfisko sadalījumu nosaka tā, lai būtu panākts saprātīgs dalībvalsts, zonas vai iecirkņa aptvērums. Paraugu ņemšanas punktiem reprezentatīvi jāpārstāv dažādās ekosistēmas, kurās atrodas pret slimību uzņēmīgo sugu savvaļas populācijas;

c) ja saimniecībās vai savvaļas populācijās veselības pārbaudes jāizdara vai paraugi jāņem vairāk nekā reizi gadā, starplaikiem starp veselības pārbaudēm un starp paraugu ņemšanām jābūt vismaz četriem mēnešiem un tik ilgiem, cik iespējams, ievērojot a) apakšpunkta prasības attiecībā uz temperatūru;

d) visās ražošanas vienībās (dīķi, cisternas, tīklu būri utt.) izdara veselības pārbaudes, kurās noskaidro, vai vienībās nav beigtu vai novājinātu zivju vai zivju ar anormālu izturēšanos. Īpaša uzmanība jāpievērš ūdens izplūdes zonai, kur straumes dēļ parasti uzkrājas vairāk novājinātu zivju;

e) uzņēmīgu sugu zivis paraugiem izraugās šādi:

i) ja zivju vidū ir varavīksnes foreles, paraugam ņem tikai šīs sugas zivis, ja vien nav citu uzņēmīgu sugu, kam vērojamas tipiskas *VHS* vai *IHN* pazīmes; ja varavīksnes foreļu nav, paraugam jābūt reprezentatīvam attiecībā uz visām citām pārstāvētajām uzņēmīgajām sugām;

ii) ja sastopamas novājinātas zivis, zivis ar anormālu uzvedību vai nesen nobeigušās (taču nesadalījušās) zivis, izraugās tās; ja zivju audzēšanai izmanto vairāk nekā vienu ūdensapgādes avotu, paraugā reprezentatīvi iekļauj zivis no visiem ūdensapgādes avotiem;

iii) paraugam ņemto zivju vidū ir tādā veidā ievāktas zivis, lai paraugā proporcionāli pārstāvētas būtu visas saimniecības daļas, kā arī visas vecumgrupas.

I.2. Konkrētas prasības veselības statusa "slimības neskarts" (I kategorija) iegūšanai attiecībā uz *VHS* un *IHN*

I.2.1. Uzraudzības programmas

a) Kāda dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām ir Direktīvas 2006/88/EK III pielikuma B daļā minētais III kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šīm sarakstā iekļautajām slimībām var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien minētajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī visas saimniecības, kuras tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, atbilst minētās direktīvas V pielikuma prasībām un ja vien uz visām minētajām saimniecībām un, ja vajadzīgs saskaņā ar minētā V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu, arī uz paraugu ņemšanas punktiem saskaņā ar minēto daļu izraudzītās savvaļas populācijās ir bijusi attiecināta viena no šīm uzraudzības programmām:

i) A paraugs – divgadīga uzraudzības programma

Saimniecībās vai paraugu ņemšanas punktos vismaz divus secīgus gadus jābūt veiktām veselības pārbaudēm un ņemtiem paraugiem, kā noteikts II iedaļas 1.A tabulā.

Šajā divu gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai abām šīm slimībām ir jābūt iegūtiem negatīviem rezultātiem un jebkādām aizdomām par *VHS*, *IHN* vai tām abām ir jābūt izslēgtām saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām paraugu ņemšanas un diagnostikas metodēm;

ii) B paraugs – četrgadīga uzraudzības programma ar samazinātu parauga lielumu

Saimniecībās vai paraugu ņemšanas punktos vismaz četrus secīgus gadus jābūt veiktām veselības pārbaudēm un ņemtiem paraugiem, kā noteikts II iedaļas 1.B tabulā.

Šajā četru gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām ir jābūt iegūtiem negatīviem rezultātiem un jebkādām aizdomām par *VHS*, *IHN* vai tām abām ir jābūt izslēgtām saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām paraugu ņemšanas un diagnostikas metodēm.

b) Ja a) apakšpunktā minētās uzraudzības programmas īstenošanas laikā kādā šīs uzraudzības programmas aptvertā saimniecībā ir apstiprināta inficēšanās ar *VHS*, *IHN* vai abām šīm slimībām un tāpēc saimniecībai ir atņemts II kategorijas veselības statuss, saimniecība II kategorijas veselības statusu var nekavējoties atgūt un statusa "slimības neskarts" iegūšanai paredzētās uzraudzības programmas īstenošanu turpināt, neīstenojot I.2.2. punktā izklāstīto izskaušanas programmu, ja vien saimniecība atbilst šādiem nosacījumiem:

i) tā ir kontinentāla saimniecība, kuras veselības statuss attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai abām šīm slimībām saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 3. punktu nav atkarīgs no apkārtējos dabiskajos ūdeņos esošo ūdensdzīvnieku populāciju veselības statusa attiecībā uz šīm sarakstā iekļautajām slimībām;

ii) tā ir iztukšota, iztīrīta, dezinficēta un turēta neizmantota; neizmantošanas periods ir vismaz sešas nedēļas;

iii) tās krājumi ir atjaunoti ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai abām šīm slimībām ir I kategorijas veselības statuss.

I.2.2. Izskaušanas programmas

I.2.2.1. Vispārīgas prasības

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šīm sarakstā iekļautajām slimībām var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta a) līdz e) apakšpunktam atbilstoša izskaušanas programma:

a) ir jābūt faktiski piemērotiem Direktīvas 2006/88/EK V nodaļas 4. iedaļā noteiktajiem minimālajiem kontroles pasākumiem, un tās(-o) saimniecības(-u) apkaimē, kas oficiāli deklarēta(-s) par inficētu(-ām) ar *VHS*, *IHN* vai abām šīm sarakstā iekļautajām slimībām, ir jābūt izveidotai šīs direktīvas 32. panta b) punktā minētajai robežzonai, kurā ietilpst aizsardzības zona un uzraudzības zona.

Robežzonai jābūt definētai katrā gadījumā atsevišķi, ņemot vērā faktorus, kas attiecībā uz sarakstā iekļautās slimības izplatīšanos uz saimniecībās audzētām zivīm un savvaļas zivīm, ietekmē tādus riskus kā: zivju mirstība pēc skaita, mirstības rādītājs un sadalījums ar *VHS*, *IHN* vai abām šīm slimībām inficētajā saimniecībā; attālums līdz apkaimes saimniecībām un to biezība; attālums līdz tuvākajām kautuvēm; saskarē esošās saimniecības; saimniecībās pārstāvētās sugas; slimības skartajās saimniecībās un to apkaimes saimniecībās izmantotā audzēšanas prakse; hidrodinamiskie apstākļi un citi konstatēti epidemioloģiski nozīmīgi faktori.

Veidojot aizsardzības zonu un uzraudzības zonu, uz šo zonu ģeogrāfisko norobežošanu attiecina šādas minimālās prasības:

i) par inficētu ar *VHS*, *IHN* vai abām šīm sarakstā iekļautajām slimībām oficiāli deklarētas saimniecības tiešajā apkaimē izveido aizsardzības zonu, kas atbilst:

1) piekrastes teritorijās – teritorijai, kas ietilpst aplī, kura rādiuss atbilst vismaz vienas plūdmaiņu joslas platumam vai ir vismaz 5 km (izmanto lielāko vērtību) un kura centrs ir saimniecība, kas oficiāli deklarēta par inficētu ar *VHS*, *IHN* vai tām abām, vai līdzvērtīgai teritorijai, kas noteikta saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem;

2) iekšzemes teritorijās – visai ūdens sateces teritorijai, kas atbilst saimniecībai, kura oficiāli deklarēta par inficētu ar *VHS*, *IHN* vai tām abām; kompetentā iestāde zonas plašumu var ierobežot tikai ar ūdens sateces teritorijas daļām vai ar saimniecības teritoriju, ja vien tādējādi nepasliktinās *VHS*, *IHN* vai to abu izplatības profilakse;

ii) kompetentā iestāde ārpus aizsardzības zonas izveido uzraudzības zonu, un tā atbilst:

1) piekrastes teritorijās – aizsardzības zonu aptverošai teritorijai, kur vērojama plūdmaiņu joslu zonu pārklāšanās; vai aizsardzības zonu aptverošai teritorijai, kas ietilpst aplī, kura rādiuss ir 10 km no aizsardzības zonas centra; vai līdzvērtīgai teritorijai, ko nosaka saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem;

2) iekšzemes teritorijās – paplašinātai teritorijai ārpus izveidotās aizsardzības zonas;

b) visās saimniecībās, kas aizsardzības zonā tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas un kas nav oficiāli deklarētas par inficētām ar *VHS*, *IHN* vai tām abām, veic oficiālu izmeklēšanu, kurā ietilpst vismaz šādi elementi:

i) paraugu ievākšana 10 zivju testēšanai gadījumos, kur tiek novērotas *VHS*, *IHN* vai abām šīm infekcijām raksturīgas klīniskas vai *post mortem* pazīmes, vai vismaz 30 zivju testēšanai gadījumos, kur klīniskas vai *post mortem* pazīmes nav novērotas;

ii) viena veselības pārbaude: saimniecībās, kur i) punktā minētajos testos ir iegūti negatīvi rezultāti; līdz brīdim, kad aizsardzības zonu saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu atceļ, periodā, kad ūdens temperatūra ir zem 14 °C, veselības pārbaudes turpina reizi mēnesī, ja vien zivju dīķi vai tīklu būri nav klāti ar ledu;

c) visas saimniecības, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *VHS*, *IHN* vai tām abām, jāiztukšo, jāiztīra, jādezinficē, un tajās jāīsteno neizmantošanas periods. Neizmantošanas periods ir vismaz sešas nedēļas. Kad visas vienā un tajā pašā aizsardzības zonā oficiāli par inficētām deklarētās saimniecības ir iztukšotas, īsteno vismaz trīs nedēļas ilgu sinhronizētu neizmantošanas periodu. Šī rindkopa attiecas arī uz jaunām saimniecībām, kas izskaušanas programmas īstenošanas laikā ir oficiāli deklarētas par inficētām.

Kad oficiāli par inficētām deklarētajās saimniecībās ir īstenots neizmantošanas periods, aizsardzības zonas pārveido par uzraudzības zonām.

Kompetentā iestāde var nolemt pieprasīt, lai izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās tiktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un turētas neizmantotas arī citas saimniecības. Neizmantošanas perioda ilgumu šajās citās saimniecībās kompetentā iestāde nosaka, izvērtējot risku katrā atsevišķā gadījumā;

d) visās saimniecībās, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *VHS*, *IHN* vai abām šīm sarakstā iekļautajām slimībām, un visās citās saimniecībās, kas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās, kuras minētas c) apakšpunktā, turētas neizmantotas, krājumus atjauno ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar veselības statusu "slimības neskarts" (I kategorija) attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām.

Krājumus atjauno tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības ir iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu īstenots neizmantošanas periods;

e) uz visām saimniecībām, kas izskaušanas programmas aptvertajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, un, ja ir vajadzīga savvaļas populāciju uzraudzība, uz paraugu ņemšanas punktiem, kas izraudzīti saskaņā I.1. punktu, vēlāk attiecina I.2.1. punktā noteikto uzraudzības shēmu.

I.2.2.2. Statusa "slimības neskarts" atgūšanas prasības, ko izvirza attiecībā uz kontinentāliem iecirkņiem, kuri sastāv tikai no vienas saimniecības, kas agrāk deklarēta par *IHN*, *VHS* vai to abu neskartu

Kontinentāls iecirknis, kas sastāv tikai no vienas par *VHS*, *IHN* vai abu šo sarakstā iekļauto slimību neskartu deklarētas saimniecības, kuras veselības statusu attiecībā uz šīm sarakstā iekļautajām slimībām saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 3. punktu neietekmē apkārt esošie dabiskie ūdeņi un kurai I kategorijas veselības statuss saskaņā ar minētās direktīvas 53. panta 3. punktu ir atcelts, I kategorijas veselības statusu var atgūt tūlīt pēc tam, kad kompetentā iestāde apstiprinājusi šādu nosacījumu izpildi:

a) saimniecībai, kas oficiāli apstiprināta par inficētu ar *VHS*, *IHN* vai tām abām, jābūt iztukšotai, iztīrītai, dezinficētai un tajā jābūt īstenotam neizmantošanas periodam; neizmantošanas periodam jāilgst vismaz sešas nedēļas;

b) saimniecībā, kas oficiāli apstiprināta par inficētu ar *VHS*, *IHN* vai tām abām, krājumiem jābūt atjaunotiem ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai abām šīm slimībām ir I kategorijas veselības statuss.

I.3. Konkrētas prasības statusa "slimības neskarts" (I kategorija) saglabāšanai attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām

Gadījumos, kur I kategorijas veselības statusa saglabāšanai ir nepieciešama mērķorientēta uzraudzība, kā paredzēts Direktīvas 2006/88/EK 52. pantā, visās saimniecībās, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, izdara veselības pārbaudi un ņem zivju paraugus saskaņā ar šīs daļas II iedaļas 1.C tabulu, ņemot vērā to, kāda ir saimniecības riska pakāpe attiecībā uz aplipšanu ar *VHS*, *IHN* vai abām šīm sarakstā iekļautajām slimībām.

Nosakot, cik bieži *VHS*, *IHN* vai to abu sakarā jāveic veselības pārbaudes I kategorijas veselības statusa iecirkņos, kuri atrodas kontinentālās teritorijās un kuru veselības statuss attiecībā uz *VHS* vai *IHN* saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 2. punktu ir atkarīgs no apkārtējos dabiskajos ūdeņos esošo ūdensdzīvnieku populāciju veselības statusa, uzskata, ka risks aplipt ar *VHS*, *IHN* vai tām abām ir augsts.

Statusu "slimības neskarts" saglabā tikai tik ilgi, kamēr visiem paraugiem, kas testēti, izmantojot II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai abām šīm sarakstā iekļautajām slimībām rezultāti ir negatīvi un kamēr saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir izslēgtas jebkādas aizdomas par *VHS*, *IHN* vai tām abām.

I.4. Prasības attiecībā uz Direktīvas 2006/88/EK 39. pantā paredzēto ierobežošanas pasākumu atcelšanu, proti, maiņu no V kategorijas veselības statusa uz III kategorijas statusu

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šīm sarakstā iekļautajām slimībām var iegūt III kategorijas veselības statusu, ja vien:

a) ir izpildītas I.2.2.1. punkta a), b) un c) apakšpunkta prasības. Ja neizmantošanas periodu īstenot nav tehniski iespējams, uz šīm saimniecībām attiecina kādu alternatīvu pasākumu, kas gandrīz līdzvērtīgi nodrošina *IHNV*, *VHSV* vai to abu iznīcināšanu saimniecības vidē;

b) visās saimniecībās, kuras oficiāli deklarētas par inficētām, un visās citās saimniecībās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods/veikti alternatīvi pasākumi saskaņā ar a) apakšpunktu, krājumi ir atjaunoti ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I, II vai III kategorijas veselības statusu attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām;

c) krājumi atjaunoti tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās īstenots neizmantošanas periods/veikti alternatīvi pasākumi saskaņā ar a) apakšpunktu.

II. **Diagnostikas un paraugu ņemšanas metodes**

II.1. Orgāni, no kuriem jāņem paraugi

Izmeklējamais audu materiāls ir liesa, nieru priekšdaļa un vai nu sirds, vai galvas smadzenes. Ņemot paraugus no vaisliniekiem, var izmeklēt arī olšūnu vai sēklas šķidrumu.

Attiecībā uz nelieliem zivju mazuļiem pēc tam, kad nodalīta ķermeņa daļa aiz zarnu atveres, par 4 cm īsākas veselas zivis var sasmalcināt ar sterilām grieznēm vai skalpeli. Ja paraugu veido veselas 4 līdz 6 cm garas zivis, jāievāc iekšas, arī nieres.

Kopot atļauts augstākais 10 zivju orgānu daļas.

II.2. Diagnostikas metodes statusa "slimības neskarts" iegūšanai un saglabāšanai attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām

II pielikuma 1. daļas I. punktā sniegtajām apstiprinātajām diagnostikas metodēm un procedūrām atbilstošā diagnostikas metode, ar kuru attiecībā uz *VHS*, *IHN* vai tām abām iegūst vai saglabā statusu "slimības neskarts", ir vai nu:

a) vīrusu izolēšana šūnu kultūrās, pēc kuras veic identifikāciju, izmantojot vai nu imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*), netiešās imūnfluorescences antivielu testu (*IFAT*), vīrusneitralizācijas testu, vai reāllaika apgrieztās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcijas testu (*RT-qPCR*); vai

b) *RT-qPCR*.

II.3. Paraugu ņemšanas un diagnostikas metodes, ar kurām izslēdz vai apstiprina *VHS* vai *IHN* klātbūtni

Ja nepieciešams saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 28. pantu apstiprināt vai izslēgt aizdomas par *VHS*, *IHN* vai tām abām, ievēro šādas pārbaudes, paraugu ņemšanas un testēšanas procedūras:

a) saimniecībā, par kuru ir aizdomas, izdara vismaz vienu veselības pārbaudi un, ja klīniski vai *post mortem* ir novērotas *VHS* vai *IHN* infekcijai vai tām abām raksturīgas pazīmes, ņem paraugu ar 10 zivīm, vai, ja klīniski vai *post mortem* šādas pazīmes nav novērotas, paraugu ar vismaz 30 zivīm. Paraugus testē, saskaņā ar II pielikuma 1. daļas II iedaļā aprakstītajām detalizētajām diagnostikas metodēm un procedūrām izmantojot vienu vai vairākas no i) un ii) punktā norādītajām diagnostikas metodēm:

   i) šūnu kultūrā veikta parastā vīrusa izolēšana, pēc kuras veic imūnķīmisku vai molekulāru vīrusa identificēšanu;

   ii) vīrusa noteikšana ar *RT-qPCR*;

   iii) citi diagnostiski paņēmieni, attiecībā uz kuriem ir pierādīta līdzvērtīga rezultativitāte, piemēram, netiešās imūnfluorescences antivielu tests (*IFAT*), imūnfermentatīvā analīze (*ELISA*), *RT-PCR* un imūnhistoķīmiskā analīze (*IHC*);

b) *VHS* klātbūtni uzskata par apstiprinātu, ja ar vienu vai vairākām no minētajām diagnostikas metodēm attiecībā uz *VHSV* tiek iegūti pozitīvi rezultāti. *IHN* klātbūtni uzskata par apstiprinātu, ja ar vienu vai vairākām no minētajām diagnostikas metodēm tiek iegūti pozitīvi rezultāti attiecībā uz *IHNV*. Pirmā *VHS* vai *IHN* gadījuma apstiprināšanā agrāk neinficētās dalībvalstīs, zonās vai iecirkņos balstās uz parasto vīrusa izolēšanas testu šūnu kultūrā vai uz *RT-qPCR*;

c) ja šūnu kultivēšanas testi vai *RT-qPCR* testi nedz *VHSV*, nedz *IHNV* klātbūtni tālāk neapliecina, aizdomas par *VHSV* vai *IHNV* var izslēgt.

1.A tabula

Uzraudzības shēma zonām un iecirkņiem, paredzēta I.2.1. punkta a) apakšpunkta i) punktā minētajam divu gadu kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *VHS* vai *IHN*

Saimniecības veids	Veselības pārbaužu skaits gadā (divos gados)	Paraugu ņemšanu skaits gadā (divos gados)	Zivju skaits paraugā (1)	
			Augošo zivju skaits	Zivju vaislinieku skaits (2)
a) Saimniecības ar vaisliniekiem	2	2	50 (pirmā pārbaude) 75 (otrā pārbaude)	30 (pirmā vai otrā pārbaude) 0 (pirmā vai otrā pārbaude)
b) Saimniecības, kurās ir tikai vaislinieki	2	1	0	75 (pirmā vai otrā pārbaude)
c) Saimniecības bez vaisliniekiem	2	2	75 (3) (pirmā un otrā pārbaude)	0

Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 10

(1) Paraugi jāņem ne drīzāk kā trīs nedēļas pēc zivju pārcelšanas no saldūdens sālsūdenī.
(2) Vaislinieku olšūnu vai sēklas šķidrumu brieduma fāzē iegūst ar noslaukšanu.
(3) Paraugi jāņem no tāda zivju skaita, lai tad, ja paredzētā izplatība ir 5 %, *VHSV* vai *IHNV* būtu noteicami ar 95 % ticamību.

1.B tabula

Uzraudzības shēma ar samazinātu parauga lielumu, paredzēta I.2.1. punkta a) apakšpunkta ii) punktā minētajam četru gadu kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *VHS* vai *IHN*

Saimniecības veids	Veselības pārbaužu skaits gadā	Paraugu ņemšanu skaits gadā	Zivju skaits paraugā (1)	
			Augošo zivju skaits	Zivju vaislinieku skaits (2)
Pirmie divi uzraudzības perioda gadi				
a) Saimniecības ar vaisliniekiem	2	1	0 (pirmā pārbaude) 30 (otrā pārbaude)	0 (pirmā pārbaude) 0 (otrā pārbaude)
b) Saimniecības, kurās ir tikai vaislinieki	2	1	0	30 (pirmā vai otrā pārbaude)
c) Saimniecības bez vaisliniekiem	2	1	30 (3) (pirmā vai otrā pārbaude)	0
Pēdējie divi uzraudzības perioda gadi				
a) Saimniecības ar vaisliniekiem	2	2	30 (pirmā pārbaude) 0 (otrā pārbaude)	0 (pirmā pārbaude) 30 (otrā pārbaude)

Saimniecības veids	Veselības pārbaužu skaits gadā	Paraugu ņemšanu skaits gadā	Zivju skaits paraugā (1)	
			Augošo zivju skaits	Zivju vaislinieku skaits (2)
b) Saimniecības, kurās ir tikai vaislinieki	2	2		30 (pirmā un otrā pārbaude)
c) Saimniecības bez vaislinie-kiem	2	2	30 (3) (pirmā un otrā pārbaude)	

Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 10

(1) Paraugi jāņem ne drīzāk kā trīs nedēļas pēc zivju pārcelšanas no saldūdens sālsūdenī.
(2) Vaislinieku olšūnu vai sēklas šķidrumu brieduma fāzē iegūst ar noslaukšanu.
(3) Paraugi jāņem no tāda zivju skaita, lai tad, ja paredzētā izplatība ir 10 %, *VHSV* vai *IHNV* būtu noteicami ar 95 % ticamību.

1.C tabula

Uzraudzības shēmas zonām vai iecirkņiem statusa "slimības neskarts" saglabāšanai attiecībā uz *VHS* vai *IHN*, kā minēts I.3. punktā

Riska pakāpe	Veselības pārbaužu skaits	Zivju skaits paraugā (3)
Augsta	Divas reizes gadā	30 (1) (2)
Vidēja	Reizi gadā	30 (1)
Zema	Reizi divos gados	30 (1)

Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 10

(1) Paraugi jāņem ne drīzāk kā trīs nedēļas pēc zivju pārcelšanas no saldūdens sālsūdenī.
(2) Paraugi jāņem no tāda zivju skaita, lai tad, ja paredzētā izplatība ir 10 %, *VHSV* vai *IHNV* būtu noteicami ar 95 % ticamību.
(3) Jābūt vismaz vienam paraugam katrai veselības pārbaudei.

2. DAĻA

UZRAUDZĪBAS UN KONTROLES METODES ATTIECĪBĀ UZ KOIJU HERPESVĪRUSA SLIMĪBU (*KHVD*)

I. **Uzraudzības un izskaušanas programmām izvirzītās prasības, kas jāievēro, lai iegūtu un saglabātu veselības statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *KHVD* un ierobežotu inficēšanos ar koiju herpesvīrusu (*KHV*)**

I.1. Vispārīgas prasības

Ja saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu ir vajadzīga mērķorientēta savvaļas populāciju uzraudzība, paraugu ņemšanas punktu skaitu un ģeogrāfisko sadalījumu nosaka tā, lai būtu panākts saprātīgs dalībvalsts, zonas vai iecirkņa aptvērums. Paraugu ņemšanas punktiem reprezentatīvi jāpārstāv arī dažādās ekosistēmas, kur atrodas savvaļas uzņēmīgās populācijas, proti, upju sistēmas un ezeri.

Mērķorientēta uzraudzība balstās uz to vietu regulāru monitorēšanu, kurās uzturas uzņēmīgas sugas. Vietas monitorē tad, kad sasniegti ūdens temperatūras līmeņi, kuros iespējama slimības attīstīšanās (> 15 °C), un ne agrāk kā divas nedēļas no datuma, kad šādas temperatūras sasniegtas. Jebkādas vietā atrastas slimas zivis vai zivis, kam vērojama anormāla izturēšanās, ņem paraugam un testē.

Visos iespējamos gadījumos paraugus ņem no zivīm, kas ilgāku laiku turētas tādu temperatūru diapazonā, kurās iespējama vīrusa attīstīšanās, proti, divas līdz trīs nedēļas 15 °C līdz 26 °C temperatūrā. Tomēr ir pieļaujama šāda pieeja:

a) zivis pārceļot no ziemas dīķiem uz vasaras dīķiem, ievāc subpopulāciju, ko patur tajā pašā vasaras dīķa ūdenstilpē, līdz temperatūra atbilst minimālajām prasībām; vai

b) paraugus ņem zivju produkcijas ievākšanas laikā vai, laikā, kad piekopjot parasto saimniekošanas praksi, ar zivīm veic citas manipulācijas. Lai paaugstinātu varbūtību konstatēt *KHV*, ja vien iespējams, paraugus ievāc 24 līdz 72 stundas pēc tam, kad šāda saimniekošanas prakse piekopta.

Ja saimniecībās vai savvaļas populācijās veselības pārbaude jāizdara vai paraugi jāņem biežāk nekā reizi gadā, veselības pārbaudes vai paraugu ņemšana ar iespējami ilgiem starplaikiem jāveic sezonā, kad ūdens temperatūrai ir varbūtīgi sasniegt gada augstākās vērtības, nepārsniedzot robežvērtību 28 °C.

Visās ražošanas vienībās (dīķi, cisternas) jāizdara veselības pārbaudes, kurās noskaidro, vai vienībās nav beigtu vai novājinātu zivju vai zivju ar anormālu izturēšanos.

Ievāc *Cyprinus carpio* un tās hibrīdus, piemēram, *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, ja tās saimniecībā ir.

Paraugiem ņemamās zivis izraugās šādi:

i) ja sastopamas novājinātas zivis, zivis ar anormālu uzvedību vai nesen nobeigušās (taču nesadalījušās) zivis, jāizraugās tās;

ii) ja zivju audzēšanai izmanto vairāk nekā vienu ūdensapgādes avotu, paraugu ņemšanai reprezentatīvi jāaptver zivis no visiem ūdensapgādes avotiem;

iii) paraugam ņemto zivju vidū jābūt tādā veidā ievāktām zivīm, lai paraugā proporcionāli pārstāvētas būtu visas saimniecības daļas, kā arī visas vecumgrupas.

I.2. Konkrētas prasības veselības statusa "slimības neskarts" (I kategorija) iegūšanai attiecībā uz *KHVD*

I.2.1. Uzraudzības programmas

a) Kāda dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *KHVD* ir III kategorijas veselības statuss, var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien minētajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī visas saimniecības, kuras tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, atbilst minētās direktīvas V pielikuma prasībām attiecībā uz statusu "slimības neskarts" un ja vien uz visām minētajām saimniecībām un, ja vajadzīgs saskaņā ar minētā pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu, arī uz paraugu ņemšanas punktiem saskaņā ar minēto daļu izraudzītās savvaļas populācijās ir bijusi attiecināta viena no šīm uzraudzības programmām:

i) A paraugs – divgadīga uzraudzības programma

Saimniecībās vai paraugu ņemšanas punktos vismaz divus secīgus gadus jābūt veiktām veselības pārbaudēm un ņemtiem paraugiem, kā noteikts III iedaļas 2.A tabulā.

Šajā divu gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *KHV* ir jābūt iegūtiem negatīviem rezultātiem un saskaņā ar III.2. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir jābūt izslēgtām jebkādām aizdomām par *KHVD*;

ii) B paraugs – četrgadīga uzraudzības programma ar samazinātu parauga lielumu

Saimniecībās vai paraugu ņemšanas punktos vismaz četrus secīgus gadus jābūt veiktām veselības pārbaudēm un ņemtiem paraugiem, kā noteikts III iedaļas 2.B tabulā.

Šajā četru gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *KHV* ir jābūt iegūtiem negatīviem rezultātiem un saskaņā ar III.2. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir jābūt izslēgtām jebkādām aizdomām par *KHVD*.

b) Ja a) apakšpunktā minētās četrgadīgās uzraudzības programmas īstenošanas laikā kādā šīs uzraudzības programmas aptvertā saimniecībā ir apstiprināta inficēšanās ar *KHV* un ja tāpēc saimniecībai ir atņemts II kategorijas veselības statuss, saimniecība II kategorijas veselības statusu var nekavējoties atgūt un statusa "slimības neskarts" iegūšanai paredzētās uzraudzības programmas īstenošanu turpināt, neīstenojot I.2.2. punktā izklāstīto izskaušanas programmu, ja vien saimniecība atbilst šādiem nosacījumiem:

i) tā ir kontinentāla saimniecība, kuras veselības statuss attiecībā uz *KHVD* saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 3. punktu nav atkarīgs no apkārtējā dabiskajā ūdenī esošo ūdensdzīvnieku populāciju veselības statusa attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību;

ii) tā ir iztukšota, iztīrīta, dezinficēta un tajā īstenots neizmantošanas periods; neizmantošanas periods ir vismaz sešas nedēļas;

iii) tās krājumi ir atjaunoti ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *KHVD* ir I kategorijas veselības statuss.

I.2.2. Izskaušanas programmas

I.2.2.1. Vispārīgas prasības

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *KHVD* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta vismaz šāda izskaušanas programma:

a) ir faktiski veikti Direktīvas 2006/88/EK V nodaļas 4. iedaļā noteiktie minimālie kontroles pasākumi, un tās(-o) saimniecības(-u) apkaimē, kas oficiāli deklarēta(-s) par inficētu(-ām) ar *KHV*, ir izveidota šīs direktīvas 32. panta b) punktā minētā robežzona, kurā ietilpst aizsardzības zona un uzraudzības zona.

Robežzonai jābūt definētai katrā gadījumā atsevišķi, ņemot vērā faktorus, kas attiecībā uz *KHVD* izplatīšanos uz saimniecībās audzētām zivīm un savvaļas zivīm, ietekmē tādus riskus kā: zivju mirstība pēc skaita, mirstības rādītājs un sadalījums ar *KHV* inficētajā saimniecībā; attālums līdz apkaimes saimniecībām un to biezība; attālums līdz tuvākajām kautuvēm; saskarē esošās saimniecības; saimniecībās pārstāvētās sugas; slimības skartajās saimniecībās un to apkaimes saimniecībās izmantotā audzēšanas prakse; hidrodinamiskie apstākļi un citi konstatēti epidemioloģiski nozīmīgi faktori.

Veidojot aizsardzības zonu un uzraudzības zonu, uz šo zonu ģeogrāfisko norobežošanu attiecina šādas minimālās prasības:

i) tiešā tuvumā par inficētu ar *KHV* oficiāli deklarētai saimniecībai izveido aizsardzības zonu, kas atbilst visai par inficētu ar *KHV* oficiāli deklarētās saimniecības ūdens sateces teritorijai; kompetentā iestāde zonu var attiecināt tikai uz ūdens sateces teritorijas daļām, ja vien netiek pasliktināta *KHVD* izplatības profilakse;

ii) ārpus aizsardzības zonas izveido uzraudzības zonu, kas atbilst paplašinātai teritorijai, kura aptver izveidoto aizsardzības zonu;

b) visās saimniecībās, kas aizsardzības zonā tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas un kas nav oficiāli deklarētas par inficētām ar *KHV*, veic oficiālu izmeklēšanu, kurā ietilpst vismaz šādi elementi:

i) paraugu ievākšana 10 zivju testēšanai gadījumos, kur tiek novērotas *KHVD* raksturīgas klīniskas vai *post mortem* pazīmes, vai 30 zivju testēšanai gadījumos, kur klīniskas vai *post mortem* pazīmes nav novērotas;

ii) viena veselības pārbaude; saimniecībās, kur III.2. punktā minētajos testos ir iegūti negatīvi rezultāti; veselības pārbaudes sezonā, kad ūdens temperatūrai ir varbūtīgi sasniegt > 15 °C, reizi mēnesī turpina līdz brīdim, kad aizsardzības zonu saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu atceļ;

c) visas saimniecības, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *KHV*, jāiztukšo, jāiztīra, jādezinficē, un tajās jāīsteno neizmantošanas periods. Neizmantošanas periods ir vismaz sešas nedēļas. Kad visas vienā un tajā pašā aizsardzības zonā oficiāli par inficētām deklarētās saimniecības ir iztukšotas, īsteno vismaz trīs nedēļas ilgu sinhronizētu neizmantošanas periodu. Šī rindkopa attiecas arī uz jaunām saimniecībām, kas izskaušanas programmas īstenošanas laikā ir oficiāli deklarētas par inficētām.

Kad oficiāli par inficētām deklarētajās saimniecībās ir īstenots neizmantošanas periods, aizsardzības zonas pārveido par uzraudzības zonām.

Kompetentā iestāde var nolemt pieprasīt, lai izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās tiktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un turētas neizmantotas arī citas saimniecības. Minētā neizmantošanas perioda ilgumu kompetentā iestāde nosaka, izvērtējot risku katrā atsevišķā gadījumā;

d) visās saimniecībās, kuras oficiāli deklarētas par inficētām ar *KHV*, un visās citās saimniecībās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods, zivju krājumus atjauno:

i) ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *KHVD* ir I kategorijas veselības statuss; vai

ii) pārejas periodā līdz 2020. gada 31. decembrim ar zivīm no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar apstiprinātu *KHVD* uzraudzības programmu.

Krājumus atjauno tikai pēc tam, kad visas saimniecības, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *KHV*, ir iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu īstenots neizmantošanas periods;

e) uz visām saimniecībām, kas izskaušanas programmas aptvertajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, un, ja ir vajadzīga savvaļas populāciju uzraudzība, uz paraugu ņemšanas punktiem, kas izraudzīti saskaņā ar I.1. punktu, vēlāk jābūt attiecinātai vismaz I.2.1. punktā noteiktajai uzraudzības programmai.

I.2.2.2. Statusa "slimības neskarts" atgūšanas prasības, ko izvirza attiecībā uz kontinentāliem iecirkņiem, kuri sastāv tikai no vienas saimniecības, kas agrāk deklarēta par *KHVD* neskartu

Kontinentāls iecirknis, kas sastāv tikai no vienas saimniecības, kurai attiecībā uz *KHVD* ir I kategorijas veselības statuss, kuras veselības statusu attiecībā uz *KHVD* saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 3. punktu neietekmē apkārt esošie dabiskie ūdeņi un kurai I kategorijas veselības statuss ir atcelts saskaņā ar minētās direktīvas 53. panta 3. punktu, I kategorijas veselības statusu attiecībā uz *KHVD* var atgūt tūlīt pēc tam, kad kompetentā iestāde apstiprinājusi šādu nosacījumu izpildi:

a) tas ir iztukšots, iztīrīts, dezinficēts un tajā īstenots neizmantošanas periods; neizmantošanas periodam jābūt bijušam vismaz sešu nedēļu ilgam;

b) tā krājumi atjaunoti ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem ir I kategorijas veselības statuss, vai no iecirkņiem, uz kuriem attiecina *KHVD* uzraudzības programmu (II kategorijas veselības statuss).

I.3. Konkrētas prasības statusa "slimības neskarts" (I kategorija) saglabāšanai attiecībā uz *KHVD*

Gadījumos, kur I kategorijas veselības statusa saglabāšanai ir nepieciešama mērķorientēta uzraudzība, kā paredzēts Direktīvas 2006/88/EK 52. pantā, visās saimniecībās, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, izdara veselības pārbaudi un ņem paraugus saskaņā ar šīs daļas III iedaļas 2.B tabulu, ņemot vērā to, kāda ir saimniecības riska pakāpe attiecībā uz aplipšanu ar *KHV*.

Attiecībā uz *KHVD* veiktu veselības pārbaužu biežums I kategorijas iecirkņos, kuri atrodas kontinentālās teritorijās un kuros ietilpst viena vai vairākas saimniecības, kam veselības statuss attiecībā uz *KHVD* saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 2. punktu ir atkarīgs no tā, kāds attiecībā uz minēto sarakstā iekļauto slimību ir apkārtējo dabisko ūdeņu veselības statuss, atbilst skaitam, kas minētajā 2.C tabulā ir norādīts iepretim augstai riska pakāpei.

Dalībvalstīs, zonās vai iecirkņos, kur saimniecību skaits ir ierobežots un šo saimniecību mērķorientēta uzraudzība nenodrošina pietiekamus epidemioloģiskus datus, statusa "slimības neskarts" saglabāšanai paredzētajās uzraudzības shēmās iekļauj paraugu ņemšanas punktus, kas izraudzīti saskaņā ar I.1. punkta prasībām.

Šos paraugu ņemšanas punktus inspicē un tajos ņem paraugus, katru gadu 50 % paraugu ņemšanas punktu rotējot. Paraugu ņemšanu veic saskaņā ar III iedaļas 2.C tabulu. Paraugus ņem, sagatavo un izmeklē, kā aprakstīts II iedaļā, un attiecībā uz *KHVD* ierosinātāja klātbūtni laboratoriskajos izmeklējumos jābūt iegūtai negatīvai atbildei.

Statusu "slimības neskarts" saglabā tikai tik ilgi, kamēr visiem paraugiem, kas testēti, izmantojot II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *KHVD* rezultāti ir negatīvi, un saskaņā ar III.2. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm jābūt izslēgtām jebkādām aizdomām par *KHVD*.

I.4. Konkrētas prasības attiecībā uz to ierobežošanas pasākumu atcelšanu, kas Direktīvas 2006/88/EK 39. pantā paredzēti, lai dalībvalstīs, iecirkņos un zonās, kam ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz *KHVD* iegūtu III kategorijas veselības statusu

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *KHVD* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt III kategorijas veselības statusu, ja vien:

a) ir izpildītas I.2.2.1. punkta a), b) un c) apakšpunkta prasības. Ja neizmantošanas periodu īstenot nav tehniski iespējams, uz šīm saimniecībām attiecina kādu alternatīvu pasākumu, kas gandrīz līdzvērtīgi nodrošina *KHV* iznīcināšanu saimniecības vidē;

b) visās saimniecībās, kuras oficiāli deklarētas par inficētām, un visās citās saimniecībās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods/veikti alternatīvi pasākumi saskaņā ar a) apakšpunktu, krājumi ir atjaunoti ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I, II vai III kategorijas veselības statusu attiecībā uz *KHVD*;

c) krājumi atjaunoti tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās īstenots neizmantošanas periods/veikti alternatīvi pasākumi saskaņā ar a) apakšpunktu.

II. **Uzraudzībai paredzētās diagnostikas un paraugu ņemšanas metodes, kas jāizmanto, lai iegūtu un saglabātu statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *KHVD***

II.1. Paraugi

Izmeklējamais audu materiāls ir žaunu un nieru daļas. Kopot atļauts augstākais divu zivju orgānu daļas.

II.2. Uzraudzībai paredzētās diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai iegūtu un saglabātu statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *KHVD*

Diagnostikas metode, ar ko iegūst vai saglabā statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *KHVD*, saskaņā ar II pielikuma 2. daļas II punktā aprakstītajām detalizētajām diagnostikas metodēm un procedūrām ir reāllaika *PCR* (*qPCR*).

III. **Diagnostikas un paraugu ņemšanas metodes oficiālām izmeklēšanām, kurās apstiprina vai izslēdz aizdomas par *KHVD***

III.1. Paraugi

Izmeklējamais audu materiāls ir žaunu daļas un nieres. Kopot atļauts augstākais divu zivju orgānu daļas.

III.2. Oficiālās izmeklēšanas metodes un diagnostikas metodes, ar kurām izslēdz vai apstiprina *KHV* infekcijas klātbūtni

Ja nepieciešams saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 28. pantu apstiprināt vai izslēgt aizdomas par *KHVD*, ievēro šādu pārbaudes, paraugu ņemšanas un testēšanas procedūru:

a) ja klīniski vai *post mortem* ir novērotas *KHV* infekcijai raksturīgas pazīmes, oficiālā izmeklēšanā izdara vismaz vienu veselības pārbaudi un ņem vienu paraugu ar 10 zivīm, vai, ja šādas pazīmes klīniski vai *post mortem* nav novērotas, paraugu ar 30 zivīm. Paraugus testē, saskaņā ar II pielikuma 2. daļas II punktā aprakstītajām detalizētajām diagnostikas metodēm un procedūrām izmantojot b) apakšpunktā aprakstīto diagnostikas metodi;

b) *KHV* infekcijas klātbūtni uzskata par apstiprinātu, ja, izmantojot *PCR*, konstatē *KHV*;

ja šis tests *KHV* klātbūtni tālāk neapliecina, aizdomas par *KHVD* var izslēgt.

2.A tabula

Uzraudzības shēma zonām un iecirkņiem, paredzēta divu gadu kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *KHVD*, kā minēts I.2.1. punktā

		Klīnisko pārbaužu skaits gadā (divos gados)	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā (divos gados)	Zivju skaits paraugā
Saimniecības/paraugu ņemšanas vietas	Pirmie divi uzraudzības perioda gadi	2	2	75 [1]
	Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 2			

[1] Paraugi jāņem no tāda zivju skaita, lai tad, ja paredzētā izplatība ir 5 %, *KHV* būtu noteicams ar 95 % ticamību.

2.B tabula

Uzraudzības shēma zonām un iecirkņiem, paredzēta četru gadu kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *KHVD*, kā minēts I.2.1. punktā

		Klīnisko pārbaužu skaits gadā	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā	Zivju skaits paraugā
Saimniecības/paraugu ņemšanas vietas	Pirmie divi uzraudzības perioda gadi	1	1	30
Saimniecības/paraugu ņemšanas vietas	Pēdējie divi uzraudzības perioda gadi	2	2	30
	Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 2			

2.C tabula

Uzraudzības shēmas zonām vai iecirkņiem statusa "slimības neskarts" saglabāšanai attiecībā uz *KHVD*, kā minēts I.3. punktā

Riska pakāpe	Veselības pārbaužu skaits	Zivju skaits paraugā
Augsta	Divas reizes gadā	30
Vidēja	Reizi gadā	30
Zema	Reizi divos gados	30

Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 2

2.D tabula

Uzraudzības shēma statusa "slimības neskarts" saglabāšanai attiecībā uz *KHVD* dalībvalstīs, zonās vai iecirkņos, kur saimniecību skaits ir ierobežots un šo saimniecību mērķorientēta uzraudzība nesagādā pietiekamus epidemioloģiskus datus, kā minēts I.3. punktā

	Klīnisko pārbaužu skaits gadā	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā	Zivju skaits paraugā
Paraugu ņemšanas punkti	Reizi divos gados	Reizi divos gados	30

Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 2

3. DAĻA

UZRAUDZĪBAS UN KONTROLES METODES ATTIECĪBĀ UZ LAŠU INFEKCIOZO ANĒMIJU (*ISA*)

I. **Uzraudzības un izskaušanas programmām izvirzītās prasības, kas jāievēro, lai attiecībā uz *ISA* iegūtu un saglabātu veselības statusus "slimības neskarts" un ierobežotu inficēšanos ar *ISAV* vīrusa genotipu "*HPR* deletēts"**

I.1. Vispārīgas prasības

Ja veselības pārbaudes un paraugu ņemšanu saimniecībās saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu prasīts veikt biežāk nekā reizi gadā, starplaikiem starp veselības pārbaudēm vai paraugu ņemšanām jābūt iespējami ilgiem.

Ja saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu ir vajadzīga mērķorientēta savvaļas populāciju uzraudzība, paraugu ņemšanas punktu skaitu un ģeogrāfisko sadalījumu nosaka tā, lai būtu panākts saprātīgs dalībvalsts, zonas vai iecirkņa aptvērums. Paraugu ņemšanas punktiem reprezentatīvi jāpārstāv dažādās ekosistēmas, kur atrodas savvaļas uzņēmīgās populācijas.

Visās ražošanas vienībās, tādās kā dīķi, cisternas un tīklu būri, izdara veselības pārbaudes, noskaidrojot, vai vienībās nav beigtu vai novājinātu zivju vai zivju ar anormālu izturēšanos. Īpaša uzmanība jāpievērš ūdens izplūdes zonai, kur straumes dēļ parasti uzkrājas vairāk novājinātu zivju;

Paraugiem ievācamās zivis izraugās šādi:

a) izraugās tikai mirstošas vai nupat mirušas, taču nesadalījušās zivis; prioritāri ievākt ir jo īpaši zivis, kam vērojama anēmija, asiņošana vai citas klīniskas pazīmes, kas liecina par asinsrites traucējumiem;

b) ja vietā uzņēmīgo sugu vidū ir Atlantijas lasis, prioritāri ir Atlantijas laša paraugi. Ja zivsaimniecībā Atlantijas lašu nav, paraugi jāņem no citām uzņēmīgām sugām;

c) ja zivju audzēšanai izmanto vairāk nekā vienu ūdensapgādes avotu, paraugā reprezentatīvi iekļauj zivis no visiem ūdensapgādes avotiem;

d) paraugam ņemto zivju vidū ir tādā veidā ievāktas zivis, lai paraugā proporcionāli pārstāvētas būtu visas saimniecības ražošanas vienības, piemēram, tīklu būri, cisternas un dīķi, kā arī visas vecumgrupas.

I.2. Konkrētas prasības I kategorijas veselības statusa iegūšanai attiecībā uz *ISA*

I.2.1. Uzraudzības programmas

Kāda dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *ISA* saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK III pielikuma B daļu ir III kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien minētajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī visas saimniecības, kuras tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, atbilst Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma attiecīgajām prasībām un ja vien uz visām minētajām saimniecībām un, ja vajadzīgs saskaņā ar minētā V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu, arī uz paraugu ņemšanas punktiem saskaņā ar minēto daļu izraudzītās savvaļas populācijās ir bijusi attiecināta šāda uzraudzības programma:

a) saimniecībās vai paraugu ņemšanas punktos vismaz divus secīgus gadus ir veiktas veselības pārbaudes un ņemti paraugi, kā noteikts II iedaļas 3.A tabulā;

b) šajā divu gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts" ir jābūt iegūtiem negatīviem rezultātiem un saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir jābūt izslēgtām jebkādām aizdomām par *ISA*;

c) ja uzraudzības programmas īstenošanas laikā attiecīgās uzraudzības programmas aptvertā saimniecībā ir apstiprināta *ISA* un attiecīgi tās II kategorijas veselības statuss ticis atņemts, ir jābūt īstenotai izskaušanas programmai saskaņā ar I.2.2. punktu.

I.2.2. Izskaušanas programmas

I.2.2.1. Vispārīgas prasības

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *ISA* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta izskaušanas programma, kas atbilst šādiem a) līdz e) apakšpunktiem:

a) ir faktiski veikti Direktīvas 2006/88/EK V nodaļas 3. iedaļā noteiktie minimālie kontroles pasākumi, un tās(-o) saimniecības(-u) apkaimē, kura(-s) oficiāli deklarēta(-s) par inficētu(-ām) ar *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts" vai kurā(-s) apstiprināta *ISA* klātbūtne, jo īpaši ir izveidota šīs direktīvas 32. panta b) punktā minētā robežzona, kurā ietilpst aizsardzības zona un uzraudzības zona.

Robežzona katrā gadījumā jādefinē atsevišķi, ņemot vērā faktorus, kas attiecībā uz *ISA* izplatīšanos uz saimniecībās audzētām zivīm vai savvaļas zivīm, ietekmē tādus riskus kā: ar genotipam "*HPR* deletēts" piederīgu *ISAV* inficētu vai ar apstiprinātu *ISA* slimu zivju mirstība pēc skaita, tās rādītājs un sadalījums; attālums līdz apkaimes saimniecībām un to biezība; attālums līdz tuvākajām kautuvēm; saskarē esošās saimniecības; saimniecībās pārstāvētās sugas; slimības skartajās saimniecībās un to apkaimes saimniecībās izmantotā audzēšanas prakse; hidrodinamiskie apstākļi un citi konstatēti epidemioloģiski nozīmīgi faktori.

Veidojot aizsardzības zonu un uzraudzības zonu, uz šo zonu ģeogrāfisko norobežošanu attiecina šādas minimālās prasības:

i) par inficētu ar *ISA* oficiāli deklarētas saimniecības tuvākajā apkaimē izveido aizsardzības zonu, kura atbilst:

1) piekrastes teritorijās – teritorijai, kas ietilpst aplī, kura rādiuss atbilst vismaz vienas plūdmaiņu joslas platumam vai ir vismaz 5 km (izmanto lielāko vērtību) un kura centrs ir saimniecība, kas oficiāli deklarēta par inficētu ar *ISA*, vai līdzvērtīgai teritorijai, kas noteikta saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem;

2) iekšzemes teritorijās – visai ūdens sateces teritorijai, kas atbilst saimniecībai, kura oficiāli deklarēta par inficētu ar *ISA*; kompetentā iestāde zonu var attiecināt tikai uz ūdens sateces teritorijas daļām, ja vien netiek pasliktināta *ISA* izplatības profilakse;

ii) ārpus aizsardzības zonas izveido uzraudzības zonu, un tā atbilst:

1) piekrastes teritorijās – aizsardzības zonu aptverošai teritorijai, kurā vērojama plūdmaiņu joslu zonu pārklāšanās; vai aizsardzības zonu aptverošai teritorijai, kas ietilpst aplī, kura rādiuss ir 10 km no aizsardzības zonas centra; vai līdzvērtīgai teritorijai, ko nosaka saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem; vai

2) iekšzemes teritorijās – paplašinātai teritorijai ārpus izveidotās aizsardzības zonas;

b) visās saimniecībās, kas aizsardzības zonā tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas un kas nav oficiāli deklarētas par inficētām ar *ISA*, veic oficiālu izmeklēšanu, kurā ietilpst vismaz šādi elementi:

i) paraugu ievākšana vismaz 10 mirstošu zivju testēšanai gadījumos, kur tiek novērotas *ISA* raksturīgas klīniskas vai *post mortem* pazīmes, vai vismaz 30 zivju testēšanai gadījumos, kur klīniskas vai *post mortem* pazīmes nav novērotas;

ii) viena veselības pārbaude; saimniecībās, kurās i) punktā minētie testi ir devuši negatīvus rezultātus, veselības pārbaudes reizi mēnesī jāturpina līdz brīdim, kad aizsardzības zonu saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu atceļ;

c) visas saimniecības, kuras ir oficiāli deklarētas par inficētām ar *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts" vai kurās apstiprināta *ISA* klātbūtne, jāiztukšo, jāiztīra, jādezinficē, un tajās vismaz trīs mēnešus jāīsteno neizmantošanas periods. Aizsardzības un uzraudzības zonas var atcelt tad, kad visas saimniecības aizsardzības zonā tikušas iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas, un pēc tam tajās vismaz sešas nedēļas īstenots sinhronizēts neizmantošanas periods.

Kad oficiāli par inficētām deklarētajās saimniecībās ir īstenots neizmantošanas periods, aizsardzības zonas pārveido par uzraudzības zonām.

Kompetentā iestāde var nolemt pieprasīt, lai izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās tiktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un turētas neizmantotas arī citas saimniecības. Neizmantošanas perioda ilgumu šajās citās saimniecībās kompetentā iestāde nosaka, izvērtējot risku katrā atsevišķā gadījumā;

d) visās saimniecībās, kuras oficiāli deklarētas par inficētām ar *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts" vai kurās apstiprināta *ISA*, un visās citās saimniecībās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods, zivju krājumus atjauno ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I kategorijas statusu attiecībā uz *ISA*.

Krājumus atjauno tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības ir iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu īstenots neizmantošanas periods;

e) uz visām saimniecībām, kas izskaušanas programmas aptvertajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, un, ja ir vajadzīga savvaļas populāciju uzraudzība, uz paraugu ņemšanas punktiem, kas izraudzīti saskaņā ar I.1. punktu, vēlāk attiecina I.2.1. punktā aprakstīto uzraudzības shēmu.

I.2.2.2. Prasības, kas attiecībā uz statusa "slimības neskarts" atgūšanu izvirzītas kontinentāliem iecirkņiem, kuros ietilpst viena atsevišķa saimniecība, kam agrāk deklarēts I kategorijas veselības statuss

Kontinentāls iecirknis, kas sastāv tikai no vienas saimniecības, kurai attiecībā uz *ISA* ir I kategorijas veselības statuss, kuras veselības statusu saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 3. punktu neietekmē apkārt esošie dabiskie ūdeņi un kurai I kategorijas veselības statuss ir atcelts saskaņā ar minētās direktīvas 53. panta 3. punktu, šo statusu var atgūt tūlīt pēc tam, kad kompetentā iestāde apstiprinājusi, ka tas atbilst šādiem nosacījumiem:

a) tas ir iztukšots, iztīrīts, dezinficēts un tajā īstenots neizmantošanas periods; neizmantošanas periods ir vismaz sešas nedēļas;

b) tā krājumi ir atjaunoti ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *ISA* ir I kategorijas veselības statuss.

I.3. Minimālie kontroles pasākumi statusa "slimības neskarts" (I kategorija) saglabāšanai attiecībā uz *ISA*

Gadījumos, kur I kategorijas veselības statusa saglabāšanai ir nepieciešama mērķorientēta uzraudzība, kā paredzēts Direktīvas 2006/88/EK 52. pantā, visās saimniecībās, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, izdara veselības pārbaudes un ņem paraugus saskaņā ar šīs daļas II iedaļas 3.B tabulu ([1]), ņemot vērā to, kāda ir saimniecības riska pakāpe attiecībā uz aplipšanu ar *ISA*.

Nosakot, cik bieži *ISA* sakarā jāveic veselības pārbaudes I kategorijas veselības statusa iecirkņos, kuri atrodas kontinentālās teritorijās un kuru veselības statuss attiecībā uz *ISA* ir atkarīgs no tā, kāds veselības statuss ir apkārtējiem dabiskajiem ūdeņiem, kur dzīvo Atlantijas lasis (*Salmo salar*), uzskata, ka risks aplipt ar *ISA* ir augsts.

Statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *ISA* drīkst saglabāt tikai tik ilgi, kamēr visiem paraugiem, kas testēti, izmantojot II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts" rezultāti ir negatīvi un kamēr saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm izslēgtas jebkādas aizdomas par *ISA*.

I.4. Konkrētas prasības dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kam agrāk bijis V kategorijas veselības statuss, III kategorijas veselības statusa iegūšanai attiecībā uz *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts"

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *ISA* ir V kategorijas veselības statuss, var iegūt III kategorijas statusu, ja vien:

a) ir izpildītas I.2.2.1. punkta a), b) un c) apakšpunkta prasības. Ja neizmantošanas periodu īstenot nav tehniski iespējams, uz šīm saimniecībām attiecina kādu alternatīvu pasākumu, kas gandrīz līdzvērtīgi nodrošina *ISAV* iznīcināšanu saimniecības vidē;

b) visās saimniecībās, kuras oficiāli deklarētas par inficētām, un visās citās saimniecībās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods vai uz kurām attiecināti alternatīvi pasākumi saskaņā ar a) apakšpunktu, krājumi ir atjaunoti ar zivīm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I, II vai III kategorijas veselības statusu attiecībā uz *ISA*;

c) krājumi šādi atjaunoti tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās īstenots neizmantošanas periods/saskaņā ar a) apakšpunktu veikti alternatīvi pasākumi;

d) divu gadu laikā, kas seko a), b) un c) apakšpunktā minēto pasākumu izpildei, šajās saimniecībās nav apstiprināts *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts" un šajā periodā aizdomas tikušas izslēgtas saskaņā ar II.3. punktā noteiktajām procedūrām.

([1]) Neattiecas uz saimniecībām, kurās audzē tikai varavīksnes foreli (*Onchorhynchus mykiss*), strauta foreli (*Salmo trutta*) vai tās abas un kurās ūdeni piegādā tikai no saldūdens apgādes avotiem, kur nedzīvo Atlantijas lasis (*Salmo salar*).

II. **Diagnostikas metodes un oficiālie izmeklējumi**

II.1. Paraugi

Izmeklējamais audu materiāls ir:

a) histoloģiskai analīzei: galvasniere, aknas, sirds, aizkuņģa dziedzeris, zarnas, liesa un žaunas;

b) imūnhistoķīmiskai analīzei: vidusniere un sirds ar vārstuļiem un *bulbus arteriosus*;

c) *RT-qPCR* analīzei: vidusniere un sirds;

d) vīrusu kultūrai: vidusniere, sirds, aknas un liesa.

Kopot atļauts augstākais piecu zivju orgānu daļas.

II.2. Diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *ISA*

Diagnostikas metode, kas jāizmanto, lai saskaņā ar I.2. un I.3. punktu iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *ISA*, ir *RT-qPCR*, pēc kuras veikšanas pozitīvos paraugus saskaņā ar II pielikuma 3. daļā sniegtajiem detalizētajiem metožu un procedūru aprakstiem sekvenē.

Ja *RT-qPCR* rezultāts ir pozitīvs, pirms Direktīvas 2006/88/EK 28. pantā paredzēto sākotnējo kontroles pasākumu īstenošanas jātestē vēl citi paraugi.

Minētos paraugus saskaņā ar II pielikuma 3. daļā sniegtajiem detalizētajiem metožu un procedūru aprakstiem testē šādi:

a) paraugiem veic skrīningu ar *RT-qPCR*, arī sekvenē *HE* gēnu, lai pārliecinātos par *HPR* delēciju;

un

b) audu preparātus izmeklē ar specifiskām *ISAV* antivielām (konkrētāk, fiksētiem griezumiem ar *IHC*, bet audu nospiedumiem – ar *IFAT*); vai

c) izmantojot vismaz vienu paraugu no jebkuras saimniecībā paraugam paņemtas zivs, izolē un identificē *ISAV* šūnu kultūrā.

II.3. Oficiālās izmeklēšanas metodes un diagnostikas metodes, ar kurām izslēdz vai apstiprina *ISA* klātbūtni

Ja nepieciešams saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 28. pantu apstiprināt vai izslēgt aizdomas par *ISA*, ievēro šādu pārbaudes, paraugu ņemšanas un testēšanas procedūru:

a) oficiāla izmeklēšana, kurā, ja klīniski vai *post mortem* ir novērotas *ISA* infekcijai raksturīgas pazīmes, izdara vismaz vienu veselības pārbaudi un ņem vienu paraugu ar 10 mirstošām zivīm. Ja klīniski vai *post mortem* *ISA* raksturīgas pazīmes nav novērotas, pēc veselības pārbaudes saskaņā ar I.1. punktu selektīvi ņem paraugus no vismaz 30 mirstošām zivīm vai nesen mirušām zivīm (ar normālu ķermeņa uzbūvi). Paraugus testē saskaņā ar b) apakšpunktā aprakstītajām diagnostikas metodēm;

b) ja veiktajai *RT-qPCR* attiecībā uz *ISAV* ar genotipu "*HPR* deletēts" rezultāts ir pozitīvs, pirms Direktīvas 2006/88/EK 28. pantā paredzēto sākotnējo kontroles pasākumu īstenošanas jātestē vēl citi paraugi. Gadījumus, kur ir aizdomas par inficēšanos ar *ISA*, apstiprina saskaņā ar šādiem kritērijiem, izmantojot II pielikuma 3. daļā sniegtos detalizētos metožu un procedūru aprakstus:

i) konstatē *ISAV* ar *RT-qPCR*, arī sekvenējot *HE* gēnu, lai pārliecinātos par *HPR* delēciju, un ar specifisku *ISAV* antivielu starpniecību (konkrētāk, fiksētiem griezumiem ar *IHC*, bet audu nospiedumiem – ar *IFAT*) *ISAV* konstatē audu preparātos;

vai

ii) *ISAV* konstatē ar *RT-qPCD*, arī sekvenējot *HE* gēnu, lai pārliecinātos par *HPR* delēciju, kā arī

izmantojot vismaz vienu paraugu no jebkuras zivs saimniecībā, *ISAV* izolē un identificē šūnu kultūrā;

c) atrades, kas klīniski, ar smagām patoloģiskām pārmaiņām vai histopatoloģiski liecina par *ISA*, ir jāapstiprina, vīrusu saskaņā ar II pielikuma 3. daļu konstatējot ar divām diagnostikas metodēm, kuru pamatā ir neatkarīgi konstatēšanas principi, piemēram, ar *RT-qPCR* un *IHC*.

Aizdomas par *ISA* var izslēgt, ja tiek konstatēts, ka testos un pārbaudēs, kas veikti 12 mēnešu laikā kopš aizdomu rašanās, nav gūti tālāki pierādījumi par *ISA* klātbūtni.

3.A tabula

Uzraudzības shēma zonām un iecirkņiem, paredzēta divu gadu kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *ISA*, kā minēts I.2.1. punktā

Uzraudzības gads	Veselības pārbaužu skaits gadā (divos gados)	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā (divos gados)	Gadā ņemamo zivju paraugu skaits
1. gads	6	2 (1)	2 * 75 (2)
2. gads	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Gada laikā paraugi jāņem, jāglabā un jāizmeklē divos mēnesi ilgos testēšanas periodos (proti, pavasarī un rudenī) vai tad, kad tas praktisku apsvērumu dēļ lietderīgi.
(2) Maksimālais zivju skaits kopotā paraugā: 5.

3.B tabula

Uzraudzības shēmas zonām vai iecirkņiem minētā statusa "slimības neskarts" saglabāšanai attiecībā uz *ISA*, kā minēts I.3. punktā (2)

Riska pakāpe	Veselības pārbaužu skaits gadā	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā	Gadā ņemamo zivju paraugu skaits
Augsta	2	2 (1)	2 * 30
Vidēja	1	1 (1)	30
Zema	Reizi divos gados	Reizi divos gados	30 reizes divos gados

(1) Paraugi gada laikā jāņem un jāizmeklē divos mēnesi ilgos testēšanas periodos (proti, pavasarī un rudenī) vai tad, kad tas praktisku apsvērumu dēļ lietderīgi.
(2) Neattiecas uz saimniecībām, kurās audzē tikai varavīksnes foreli (*Onchorhynchus mykiss*), strauta foreli (*Salmo trutta*) vai tās abas un kurās ūdeni piegādā tikai no saldūdens apgādes avotiem, kur nedzīvo Atlantijas lasis (*Salmo salar*).

4. DAĻA

UZRAUDZĪBAS UN KONTROLES METODES ATTIECĪBĀ UZ INFICĒŠANOS AR *MARTEILIA REFRINGENS*

I. **Uzraudzības un izskaušanas programmām izvirzītās prasības, kas jāievēro, lai iegūtu un saglabātu veselības statusus "slimības neskarts" attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens***

I.1. Vispārīgas prasības

Veselības pārbaudes un attiecīgā gadījumā paraugu ņemšana laboratoriskiem izmeklējumiem jāveic gada periodā, par kuru zināms, ka parazīta izplatība attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tad ir maksimāla. Ja šādi dati nav pieejami, paraugus ņem tieši pēc tam, kad ūdens temperatūra pārsniegusi 17 °C.

Ja saskaņā ar 4. daļas prasībām jāņem gliemeņu paraugi, izmanto šādus kritērijus:

a) ja ražošanas vienībās vai ražošanas teritorijā atrodas *Ostrea* spp. vai *Mytilus* spp., no abām ģintīm jāņem pēc apjoma vienādi paraugi. Ja ir tikai viena no šīm ģintīm, paraugu ņem no tās. Ja nav ne *Ostrea*, ne *Mytilus* ģints pārstāvju, paraugam jābūt reprezentatīvam attiecībā uz visām citām pārstāvētajām uzņēmīgajām sugām;

b) ja ražošanas vienībās ir novājinātas, atvērušās vai nesen nobeigušās, taču nesadalījušās gliemenes, pirmām kārtām ievāc tās. Ja šādu gliemeņu nav, paraugam ņemto gliemeņu vidū jābūt vecākajām veselīgajām gliemenēm;

c) ja paraugus ņem saimniecībās, kurās gliemeņu audzēšanā izmanto vairāk nekā vienu ūdensapgādes avotu, paraugu ņemšanai reprezentatīvi jāaptver gliemenes no visiem ūdensapgādes avotiem, raugoties, lai paraugā būtu proporcionāli pārstāvētas visas saimniecības daļas;

d) ņemot paraugus gliemeņu audzēšanas teritorijās, gliemenes no pietiekami daudziem paraugu ņemšanas punktiem paraugam ievāc tā, lai tajā būtu proporcionāli pārstāvētas visas gliemeņu audzēšanas teritorijas daļas. Galvenie faktori, kas jāņem vērā, šos paraugu ņemšanas punktus izraugoties, ir līdzšinējie paraugu ņemšanas punkti, kuros konstatēta *Marteilia refringens*, apdzīvotības biezība, ūdens plūsmas, uzņēmīgo sugu klātbūtne, vektorsugu klātbūtne, batimetrija un saimniekošanas prakses. Paraugu ievākšanai jāaptver arī dabiskās gultnes.

I.2. Konkrētas prasības I kategorijas veselības statusa iegūšanai attiecībā uz *Marteilia refringens*

I.2.1. Uzraudzības programmas

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens* ir III kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām vai gliemeņu audzēšanas teritorijām, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta vismaz šāda uzraudzības programma, kurā ietilpst veselības pārbaudes un paraugu ņemšana testēšanai.

Divgadīgā uzraudzības programma:

a) saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās vismaz divus secīgus gadus ir veiktas veselības pārbaudes un ņemti paraugi, kā noteikts II iedaļas 4.A tabulā;

b) šajā divu gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *Marteilia refringens* ir iegūti negatīvi rezultāti un saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir izslēgtas jebkādas aizdomas par *Marteilia refringens*;

c) ja paraugā jāiekļauj *Ostrea edulis, Mytilus edulis* vai *Mytilus galloprovincialis*, kas iegūtas no dalībvalsts, zonas vai iecirkņa ar I kategorijas veselības statusu, tām saimniecībā vai gliemeņu audzēšanas teritorijā jābūt introducētām vismaz pavasarī tieši pirms uzraudzības programmas īstenošanas perioda.

I.2.2. Izskaušanas programmas

Uzskata, ka lielākajā daļā gadījumu *Marteilia refringens* izskaust nav iespējams, taču, ja dalībvalsts to uzskata par iespējamu, izmanto šāda parauga izskaušanas programmu.

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām vai gliemeņu audzēšanas teritorijām, kuras attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta vismaz šāda izskaušanas programma:

a) ir faktiski veikti Direktīvas 2006/88/EK V nodaļas 3. iedaļā noteiktie pasākumi, un tās(-o) saimniecības(-u) vai gliemeņu audzēšanas teritorijas(-u) apkaimē, kas oficiāli deklarēta(-s) par inficētu(-ām) ar *Marteilia refringens*, jo īpaši ir izveidota Direktīvas 2006/88/EK 32. panta b) punktā minētā robežzona, kurā ietilpst aizsardzības zona un uzraudzības zona.

Robežzonu katrā gadījumā definē atsevišķi, ņemot vērā faktorus, kas ietekmē tādus *Marteilia refringens* izplatīšanās riskus kā: ar *Marteilia refringens* inficētās saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas gliemeņu, arī savvaļas gliemeņu, mirstība pēc skaita, mirstības raksturojums pēc vecuma, mirstības rādītājs un sadalījums; attālums līdz apkaimes saimniecībām vai gliemeņu audzēšanas teritorijām un to biezība, ieskaitot savvaļas gliemenes; tas, cik tuvu atrodas pārstrādes uzņēmumi, tādas saimniecības, ar kurām ir saskare, vai gliemeņu audzēšanas teritorijas; sugas, jo īpaši uzņēmīgas sugas un vektorsugas, kas atrodas saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās; slimības skartajās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās un to apkaimes saimniecībās un gliemeņu audzēšanas teritorijās izmantotā audzēšanas prakse; hidrodinamiskie apstākļi un citi konstatēti epidemioloģiski nozīmīgi faktori.

Veidojot aizsardzības zonu un uzraudzības zonu, uz tām attiecina šādas minimālās prasības:

i) par inficētu ar *Marteilia refringens* oficiāli deklarētas saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas tuvākajā apkaimē izveido aizsardzības zonu, kas atbilst teritorijai, kuru nosaka saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem;

ii) ārpus aizsardzības zonas izveido to aptverošu uzraudzības zonu, kas atbilst teritorijai, kuru nosaka saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem;

b) visās saimniecībās un gliemeņu audzēšanas teritorijās, kas aizsardzības zonā tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas un kas nav oficiāli deklarētas par inficētām ar *Marteilia refringens*, veic oficiālu izmeklēšanu, kurā tiek vismaz ņemti paraugi 150 gliemeņu testēšanai pēc *Marteilia refringens* transmisijas perioda sākuma. Ja transmisijas periods nav zināms, paraugu ņemšanu sāk periodā, kurā ūdens temperatūra pārsniegusi 17 °C;

c) visas saimniecības un gliemeņu audzēšanas teritorijas, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *Marteilia refringens*, jāiztukšo, tajās jāīsteno neizmantošanas periods, ja iespējams, tās jāiztīra un jādezinficē.

Neizmantošanas periods ir vismaz:

i) divi mēneši saimniecībām un gliemeņu audzēšanas teritorijām, kas ir ierobežoti savienotas ar tādiem apkārtējiem ūdeņiem kā ikru inkubatori un mazuļu audzētavas;

ii) divi mēneši saimniecībām un gliemeņu audzēšanas teritorijām, kas ir neierobežoti savienotas ar apkārtējiem ūdeņiem, ja vien uzņēmīgo sugu inficētās gliemenes un tādas uzņēmīgo sugu gliemenes, kas epidemioloģiski saistītas ar inficēto saimniecību vai gliemeņu audzēšanas teritoriju, ir ievāktas vai aizvāktas, pirms iestājies gada periods, par kuru zināms, ka *Marteilia refringens* izplatība tad ir maksimāla, vai, ja šis periods nav zināms, pirms perioda, kad ūdens temperatūra pārsniedz 17 °C;

iii) četrpadsmit mēneši saimniecībām un gliemeņu audzēšanas teritorijām, kas ir neierobežoti savienotas ar apkārtējiem ūdeņiem, ja vien uzņēmīgo sugu inficētās gliemenes un tādas uzņēmīgo sugu gliemenes, kas epidemioloģiski saistītas ar inficēto saimniecību vai gliemeņu audzēšanas teritoriju, nav ievāktas vai aizvāktas, pirms iestājies gada periods, par kuru zināms, ka *Marteilia refringens* izplatība tad ir maksimāla, vai, ja šādi dati nav zināmi, pirms perioda, kad ūdens temperatūra pārsniedz 17 °C, kamēr uzņēmīgo sugu gliemenes nav ievāktas vai aizvāktas.

Kad visas oficiāli par inficētām deklarētās saimniecības un gliemeņu audzēšanas teritorijas ir iztukšotas, jāīsteno vismaz četras nedēļas ilgs sinhronizēts neizmantošanas periods.

Kompetentā iestāde var nolemt pieprasīt, lai izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās tiktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un turētas neizmantotas arī citas saimniecības. Minētā neizmantošanas perioda ilgumu kompetentā iestāde nosaka, izvērtējot risku katrā atsevišķā gadījumā;

d) visās par inficētām oficiāli deklarētajās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās un visās citās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods, krājumus atjauno ar gliemenēm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I kategorijas veselības statusu attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens*.

Krājumus atjauno tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības ir saskaņā ar I.2.2. punkta c) apakšpunktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās attiecīgi īstenots neizmantošanas periods;

e) uz visām saimniecībām un gliemeņu audzēšanas teritorijām, kas izskaušanas programmas aptvertajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, pēc tam jāattiecina šīs daļas I.2.1. punktā aprakstītā uzraudzības shēma.

I.3. Konkrētas prasības veselības statusa "slimības neskarts" (I kategorija) saglabāšanai attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens*

Gadījumos, kur I kategorijas veselības statusa saglabāšanai ir nepieciešama mērķorientēta uzraudzība, kā paredzēts Direktīvas 2006/88/EK 52. pantā, visās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, izdara veselības pārbaudes un ņem paraugus saskaņā ar II iedaļas 4.B tabulu, ņemot vērā to, kāda ir saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas riska pakāpe attiecībā uz aplipšanu ar *Marteilia refringens*.

Statusu "slimības neskarts" drīkst saglabāt tikai tik ilgi, kamēr, visiem paraugiem izmantojot II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *Marteilia refringens* rezultāti ir negatīvi, un saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir izslēgtas jebkādas aizdomas par *Marteilia refringens*.

I.4. Prasības attiecībā uz Direktīvas 2006/88/EK 39. pantā paredzēto ierobežošanas pasākumu atcelšanu (pāreja no V kategorijas uz III kategorijas veselības statusu) attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens*

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt III kategorijas veselības statusu, ja vien:

a) ir izpildītas I.2.2. punkta a), b) un c) apakšpunkta prasības. Ja neizmantošanas periodu īstenot nav tehniski iespējams, uz šīm saimniecībām attiecina kādu alternatīvu pasākumu, kas gandrīz līdzvērtīgi nodrošina *Marteilia refringens* iznīcināšanu saimniecības vidē;

b) visās par inficētām oficiāli deklarētajās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās un visās citās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods/saskaņā ar a) apakšpunktu veikti alternatīvi pasākumi, krājumi ir atjaunoti ar gliemenēm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonas vai iecirkņiem ar I, II vai III kategorijas veselības statusu attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens*;

c) krājumi atjaunoti tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās īstenots neizmantošanas periods vai uz tām attiecināti alternatīvi pasākumi saskaņā ar a) apakšpunktu;

d) divu gadu laikā, kas seko a), b) un c) apakšpunktā minēto pasākumu izpildei, nav apstiprināta inficēšanās ar *Marteilia refringens* un šajā periodā aizdomas tikušas izslēgtas saskaņā ar II.3. punktā noteiktajām procedūrām.

II. **Diagnostikas metodes un oficiālie izmeklējumi**

II.1. Paraugi

II.2. un II.3. punktā paredzēto diagnostisko testu vajadzībām laboratorijā nodod visu dzīvnieka ķermeni.

II.2. Diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts" attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens*

Diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens* iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts", saskaņā ar II pielikuma 4. daļā aprakstītajām detalizētajām diagnostikas metodēm un procedūrām ir histopatoloģija, audu nospiedumi vai *PCR*.

II.3. Oficiālās izmeklēšanas metodes un diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai apstiprinātu *Marteilia refringens* klātbūtni vai izslēgtu aizdomas par inficēšanos ar to

Ja nepieciešams saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 28. pantu apstiprināt vai izslēgt aizdomas par inficēšanos ar *Marteilia refringens*, ievēro šādu pārbaudes, paraugu ņemšanas un testēšanas procedūru:

a) oficiālajā izmeklēšanā ietilpst vismaz viens pēc *Marteilia refringens* transmisijas perioda sākšanās ņemts paraugs ar 30 gliemenēm no uzņēmīgām sugām (ja aizdomu pamatā ir ziņas par mirstību) vai ar 150 gliemenēm no uzņēmīgām sugām (ja ziņu par mirstību nav bijis). Ja transmisijas periods nav zināms, paraugu ņemšanu sāk periodā, kurā ūdens temperatūra pārsniegusi 17 °C;

b) paraugus testē, saskaņā ar II pielikuma 4. daļas I iedaļā aprakstītajām detalizētajām diagnostikas metodēm un procedūrām izmantojot i) punktā aprakstītās diagnostikas metodes:

i) *Marteilia refringens* klātbūtni uzskata par apstiprinātu tad, ja papildus pozitīvam rezultātam, kas iegūts histopatoloģijā, ar audu nospiedumiem vai *in situ* hibridizācijā, šāds rezultāts ir iegūts arī *PCR*, pēc kuras izdarīta sekvenēšana;

ii) ja i) punktā minētie testi par *Marteilia refringens* klātbūtni tālāk neliecina, aizdomas par inficēšanos ar *Marteilia refringens* var izslēgt.

4.A tabula

Uzraudzības shēma dalībvalstīm, zonām un iecirkņiem, paredzēta kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *Marteilia refrigens*, kā minēts I.2.1. punktā

	Veselības pārbaužu skaits gadā	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā	Gliemeņu skaits paraugā
Saimniecības/gliemeņu audzēšanas teritorijas	1	1	150

4.B tabula

Uzraudzības shēmas dalībvalstīm, zonām un iecirkņiem statusa "slimības neskarts" saglabāšanai attiecībā uz *Marteilia refringens*, kā minēts I.3. punktā

Riska pakāpe	Veselības pārbaužu skaits	Laboratorisko izmeklējumu skaits	Gliemeņu skaits paraugā
Augsta	Reizi gadā	Reizi divos gados	150
Vidēja	Reizi divos gados	Reizi divos gados	150
Zema	Reizi divos gados	Reizi četros gados	150

5. DAĻA

UZRAUDZĪBAS UN KONTROLES METODES ATTIECĪBĀ UZ INFICĒŠANOS AR *BONAMIA OSTREAE*

I. **Uzraudzības vai izskaušanas programmām izvirzītās prasības, kas jāievēro, lai iegūtu un saglabātu veselības statusus "slimības neskarts" attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae***

I.1. Vispārīgas prasības

Veselības pārbaudes un attiecīgā gadījumā paraugu ņemšana jāveic gada periodā, par kuru zināms, ka *Bonamia ostreae* izplatība attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tad ir maksimāla. Ja šādi dati nav pieejami, paraugus ņem ziemā vai pavasara sākumā.

Ja saskaņā ar 5. daļas prasībām jāņem gliemeņu paraugi, izmanto šādus kritērijus:

a) ja ir sastopama *Ostrea edulis*, paraugam ņem tikai šīs sugas austeres. Ja *Ostrea edulis* nav, paraugam jābūt reprezentatīvam attiecībā uz visām citām pārstāvētajām uzņēmīgajām sugām;

b) ja sastopamas novājinātas, atvērušās vai nesen nobeigušās, taču nesadalījušās gliemenes, pirmām kārtām ievāc tās. Ja šādu gliemeņu nav, paraugam ņemto gliemeņu vidū jābūt vecākajām veselīgajām gliemenēm;

c) ņemot paraugus saimniecībās, kurās gliemeņu audzēšanā izmanto vairāk nekā vienu ūdensapgādes avotu, paraugu ņemšanai reprezentatīvi jāaptver gliemenes no visiem ūdensapgādes avotiem, raugoties, lai paraugā būtu proporcionāli pārstāvētas visas saimniecības daļas;

d) ņemot paraugus gliemeņu audzēšanas teritorijās, paraugam ievāc gliemenes no skaitā pietiekamiem paraugu ņemšanas punktiem. Galvenie faktori, kas jāņem vērā, šos paraugu ņemšanas punktus izraugoties, ir līdzšinējie punkti, kuros konstatēta *Bonamia ostreae*, apdzīvotības biezība, ūdens plūsmas, uzņēmīgo sugu klātbūtne, vektorsugu klātbūtne, batimetrija un saimniekošanas prakses. Paraugu ievākšanai jāaptver arī audzēšanas teritorijās vai tām blakus esošās dabiskās gultnes.

I.2. Konkrētas prasības I kategorijas veselības statusa iegūšanai attiecībā uz *Bonamia ostreae*

I.2.1. Uzraudzības programmas

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *Bonamia ostreae* ir III kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var atgūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta vismaz šāda uzraudzības programma, kurā ietilpst veselības pārbaudes un paraugu ņemšana testēšanai.

Divgadīgā uzraudzības programma:

a) saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, kas tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, vismaz divus secīgus gadus ir veiktas veselības pārbaudes un ņemti paraugi, kā noteikts šajā daļā sniegtajā 5.A tabulā;

b) šajā divu gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *Bonamia ostreae* ir iegūti negatīvi rezultāti un saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir izslēgtas jebkādas aizdomas par *Bonamia ostreae*;

c) ja paraugā jāiekļauj *Ostrea edulis*, kas iegūtas no dalībvalsts, zonas vai iecirkņa ar I kategorijas veselības statusu, tām jābūt saimniecībā vai gliemeņu audzēšanas teritorijā introducētām vismaz rudenī tieši pirms uzraudzības programmas īstenošanas perioda.

I.2.2. Izskaušanas programmas

Uzskata, ka lielākajā daļā gadījumu *Bonamia ostreae* izskaust nav iespējams, taču, ja dalībvalsts to uzskata par iespējamu, izmanto šāda parauga izskaušanas programmu.

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var atgūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām vai gliemeņu audzēšanas teritorijām, kuras attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta vismaz šāda izskaušanas programma:

a) ir faktiski veikti Direktīvas 2006/88/EK V nodaļas 3. iedaļā noteiktie minimālie kontroles pasākumi, un tās(-o) saimniecības(-u) vai gliemeņu audzēšanas teritorijas(-u) apkaimē, kas oficiāli deklarēta(-s) par inficētu(-ām) ar *Bonamia ostreae*, jo īpaši ir izveidota šīs direktīvas 32. panta b) punktā minētā robežzona, kurā ietilpst aizsardzības zona un uzraudzības zona.

Robežzonu katrā gadījumā definē atsevišķi, ņemot vērā faktorus, kas ietekmē tādus šīs sarakstā iekļautās slimības izplatīšanās riskus kā: ar *Bonamia ostreae* inficētās saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas gliemeņu, arī savvaļas gliemeņu, mirstība pēc skaita, tās rādītājs, raksturojums pēc vecuma un sadalījuma; attālums līdz apkaimes saimniecībām vai gliemeņu audzēšanas teritorijām un to biezība, ieskaitot savvaļas gliemenes; tas, cik tuvu atrodas pārstrādes uzņēmumi, tādas saimniecības, ar kurām ir saskare, vai gliemeņu audzēšanas teritorijas; sugas, kas atrodas saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, jo īpaši uzņēmīgās sugas un vektorsugas; slimības skartajās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās un to apkaimes saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās izmantotā audzēšanas prakse; hidrodinamiskie apstākļi un citi epidemioloģiski nozīmīgi konstatēti faktori.

Veidojot aizsardzības zonu un uzraudzības zonu, uz tām attiecina šādas minimālās prasības:

i) par inficētu ar *Bonamia ostreae* oficiāli deklarētās saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas tiešā tuvumā izveido aizsardzības zonu, kas atbilst teritorijai, kuru nosaka saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epizootioloģiskiem datiem;

ii) ārpus aizsardzības zonas izveido to aptverošu uzraudzības zonu, kas atbilst teritorijai, kuru nosaka saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem;

b) visās saimniecībās un gliemeņu audzēšanas teritorijās, kas aizsardzības zonā tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas un kas nav oficiāli deklarētas par inficētām ar *Bonamia ostreae*, jāveic oficiāla izmeklēšana, kurā vismaz tiek ņemti paraugi 150 pie uzņēmīgām sugām piederošu gliemeņu testēšanai pēc *Bonamia ostreae* transmisijas perioda sākuma. Ja transmisijas periods nav zināms, paraugus sāk ņemt ziemā vai pavasara sākumā;

c) visas saimniecības un gliemeņu audzēšanas teritorijas, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *Bonamia ostreae*, ir jāiztukšo, tajās jāīsteno neizmantošanas periods un, ja iespējams, tās jāiztīra un jādezinficē. Neizmantošanas periods ir vismaz seši mēneši.

Kad visas oficiāli par inficētām deklarētās saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas ir iztukšotas, jāīsteno vismaz četras nedēļas ilgs sinhronizēts neizmantošanas periods.

Kompetentā iestāde var nolemt pieprasīt, lai izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās tiktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un turētas neizmantotas arī citas saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas. Minētā neizmantošanas perioda ilgumu kompetentā iestāde nosaka, izvērtējot risku katrā atsevišķā gadījumā;

d) visās par inficētām oficiāli deklarētajās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās un visās citās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods, krājumus atjauno ar gliemenēm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I kategorijas veselības statusu attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae*. Krājumus atjauno tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības ir saskaņā ar I.2.2. punkta c) apakšpunktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās attiecīgi īstenots neizmantošanas periods;

e) uz visām saimniecībām un gliemeņu audzēšanas teritorijām, kas izskaušanas programmas aptvertajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, pēc tam jāattiecina I.2. punktā noteiktā uzraudzības programma.

I.3. Konkrētas prasības veselības statusa "slimības neskarts" (I kategorija) saglabāšanai attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae*

Gadījumos, kur I kategorijas veselības statusa saglabāšanai ir nepieciešama mērķorientēta uzraudzība, kā noteikts Direktīvas 2006/88/EK 52. pantā, visās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, izdara veselības pārbaudes un ņem paraugus saskaņā ar šīs daļas II iedaļas 5.B tabulu, ņemot vērā to, kāda ir saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas riska pakāpe attiecībā uz aplipšanu ar *Bonamia ostreae*.

Statusu "slimības neskarts" attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae* drīkst saglabāt tikai tik ilgi, kamēr, visiem paraugiem izmantojot II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz *Bonamia ostreae* ir iegūti negatīvi rezultāti, un saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir izslēgtas jebkādas aizdomas par *Bonamia ostreae*.

I.4. Prasības attiecībā uz Direktīvas 2006/88/EK 39. pantā paredzēto ierobežošanas pasākumu atcelšanu (pāreja no V kategorijas uz III kategorijas veselības statusu) attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae*

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo slimību var iegūt III kategorijas veselības statusu, ja vien:

a) ir izpildītas I.2.2. punkta a), b) un c) apakšpunkta prasības. Ja neizmantošanas periodu īstenot nav tehniski iespējams, uz šīm saimniecībām attiecina kādu alternatīvu pasākumu, kas gandrīz līdzvērtīgi nodrošina *Bonamia ostreae* iznīcināšanu saimniecības vidē;

b) visās par inficētām oficiāli deklarētajās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās un visās citās saimniecībās vai gliemeņu audzēšanas teritorijās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods/saskaņā ar a) apakšpunktu veikti alternatīvi pasākumi, krājumi ir atjaunoti ar gliemenēm, kas iegūtas no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I, II vai III kategorijas veselības statusu attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae*;

c) krājumi atjaunoti tikai pēc tam, kad visas par inficētām oficiāli deklarētās saimniecības vai gliemeņu audzēšanas teritorijas iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās īstenots neizmantošanas periods/saskaņā ar a) apakšpunktu veikti alternatīvi pasākumi;

d) divu gadu laikā, kas seko a), b) un c) apakšpunktā minēto pasākumu izpildei, nav apstiprināta inficēšanās ar *Bonamia ostreae* un šajā periodā aizdomas tikušas izslēgtas saskaņā ar II.3. punktā noteiktajām procedūrām.

II. **Diagnostikas metodes un kritēriji**

II.1. Paraugi

II.2. un II.3. punktā paredzēto diagnostisko testu veikšanai laboratorijā nodod visu dzīvnieka ķermeni.

II.2. Diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts" attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae*

Diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai attiecībā uz inficēšanos ar *Bonamia ostreae* iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts", ir histopatoloģija, audu nospiedumi vai *PCR*. Izmantojot šīs diagnostikas metodes, ievēro II pielikuma 5. daļā aprakstītās attiecīgās detalizētās metodes un procedūras.

II.3. Diagnostikas kritēriji, kas jāizmanto, lai apstiprinātu *Bonamia ostreae* klātbūtni vai izslēgtu aizdomas par inficēšanos ar to

Ja nepieciešams saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 28. pantu apstiprināt vai izslēgt aizdomas par inficēšanos ar *Bonamia ostreae*, ievēro šādu pārbaudes, paraugu ņemšanas un testēšanas procedūru.

Oficiālajā izmeklēšanā ietilpst vismaz viens pēc *Bonamia ostreae* transmisijas perioda sākšanās ņemts paraugs ar 30 gliemenēm no uzņēmīgām sugām (ja aizdomu pamatā ir ziņojums par mirstību) vai ar 150 gliemenēm no uzņēmīgām sugām (ja ziņu par mirstību nav bijis). Ja transmisijas periods nav zināms, paraugus sāk ņemt ziemā vai pavasara sākumā. Paraugus testē, saskaņā ar II pielikuma 5. daļas I iedaļā aprakstītajām detalizētajām diagnostikas metodēm un procedūrām izmantojot i) punktā aprakstītās diagnostikas metodes:

i) *Bonamia ostreae* klātbūtni uzskata par apstiprinātu tad, ja, ievērojot II pielikuma 5. daļā aprakstītās apstiprinātās metodes un procedūras, papildus pozitīvam rezultātam, kas iegūts histopatoloģijā, ar audu nospiedumiem vai *in situ* hibridizācijā, šāds rezultāts ir iegūts arī *PCR*, pēc kuras izdarīta sekvenēšana;

ii) ja šie testi *Bonamia ostreae* klātbūtni tālāk neapliecina, aizdomas par *Bonamia ostreae* infekcijas klātbūtni izslēdz.

5.A tabula

Uzraudzības shēma dalībvalstīm, zonām un iecirkņiem, paredzēta kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *Bonamia ostreae*, kā minēts I.2.1. punktā

	Veselības pārbaužu skaits gadā	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā	Gliemeņu skaits paraugā
Saimniecības/gliemeņu audzēšanas teritorijas	1	1	150

5.B tabula

Uzraudzības shēmas dalībvalstīm, zonām un iecirkņiem I.3. punktā minētā statusa "slimības neskarts" saglabāšanai attiecībā uz *Bonamia ostreae*

Riska pakāpe	Veselības pārbaužu skaits	Laboratorisko izmeklējumu skaits	Gliemeņu skaits paraugā
Augsta	Reizi gadā	Reizi divos gados	150
Vidēja	Reizi divos gados	Reizi divos gados	150
Zema	Reizi divos gados	Reizi četros gados	150

6. DAĻA

UZRAUDZĪBAS UN KONTROLES METODES ATTIECĪBĀ UZ BALTO PLANKUMU SLIMĪBU (*WSD*)

I. **Uzraudzības un izskaušanas programmām izvirzītās prasības, kas jāievēro, lai iegūtu un saglabātu veselības statusus "slimības neskarts" attiecībā uz *WSD* un ierobežotu inficēšanos ar *WSSV***

I.1. Vispārīgas prasības attiecībā uz pārbaudēm un paraugu ņemšanu

Laboratoriskai izmeklēšanai paredzētiem paraugiem vēžveidīgos ņem tad, kad ir varbūtīgi, ka sasniegta gada augstākā ūdens temperatūra. Ja tas praktiski iespējams un lietderīgi, prasība par ūdens temperatūru jāattiecina arī uz veselības pārbaudēm.

Ja saskaņā ar šīs daļas prasībām jāņem saimniecības audzētu vēžveidīgo paraugi, izmanto šādus kritērijus:

a) ja ražošanas vienībās ir novājināti vai mirstoši vēžveidīgie, pirmām kārtām ievāc tos. Ja šādu vēžveidīgo nav, paraugam ņemto vēžveidīgo vidū jābūt pie izraudzītajām uzņēmīgajām sugām piederošiem un paraugā ar dažādām lieluma kohortām proporcionāli pārstāvētiem vēžveidīgajiem, proti, jaunuļiem un pieaugušiem indivīdiem;

b) ja vēžveidīgo audzēšanai izmanto vairāk nekā vienu ūdensapgādes avotu, paraugu ņemšanai reprezentatīvi jāaptver vēžveidīgie no visiem ūdensapgādes avotiem.

Ja saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu ir vajadzīga mērķorientēta savvaļas populāciju uzraudzība, paraugu ņemšanas punktu skaitu un ģeogrāfisko sadalījumu nosaka tā, lai būtu panākts saprātīgs dalībvalsts, zonas vai iecirkņa aptvērums. Paraugu ņemšanas punktiem reprezentatīvi jāpārstāv arī dažādās ekosistēmas, kur atrodas uzņēmīgo sugu savvaļas populācijas, proti, jūras, grīvu, upju un ezeru sistēmas.

Ja saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu ir vajadzīga mērķorientēta savvaļas populāciju uzraudzība, paraugam ņemtos vēžveidīgos izraugās šādi:

i) jūras un grīvu sistēmu teritorijās izraugās vienu vai vairākas no šādām sugām: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* vai tīģergarneļu sugas, proti, *Penaeus japonicus, Penaeus kerathurus, Penaeus semisulcatus*. Ja minēto sugu nav, paraugam jābūt reprezentatīvam attiecībā uz citām pārstāvētajām uzņēmīgajām desmitkājvēžu sugām. Tā kā uzņēmīgo saimniekorganismu klāsts ir plašs, tos var izraudzīties no tādām desmitkājvēžu ģintīm vai dzimtām, kuru uzņēmība ir eksperimentāli vai dabiski pierādīta;

ii) upju un ezeru sistēmās izraugās vienu vai vairākas no šādām sugām: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* vai *Orconectes limosus*. Ja minēto sugu nav, paraugam jābūt reprezentatīvam attiecībā uz citām pārstāvētajām uzņēmīgajām desmitkājvēžu sugām. Tā kā uzņēmīgo saimniekorganismu klāsts ir plašs, tos var izraudzīties no tādām desmitkājvēžu ģintīm vai dzimtām, kuru uzņēmība ir eksperimentāli vai dabiski pierādīta;

iii) ja vēžveidīgo vidū ir novājināti vai mirstoši vēžveidīgie, pirmām kārtām ievāc tos. Ja šādu vēžveidīgo nav, paraugam ņemto vēžveidīgo vidū jābūt pie izraudzītajām uzņēmīgajām sugām piederošiem un paraugā ar dažādām lieluma kohortām proporcionāli pārstāvētiem vēžveidīgajiem, proti, jaunuļiem un pieaugušiem indivīdiem.

I.2. Konkrētas prasības I kategorijas veselības statusa iegūšanai attiecībā uz *WSD*

I.2.1. Uzraudzības programmas

a) Kāda dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *WSD* saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK III pielikuma B daļu ir III kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien minētajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī visas saimniecības, kuras tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, atbilst attiecīgajām minētās direktīvas V pielikuma prasībām un ja uz visām minētajām saimniecībām un, ja vajadzīgs saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu, arī uz paraugu ņemšanas punktiem saskaņā ar minēto daļu izraudzītās savvaļas populācijās ir bijusi attiecināta šāda divgadīga uzraudzības programma, kurā ietilpst veselības pārbaudes un paraugu ņemšana testēšanai.

Saimniecībās vai paraugu ņemšanas punktos vismaz divus secīgus gadus ir veiktas veselības pārbaudes un ņemti paraugi, kā noteikts II iedaļas 6.A tabulā.

Šajā divu gadu periodā visu paraugu testēšanā, kurā izmanto II.2. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, attiecībā uz inficēšanos ar *WSD* ir iegūti negatīvi rezultāti un saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm ir izslēgtas jebkādas aizdomas par *WSD*.

b) Ja a) apakšpunktā minētās uzraudzības programmas īstenošanas laikā kādā šīs uzraudzības programmas aptvertā saimniecībā ir apstiprināta inficēšanās ar *WSSV* un ja tāpēc saimniecībai ir atņemts II kategorijas veselības statuss, saimniecība II kategorijas veselības statusu var nekavējoties atgūt un statusa "slimības neskarts" iegūšanai paredzētās uzraudzības programmas īstenošanu turpināt, neīstenojot I.2.2. punktā izklāstīto izskaušanas programmu, ja vien:

i) tā ir kontinentāla saimniecība, kuras veselības statuss attiecībā uz *WSD* saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 3. punktu nav atkarīgs no apkārtējo dabisko ūdeņu veselības statusa attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību;

ii) tā ir iztukšota, iztīrīta, dezinficēta un tajā īstenots neizmantošanas periods; neizmantošanas periodam jāilgst vismaz sešas nedēļas;

iii) tās krājumi ir atjaunoti ar vēžveidīgajiem, kas iegūti no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *WSD* ir I kategorijas veselības statuss.

I.2.2. Izskaušanas programmas

I.2.2.1. Vispārīgas prasības

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *WSD* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt I kategorijas veselības statusu, ja vien uz visām saimniecībām, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, ir bijusi attiecināta vismaz šāda izskaušanas programma:

a) ir faktiski veikti Direktīvas 2006/88/EK V nodaļas 4. iedaļā noteiktie minimālie kontroles pasākumi, un tās(-o) saimniecības(-u) apkaimē, kas oficiāli deklarēta(-s) par inficētu(-ām) ar *WSD*, ir izveidota šīs direktīvas 32. panta b) punktā minētā robežzona, kurā ietilpst aizsardzības zona un uzraudzības zona.

Robežzonai jābūt definētai katrā gadījumā atsevišķi, ņemot vērā faktorus, kas attiecībā uz *WSD* izplatīšanos uz saimniecībās audzētiem un savvaļas vēžveidīgajiem, ietekmē tādus riskus kā: ar *WSD* inficētās saimniecības vēžveidīgo mirstība pēc skaita, tās rādītājs un sadalījums; attālums līdz apkaimes saimniecībām un to biezība; saskarē esošās saimniecības; saimniecībās pārstāvētās sugas; slimības skartajās saimniecībās un to apkaimes saimniecībās izmantotā audzēšanas prakse; hidrodinamiskie apstākļi un citi epidemioloģiski nozīmīgi konstatēti faktori.

Veidojot aizsardzības zonu un uzraudzības zonu, uz tām attiecina šādas minimālās prasības:

i) par inficētu ar *WSD* oficiāli deklarētas saimniecības tuvākajā apkaimē izveido aizsardzības zonu, kura atbilst:

1) jūras un grīvas teritorijās – teritorijai, kas ietilpst aplī, kura rādiuss atbilst vismaz vienas plūdmaiņu joslas platumam vai ir vismaz 5 km (izmanto lielāko vērtību) un kura centrs ir saimniecība, kas oficiāli deklarēta par inficētu ar *WSD*, vai līdzvērtīgai teritorijai, kas noteikta saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem; vai

2) saldūdeņos – visai ūdens sateces teritorijai, kas atbilst saimniecībai, kura oficiāli deklarēta par inficētu ar *WSD*; kompetentā iestāde aizsardzības zonu var ierobežot tikai ar ūdens sateces teritorijas daļām, ja vien tādējādi nepasliktinās *WSD* izplatības profilakse;

ii) ārpus aizsardzības zonas izveido uzraudzības zonu, un tā atbilst:

1) jūras teritorijās – aizsardzības zonu aptverošai teritorijai, kurā vērojama plūdmaiņu joslu zonu pārklāšanās; vai aizsardzības zonu aptverošai teritorijai, kas ietilpst aplī, kura rādiuss ir 10 km no aizsardzības zonas centra; vai līdzvērtīgai teritorijai, kas noteikta saskaņā ar attiecīgiem hidrodinamiskiem vai epidemioloģiskiem datiem; vai

2) saldūdeņos – paplašinātai teritorijai ārpus izveidotās aizsardzības zonas;

b) visās saimniecībās, kas aizsardzības zonā tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas un kas nav oficiāli deklarētas par inficētām ar *WSD*, veic oficiālu izmeklēšanu, kurā ietilpst vismaz šādi elementi:

i) ja klīniski vai *post mortem* ir novērotas *WSD* infekcijai raksturīgas pazīmes, paraugu ievākšana 10 vēžveidīgo testēšanai vai, ja šādas pazīmes klīniski vai *post mortem* nav novērotas, 150 vēžveidīgo testēšanai, un

ii) viena veselības pārbaude; saimniecībās, kur i) punktā minētajos testos gūtie rezultāti ir negatīvi, sezonā, kad ūdens temperatūrai ir varbūtīgi sasniegt gada augstākās vērtības, veselības pārbaudes reizi mēnesī turpina līdz brīdim, kad aizsardzības zonu saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu atceļ;

c) visas saimniecības, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *WSD*, jāiztukšo, jāiztīra, jādezinficē, un tajās jāīsteno neizmantošanas periods. Neizmantošanas periods ir vismaz sešas nedēļas. Kad visas oficiāli par inficētām deklarētās saimniecības ir iztukšotas, jāīsteno vismaz trīs nedēļas ilgs sinhronizēts neizmantošanas periods. Šī rindkopa attiecas arī uz jaunām saimniecībām, kas izskaušanas programmas īstenošanas laikā ir oficiāli deklarētas par inficētām.

Kad oficiāli par inficētām deklarētajās saimniecībās ir īstenots neizmantošanas periods, aizsardzības zonas pārveido par uzraudzības zonām.

Kompetentā iestāde var nolemt pieprasīt, lai izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās tiktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un turētas neizmantotas arī citas saimniecības. Minētā neizmantošanas perioda ilgumu kompetentā iestāde nosaka, izvērtējot risku katrā atsevišķā gadījumā;

d) visās saimniecībās, kuras oficiāli deklarētas par inficētām, un visās citās saimniecībās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods, krājumus atjauno:

i) ar vēžveidīgajiem, kas iegūti no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *WSD* ir I kategorijas veselības statuss; vai

ii) pārejas periodā līdz 2020. gada 31. decembrim ar vēžveidīgajiem no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar apstiprinātu *WSD* uzraudzības programmu.

Krājumus atjauno tikai pēc tam, kad visas saimniecības, kas oficiāli deklarētas par inficētām ar *WSD*, ir saskaņā ar I.2.2.1. punkta c) apakšpunktu iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās attiecīgi īstenots neizmantošanas periods;

e) uz visām saimniecībām, kas izskaušanas programmas aptvertajā dalībvalstī, zonā vai iecirknī tur Direktīvas 2006/88/EK IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, un, ja ir vajadzīga savvaļas populāciju uzraudzība, uz paraugu ņemšanas punktiem, kas izraudzīti saskaņā ar minētās direktīvas V pielikuma I daļas 2. punkta otro daļu, vēlāk jābūt attiecinātai vismaz I.2.1. punktā noteiktajai uzraudzības programmai.

I.2.2.2. Statusa "slimības neskarts" (attiecībā uz *WSD*) atgūšanas prasības, ko izvirza attiecībā uz kontinentāliem iecirkņiem, kuri sastāv tikai no vienas saimniecības, kas agrāk deklarēta par *WSD* neskartu

Kontinentāls iecirknis, kas sastāv tikai no vienas saimniecības, kurai attiecībā uz *WSD* ir I kategorijas veselības statuss, kuras veselības statusu attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK V pielikuma II daļas 3. punktu neietekmē apkārt esošie dabiskie ūdeņi un kurai I kategorijas veselības statuss ir atcelts saskaņā ar minētās direktīvas 53. panta 3. punktu, I kategorijas veselības statusu var atgūt tūlīt pēc tam, kad kompetentā iestāde apstiprinājusi šādu nosacījumu izpildi:

a) saimniecība, kurā bijusi *WSD*, ir iztukšota, iztīrīta, dezinficēta un tajā īstenots neizmantošanas periods; neizmantošanas periodam jābūt bijušam vismaz sešu nedēļu ilgam;

b) saimniecībā, kurā bijusi *WSD*, krājumi ir atjaunoti ar vēžveidīgajiem, kas iegūti no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem, kuriem attiecībā uz *WSD* ir I kategorijas veselības statuss.

I.3. Konkrētas prasības veselības statusa "slimības neskarts" (I kategorija) saglabāšanai attiecībā uz *WSD*

Gadījumos, kur I kategorijas veselības statusa saglabāšanai ir nepieciešama mērķorientēta uzraudzība, kā paredzēts Direktīvas 2006/88/EK 52. pantā, visās saimniecībās, kas attiecīgajā dalībvalstī, zonā vai nodalījumā tur minētās direktīvas IV pielikuma II daļā norādītās uzņēmīgās sugas, izdara veselības pārbaudi un ņem paraugus saskaņā ar II iedaļas 6.B tabulu, ņemot vērā to, kāda ir saimniecības riska pakāpe attiecībā uz aplipšanu ar *WSD*.

Dalībvalstīs, zonās vai iecirkņos, kur saimniecību skaits ir ierobežots un šo saimniecību mērķorientēta uzraudzība nenodrošina pietiekamus epidemioloģiskus datus, statusa "slimības neskarts" saglabāšanai paredzētajās uzraudzības programmās iekļauj paraugu ņemšanas punktus, kas izraudzīti saskaņā ar I.1. punkta prasībām.

Šos paraugu ņemšanas punktus inspicē un tajos ņem paraugus, katru gadu 50 % paraugu ņemšanas punktu rotējot. Paraugus ņem saskaņā ar II iedaļas 6.B tabulu. Paraugus ņem, sagatavo un izmeklē saskaņā ar II iedaļā aprakstītajām diagnostikas un paraugu ņemšanas metodēm, un attiecībā uz *WSD* ierosinātāja klātbūtni laboratoriskajos izmeklējumos atbildei jābūt negatīvai.

Statusu "slimības neskarts" saglabā tik ilgi, kamēr, visiem paraugiem izmantojot II.2. punktā aprakstītās diagnostikas un paraugu ņemšanas metodes, attiecībā uz *WSD* rezultāti ir negatīvi un saskaņā ar II.3. punktā aprakstītajām oficiālajām izmeklēšanas un diagnostikas metodēm tiek izslēgtas jebkādas aizdomas par *WSD*.

I.4. Prasības attiecībā uz Direktīvas 2006/88/EK 39. pantā paredzēto ierobežošanas pasākumu atcelšanu (pāreja no V kategorijas uz III kategorijas veselības statusu) attiecībā uz *WSD*

Dalībvalsts, zona vai iecirknis, kam attiecībā uz *WSD* ir V kategorijas veselības statuss, attiecībā uz šo sarakstā iekļauto slimību var iegūt III kategorijas veselības statusu, ja vien:

a) ir izpildītas I.2.2.1. punkta a), b) un c) apakšpunkta prasības. Ja neizmantošanas periodu īstenot nav tehniski iespējams, uz šīm saimniecībām attiecina kādu alternatīvu pasākumu, kas gandrīz līdzvērtīgi nodrošina *WSSV* iznīcināšanu saimniecības vidē;

b) visās saimniecībās, kuras oficiāli deklarētas par inficētām ar *WSD*, un visās citās saimniecībās, kuras atrodas izveidotajās aizsardzības un uzraudzības zonās un kurās īstenots neizmantošanas periods/saskaņā ar a) apakšpunktu veikti alternatīvi pasākumi, krājumi ir atjaunoti ar vēžveidīgajiem, kas iegūti no dalībvalstīm, zonām vai iecirkņiem ar I, II vai III kategorijas veselības statusu attiecībā uz *WSD*;

c) krājumi atjaunoti tikai pēc tam, kad visas par inficētām ar *WSD* oficiāli deklarētās saimniecības iztukšotas, iztīrītas, dezinficētas un tajās īstenots neizmantošanas periods/saskaņā ar a) apakšpunktu veikti alternatīvi pasākumi;

d) divu gadu laikā pēc a) un b) apakšpunktā minēto pasākumu izpildes *WSD* nav konstatēta un šajā periodā aizdomas tikušas izslēgtas saskaņā ar II.3. punktā noteiktajām procedūrām.

II. **Diagnostikas un paraugu ņemšanas metodes**

II.1. Paraugi

Pirms sagatavo paraugus divsoļu *PCR* vajadzībām, vispārējā pārsega epidermas paraugus – nogrieztus, vai testā izmantotā dzīvnieka kāju, vēderkāju, mutes daļu vai žaunu sastāvā – fiksē 95 % etilspirtā.

Ar *PCR* iegūtu diagnostisku datu atbalstīšanai var ievākt citus paraugus, kas ar fiksēšanu sagatavoti histoloģiskai pārbaudei un mikroskopēšanai ar transmisijas elektronu mikroskopu.

II.2. Diagnostikas metodes, kas jāizmanto, lai iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *WSD*

Diagnostikas metode, kas jāizmanto, lai attiecībā uz *WSD* iegūtu vai saglabātu statusu "slimības neskarts", saskaņā ar II pielikuma 6. daļā aprakstītajām detalizētajām metodēm un procedūrām ir divsoļu *PCR*.

Ja divsoļu *PCR* ir gūts pozitīvs rezultāts, pirms īstenot Direktīvas 2006/88/EK 28. pantā paredzētos sākotnējos kontroles pasākumus, to apstiprina, sekvenējot amplikonu, – ja vien iespējams, paraugam ņemtajos uzņēmīgajos saimniekorganismos ar histoloģiskas pārbaudes un transmisijas elektronu mikroskopa starpniecību praktiski pierādot patognomoniskas *WSD* pazīmes.

II.3. Oficiālās izmeklēšanas metodes un diagnostikas metodes, ar kurām izslēdz aizdomas par *WSD* infekcijas klātbūtni vai šo infekciju apstiprina

Ja nepieciešams saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 28. pantu apstiprināt *WSD* infekcijas klātbūtni vai izslēgt aizdomas par to, ievēro šādu pārbaudes, paraugu ņemšanas un testēšanas procedūru:

a) ja klīniski vai *post mortem* ir novērotas *WSD* infekcijai atbilstošas pazīmes, oficiālā izmeklēšanā izdara vismaz vienu veselības pārbaudi un ņem vienu paraugu ar 10 vēžveidīgajiem vai, ja šādas pazīmes klīniski vai *post mortem* nav novērotas, paraugu ar 150 vēžveidīgajiem. Paraugus testē, izmantojot II.2. punktā aprakstīto diagnostikas metodi (divsoļu *PCR*);

b) *WSD* klātbūtni uzskata par apstiprinātu, ja, ievērojot šajā II pielikuma 6. daļā aprakstītās detalizētās metodes un procedūras, divsoļu *PCR*, pēc kuras veikta sekvenēšana attiecībā uz *WSSV* ir pozitīva un ja paraugam ņemtajos saimniekorganismos ir vērojamas patognomoniskas *WSD* pazīmes.

Ja šie testi *WSD* klātbūtni tālāk neapliecina, aizdomas par *WSD* var izslēgt.

6.A tabula

Uzraudzības shēma dalībvalstīm, zonām un iecirkņiem, paredzēta divu gadu kontroles periodam, kam jābūt īstenotam pirms statusa "slimības neskarts" iegūšanas attiecībā uz *WSD*, kā minēts I.2.1. punktā

	Klīnisko pārbaužu skaits gadā	Laboratorisko izmeklējumu skaits gadā	Vēžveidīgo skaits paraugā
Saimniecības/paraugu ņemšanas vietas	1	1	150

6.B tabula

Uzraudzības shēmas dalībvalstīm, zonām un iecirkņiem statusa "slimības neskarts" saglabāšanai attiecībā uz *WSD*, kā minēts I.3. punktā

Riska pakāpe	Veselības pārbaužu skaits	Laboratorisko izmeklējumu skaits	Vēžveidīgo skaits paraugā
Augsta	Reizi gadā	Reizi divos gados	150
Vidēja	Reizi divos gados	Reizi divos gados	150
Zema	Reizi divos gados	Reizi četros gados	150

II PIELIKUMS

DETALIZĒTAS DIAGNOSTIKAS METODES UN PROCEDŪRAS

I. **Ievads**

Šajā pielikumā ir aprakstītas detalizētas procedūras attiecībā uz diagnostikas metodēm, kas jālieto, lai veiktu laboratoriskos izmeklējumus šā lēmuma I pielikumā aprakstītajās izskaušanas un uzraudzības programmās un lai saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu apstiprinātu vai izslēgtu aizdomas par šādu minētās direktīvas IV pielikuma II daļā iekļautu neeksotisku slimību ("sarakstā iekļauto slimību") klātbūtni:

1.	Virusālā hemorāģiskā septicēmija (*VHS*)	1. daļa
2.	Infekciozā hematopoētiskā nekroze (*IHN*)	1. daļa
3.	Koiju herpesvīruss (*KHV*)	2. daļa
4.	Lašu infekciozā anēmija (*ISA*)	3. daļa
5.	*Marteilia refringens* infekcija	4. daļa
6.	*Bonamia ostreae* infekcija	5. daļa
7.	Balto plankumu slimība (*WSD*)	6. daļa

II. **Definīcijas**

Šā pielikuma vajadzībām "transporta barotne" ir tāda barotne ar šūnu kultūru, kurā ir 10 % teļa seruma un 200 SV penicilīna, 200 µg streptomicīna un 200 µg kanamicīna uz mililitru, vai citas antibiotikas, kuru iedarbīgums ir pierādīts.

1. DAĻA

DETALIZĒTAS DIAGNOSTIKAS METODES UN PROCEDŪRAS *IHN* UN *VHS* UZRAUDZĪBAI UN APSTIPRINĀŠANAI

I. ***VHS* un *IHN* uzraudzībai paredzētās diagnostikas metodes un procedūras**

Ņemot paraugus un veicot laboratoriskus izmeklējumus ar I pielikuma 1. daļas II.1. un II.2. punktā aprakstītajām diagnostikas metodēm, lai, kā aprakstīts minētā pielikuma 1. daļas I iedaļā, iegūtu vai saglabātu veselības statusu "slimības neskarts" attiecībā uz *IHN* vai *VHS*, izmanto detalizētās diagnostikas metodes un procedūras, kas tālāk aprakstītas I.1. līdz I.6. punktā.

I.1. Zivju paraugu sagatavošana un nosūtīšana

I.1.1. Šūnu kultūru virusoloģiskai izmeklēšanai paredzētie audi

Pirms nosūtīšanas vai pārvešanas uz laboratoriju izmeklējamās orgānu daļas no zivs ķermeņa izņem ar steriliem secēšanas instrumentiem un ievieto sterilās plastmasas mēģenēs ar transporta barotni.

Šūnu kultūru virusoloģiskai izmeklēšanai un *RT-qPCR* piemērotais zivju materiāla daudzums ir atkarīgs no zivju lieluma. Piemēram, zivju kāpuriem, kuru garums ir mazāks nekā 4 cm, paraugam ņem visu ķermeni, 4 līdz 6 cm garām zivīm – iekšas kopā ar nierēm, savukārt lielākām zivīm – nieres, liesu, sirdi un/vai galvas smadzenes, bet vaislas zivīm nārsta laikā – olšūnu šķidrumu.

Olšūnu vai spermas šķidrumu vai orgānu daļas augstākais no desmit zivīm var ievākt vienā sterilā mēģenē, kurā ir vismaz 4 ml transporta barotnes, un tie veido vienu kopotu paraugu. Katra parauga audu svars ir vismaz 0,5 grami (g).

Šūnu kultūras virusoloģiskā izmeklēšana jāsāk iespējami drīz un ne vēlāk kā 48 stundas pēc paraugu ievākšanas. Izņēmuma gadījumos, ja pārbaudāmo materiālu aizsargā transporta barotne un ja pārvadāšanas laikā iespējams ievērot prasības attiecībā uz temperatūru, virusoloģisko izmeklēšanu var sākt vēlākais 72 stundas pēc materiāla ievākšanas.

I.1.2. Paraugi apgrieztās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcijas analīzei (*RT-PCR* vai *RT-qPCR*)

Paraugus no zivīm ar sterilu instrumentu ņem saskaņā ar I.1.1. punktā aprakstīto procedūru un ievieto sterilās plastmasas mēģenēs ar transporta barotni. Vienā mēģenē var ievākt audus no 10 zivīm, un tie veido vienu kopotu paraugu. Tomēr, ja inokulāta apjoms ir neliels, var izmantot audus ne vairāk kā no piecām zivīm. Paraugus, ievērojot ražotāja ieteikumus, var arī kopot RNS stabilizējošos reaģentos, piemēram, izmantojot 0,2 g audu uz 1 ml reaģenta, lai arī katra zivs jāapstrādā atsevišķi un nav jāliek kopotos paraugos, jo ekstrahēšanai lietojamā materiāla ir maz.

Uz laboratoriju var sūtīt arī veselas zivis.

I.2. Zivju paraugu nosūtīšana

Lai laikā, kad paraugi tiek transportēti uz laboratoriju, nodrošinātu paraugu atdzesēšanu, mēģenes ar šūnu kultivēšanai vai *RT-PCR*/*RT-qPCR* analīzei paredzētiem zivju audiem transporta barotnē kopā ar pietiekamu daudzumu ledus – vai alternatīvas dzesēšanas vides ar tādu pašu dzesējošu iedarbību – ievieto izotermiskos konteineros, piemēram, polistirola kastēs ar biezām sienām. Tomēr nepieļauj paraugu sasalšanu. Parauga temperatūra pārvadāšanas laikā nevienu brīdi nedrīkst pārsniegt 10 °C, un transportēšanas kastē, to saņemot, vēl ir jābūt ledum vai arī vienam vai vairākiem aukstumblokiem vēl jābūt daļēji vai pilnīgi sasalušiem.

Ja pārvadāšanas laikā iespējams pildīt pirmajā daļā minētās prasības attiecībā uz temperatūru, uz laboratoriju var nosūtīt veselas zivis. Veselas zivis ietin absorbējošā papīrā, un visbeidzot tās nosūtīšanai ieliek plastikāta maisā. Sūtīt var arī dzīvas zivis.

I.3. Papildu diagnostiskā materiāla ievākšana

Ja attiecīgā diagnostikas laboratorija atļauj, ievākt un papildu izmeklējumiem sagatavot var arī citus zivs audus.

I.4. Paraugu sagatavošana šūnu kultūras izmeklēšanai un *RT-qPCR*

I.4.1. Sasaldēšana izņēmuma gadījumos

Ja rodas praktiskas grūtības, kuru dēļ paraugu apstrāde 48 stundu laikā pēc zivju audu ievākšanas nav iespējama, ir pieļaujams audu paraugus sasaldēt transporta barotnē – 20 °C vai zemākā temperatūrā un virusoloģisko izmeklēšanu veikt 14 dienu laikā. Tomēr pirms izmeklēšanas zivju audus sasaldē un atkausē tikai vienu reizi. Ir jāglabā pieraksti ar detalizētu informāciju par katru zivju audu paraugu sasaldēšanas iemeslu.

I.4.2. Orgānu homogenizēšana

Laboratorijā audus mēģenēs pilnīgi homogenizē (vai nu ar homogenizatoru *Stomacher*, blenderi, vai miezeri un piestu ar sterilām smiltīm) un pēc tam sākotnējā transporta barotnē suspendē.

Ja paraugu veido vesela zivs, kas īsāka par 4 cm, pēc tam, kad nodalīta ķermeņa daļa aiz zarnu atveres, šādu zivi sasmalcina ar sterilām grieznēm vai skalpeli. Ja paraugu veido vesela zivs, kuras garums ir no 4 līdz 6 cm, ievāc iekšas, arī nieres. Ja paraugu veido vesela zivs, kas garāka par 6 cm, audu paraugus ņem, kā aprakstīts I.1. punktā. Audu paraugus sasmalcina ar sterilām grieznēm vai skalpeli, homogenizē, kā aprakstīts šā punkta pirmajā daļā, un suspendē transporta barotnē.

Galīgo attiecību starp audu materiālu un transporta barotni laboratorijā koriģē, panākot 1:10.

I.4.3. Homogenizētā materiāla centrifugēšana

Homogenizēto materiālu 15 minūtes centrifugē atdzesētā centrifūgā 2 °C līdz 5 °C temperatūrā ar 2 000 līdz 4 000 × *g*, un ievāc centrifugātu, ko vai nu četras stundas 15 °C temperatūrā, vai visu nakti 4 līdz 8 °C temperatūrā var apstrādāt ar antibiotikām. Transporta barotnē nosūtītu paraugu centrifugātu ar antibiotikām var neapstrādāt.

Ja rodas praktiskas grūtības, kuru dēļ šūnas nevar inokulēt 48 stundu laikā pēc zivju audu paraugu paņemšanas, piemēram, sabojājies inkubators vai problēmas ar šūnu kultūrām, centrifugātu drīkst sasaldēt – 80 °C temperatūrā un virusoloģisko izmeklēšanu veikt 14 dienu laikā.

Ja ievākto centrifugātu 48 stundas pēc parauga ņemšanas uzglabā – 80 °C temperatūrā, to var atkārtoti izmantot tikai vienreiz – virusoloģiskajai izmeklēšanai.

Pirms šūnu inokulēšanas centrifugātu vienādās daļās samaisa ar attiecīgi atšķaidītiem kopotiem antiserumiem pret infekciozās pankreātiskās nekrozes (*IPN*) vīrusa vietējiem serotipiem un kopā ar šo maisījumu vismaz vienu stundu inkubē 15 °C temperatūrā vai ne vairāk kā 18 stundas – 4 °C temperatūrā. Šā antiseruma titrs 50 % plaku samazināšanās testā ir vismaz 1/2 000.

Visus inokulātus ar *IPN* vīrusa antiserumu apstrādā tāpēc, lai novērstu citopātisko efektu (*CPE*), ko inokulētās šūnu kultūrās rada *IPN* vīrusa attīstīšanās. Tas samazinās virusoloģisko pārbaužu ilgumu, kā arī to gadījumu skaitu, kur būtu jāuzskata, ka radies *CPE* liecina par *VHSV* vai *IHNV*.

Ja paraugi ir no ražošanas vienībām, kuras uzskata par brīvām no *IPN*, inokulātus ar *IPN* vīrusa antiserumu var neapstrādāt.

I.4.4. Paraugu gatavošana uzraudzības programmām, kuru pamatā ir *RT-PCR* un *RT-pPCR*

Ja paraugi ņemti transporta barotnē, īsteno I.4.2. un I.4.3. punktā aprakstīto procedūru. Pēc centrifugēšanas ievāc centrifugātu un ekstrahē RNS. Ja tieši pēc centrifugēšanas nav jāveic tālāka izmeklēšana, paraugus tūlīt sasaldē – 20 °C vai zemākā temperatūrā.

RNS stabilizējošā reaģentā konservētu zivju audu analizēšanas vajadzībām tālāku darbu ar atšķirīgā temperatūrā glabātiem paraugiem veic saskaņā ar šādu grafiku:

37 °C glabāti paraugi: viena diena,

25 °C glabāti paraugi: viena nedēļa,

4 °C glabāti paraugi: viens mēnesis,

– 20 °C glabāti paraugi: beztermiņa.

Ar kopotiem paraugiem RNS stabilizējošā reaģentā rīkojas tāpat kā ar atsevišķiem paraugiem RNS stabilizējošā reaģentā. RNS stabilizējošā reaģentā ievietoto kopotu paraugu apjoms nedrīkst pārsniegt apjomu, ko ekstrahēšanai ar RNS komplektiem (tādiem kā *RNeasy Mini kits* (*Qiagen*) vai līdzīgiem) ieteicis ražotājs. Ja kopotie paraugi ir lielāki, ekstrahēšanas komplektiem vai metodēm jābūt tādiem, kas atbilst šādi veidotiem kopotiem paraugiem.

RNS stabilizējošos reaģentos ievāktus paraugus neizmanto šūnu kultivēšanai.

I.4.5. *RT-qPCR* paredzētie kopotie paraugi

Tā kā šeit sniegto *RT-qPCR* protokolu jutība ir līdzvērtīga šūnu kultivēšanas metožu jutībai vai par to augstāka, *PCR* vajadzībām var izmantot centrifugātu, kas iegūts no barotnē ar šūnu kultūru homogenizēta zivju audu materiāla, kurš ņemts ne vairāk kā no 10 zivju kopotiem orgāniem. Salīdzinājumā ar šūnu kultivēšanu *PCR* testā izmanto daudz mazāk inokulāta, tāpēc, pirms likt kopā materiālu ekstrahēšanai, visi zivju audi rūpīgi jāhomogenizē.

Tas pats princips jāievēro arī tad, ja paraugus ievāc RNS stabilizējošos reaģentos. Tomēr minētajā gadījumā reprezentatīvu materiālu no zivīm, kuru skaits var sasniegt 10, bieži vien vienā mēģenē ievākt ir grūti, tāpēc zivju skaits kopotā paraugā jāsamazina līdz 2–5.

I.5. Šūnu kultūru virusoloģiskā izmeklēšana

I.5.1. Šūnu kultūras un barotnes

20 līdz 30 °C temperatūrā piemērotā barotnē, proti, Īgla barotnē *MEM* vai tās modificētā variantā, pievienojot 10 % liellopu embrionālā seruma un antibiotikas standartkoncentrācijās, audzē zilžaunu sauleszivs šūnu līnijas-2 (*BF*-2), varavīksnes foreles gonādu šūnu līnijas-2 (*RTG*-2) un vai nu *Epithelioma papulosum cyprini* (*EPC*), vai melngalvas mailītes (*FHM*) šūnas.

Ja šūnas kultivē slēgtos stobriņos, barotne jābuferē ar bikarbonātu. Barotni, ko izmanto šūnu kultivēšanai vaļējos traukos, var buferēt ar *tris*-(hidroksimetil)aminometāna-HCl (*Tris*-HCl) (23 mM) un nātrija bikarbonātu (6 mM). pH jābūt 7,6 ± 0,2.

Šūnu kultūrām, ko paredzēts inokulēt ar zivju audu materiālu, jābūt jaunām, parasti, ja vien iespējams, tās ir vienu dienu vecu šūnu kultūru monoslāņi; tomēr pieņemams vecuma diapazons ir 4 līdz 48 stundas. Šūnām inokulātā aktīvi jāaug.

I.5.2. Šūnu kultūru inokulēšana

Lai novērstu homoloģisku interferenci, ar antibiotikām apstrādāto orgānu suspensiju šūnu kultūrās inokulē divos atšķaidījumos, proti, primārajā atšķaidījumā un turklāt tā atšķaidījumā 1:10, tātad audu materiāla galīgie atšķaidījumi barotnē ar šūnu kultūru būs attiecīgi 1:100 un 1:1 000. Atbilstoši I.5.1. punktam inokulē vismaz divas no tajā minētajām šūnu līnijām. Attiecībai starp inokulāta apjomu un šūnu kultūru saturošās barotnes tilpumu jābūt apmēram 1:10.

Katram atšķaidījumam un katrai šūnu līnijai jāizmanto vismaz apmēram 2 cm^2 šūnu platības, kas atbilst vienai 24 iedobju šūnu kultūras plates iedobei. Ja vien iespējams, izmanto šūnu kultūras plates.

I.5.3. Šūnu kultūru inkubēšana

Inokulētās šūnu kultūras 7 līdz 10 dienas inkubē 15 °C temperatūrā. Ja, liecinot par barotnes paskābināšanos, barotnei ar šūnu kultūru krāsa mainās no sarkanas uz dzeltenu, ar sterilu bikarbonāta šķīdumu vai ar līdzvērtīgām vielām koriģē pH, lai nodrošinātu, ka šūnas joprojām ir uzņēmīgas pret vīrusa infekciju.

Vismaz reizi sešos mēnešos vai tad, ja ir aizdomas par šūnu uzņēmīguma samazināšanos, saldētās *VHSV* un *IHNV* kultūras titrē, lai pārliecinātos par šūnu kultūru uzņēmību pret infekciju. Ja iespējams, izmanto III iedaļā aprakstīto procedūru.

I.5.4. Mikroskopija

Inokulētajām šūnu kultūrām regulāri (vismaz trīs reizes nedēļā) 40 līdz 150 reižu palielinājumā apskata, vai nav radies *CPE*. Ja novērojams nepārprotams *CPE*, tūlīt saskaņā ar I.6. punktu jāsāk vīrusa identificēšanas procedūras.

I.5.5. Šūnu pārsēšana

Ja pēc 7 līdz 10 dienas ilgas primārās inkubēšanas *CPE* nav radies, kultūru pārsēj uz jaunām šūnu kultūrām, izmantojot tādu pašu šūnu platību kā primārajai kultūrai.

Kad pagājušas 7 līdz 10 dienas pēc inokulēšanas, pa šūnu līnijām kopo visu primāro kultūru veidojošo kultūru vai iedobju barotnes (centrifugāta) alikvotas. Tad šos kopotos paraugus, kā aprakstīts I.5.2. punktā, neatšķaidītā veidā un atšķaidījumā 1:10 (iegūstot galīgos centrifugāta atšķaidījumus, attiecīgi 1:10 un 1:100) inokulē homoloģiskās šūnu kultūrās. Var arī primārās kultūras barotnes desmitprocentīgas alikvotas inokulēt tieši iedobē ar jaunu šūnu kultūru (pārsēšana no iedobes iedobē). Pirms atšķaidījumus inokulēt, tos, kā aprakstīts I.4.3. punktā, var iepriekš inkubēt ar *IPN* vīrusa antiserumu attiecīgā atšķaidījumā.

Pēc tam inokulētās kultūras 7 līdz 10 dienas inkubē 15 °C temperatūrā un apskata saskaņā ar I.5.4. punktu.

Ja toksisks *CPE* rodas pirmajās trijās inkubēšanas dienās, šūnas pārsēj šajā posmā, pēc tam 7 dienas inkubē un atkal pārsēj ar turpmāku septiņu dienu inkubēšanu. Ja toksisks *CPE* rodas vēlāk kā pēc trim dienām, šūnām var veikt vienu pasāžu un tās inkubēt tā, lai no pirmās inokulēšanas kopā būtu 14 dienas. Pēdējās septiņās inkubēšanas dienās nekādu toksicitātes pazīmju nedrīkst būt.

Ja par spīti apstrādei ar antibiotikām rodas bakteriāla kontaminācija, pirms pārsēšanas 15 līdz 30 minūtes 2 līdz 5 °C temperatūrā jāveic centrifugēšana ar 2 000 līdz 4 000 × *g* vai centrifugāta filtrēšana ar 0,45 µm filtru vai abas šīs darbības (membrāna ar zemu olbaltumvielu saistīšanas spēju). Turklāt pārsēšanā ievēro tās pašas procedūras, kas attiecībā uz toksisku *CPE* aprakstītas šā punkta ceturtajā daļā.

Ja *CPE* nerodas, testa rezultātu var paziņot par negatīvu.

I.6. Vīrusa identificēšana

Ja novērojumi liecina, ka šūnu kultūrā ir *CPE*, ievāc barotni (centrifugātu) un pārbauda ar vienu vai vairākiem šādiem paņēmieniem: imūnfermentatīvā analīze (*ELISA*), imūnfluorescence (*IF*), neitralizācija, *RT-PCR* vai *RT-qPCR*. Ja ar šiem testiem vienas nedēļas laikā vīrusu nav bijis iespējams galīgi identificēt, centrifugāts nekavējošai identifikācijai jānosūta uz Direktīvas 2006/88/EK VI pielikumā minētajām zivju slimībās specializētajām laboratorijām – valsts references laboratoriju vai ES references laboratoriju.

I.6.1. ELISA

Vīrusa izolāta identificēšanai izdara divslāņu *ELISA* ar divām antivielām. Mikrotitrēšanas platēs uzklāj pārklājumu, daudzumā 50 µl uz iedobi (0,9 pg) iepilinot no truša antiseruma pret *IHNV* vai *VHSV* iegūtu pierādītas kvalitātes attīrītu A proteīna imūnglobulīnu (*Ig*) karbonāta buferšķīdumā (pH 9,6) ar nātrija azīda saturu 15 mM, un no 18 stundām līdz 2 nedēļām inkubē 4 °C temperatūrā.

Šķīdumu platē katru paraugu, kas satur 1 % *Triton X*-100, un pozitīvos kontrolparaugus atšķaida ar buferšķīdumu (proti, liellopu seruma albumīnu fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā *PBS-T*, *BSA* 1 %) četros atšķaidījumos: neatšķaidīts, 1:4, 1:16, 1:64. *ELISA* plates skalo fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā, kas satur 0,05 % *Tween*-20 (*PBS-T*), un noskalotajā un ar pārklājumu klātajā *ELISA* platē ievada 50 µl no katras šķīdumu plates šķīdumu koncentrācijas.

Pēc tam *ELISA* plates 30 minūtes inkubē 37 °C temperatūrā. Tad plates skalo un 30 minūtes 37 °C temperatūrā inkubē ar specifiskām monoklonālajām antivielām (konkrētāk, *VHSV* identificēšanai ar MAb IP5B11 un *IHNV* identificēšanai attiecīgi ar Hyb 136-3). *ELISA* platē pievieno 50 µl truša pretpeles antivielas mārrutku peroksidāzes konjugāta atšķaidījumā ar *PBS-T-BSA* 1:1 000.

Visbeidzot pēc atkārtotas skalošanas ierosina reakcijas, katrā iedobē pievienojot 50 µl ortofenilēndiamīna (*OPD*). *ELISA* plates tumsā istabas temperatūrā inkubē 20 minūtes, un reakciju apstādina, katrā iedobē pievienojot 100 µl 0,5 M H_2SO_4.

ELISA lasāmierīcē monitorē absorbenci viļņa garumiem 492 un 620 nm. Pēc testa rezultātu salīdzināšanas ar pozitīvo un negatīvo kontroļu absorbences vērtībām paraugus apzīmē kā pozitīvus vai negatīvus. Kopumā paraugus, kam neatšķaidītam materiālam kopējā absorbence (A) < 0,5, uzskata par negatīviem, paraugus ar A vērtībām no 0,5 līdz 1,0 uzskata par aizdomīgiem un paraugus, kam A > 1,0, uzskata par pozitīviem.

Šajā punktā minēto *ELISA* variantu vietā var izmantot citus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

I.6.2. Imūnfluorescence – *IF*

Sarakstā minētos patogēnus *VHSV* un *IHNV* identificē, inficējot šūnas 96 iedobju "Black" platēs, parastajās 24 iedobju platēs vai uz 24 iedobju plates segstikliem. Ja *IHNV*, *VHSV* vai tos abus identificē, inficējot šūnas uz segstikliem, rīkojas pēc šāda protokola:

a) segstikliem uzsēj šūnas tādā blīvumā, lai pēc 24 stundu kultivēšanas būtu 60 % līdz 90 % konfluence. Ja iespējams, šajā nolūkā ieteicamas *EPC* šūnas, jo tās stingri pielīp stikla virsmām, tomēr tikpat labi var izmantot citas šūnu līnijas – tādas kā *BF*-2, *RTG*-2 vai *FHM*. 150 µl šūnu kultūras centrifugāta divos dažādos atšķaidījumos (1:10 un 1:1 000) dublikātā inokulē vienu dienu vecos monoslāņos un 24 stundas inkubē 15 °C temperatūrā;

b) pēc tam barotni ar šūnu kultūru izņem un inficētos šūnu monoslāņus fiksē ar 0,5 ml ledusauksta acetona ūdens šķīduma (80 % tilpumkoncentrācija). Fiksāciju 15 minūtes istabas temperatūrā veic velkmes skapī, pēc tam no acetona šķīduma atbrīvojas un segstikliņus vismaz 30 minūtes žāvē ar gaisu. Šajā posmā plates vai nu nekavējoties apstrādā, vai – 20 °C temperatūrā glabā turpmākai lietošanai;

c) specifiskas monoklonālas antivielas (konkrētāk, *VHSV* identificēšanai MAb IP5B11, savukārt *IHNV* identificēšanai attiecīgi Hyb 136-3) atšķaida 0,01 M *PBST* ar pH 7,2 tādā atšķaidījumā, kā ieteic MAb piegādātājs; fiksētajam monoslānim pievieno 50 līdz 100 µl uz iedobi, un plates mitrā kamerā vienu stundu inkubē 37 °C temperatūrā;

d) segstikliņus trīs reizes saudzīgi skalo ar 0,05 % *Tween*-20 saturošu fosfātu buferšķīdumu (*PBS-T*) un pēc pēdējās skalošanas no visa buferšķīduma atbrīvojas. Pēc tam šūnas vienu stundu inkubē 37 °C, par primāro antivielu lietojot peļu imūnglobulīna antivielu konjugātu fluorescīna izotiocianātā (*FITC*) vai tetrametilrodamīna-5-(un-6-) izotiocianātā (*TRITC*), saskaņā ar piegādātāja norādījumiem atšķaida, atkal skalo *PBS-T* un nožāvē. Iekrāsotās kultūras novieto uz priekšmetstikliņiem, izmantojot glicerīna sālsūdens šķīdumu, un pārbauda krītošā ultravioletā (UV) gaismā. Izmanto 10 × un 12 × okulārus un 25 × vai 40 × objektīva lupu ar skaitlisko apertūru attiecīgi < 0,7 un < 1,3.

Alternatīvi attiecībā uz šūnu kultūrām, fiksēšanu un standartkvalitātes antivielām var lietot citus *IF* paņēmienus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

I.6.3. Neitralizācija

No ievāktā centrifugāta, centrifugējot (2 000 līdz 4 000 × *g*) vai filtrējot caur membrānas filtru (0,45 μm) ar zemu olbaltumvielu saistīšanas spēju, atdala šūnas, un centrifugātu barotnē ar šūnu kultūru atšķaida 1:100 un 1:10 000.

Vismaz divu centrifugāta atšķaidījumu alikvotas atsevišķi sajauc ar vienādām turpmāk minēto reaģentu daļām un pēc tam 60 minūtes inkubē 15 °C temperatūrā:

a) serums, kas satur specifiskas grupas antivielas pret *VHSV* atšķaidījumā 1:50 (tilpumkoncentrācija);

b) serums, kas satur specifiskas grupas antivielas pret *IHNV* atšķaidījumā 1:50 (tilpumkoncentrācija);

c) kopots antiserums pret vietējiem *IPNV* serotipiem atšķaidījumā 1:50 (tilpumkoncentrācija);

d) tikai barotne (pozitīvais kontrolparaugs).

Katram vīrusa centrifugāta un seruma maisījumam inokulē vismaz divas šūnu kultūras, katru ar 50 μl, un pēc tam inkubē 15 °C temperatūrā. Kā aprakstīts I.5.4. punktā, pārliecinās, vai nerodas *CPE*.

VHSV celmus un izolātus, kas nereaģē neitralizācijas testos, identificē ar *IF* vai ar *ELISA*.

Alternatīvi var izmantot citus neitralizācijas testus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Vīrusu RNS sagatavošana

Visas darbības ar RNS veic cimdos uz ledus.

RNS ekstrahē ar fenola–hloroforma metodi vai ar RNS afinitātes rotācijas stobriņiem saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos RNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva RNS, kas piemērota izmantošanai turpmākajos punktos detalizēti aprakstītajos *RT-PCR* protokolos.

RNS atkārtoti suspendē destilētā no ribonukleāzes brīvā ūdenī (proti, ar 0,1 % dietilpirokarbonātu apstrādātā ūdenī) vai piemērotā eluēšanas buferšķīdumā.

I.6.4.2. RT-PCR

IHNV konstatēšanai izmanto šādus praimerus:

tiešais praimeris: 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

atgriezeniskais praimeris: 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

Izmanto šādus ciklus (viensoļa *RT-PCR*): 1 cikls: 50 °C 30 min; 1 cikls: 95 °C 2 min; 30 cikli: 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 60 s; 1 cikls: 72 °C 7 min un mērcēšana 4 °C temperatūrā.

VHSV konstatēšanai izmanto šādus praimerus:

VN tiešais: 5′-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3′;

VN atgriezeniskais: 5′-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3′.

Izmanto šādus ciklus (viensoļa *RT-PCR*): 50 °C 30 min, 95 °C 15 min, 35 cikli ar 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 60 s. Pēc tam 68 °C temperatūrā 7 minūtes ļauj notikt reakcijai.

RT-PCR reakciju daudzumu un specifiskumu izvērtē ar gela elektroforēzi 1,5 % agarozes gelā ar etīdija bromīdu un novēro UV caurgaismošanā. Attiecībā uz *IHNV* var novērot *PCR* amplikonu 693 bp. Attiecībā uz *VHSV* šis lielums ir 505 bp.

PCR rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Turklāt nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltuspozitīvi rezultāti. Tāpēc, lai novērstu jebkādas šaubas, ir jāiekļauj pietiekami pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi un sekvenēšanas amplikoni. Attiecībā uz *VHSV* praimeriem īpaši uzmanīgi jārīkojas ar *BF*-2 šūnām, jo praimeri var reaģēt ar šūnu līnijas DNS/RNS, dodot līdzīga izmēra viltuspozitīvu rezultātu. Testējot no *BF*-2 šūnām iegūtu centrifugātu, visi amplificētie *PCR* fragmenti jāsekvenē.

I.6.4.3. *RT-qPCR VHSV* noteikšanai

VHSV noteikšanai amplificēšanu veic ar šādiem praimeriem un provi:

tiešais praimeris: 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′,

atgriezeniskais praimeris: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′

un prove: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Viensoļa RT-PCR

Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Ciklēšanas nosacījumi: 50 °C 30 min, 95 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 15 s, 60 °C 40 s, 72 °C 20 s; ja nepieciešams, koriģē. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

I.6.4.4. *RT-qPCR IHNV* noteikšanai

IHNV noteikšanai amplificēšanu veic ar šādiem praimeriem un provi:

tiešais praimeris: 5′- AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′,

atgriezeniskais praimeris: 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3′

un prove: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Divsoļu RT-qPCR

Tā kā turpmāk minētais tests ir atkarīgs no divsoļu amplifikācijas, ar abu reakciju mēģenēm ir jārīkojas ļoti piesardzīgi, lai nenotiktu kontaminēšanās.

Ciklēšanas nosacījumi (pēc *RT* soļa): 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 40 cikli ar 95 °C 15 s un 60 °C 1 min; ja nepieciešams, koriģē.

Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

II. **Detalizētas diagnostikas metodes un procedūras, ar kurām domājama uzliesmojuma gadījumā apstiprina vai izslēdz aizdomas par *VHS*, *IHN* vai tām abām**

Ja ir nepieciešama laboratoriska izmeklēšana, lai saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu, izmantojot tās I pielikuma 1. daļas II.3. punktā aprakstītās diagnostikas metodes, apstiprinātu vai izslēgtu *IHN*, *VHS* vai tās abas, izmanto šādas detalizētas diagnostikas metodes un procedūras:

a) parastā vīrusa izolēšana, kam seko vīrusa identificēšana ar seroneitralizāciju vai ar imūnķīmiskām vai molekulārām metodēm;

b) vīrusa konstatēšana ar *RT-PCR* vai *RT-qPCR*;

c) citi diagnostiski paņēmieni, piemēram, *IFAT*, *ELISA*, *RT-PCR*, *IHC*.

II.1. Parastā vīrusa izolēšana, kam seko vīrusa identificēšana

II.1.1. Paraugu izraudzīšanās

Izmeklēšanai ņem vismaz 10 zivis, kam vērojamas tipiskas *IHN* vai *VHS* pazīmes.

II.1.2. Zivju paraugu sagatavošana un nosūtīšana

Sagatavošanā un nosūtīšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro I.2. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.1.3. Papildu diagnostiskā materiāla ievākšana

Papildu materiāla vākšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro I.3. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.1.4. Paraugu sagatavošana šūnu kultūras izmeklēšanai

Paraugu sagatavošanā šūnu kultūras izmeklēšanai, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro I.4. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.1.5. Šūnu kultūru virusoloģiska izmeklēšana

Virusoloģiskajā izmeklēšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro I.5. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.1.6. Vīrusa identificēšana

Vīrusa identificēšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro I.6. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.2. Vīrusa konstatēšana ar *RT-qPCR*

II.2.1. Paraugu ņemšana

Paraugu ņemšanā, ko veic, lai konstatētu vīrusus ar *RT-qPCR*, ievēro I.1.2. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.2.2. Zivju paraugu sagatavošana un nosūtīšana

Paraugus vīrusu konstatēšanai ar *RT-qPCR* sagatavo un nosūta, ievērojot I.2. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.2.3. Papildu diagnostiskā materiāla ievākšana

Papildu diagnostiskā materiāla ievākšanā, ko veic, lai konstatētu vīrusus ar *RT-qPCR*, ievēro I.3. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.2.4. Paraugu sagatavošana *RT-qPCR* vajadzībām

Paraugu sagatavošanā, ko veic, lai konstatētu vīrusus ar *RT-qPCR*, ievēro I.6.4.1. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.2.5. RT-qPCR

Vīrusa konstatēšanā ar *RT-qPCR* ievēro I.6.4.1., I.6.4.3. un I.6.4.4. punktā noteiktās metodes un procedūras.

II.3. Citi diagnostiskie paņēmieni

Saskaņā ar I.4.3. punkta aprakstu pagatavoto centrifugātu var iesniegt *ELISA* testam, netiešās imūnfluorescences antivielu testam (*IFAT*) vai *RT-PCR* attiecīgi saskaņā ar I.6.1., I.6.2. vai I.6.4. punktu. Audu materiālam var izmantot citus diagnostiskus paņēmienus, piemēram, sasaldētiem griezumiem – netiešo fluorescējošo antivielu testu (*IFAT*) vai formalīnā fiksētam audu materiālam – imūnhistoķīmisko analīzi. Šos ātros paņēmienus 48 stundu laikā no paraugu ņemšanas papildina ar vai nu II punkta a) apakšpunktam, vai II punkta b) apakšpunktam atbilstošu virusoloģisku izmeklēšanu, ja:

a) iegūts negatīvs rezultāts; vai

b) ar materiālu, kas ņemts no pirmā *IHN* vai *VHS* gadījuma audiem, iegūts pozitīvs rezultāts.

III. **Titrēšanas procedūra, kurā pārliecinās par šūnu kultūru uzņēmību pret inficēšanos**

Veicot I.5.3. punktā minēto titrēšanu, kurā pārliecinās par šūnu kultūru uzņēmību pret inficēšanos, ievēro šā punkta tālākajās daļās aprakstītās procedūras.

Izmanto vismaz divus *VHSV* izolātus un vismaz vienu *IHNV* izolātu. Izolāti pārstāv nozīmīgāko vīrusu grupu Eiropas Savienībā, proti, attiecībā uz *VHSV* viens patogēnisks izolāts, kas saldūdenī iegūts no varavīksnes foreles, un viens patogēnisks izolāts, kas jūras ūdenī iegūts no akmeņplekstes, bet attiecībā uz *IHNV* – viens patogēnisks celms, kas Eiropas Savienībā iegūts no varavīksnes foreles. Izmanto dalībvalstīs iegūtus izteiktus izolātus. *VHSV* vīrusam šūnu kultūrkolbās ar maziem šūnu kultūras pasāžas skaitļiem pavairo *BF*-2 vai *RTG*-2 līnijas partijas, savukārt *IHNV* vīrusam – *EPC* vai *FHM* līnijas partijas. Izmanto tādu barotni ar šūnu kultūru, kas satur vismaz 10 % seruma. Inokulēšanai izmanto zemu inficētspējas multiplicitāti (*MOI*) (< 1).

Kad iestājies pilnīgs *CPE*, šūnu kultūras centrifugātu 15 minūtes centrifugējot ar 2 000 × *g*, ievāc vīrusu, sterilizē caur 0,45 μm membrānas filtru un sadala pa etiķetētām kriomēģenēm. Vīrusu glabā – 80 °C temperatūrā.

Nedēļu pēc sasaldēšanas trīs replicētas mēģenes ar katru vīrusu zem auksta ūdens atkausē un titrē pa to attiecīgajām šūnu līnijām. Katru vīrusa izolātu atkausē un titrē vismaz reizi sešos mēnešos vai tad, ja ir aizdomas, ka ir samazinājies šūnu līnijas uzņēmīgums.

Titrēšanas procedūrām jābūt detalizēti aprakstītām un katrreiz jāievēro viena un tā pati procedūra.

Titrēšanā pēc beigupunkta atšķaidījuma katrā atšķaidījuma solī izmanto vismaz sešus replicētus paraugus. Titrus salīdzina ar iepriekš iegūtiem titriem. Ja jebkuram no trim vīrusu izolātiem salīdzinājumā ar sākotnējo titru tas samazinās par koeficientu 2 log vai vairāk, šūnu līniju uzraudzībā vairs neizmanto.

Ja laboratorijā tur dažādas šūnu līnijas, atsevišķi pārbauda katru līniju.

Par vismaz 10 gadiem glabā pierakstus.

2. DAĻA

DETALIZĒTAS DIAGNOSTIKAS METODES UN PROCEDŪRAS *KHV* SLIMĪBAS (*KHVD*) UZRAUDZĪBAI UN APSTIPRINĀŠANAI

I. **Detalizētas diagnostikas metodes un procedūras *KHVD* klātbūtnes apstiprināšanai vai attiecīgu aizdomu izslēgšanai**

Ja ir nepieciešama laboratoriska izmeklēšana, lai saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu, izmantojot tās I pielikuma 2. daļas III iedaļā aprakstītās diagnostikas metodes, apstiprinātu *KHVD* klātbūtni vai izslēgtu aizdomas par to, izmanto šīs daļas I.1.–I.2. punktā aprakstītās detalizētās diagnostikas metodes un procedūras.

I.1. Zivju paraugu sagatavošana

Diagnostiskiem nolūkiem nosūtīt un testēšanai ar parastajām uz *PCR* vai *qPCR* bāzētām metodēm izmantot var dzīvas vai nonāvētas un atsevišķi hermētiskās aseptiskās tvertnēs iepakotas zivis vai, alternatīvi, sasaldētus orgānus vai orgānu gabalus, kas konservēti 80 līdz 100 % spirtā vai vīrusu transporta barotnē (apstrādāšanai 48 stundu laikā no ievākšanas).

KHV konstatēšanai ievāc žaunas un nieres; turklāt nodalītā papildu paraugā var iekļaut liesu, galvas smadzenes un zarnas. Akūtos gadījumos audu materiālu no ne vairāk kā piecām zivīm var kopot.

Bez tam noteiktos gadījumos (proti, ja ir aizdomas par *KHV*, tā var rīkoties ar ļoti vērtīgām zivīm) var izmantot neletālus paraugus, piemēram, asinis, uztriepes no žaunām, žaunu biopsiju, gļotādu noskrāpējumus.

I.1.1. DNS ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām.

Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai I.2. punktā minētajos *PCR* protokolos.

I.2. Ierosinātāju konstatēšana un identificēšana ar metodēm, kuru pamatā ir polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*)

I.2.1. *qPCR KHV* konstatēšanai

KHV konstatēšanai ar *qPCR* izmanto šādu *qPCR* testu:

tiešais praimeris (*KHV*-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′,

atgriezeniskais praimeris (*KHV*-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′

un prove (*KHV*-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 95 °C 15 min, kam seko 40 cikli ar 94 °C 15 s un 60 °C 60 s. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

I.2.2. Parastā *PCR KHV* konstatēšanai

Izmanto šajā punktā aprakstīto testu, kurā mērķgēns ir *KHV* timīna kināzes (TK) gēns. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *PCR* testus, kuriem ir pierādīts aprakstītajam testam līdzvērtīgs jutīgums un specifiskums.

Tiešais praimeris (*KHV*-TKf): 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′;

atgriezeniskais praimeris (*KHV*-TKr): 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 95 °C 5 min, pēc tam 35 cikli ar 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min un viens cikls ar 72 °C 10 min. Iegūtā produkta izmēram vajadzētu būt 409 bp.

PCR rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Turklāt nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltuspozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *PCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

Pirmo konstatāciju kādā teritorijā vai nu apstiprina ar sekvenēšanas metodi, vai vīrusa tūlītējai identificēšanai nosūta uz Direktīvas 2006/88/EK VI pielikumā minētajām zivju slimībās specializētajām laboratorijām – valsts references laboratoriju vai ES references laboratoriju.

II. **Detalizētās diagnostikas metodes un procedūras *KHVD* uzraudzībai**

Veicot paraugu ņemšanu un laboratoriskus izmeklējumus ar I pielikuma 2. daļas II vai III iedaļā aprakstītajām diagnostikas metodēm, lai, kā aprakstīts minētā pielikuma 2. daļas I iedaļā, iegūtu vai saglabātu noteiktus veselības statusus attiecībā uz *KHVD*, izmanto detalizētās diagnostikas metodes un procedūras, kas aprakstītas tālāk šīs daļas II.1. un II.2. punktā.

II.1. Zivju paraugu sagatavošana

Ja iespējams, paraugus ņem no zivīm, kas ilgāku laiku turētas tādu temperatūru diapazonā, kurās iespējama vīrusa attīstīšanās, proti, divas līdz trīs nedēļas 15 °C līdz 26 °C temperatūrā. Ja iespējams, paraugus ievāc 24 stundas, taču ne vēlāk kā 72 stundas pēc tam, kad piekopta tāda saimniekošanas prakse, piemēram, tīklošana vai pārvadāšana, kuras rezultātā tādu zivju organismā, kam ir nēsātāja statuss, vīruss varētu no jauna aktivizēties.

KHVD uzraudzības nolūkiem var nosūtīt un testēšanai ar metodēm, kuru pamatā ir *PCR*, izmantot dzīvas vai nonāvētas un atsevišķi hermētiskās aseptiskās tvertnēs iepakotas zivis vai, alternatīvi, sasaldētus orgānus vai orgānu gabalus, kas konservēti 80 līdz 100 % spirtā vai vīrusu transporta barotnē (apstrādāšanai 48 stundu laikā no ievākšanas). *KHVD* uzraudzībai ievāc žaunu un nieru audus.

KHVD uzraudzības nolūkā iespējami izvairās no kopotiem paraugiem. Ja nepieciešami kopoti paraugi, kopot atļauts ne vairāk kā divu zivju audu materiālu. Lielākus paraugus homogenizē miezerī ar piestu vai ar homogenizatoru *Stomacher* un pirms dzidrināšanas paņem apakšparaugus DNS ekstrahēšanai. Var rīkoties arī tā, ka no katriem paraugā iekļautajiem audiem ievāc apakšparaugu, ko ievieto lizēšanas mēģenēs.

II.1.1. DNS ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām. Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai II.2. punktā aprakstītajos *PCR* protokolos.

Pieņemama audu un barotnes attiecība ir masa/tilp. 1:9. Testus veic ar 20 līdz 25 mg audu materiāla.

II.2. *KHVD* uzraudzīšana ar metodēm, kuru pamatā ir *PCR*

KHV uzraudzībai izmanto *qPCR*. Ja teritorijā, kas agrāk nav apstiprināta par pozitīvu, parādās pozitīvi paraugi, testu rezultātus apstiprina vai nu ar:

a) paraugiem veiktas *PCR* vai divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR* galaproduktu sekvenēšanu.

Iegūtajai tīrajai konsensa sekvencei vismaz par 98 % jāatbilst etalonsekvencēm;

b) vai pretējā gadījumā paraugus var nosūtīt uz kādu valsts references laboratoriju apstiprināšanai.

II.2.1. *qPCR KHV* konstatēšanai

qPCR izmanto atbilstoši šādam aprakstam:

tiešais praimeris (*KHV*-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′,

atgriezeniskais praimeris (*KHV*-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′

un prove (*KHV*-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 95 °C 15 min, kam seko 50 cikli ar 94 °C 15 s un 60 °C 60 s.

qPCR rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Turklāt nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltuspozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

II.2.2. Parastā *PCR KHV* konstatācijas apstiprināšanai

Lai apstiprinātu *KHV* infekcijas klātbūtni, izmanto 2.1. tabulā aprakstīto parasto divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR*, pēc kuras iegūto amplificēto materiālu sekvenē.

2.1. tabula

Praimeri un nosacījumi divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR* testam, kurā mērķvīrusi ir visi karpu dzimtas herpesvīrusi (*CyHV*-1, *CyHV*-2 un *CyHV*-3)

Praimera nosaukums	Sekvence	Ciklēšanas nosacījumi	Produkta izmērs
CyHVpol-tiešais	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	*PCR* pirmais raunds *1 ciklu:* 95 °C, 2 min *40 ciklus:* 95 °C, 30 s 55 °C, 30 s 72 °C, 45 s *1 ciklu:* 72 °C, 10 min	362 bp
CyHVpol-atgriezeniskais	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Praimera nosaukums	Sekvence	Ciklēšanas nosacījumi	Produkta izmērs
CyHVpol-iekšējais tiešais	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	*PCR* otrais raunds *1 ciklu:* 95 °C, 2 min *40 ciklus:* 95 °C, 30 s 55 °C, 30 s 72 °C, 45 s *1 ciklu:* 72 °C, 10 min	339 bp
CyHVpol-iekšējais atgriezeniskais	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

PCR rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Turklāt nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltuspozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *PCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

Sekvenēšanu var veikt laboratorija vai sekvenēšanā specializējušās ārpakalpojumu firmas. Sekvenēšanas rezultātus analizē, sekvences salīdzinot ar zināmām *KHV* etalonsekvencēm (*Gen Bank* piekļuves numuri AP008984, DQ657948 un DQ177346). Iegūtajai tīrajai konsensa sekvencei vismaz par 98 % jāatbilst minētajām etalonsekvencēm.

3. DAĻA

DETALIZĒTAS DIAGNOSTIKAS METODES UN PROCEDŪRAS LAŠU INFEKCIOZĀS ANĒMIJAS (*ISA*) UZRAUDZĪBAI UN APSTIPRINĀŠANAI

I. ***ISA* uzraudzībai un kontrolei paredzētās paraugu ņemšanas procedūras**

Ņemot paraugus un veicot laboratorisku izmeklēšanu I pielikuma 3. daļā izklāstīto uzraudzības vai izskaušanas programmu nolūkā vai *ISA* klātbūtnes apstiprināšanai vai izslēgšanai saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu, izmanto šīs iedaļas I.1., I.2. un I.3. punktā noteiktās detalizētās metodes un procedūras.

I.1. Zivju paraugu sagatavošana

Laboratoriskiem izmeklējumiem attiecībā uz *ISA* klātbūtni, ja vien iespējams, zivju paraugus nekopo. Tomēr ir pieņemami kopot 2 līdz 5 zivis *ISA* uzraudzības vajadzībām.

No visām zivīm, no kurām ņemti paraugi, ievāc paraugus apgrieztās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcijas analīzei (*RT-PCR*). No zivs ar sterilu instrumentu izņem vidusnieres gabaliņu un to ievieto mikrocentrifūgas mēģenē, kur iepildīts RNS konservēšanas šķīdums (1 ml), kura lietderīgums ir pierādīts. Audus no ne vairāk kā piecām zivīm var ievākt vienā mēģenē ar transporta šķīdumu, un tie veido vienu kopotu paraugu. Viena parauga audu svaram jābūt 0,5 g. Ja zivis ir pārāk mazas, vajadzīgā parauga svara iegūšanai var nosauktajā secībā paņemt nieru, sirds, liesas, aknu vai vārtnieka aklās zarnas gabaliņus, lai iznākumā svars būtu 0,5 g.

Audus histoloģiskai izmeklēšanai ņem tikai no nesen nonāvētām zivīm ar normālu miesasbūvi, kurām novēro *ISA* klātbūtnei atbilstošas klīniskās pazīmes vai pēcnāves izmeklēšanas rezultātus. Ņem visu ārējo vai iekšējo bojājumu paraugus un no atsevišķām zivīm visos gadījumos ar skalpeļa palīdzību ņem vidusnieres, sirds, aknu, aizkuņģa dziedzera, zarnu, žaunu un liesas paraugus, ko ievieto 8–10 % tilpumkoncentrācijas fizioloģiskajā formalīna buferšķīdumā. Lai audi pietiekami labi saglabātos, fiksatīva un audu attiecībai jābūt vismaz 20:1. Imūnķīmiskajai analīzei (*IHC*) ņem vidusnieres un sirds paraugus.

No visām paraugu ņemšanai paredzētām zivīm ņem audus virusoloģiskai izmeklēšanai šūnu kultūrā. Ar sterilu instrumentu no zivīm ņem aknu, galvasnieres vai vidusnieres, sirds un liesas gabaliņus, un tos ievieto plastmasas mēģenēs, kurās iepildīti 9 ml transporta barotnes. Audus no ne vairāk kā piecām zivīm var ievākt vienā mēģenē ar transporta šķīdumu, un tie veido vienu kopotu paraugu. Viena parauga audu svaram jābūt 1,0 ± 0,5 g.

I.2. Zivju paraugu nosūtīšana

Ja pārvadāšanas laikā iespējams ievērot šā punkta trešajā daļā aprakstītās temperatūras prasības, uz laboratoriju var nosūtīt veselas zivis. Veselās zivis ietin absorbējošā papīrā un pārvadā plastikāta maisiņos, vēsumā, kā aprakstīts minētajā daļā.

Var sūtīt arī dzīvas zivis, taču tad transportēšana jāuzrauga zivju slimībās specializētajai valsts references laboratorijai un jāņem vērā papildu dezinficēšanas un biodrošības problēmas, kas rodas dzīvu zivju transportēšanā.

Virusoloģiskai izmeklēšanai vai *RT-PCR* analīzei paredzētos asins paraugus un mēģenes ar zivju audiem ievieto izotermiskos konteineros (tādos kā polistirola kastes ar biezām sienām) kopā ar pietiekamu daudzumu ledus vai aukstumbloku, kas ceļā uz laboratoriju nodrošina paraugu dzesināšanu. Paraugus nedrīkst sasaldēt, bet pārvadāšanas kastē, to saņemot, joprojām jābūt ledum vai arī vienam vai vairākiem aukstumblokiem joprojām jābūt daļēji vai pilnīgi sasalušiem. Ārkārtas apstākļos *RT-PCR* analīzei, kā arī virusoloģiskai izmeklēšanai paredzētos paraugus drīkst ātri sasaldēt un pārvest uz laboratoriju – 20 °C vai zemākā temperatūrā.

No *RT-PCR* analīzei paredzētiem audiem, ko glabā RNA*later*, RNS atkarībā no paraugu glabāšanas temperatūras ekstrahē šādā laikā:

37 °C glabāti paraugi: viena diena,

25 °C glabāti paraugi: viena nedēļa,

4 °C glabāti paraugi: viens mēnesis,

– 20 °C glabāti paraugi: bez termiņa.

Ja zivju audi fiksatīvā jātransportē histoloģiskai izmeklēšanai, tie jānosūta hermētiskās mēģenēs triecienizturīgās tvertnēs. Šos paraugus nesasaldē.

Šūnu kultūras virusoloģiskā izmeklēšana jāsāk iespējami drīz un ne vēlāk kā 48 stundas pēc paraugu ievākšanas. Izņēmuma gadījumos, ja izmeklējamo materiālu aizsargā transporta barotne un ja pārvadāšanas laikā iespējams ievērot prasības attiecībā uz temperatūru, virusoloģisko izmeklēšanu var sākt vēlākais 72 stundas pēc materiāla ievākšanas.

I.3. Papildu diagnostiskā materiāla ievākšana

Ar nosacījumu, ka diagnostiskā laboratorija to ļauj, bez I.1. punktā minētajiem ievākt un papildu izmeklēšanai sagatavot var vēl citus zivju audus.

II. **Detalizētas diagnostikas metodes un procedūras *ISA* uzraudzībai, tās klātbūtnes apstiprināšanai vai attiecīgu aizdomu izslēgšanai**

Ja laboratorisku izmeklēšanu, ar kuru, kā aprakstīts I pielikuma 3. daļas I iedaļā, attiecībā uz *ISA* iegūst vai saglabā noteiktu veselības statusu vai saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu apstiprina *ISA* klātbūtni vai izslēdz aizdomas par to, veic ar I pielikuma 3. daļas II iedaļā aprakstītajām diagnostikas metodēm, izmanto turpmāk II.1. līdz II.5. punktā aprakstītās detalizētās metodes un procedūras.

II.1. Paraugu izmeklēšana ar *RT-PCR*

ISAV skrīningam izmantotā diagnostikas metode ir *RT-qPCR*. Tā kā atkarībā no veikšanas apstākļiem *RT-qPCR* rezultāti var atšķirties, jebkādu šaubu novēršanai jāiekļauj pietiekami pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi, un amplikoni.

II.1.1. Kopējās RNS ekstrahēšana

Visas darbības ar RNS veic cimdos uz ledus.

Kopējo RNS ekstrahē ar fenola–hloroforma metodi vai saskaņā ar ražotāja norādījumiem ar RNS afinitātes rotācijas stobriņiem.

Attīrītu RNS atkārtoti suspendē destilētā no ribonukleāzes brīvā ūdenī (proti, ar 0,1 % dietilpirokarbonātu apstrādātā ūdenī).

Ekstrahētās RNS koncentrāciju un tīrību novērtē, mērot optisko blīvumu pie 260 nm un pie 280 nm. Var arī izmantot iekšējus kontrolparaugus, kuros mērķsegments ir vīrusa genoms, kā minēts II.1.3. punktā.

II.1.2. *RT-PCR ISAV* konstatēšanai

ISAV genoma amplificēšanai var izmantot vairākas *RT-PCR* metodes. Var veikt divsoļu *RT-PCR*, kurā *RT* un *PCR* reakcijas soļus izpilda divās atsevišķās mēģenēs. Tomēr var veikt arī viensoļa reakciju, kurā abas reakcijas izpilda vienā mēģenē. Ja vien iespējams, jāizmanto viensoļa metode, jo tad saturs nav jāpārvieto, tāpēc vienas mēģenes tests samazina krusteniskās kontaminācijas risku, turklāt to atzīst par tikpat jutīgu kā divsoļu metodi.

Izmanto šajā punktā aprakstītos praimerus un testu, proti, praimeru pāri ILA1 un ILA2, kuru mērķsegments ir 8. segments un kuri atzīti par piemērotiem *ISAV* konstatēšanai uzliesmojumu gadījumos un zivju vīrusa nēsātāju organismā. ILA2 atgriezeniskais praimeris neatbilst Ziemeļamerikas izolātiem, un tādos gadījumos izmanto alternatīvu praimeru komplektu.

Tiešais praimeris (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′,

atgriezeniskais praimeris (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 50 °C 30 min, viens cikls ar 94 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s; viens cikls ar 72 °C 5 min. Iegūtā produkta izmērs 155 bp.

PCR rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Turklāt nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltuspozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

II.1.3. *RT-qPCR ISAV* konstatēšanai

Ar *RT-qPCR* iespējams panākt lielāku specifiskumu un, domājams, arī jutību. Ar šo metodi testu var izpildīt ātrāk, jo nav vajadzīgs gela elektroforēzes solis, turklāt tā mazina krusteniskās kontaminācijas risku, jo vīrusa genomiskās RNS daudzumu iespējams aplēst parauga mēģenē. *RT-qPCR* testam ir tāds trūkums, ka amplificētos produktus bieži vien nav iespējams sekvenēt. Tomēr, ja ir šaubas par amplificētā produkta specifiskumu, rezultāta apstiprināšanai jāizpilda vēl kāds *ISAV* specifisks tests.

Izmanto šajā punktā aprakstīto testu, kura mērķsegments ir 8. segments. Šis tests aptver Eiropas Savienības, Eiropas Brīvās tirdzniecības asociācijas un Ziemeļamerikas izolātus. Ja vien iespējams, izmanto viensoļa metodi, jo vienas mēģenes tests samazina krusteniskās kontaminācijas risku.

Tiešais praimeris: 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′,

atgriezeniskais praimeris: 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′

un prove: 5′-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – *MGBNFQ*-3′.

Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 50 °C 30 min, viens cikls ar 95 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 15 s, 60 °C 60 s; ja nepieciešams, koriģē. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

II.1.4. Amplificētu *PCR* produktu sekvenēšana

Tiešais praimeris (ILAs6-3F): 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;

atgriezeniskais praimeris (ILAs6-2R): 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.

Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Ciklēšanas nosacījumi (viensoļa *RT-PCR*): viens cikls ar 50 °C 30 min, viens cikls ar 94 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, viens cikls ar 72 °C 5 min; ja nepieciešams, koriģē. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

Alternatīvi *HPR* sekvenēšanai 6. segmentā var izmantot šādu metodi:

tiešais praimeris: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′,

atgriezeniskais praimeris: 5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′.

Produkta izmērs: 304 nt, ja *HPR*0.

Var izmantot arī *RT-PCR* testus ar tādu pašu jutīgumu un specifiskumu kā šajā punktā aprakstītajiem testiem.

Pirms sekvenēšanas amplificētā *RT-PCR* produkta tīrību pārbauda ar gela elektroforēzi. Ja iegūts tikai viens tīrs fragments, to attīra tieši pēc *PCR* reakcijas. Ja ir vairāki amplificēti fragmenti, ar gela elektroforēzi attīra interesējošo fragmentu. *PCR* fragmentus no šķīdumiem vai agarozes geliem attīra, *PCR* fragmentiem saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot afinitātes rotācijas stobriņus.

Sekvenēšanu ar amplifikācijas praimeru palīdzību izdara sekvenēšanā specializējušās ārpakalpojumu firmas. Sekvenēšanas rezultātus analizē ar meklēšanas rīku *BLAST*, un sekvences salīdzina ar citām zināmām sekvencēm ASV Nacionālā Biotehniskās informācijas centra (*NCBI*) nukleotīdu datubāzē.

Sekvenēšanai jānovērš jebkādas šaubas par amplificēta *RT-PCR* produkta specifiskumu.

II.2. *ISAV* izolēšana uz šūnu kultūrām

II.2.1. Paraugu sagatavošana

Audus var glabāt – 80 °C temperatūrā. Pirms izmeklēšanas audus sasaldē un atkausē tikai vienu reizi. Uzraudzības un kontroles nolūkiem izmeklēšanu veic iespējami drīz.

Katru paraugu (kopotos audus pārvadāšanas šķīdumā) pilnīgi homogenizē, izmantojot validētu homogenizētāju, 0 līdz 6 °C temperatūrā 15 minūtes centrifugē (2 000 līdz 4 000 × *g*), un centrifugātu pēc filtrācijas (0,45 μm) inkubē ar vienādu tilpumu pienācīgi atšķaidīta pret *IPNV* vietējiem serotipiem izstrādājušos antiserumu maisījuma. Antiseruma titram 50 % plātnīšu neitralizācijas testā jābūt vismaz 1:2 000. Maisījumu vienu stundu inkubē 15 °C temperatūrā. Šādi iegūst inokulātu.

Visu inokulātu apstrādei ar *IPN* vīrusa antiserumu (vīruss, kurš dažās Eiropas daļās sastopams 50 % zivju paraugu) ir mērķis novērst *IPN* vīrusa izraisītu *CPE* inokulētajās šūnu kultūrās. Šādu apstrādi var veikt, lai samazinātu virusoloģisko izmeklējumu ilgumu, kā arī to gadījumu skaitu, kuros būtu jāuzskata, ka *CPE* potenciāli liecina par *ISAV*. Ja paraugi ir no ražošanas vienībām, kuras uzskata par brīvām no *IPN*, inokulātus ar *IPN* vīrusa antiserumu var neapstrādāt.

II.2.2. Šūnu kultūru inokulēšana

Primārajai *ISAV* izolēšanai izmanto Atlantijas laša nieru (*ASK*) šūnas. Ņemot vērā celmu mainīgumu un to, ka dažādu celmu vairošanās spēja dažādās šūnu līnijās atšķiras, var izmantot arī citas šūnu līnijas, par kurām pierādīts, ka tās ir pietiekami produktīvas un jutīgas *ISAV* izolēšanai. Ja vien izmanto zemu pasāžas līmeni, uzskatāms, ka līdz šim zināmo vīrusu izolātu izolēšana un augšana *ASK* šūnās noris labvēlīgi. *ASK* šūnām var novērot izteiktāku citopātisko efektu (*CPE*) nekā citām uzņēmīgām šūnu līnijām, piemēram, *SHK*-1 (laša galvasnieres šūnas-1).

ASK (65. vai agrāks pārsējums) šūnas audzē daudziedobju platēs barotnē *L*-15, kas satur 10 % liellopu embrionālā seruma, 200 mM L-glutamīna tilpumkoncentrācijā 2 % un 50 mM 2-merkaptoetanola tilpumkoncentrācijā 0,08 %. Ar antiserumu apstrādātu orgānu suspensiju inokulē jaunu, aktīvi augošu šūnu kultūrās, raugoties, lai galīgajā atšķaidījumā audu materiāla attiecība pret kultūras barotni būtu 1:1 000. Par katru orgānu iedobē ar 2 ml kultivēšanas barotnes ievada 40 µl inokulāta suspensijas. Lai līdz minimumam samazinātu krusteniskās kontaminācijas risku, paraugiem no dažādām zivaudzētavas vietām izmanto atsevišķas plates ar 12 vai 24 iedobēm.

Vienu plati atstāj bez inokulāta un izmanto par negatīvo kontrolparaugu. Par pozitīvu kontrolparaugu izmantojamu *ISAV* standartizolātu atsevišķā platē inokulē šādi. Pirmajā iedobē inokulē simt µl *ISAV* izejpreparāta (minimālais titrs 10^7, audu kultūras inficējošā deva ar beigupunktu 50 % (*TCID*50 ml^{-1})) un samaisa. Noteiktu šā materiāla tilpumu no pirmās iedobes pārvieto otrajā tā, lai iegūtais atšķaidījums būtu 1:10, un samaisa. Šo procedūru atkārto tā, lai desmitkārtīgu atšķaidījumu iegūtu sešās iedobēs. *ISAV* izejpreparātu – 80 °C temperatūrā var glabāt vismaz divus gadus, bet pēc atkausēšanas tas jāizlieto trīs dienu laikā. Jāraugās, lai testa platēs nepieļautu krustenisko kontamināciju ar pozitīvās kontroles materiālu. Lai izvairītos no šāda riska, pozitīvos kontrolparaugus sagatavo un ar tiem darbojas atsevišķi no testa platēm. Tā vietā, lai inokulēšanā katrreiz izmantotu pozitīvu kontrolparaugu, var ik sešus mēnešus testēt *ASK* šūnu jutīgumu pret *ISAV* izolātiem.

Paraugus ne ilgāk kā 15 dienas inkubē 15 ± 2 °C temperatūrā. Šūnu kultūras mikroskopā attiecībā uz *CPE* pārbauda divas reizes – laikā no piektās dienas līdz septītajai un no 12. līdz 14. dienai pēc inokulēšanas. Ja kādam kopotam paraugam vērojams *CPE*, nekavējoties saskaņā ar II.2.4. punktu jāsāk vīrusa identificēšanas procedūras. Ja līdz 14. dienai *CPE* netiek novērots, izdara netiešās imūnfluorescences antivielu testu (*IFAT*), hemadsorbcijas testu vai *RT-PCR*.

II.2.3. Šūnu pārsēšana

Šūnas pārsēj laikā starp 13. un 15. dienu. Attiecīgi atšķaidītu (1/10) kultūras centrifugātu ievada iedobēs, kurās ir svaigas, aktīvi augošas šūnas, un 14 ± 2 °C temperatūrā inkubē ne ilgāk kā 18 dienas. Šūnu kultūras mikroskopā attiecībā uz *CPE* pārbauda divas reizes – laikā no piektās dienas līdz septītajai un no 14. līdz 18. dienai pēc inokulēšanas. Ja kādam kopotam paraugam vērojams *CPE*, nekavējoties saskaņā ar II.2.4. punktu jāsāk vīrusa identificēšanas procedūras. Ja līdz 14. līdz 18. dienai *CPE* netiek novērots, veic hemadsorbcijas testu vai *RT-PCR* testu.

Ja citotoksicitāti novēro pirmajās septiņās inkubācijas dienās, šūnas pārsēj tajā posmā un 14 līdz 18 dienas inkubē, pēc tam tās atkal pārsēj un inkubē vēl 14 līdz 18 dienas. Ja citotoksicitāti novēro pēc septiņām dienām, šūnas pārsēj vienu reizi un no pirmās inokulēšanas inkubē pavisam 28 līdz 36 dienas.

Ja primārajā kultūrā vērojama bakteriāla kontaminācija, testu sagatavo vēlreiz, izmantojot – 80 °C temperatūrā glabāto audu homogenātu. Audu homogenātu pirms inokulēšanas 0 līdz 6 °C temperatūrā 15 līdz 30 minūtes centrifugē 4 000 × *g*, un centrifugātu filtrē (0,22 µm). Ja bakteriālu kontaminmāciju novēro šūnu pārsēšanas laikā, centrifugātu filtrē (0,22 µm), inokulē tikko pārsētām šūnām un inkubē vēl 14 līdz 18 dienas.

II.2.4. Vīrusa identificēšanas testi

Ja kaut vienā stadijā novēro *CPE* vai ja hemadsorbcijas tests ir pozitīvs, veic vīrusa identificēšanu. *ISAV* identificēšanā vēlamā metode ir *RT-PCR* saskaņā ar II.1. punktu un imūnfluorescences (*IF*) metode saskaņā ar II.2.6. punktu. Ja tiek uzskatīts, ka iespējama citu vīrusu klātbūtne, vīrusa identificēšanai veic papildu testus. Ja ar šiem testiem vīruss nedēļas laikā nav galīgi identificēts, centrifugātu nekavējošai identifikācijai nosūta tālāk uz:

a) Pasaules Dzīvnieku veselības organizācijas (*OIE*) references laboratoriju darbā ar *ISA*; vai

b) uz Direktīvas 2006/88/EK VI pielikumā minētajām zivju slimībās specializētajām laboratorijām – valsts references laboratoriju vai ES references laboratoriju.

II.2.5. Hemadsorbcija

Tā kā *ISAV* replicēšanās šūnu kultūrās ne vienmēr rada *CPE*, tad katrā iedobē saskaņā ar šo punktu veic *RT-PCR* testu vai hemadsorbcijas testu vai saskaņā ar II.2.6. punktu – *IF* testu.

No visām iedobēm, arī pozitīvo un negatīvo kontrolparaugu iedobēm, barotni ar šūnu kultūru izņem un ievieto etiķetētās sterilās mēģenēs. Katrā iedobē iepilda piecsimt µl skalotu truša vai zirga eritrocītu tilpumkoncentrācijā 0,2 % vai skalotas varavīksnes foreles vai Atlantijas laša eritrocītu suspensijas tilpumkoncentrācijā 0,05 % un istabas temperatūrā inkubē 45 minūtes. Pēc tam eritrocītu suspensiju izlej un katru iedobi divreiz izskalo ar barotni *L*-15. Katru iedobi pārbauda mikroskopā.

Ja uz *ASK* šūnu virsmas ir eritrocītu sakopojumi, ir iespējama inficēšanās ar ortomiksovīrusu. Ja hemadsorbcijas tests ir pozitīvs, nekavējoties saskaņā ar II.2.4. punktu veic vīrusa identificēšanas testu.

II.2.6. Imūnfluorescence (*IF*)

ASK (65. vai agrāks pārsējums) daudziedobju platēs audzē barotnē *L*-15, kas satur 10 % liellopu embrionālā seruma, 200 mM L-glutamīna tilpumkoncentrācijā 2 % un 50 mM 2-merkaptoetanola tilpumkoncentrācijā 0,08 %, un izmanto tad, kad konfluence pārsniegusi 50 %. Var izmantot arī citas šūnu līnijas vai barotni, kuru lietderīgums ir pierādīts. Divās iedobēs katrā iepilda 225 µl ar vīrusu varbūtēji inficētas kultūras centrifugāta, samaisa un 225 µl iepilda vēl divās iedobēs, iegūstot atšķaidījumu 1:5. Vēl divās iedobēs inokulātu neievada, un tās izmanto par kontrolparaugiem. Paraugiem no katras zivaudzētavas, kā arī vīrusa kontrolei izmanto atsevišķu plati. Vīrusa kontrolparaugam izmanto *ISAV* standartizolātu.

Plates inkubē 14 ± 2 °C temperatūrā un tās mikroskopiski pārbauda ne vēlāk kā 7 dienu laikā. Ja jau agrīnā stadijā novēro *CPE*, kā arī tad, ja 7 dienu laikā *CPE* nenovēro, nākamais solis ir fiksācija. Iedobes skalo ar fosfātu buferšķīdumu (*PBS*) un istabas temperatūrā 20 minūtes ar inkubācijas paņēmienu fiksē ar 80 % acetonu. Plates žāvē ar gaisa plūsmu un uzreiz nokrāso vai pirms krāsošanas ne ilgāk kā 24 stundas glabā 0 līdz 6 °C temperatūrā.

Replicētas iedobes krāso ar maisījumu no *ISAV* monoklonālajām antivielām (MAb) 3H6F8 un 1OC9F5vai ar citu MAb, kuras iedarbīgums un specifiskums ir pierādīti, pēc tam fosfātu buferšķīdumā atšķaida un 30 minūtes inkubē 37 ± 4 °C temperatūrā. Tad plates atbrīvo no monoklonālās antivielas un trīs reizes skalo ar 0,05 % *Tween* 20 fosfātu buferšķīdumā. Katrā iedobē iepilda ar fosfātu buferšķīdumu atšķaidītu peļu antivielas *IgG* un fluorescīna izotiocianāta konjugātu (*FITC*) un 30 minūtes inkubē 37 ± 4 °C temperatūrā. Monoklonālo antivielu un *FITC* konjugāta dažādo partiju atšķaidījumus katrā laboratorijā optimizē. Plates atbrīvo no antivielas un trīs reizes skalo 0,05 % *Tween* 20 fosfātu buferšķīdumā.

Tūlīt pēc tam iedobes pārbauda inversijas mikroskopā, kas pielāgots fluorescences mikroskopijai un aprīkots ar *FITC* ierosai piemērotu filtru. Ja novēro fluorescējošas šūnas, uzskata, ka tests ir pozitīvs. Pārbaude ir derīga tikai tad, ja pozitīvajiem kontrolparaugiem rezultāti ir pozitīvi, bet negatīvajiem – negatīvi.

II.3. Citu audu izmeklēšana

II.2.6. punktā minēto paņēmienu var izmantot arī citiem audiem, piemēram, aknām, liesai un sirdij, ja vien uz priekšmetstikliņu izdodas pārnest pietiekami daudz endotēlija šūnu, leikocītu vai limfocītu. Visiem audiem izmanto vienu un to pašu krāsošanas paņēmienu, lai gan dažus audus nebūtu vēlams krāsot ar propīdija jodīdu, bet gan šūnu tipu audu nospiedumā noteikt ar fāzu kontrastmikroskopu.

II.4. Histoloģija

No parafīnā ieguldītiem griezumiem ņem 5 µm biezus griezumus un krāso ar hematoksilīnu un eozīnu.

Klīniski slimu Atlantijas lašu organismā ir vērojamas mainīgas histoloģiskās pārmaiņas, taču to vidū var būt šādas:

a) vairāki eritrocīti centrālajā venozajā sinusā un plātnīšu kapilāros žaunās, kur var veidoties arī eritrocītu trombi;

b) atstatus no aknu lielajiem asinsvadiem vērojamas vairākperēkļu vai saplūdušas petehijas, hepatocītu nekroze vai abi; perēkļveida eritrocītu sakopojumi paplašinātos aknu sinusoīdos;

c) eritrocītu uzkrāšanās zarnu *lamina propria* asinsvados un varbūtēji asiņošana *lamina propria*;

d) eritrocītu uzkrāšanās rezultātā palielinājusies liesas stroma;

e) intersticiāla asiņošana – no vieglas vairākperēkļu līdz plašai difūzai – ar kanāliņu nekrozi asiņošanas vietās, eritrocītu uzkrāšanās nieru kamoliņos;

f) eritrofagocitoze liesā un sekundāra asiņošana aknās un nierēs.

II.5. Imūnhistoķīmija (*IHC*)

Formalīnā fiksētu audu parafinētiem griezumiem izmanto poliklonālas antivielas pret *ISAV* nukleoproteīnu. Izmeklē vidusnieri un sirdi (pārejas vieta, kurā ietilpst trīs kambari un vārsti). Patoloģisku pazīmju radītu aizdomu gadījumus pārbauda, izmantojot pozitīvu *IHC*. Histoloģiskos griezumus sagatavo pēc standartmetodēm.

1. Audu griezumu sagatavošana

Audus saskaņā ar standartprotokoliem vismaz vienu dienu fiksē neitrālā 10 % formalīna fosfātu buferšķīdumā, atūdeņo ar pakāpeniski pieaugoša stipruma etilspirtu, dzidrina ar ksilēnu un iegulda parafīnā. Patomorfoloģijas un *IHC* vajadzībām apmēram 5 µm biezus griezumus (*IHC* vajadzībām – uz stikliņiem ar poli-L-lizīna apvalku) 20 minūtes karsē 56 °C līdz 58 °C (maksimāli 60 °C) temperatūrā, ar ksilēna palīdzību atvasko, ar pakāpeniski sarūkoša stipruma etilspirtu rehidratē, kā arī saskaņā ar 2. punktu krāso ar hematoksilīnu un eozīnu.

2. Krāsošanas procedūra *IHC* vajadzībām

Jebkādu inkubēšanu veic istabas temperatūrā uz svārstplatformas, ja vien šajā lēmumā nav paredzēts citādi:

a) antigēnu atgūšanu nodrošina, griezumus 2 × 6 minūtes vārot 0,1 M citrāta buferšķīdumā ar pH 6,0, pēc kā 20 min izdara bloķēšanu ar 5 % piena beztauku sausnas un 2 % kazas seruma 50 mM *TBS* šķīdumā (*TBS*; *Tris*/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6);

b) pēc tam griezumus uz nakti inkubē ar primāru antivielu (monospecifisku truša antivielu pret *ISAV* nukleoproteīnu), kura atšķaidīta 1 % piena beztauku sausnas saturošā *TBS*, pēc tam trīsreiz skalo ar 0,1 % *Tween* 20 saturošu *TBS*;

c) saistītu antivielu konstatēšanai griezumus 60 minūtes inkubē truša *IgG* antivielas sārmainās fosfatāzes konjugātā. Pēc galīgās skalošanas pievieno *Fast Red* (1 mg ml^{-1}) un naftola AS-MX fosfātu (0,2 mg ml^{-1}) ar 1 mM levamizola 0,1 M *TBS* (pH 8,2) un dod iespēju 20 minūtes attīstīties. Pēc tam griezumus skalo krāna ūdenī, kontrastam krāso ar Harisa hematoksilīnu un pārklāj ar pārklājbarotni uz ūdens bāzes. Katrā testa sagatavošanā iekļauj kontrolparaugus – attiecībā uz *ISAV* gan pozitīvus, gan negatīvus audu griezumus.

3. *IHC* rezultātu interpretēšana

IHC testa rezultātus interpretē tā, kā aprakstīts a) un b) apakšpunktā:

a) kontrolgriezumus par pozitīviem uzskata tad, ja kontrolgriezumiem skaidri saskatāms, ka endokarda asinsvadu endotēlija šūnu citoplazma un kodols ir iekrāsoti sarkani (sarkanīgi). Testa parauga griezumu uzskata par pozitīvu tikai tad, ja šādu skaidri saskatāmu sarkanu kodola iekrāsojumu konstatē endotēlija šūnām;

b) kontrolgriezumus par negatīviem uzskata tad, ja tiem nav novērojama nekāda būtiska krāsas reakcija.

Tā kā ortomiksovīrusa nukleoproteīnam vīrusa replikācijas stadijā ir raksturīga lokalizācija kodolā, taču bieži vien vienlaikus izteiktāk iekrāsota ir citoplazma, tāds citoplazmas iekrāsojums un cita veida iekrāsojums, kas nav lokalizēts kodolā, uzskatāms par nespecifisku vai neizšķirīgu.

Pozitīvā gadījumā izteiktākās iekrāsojuma reakcijas parasti vērojamas sirds un nieru endotēlija šūnās. Ļoti plašos hemorāģiskos bojājumos endotēlija krāsojuma reakcijas var būt mazizteiktas vai vispār nav novērojamas, iespējams, inficētajās endotēlija šūnās notiekošas līzes dēļ.

4. DAĻA

DETALIZĒTAS DIAGNOSTIKAS METODES UN PROCEDŪRAS *MARTEILIA REFRINGENS* INFEKCIJAS UZRAUDZĪBAI UN APSTIPRINĀŠANAI

I. **Detalizētas diagnostikas metodes un procedūras, ar kurām apstiprina inficēšanos ar *Marteilia refringens***

Ja paraugu ņemšanu un laboratorisku izmeklēšanu veic, lai, kā aprakstīts šā dokumenta I pielikuma 4. daļas I iedaļā, iegūtu vai saglabātu veselības statusu attiecībā uz inficēšanos ar *Marteilia refringens* vai lai saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu, izmantojot I pielikuma 4. daļas II iedaļā aprakstītās diagnostikas metodes, apstiprinātu minētās sarakstā iekļautās slimības klātbūtni vai to izslēgtu, izmanto šīs daļas I.1., I.2. un I.3. punktā aprakstītās detalizētās diagnostikas metodes un procedūras.

I.1. Paraugu ņemšanas procedūra

Lai varbūtība atrast inficētus dzīvniekus būtu lielāka, paraugus ņemot, priekšroka ir gliemenēm, kas pavērušās vai tikko nobeigušās.

Paraugam ņemtās austeres vai ēdamgliemenes plastmasas maisiņā, kura etiķete satur informāciju par austeru vai ēdamgliemeņu izcelsmi un īpašībām, 4 °C temperatūrā vai uz atdzesēta ledus tur ne ilgāk kā 24 stundas, ja paraugā ir pavērušās gliemenes, un ne ilgāk kā 72 stundas, ja tajā pavērušos gliemeņu nav. Pavērušās vai tikko nobeigušās gliemenes tur atsevišķi no citām gliemenēm.

Marteilia refringens histoloģiskai diagnosticēšanai izmanto 3 līdz 5 mm biezu audu griezumu, kurā ietilpst žaunas un sirds audi. Dažiem testiem, arī nospiedumiem un polimerāzes ķēdes reakcijai (*PCR*) izmanto gremošanas dziedzera audus.

I.2. Mikroskopiskie paņēmieni

I.2.1. Citoloģija (nospieduma citoloģija)

Kad gremošanas dziedzera audi apžāvēti uz absorbējoša papīra, uz priekšmetstikliņa atstāj vairākus nospiedumus. Priekšmetstikliņu preparātus ar gaisa plūsmu nožāvē, fiksē metilspirtā vai absolūtajā spirtā un nokrāso, saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot kādu no tirdzniecībā pieejamiem asins preparātu krāsošanas reaģentu komplektiem, tādu kā *Diff-Quik®*/*Hemacolor®*. Kad stikliņi krāna ūdenī noskaloti un nosusināti, tiem ar piemērotas sintētiskas gumijas palīdzību uzliek segstiklu. Priekšmetstikliņus vispirms novēro palielinājumā × 200 un pēc tam – iegremdētus eļļā palielinājumā × 1 000.

Rezultāts ir pozitīvs tad, ja novēro šūnas, kuru izmērs ir no 30 līdz 40 μm. Citoplazmu iekrāso bazofilie, savukārt kodolu – eozinofilie leikocīti. Var novērot blāvus lokus ap lielām, stipri iekrāsotām (atstarojošām) granulām un, lielākās šūnās, šūnu šūnā.

Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

I.2.2. Histoloģija

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas, gremošanas dziedzeris, mantija un gonādas, vismaz 24 stundas fiksē *Davidson* fiksatīvā, pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai un krāso, piemēram, ar hematoksilīnu un eozīnu. Novērojumus veic arvien augstākā palielinājumā līdz × 1 000.

Rezultāts ir pozitīvs tad, ja novēro šūnas, kuru izmērs ir no 4 līdz 40 μm. Agrīnās stadijās ir vērojamas vairākkodolu šūnas un šūnas, kuru forma ir no sfēriskas līdz pagarinātai. Tās konstatē galvenokārt barības vada un kuņģa, dažkārt lūpu taustekļu epitēlijā. Sporulācija saistās ar šūnu dalīšanos šūnu iekšpusē un notiek gremošanas dziedzera kanāliņos un vados. Sporulācijas procesā rodas atstarojošas granulas, taču agrīnos posmos tās nenovēro. Infekcijas vēlīnās stadijās atsevišķus sporangijus novēro gremošanas trakta lūmenā. Citoplazmu iekrāso bazofilie, savukārt kodolu – eozinofilie leikocīti. Granulu krāsa var variēt no tumšoranžas līdz tumšsarkanai.

Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

I.3. Molekulārie paņēmieni

I.3.1. DNS ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām.

Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai I.3.2. punktā aprakstītajos *PCR* protokolos.

I.3.2. *Polimerāzes ķēdes reakcija* (*PCR*)

Ir izstrādāti un publicēti vairāki *PCR* protokoli.

Jāizmanto tie *PCR* praimeri, kuru mērķrajons ir iekšējā transkribētā speisera (ITS1) rajons, jo tie spēj amplificēt tikai *M. refringens*.

PCR īsteno 50 µl tilpumā. *PCR* maisījumi satur buferšķīdumu (500 mM KCl, 100 mM *Tris*/HCl [pH 9,0 25 °C temperatūrā] un 1 % *Triton*® X-100), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP maisījuma, 1 µM tiešā un atgriezeniskā praimera, 0,02 vienības μl^{-1} *Taq* DNS polimerāzes, un 10 līdz 100 ng ekstrahētas DNS. Kad DNS piecas minūtes denaturēta 94 °C, veic šādus 30 ciklus: denaturācija ar 94 °C 1 min, hibridizācija ar 55 °C 1 min, un – vienu minūti uz katru kilobāzes pāri – elongācija ar 72 °C. Veic pēdējo elongācijas soli – 10 minūtes 72 °C temperatūrā. *M. refringens* konstatēšanai izdara *PCR* ar praimeriem, kuru mērķrajons ir ITS1 (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ un 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Pozitīvie kontrolparaugi ir no stipri inficēta saimniekorganisma iegūta genomiskā DNS vai plazmīdu DNS, kurām ir mērķrajons.

Negatīvo kontrolparaugu sastāvā ir no neinficētiem saimniekorganismiem iegūta genomiskā DNS un *PCR* reaģenti bez mērķa DNS.

Pozitīvs rezultāts ir pozitīva *PCR* amplifikācija sagaidāmajā izmērā (412 bp), visu negatīvo kontrolparaugu rezultātiem esot negatīviem un visu pozitīvo kontrolparaugu rezultātiem – pozitīviem.

I.3.3. In situ hibridizācija (ISH)

Izstrādāti un publicēti ir vairāki *ISH* protokoli.

Izmanto provi, kuras mērķrajons ir rRNS gēnu kompleksa mazā apakšvienība, jo tā ir histoloģiski validēta.

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas un gremošanas dziedzeris, vismaz 24 stundas fiksē *Davidson* fiksatīvā un pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai. Nogriež 5 µm biezus griezumus, ko novieto uz priekšmetstikliņiem ar aminoalkilsilāna pārklājumu un pēc tam uz nakti karsē 40 °C karstā krāsnī. Griezumus atvasko, uz 10 minūtēm iegremdējot ksilēnā. Šo soli vienreiz atkārto un pēc tam atbrīvojas no šķīdinātāja, griezumus divreiz pēc kārtas uz 10 minūtēm iegremdējot absolūtā spirta peldēs. Pēc tam griezumus dehidratē, tos mērcējot augoša stipruma etilspirtā. Griezumus 37 °C temperatūrā 30 minūtes apstrādā ar proteināzi K (100 µg ml^{-1}) TE buferšķīdumā (*Tris* [50 mM], *EDTA* [10 mM]). Stikliņus atūdeņo, tos mērcējot augoša stipruma etilspirtā, pēc tam ar gaisu nožāvē. Griezumus inkubē ar 100 µl hibridizācijas buferšķīduma (4 × *SSC* [citrāta fizioloģiskā standartšķīduma], 50 % formamīda, 1 × Denhardta šķīduma, 250 µg ml^{-1} rauga tRNS, 10 % dekstrāna sulfāta), kas satur 10 ng (1 µl *PCR* reaģentu, kuri sagatavoti, kā aprakstīts I.3.2. punktā, izmantojot praimerus CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG un TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) proves, kas marķēta ar digoksigenīnu. Griezumus pārsedz ar *in situ* plastmasas segstikliņiem un uz piecām minūtēm novieto uz karstumbloka 95 °C temperatūrā. Pirms stikliņus 42 °C temperatūrā uz nakti atstāj hibridizēties mitrā kamerā, tos uz ledus vienu minūti atdzesina. Griezumus divreiz pa piecām minūtēm istabas temperatūrā skalo 2 × SSC un vienreiz 10 minūtes 42 °C temperatūrā skalo 0,4 × SSC. Konstatēšanas soļus veic saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Pēc tam stikliņus skalo sterilā destilētā ūdenī (dH_2O). Griezumu krāsu neitralizē ar *Bismarck Brown Yellow*, skalo ar dH_2O un, izmantojot pārklājbarotni uz ūdens bāzes, uzliek segstikliņus.

Pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi attiecīgi ir griezumi no zināmiem inficētiem un neinficētiem saimniekorganismiem.

Visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un visiem pozitīvajiem kontrolparaugiem – pozitīviem, par pozitīvu rezultātu liecina violeti melni iekrāsotas *M. refringens* šūnas zināmos mērķaudos.

I.3.4. Sekvenēšana

Sekvenēšanu veic kā vienu no apstiprinošas diagnosticēšanas galīgajiem soļiem. Mērķrajoni ir rDNS mazā apakšvienība un ITS1.

II. **Detalizētas diagnostikas metodes un procedūras *Marteilia refringens* infekcijas uzraudzībai un apstiprināšanai**

Lai īstenotu uzraudzības programmas un apstiprinātu *Marteilia refringens* infekcijas klātbūtni vai izslēgtu aizdomas par šo sarakstā iekļauto slimību saskaņā ar I pielikuma 4. daļas II iedaļas prasībām, izmantotajām diagnostikas metodēm un attiecīgajām procedūrām jāatbilst šādām 4.1. tabulas vadlīnijām.

4.1. tabula

Vadlīnijas attiecībā uz diagnostikas metožu izmantošanu uzraudzības programmās un *Marteilia refringens* infekcijas apstiprināšanai vai izslēgšanai

Metode	Mērķorientēta uzraudzība	Prezumptīvā diagnoze	Apstiprinošā diagnoze
Gremošanas dziedzera nospiedumi	X	X	X vai
Histopatoloģija	X		X vai
In situ hibridizācija			X un
PCR	X	X	X un
Sekvenēšana			X

5. DAĻA

DETALIZĒTAS DIAGNOSTIKAS METODES UN PROCEDŪRAS INFICĒŠANĀS AR *BONAMIA OSTREAE* UZRAUDZĪBAI UN APSTIPRINĀŠANAI

I. ***Bonamia ostreae* infekcijas diagnosticēšanas procedūras**

Ja paraugu ņemšanu un laboratorisku izmeklēšanu veic, lai, kā aprakstīts šā dokumenta I pielikuma 5. daļas I iedaļā, iegūtu vai saglabātu noteiktu veselības statusu attiecībā uz *Bonamia ostreae* vai lai saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu, izmantojot I pielikuma 5. daļas II iedaļā aprakstītās diagnostikas metodes, apstiprinātu minētās sarakstā iekļautās slimības klātbūtni vai to izslēgtu, izmanto turpmāk I.1., I.2. un I.3. punktā aprakstītās detalizētās diagnostikas metodes un procedūras.

I.1. Paraugu ņemšanas process

Lai varbūtība atrast inficētus dzīvniekus būtu lielāka, paraugus ņemot, priekšroka ir gliemenēm, kas pavērušās vai tikko nobeigušās.

Paraugam ņemtās austeres plastmasas maisiņā, kura etiķete satur informāciju par austeru izcelsmi un īpašībām, 4 °C temperatūrā vai uz atdzesēta ledus tur ne ilgāk kā 24 stundas, ja paraugā ir pavērušās gliemenes, un ne ilgāk kā 72 stundas, ja tajā pavērušos gliemeņu nav. Pavērušās vai tikko nobeigušās gliemenes tur atsevišķi no citām gliemenēm.

Bonamia ostreae histoloģiskai diagnosticēšanai izmanto 3 līdz 5 mm biezu audu griezumu, to vidū no žaunām un sirds audiem. Dažiem testiem, arī nospiedumiem un polimerāzes ķēdes reakcijai (*PCR*), izmanto gremošanas dziedzera audus.

I.2. Mikroskopiskie paņēmieni

I.2.1. Citoloģija (nospieduma citoloģija)

Kad žaunas vai sirds audi apžāvēti uz absorbējoša papīra, uz priekšmetstikliņa atstāj vairākus nospiedumus. Priekšmetstikliņu preparātus ar gaisa plūsmu nožāvē, fiksē metilspirtā vai absolūtajā spirtā un nokrāso, saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot kādu no tirdzniecībā pieejamajiem asins preparātu krāsošanas reaģentu komplektiem, konkrētāk, tādu kā *Diff-Quik*®/*Hemacolor*®. Kad stikliņi krāna ūdenī noskaloti un nosusināti, tiem ar piemērotas sintētiskas gumijas palīdzību uzliek segstiklu. Priekšmetstikliņus vispirms novēro palielinājumā × 200 un pēc tam – iegremdētus eļļā palielinājumā × 1 000.

Pozitīvs rezultāts būs mazu (2 līdz 5 μm platu) lodveida vai olveida organismu klātbūtne hemocītos. Tomēr parazīta klātbūtne iespējama arī ārpus šūnām. Šiem organismiem citoplazmā vērojami bazofilie leikocīti un kodolā – eozinofilie leikocīti (krāsa var atšķirties atkarībā no krāsošanas līdzekļa) un, tā kā uz priekšmetstikliņa tie izplūst, uz nospiedumiem tie var izskatīties platāki nekā histoloģiskā izmeklēšanā. Var būt novērojamas daudzkodolu šūnas. Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

I.2.2. Histoloģija

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas un gremošanas dziedzeris, vismaz 24 stundas fiksē *Davidson* fiksatīvā, pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai un krāso, piemēram, ar hematoksilīnu un eozīnu. Novērojumus veic arvien augstākā palielinājumā līdz × 1 000.

Pozitīvs rezultāts ir parazītu klātbūtne, kas izpaužas kā ļoti mazas, 2 līdz 5 μm platas šūnas, kuras novērojamas hemocītos vai atsevišķi žaunu, zarnu un mantijas epitēlija saistaudos vai dobumos un bieži vien saistās ar spēcīgu iekaisuma reakciju. Lai izslēgtu jebkādas šaubas un uzstādītu pozitīvu diagnozi, vajadzīgs, lai parazīts būtu novērots hemocītā. Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

I.3. Molekulārie paņēmieni

I.3.1. DNS ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām.

Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai turpmāk aprakstītajos *PCR* protokolos.

I.3.2. Polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*)

Izstrādāti un publicēti ir vairāki *PCR* protokoli.

Var izmantot divus *PCR* protokolus, kuros mērķrajons ir rDNS mazā apakšvienība:

a) pirmais ir parastā *PCR*, ar kuru amplificē vairākus *Haplosporidia* pārstāvjus, arī *Bonamia* spp. Praimeri, ko apzīmē kā *Bo* un *Boas*, ir attiecīgi 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ un 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′, un to amplifikācijas produkts ir 300 bp. *PCR* maisījumi satur buferšķīdumu (500 mM KCl, 100 mM *Tris*/HCl [pH 9 25 °C temperatūrā] un 1 % *Triton*® X-100), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP maisījuma, 1 μM tiešā un atgriezeniskā praimera, 0,02 vienības μl^{-1} *Taq* DNS polimerāzes, un 0,2 ng μl^{-1} DNS veidnes kopējā apjomā 50 μl. Vispirms paraugus DNS amplifikatorā ar 94 °C 5 min denaturē, pēc tam ar tiem veic 30 ciklus (94 °C viena min, 55 °C viena min, 72 °C viena min), pēc tam 10 minūtes 72 °C temperatūrā veicot galīgo paplašināšanu.

Pozitīvie kontrolparaugi ir no stipri inficēta saimniekorganisma iegūta genomiskā DNS vai plazmīdu DNS, kurām ir mērķrajons.

Negatīvo kontrolparaugu sastāvā ir no neinficētiem saimniekorganismiem iegūta genomiskā DNS un *PCR* reaģenti bez mērķa DNS.

Pozitīvs rezultāts ir pozitīva *PCR* amplifikācija sagaidāmajā izmērā (proti, 300 bp), visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un visiem pozitīvajiem kontrolparaugiem – pozitīviem;

b) otrais *PCR* protokols ir *SYBR® Green* reāllaika *PCR*. Ar tā palīdzību ir iespējams specifiski noteikt *B. ostreae* (aprakstīts zemāk) un to var kombinēt ar *SYBR® Green* reāllaika *PCR*, kas dod iespēju specifiski noteikt *B. exitiosa* (*Ramilo et al.* 2013).

Praimeri *BOSTRE-F* (5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) un *BOSTRE-R* (5′- TCGCGGTTGAATTT-TATCGT-3′) amplificē 208 bp produktu. *PCR* maisījumi satur *SYBR® Green Master Mix* (1X), 0,3 μM tiešā un atgriezeniskā praimera un 200 ng ekstrahētas DNS. Paraugus vispirms ar 95 °C 10 minūtes denaturē reāllaika detektēšanas sistēmā, pēc tam ar tiem izpilda 35 ciklus (ar 95 °C 30 s, ar 55 °C 45 s un ar 72 °C viena min). Ar temperatūras paaugstināšanās soli 0,5 °C/s analizē kušanas temperatūras līkni, to sākot 55 °C temperatūrā un beidzot 95 °C temperatūrā un pie katras temperatūras maiņas fiksējot fluorescenci.

Pozitīvie kontrolparaugi ir no stipri inficēta saimniekorganisma iegūta genomiskā DNS vai plazmīdu DNS, kurām ir mērķrajons.

Negatīvo kontrolparaugu sastāvā ir no neinficētiem saimniekorganismiem iegūta genomiskā DNS un *PCR* reaģenti bez mērķa DNS.

Visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un visiem pozitīvajiem kontrolparaugiem – pozitīviem, pozitīvs rezultāts ir pozitīva *PCR* amplifikācija ar unikālu kušanas temperatūras maksimumu (ar nosacījumiem, kādus 2013. gadā publicējis *Ramilo et al.* – 78,25 ± 0,25 °C).

I.3.3. *In situ* hibridizācija (*ISH*)

Ir izstrādāti un publicēti vairāki ISH protokoli.

Izmanto provi, kuras mērķrajons ir rRNS gēnu kompleksa mazā apakšvienība, lai gan ir liecības, ka tā krusteniski reaģē ar dažiem citiem pie *Haplosporidia* dzimtas piederīgiem organismiem.

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas un gremošanas dziedzeris, vismaz 24 stundas fiksē *Davidson* fiksatīvā un pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai. Nogriež 5 μm biezus griezumus, ko novieto uz priekšmetstikliņiem ar aminoalkilsilāna pārklājumu un pēc tam uz nakti karsē 40 °C karstā krāsnī. Griezumus atvasko, uz 10 minūtēm iegremdējot ksilēnā. Šo soli vienreiz atkārto un pēc tam atbrīvojas no šķīdinātāja, griezumus divreiz pēc kārtas uz 10 minūtēm iegremdējot absolūtā spirta peldēs. Pēc tam griezumus rehidratē, tos mērcējot dilstoša stipruma etilspirtā. Griezumus pie 37 °C 30 minūtes apstrādā ar proteināzi K (100 μg ml^{-1}) TE buferšķīdumā (*Tris* [50 mM], *EDTA* [10 mM]). Stikliņus atūdeņo, tos mērcējot augoša stipruma etilspirtā, pēc tam ar gaisu nožāvē. Griezumus inkubē ar 100 μl hibridizācijas buferšķīduma (4 × *SSC* [citrāta fizioloģiskā standartšķīduma], 50 % formamīda, 1 × Denhardta šķīduma, 250 μg ml^{-1} rauga tRNS, 10 % dekstrāna sulfāta), kas satur 20 ng (2 μl *PCR* reakcijas, kas sagatavota, kā aprakstīts I.3.2. punktā, izmantojot praimerus *Bo* un *Boas*) proves, kas marķēta ar digoksigenīnu. Griezumus pārsedz ar *in situ* plastmasas segstikliņiem un uz piecām minūtēm novieto uz karstumbloka 95 °C temperatūrā. Pirms stikliņus 42 °C temperatūrā uz nakti atstāj hibridizēties mitrā kamerā, tos uz ledus vienu minūti atdzesina. Griezumus divreiz pa piecām minūtēm istabas temperatūrā skalo 2 × SSC un vienreiz 10 minūtes 42 °C temperatūrā skalo 0,4 × SSC. Konstatēšanas soļus izpilda saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Pēc tam stikliņus skalo sterilā destilētā ūdenī (dH_2O). Griezumu krāsu neitralizē ar *Bismarck Brown Yellow*, skalo ar dH_2O un, izmantojot pārklājbarotni uz ūdens bāzes, uzliek segstikliņus.

Pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi attiecīgi ir griezumi no zināmiem inficētiem un neinficētiem saimniekorganismiem.

Visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un pozitīvajiem – pozitīviem, pozitīvs rezultāts ir hemocītos novērojami iekrāsoti parazīti.

I.3.4. Sekvenēšana

Sekvenēšanu veic kā vienu no apstiprinošas diagnosticēšanas galīgajiem soļiem. Mērķrajoni ir rDNS mazā apakšvienība un ITS1.

II. ***Bonamia ostreae* infekcijas uzraudzības un apstiprināšanas procedūras**

Lai īstenotu uzraudzības programmas un saskaņā ar I pielikuma 5. daļas II iedaļas prasībām apstiprinātu *Bonamia ostreae* klātbūtni vai izslēgtu aizdomas par inficēšanos ar to, izmantotajām diagnostikas metodēm un attiecīgajām procedūrām jāatbilst šādām 5.1. tabulas vadlīnijām.

5.1. tabula

Vadlīnijas attiecībā uz diagnostikas metožu izmantošanu uzraudzības programmās un *Bonamia ostreae* infekciju apstiprināšanai vai izslēgšanai

Metode	Mērķorientēta uzraudzība	Prezumptīvā diagnoze	Apstiprinošā diagnoze
Sirds vai žaunu audu nospiedumi	X	X	X vai
Histopatoloģija	X		X vai
In situ hibridizācija			X un
PCR	X	X	X un
Sekvenēšana			X

6. DAĻA

DETALIZĒTAS DIAGNOSTIKAS METODES UN PROCEDŪRAS BALTO PLANKUMU SLIMĪBAS (*WSD*) UZRAUDZĪBAI UN APSTIPRINĀŠANAI

1. **Diagnostikas procedūras *WSSV* konstatēšanai**

Ja paraugu ņemšanu un laboratorisku izmeklēšanu veic I pielikuma 6. daļas I iedaļā aprakstīto uzraudzības un izskaušanas programmu vajadzībām un saskaņā ar Direktīvas 2006/88/EK 57. panta b) punktu *WSSV* klātbūtni apstiprinot vai aizdomas par inficēšanos ar to izslēdzot ar I pielikuma 6. daļas II iedaļā aprakstītajām diagnostikas metodēm, izmanto šīs daļas 2.–7. punktā aprakstītās detalizētās diagnostikas metodes un procedūras.

Šajā II pielikuma daļā aprakstītās metodes un procedūras ir pielāgotas no akreditētā ISO 17025 testa, ko izmanto vēžveidīgo slimībās specializētā Eiropas Savienības references laboratorija. Var izmantot alternatīvas pieejas, kurās izmanto līdzvērtīgus nosacījumus, vai komplektus, kurus ražojuši citi ražotāji, bet kuri piedāvā šajā daļā aprakstītajiem testiem līdzvērtīgu jutīgumu un specifiskumu. Visos gadījumos polimerāzes ķēdes reakcijā amplificēto produktu sekvenē, lai apliecinātu, ka tas identisks balto plankumu sindroma vīrusam (*WSSV*).

2. **Paraugu ņemšanas procedūra**

No vēžveidīgajiem iegūtus *WSSV* saturošus audus (vēderkājas un žaunas) var glabāt etilspirtā, RNA*later* vai šai vajadzībai strauji sasaldēt – 80 °C. Stadijas, kas nepieciešamas *WSSV* identificēšanai no audu paraugiem, ir šādas: audu homogenizēšana, DNS ekstrahēšana, *WSSV* DNS īpatnējā amplificēšana ar *PCR*, amplificētā produkta vizualizācija uz gela, DNS attīrīšana un sekvenēšana, lai apstiprinātu patogēna identitāti.

3. **Audu homogenizēšana**

Audu saārdīšanai un homogenāta sagatavošanai piemērotā buferšķīdumā izmanto audu saārdītāju *FastPrep* un *Lysing Matrix A* mēģenes (*MP Biomedicals*). Audus nosver, ievieto *Lysing Matrix A* mēģenēs, piemērotā buferšķīdumā (lietošanai ar DNS audu komplektu (*Qiagen*) – G2 un 10 µl K proteināzes) atšķaida, līdz masa/tilp. ir 1/10 vai kā norādījis ražotājs, un divas minūtes homogenizē ar homogenizētāju *FastPrep* 24. Homogenizētus paraugus inkubē 56 °C vismaz četras stundas vai pa nakti. Paraugus apstrādā virpuļmikserī, divas minūtes centrifugē ar 9 000 rpm un 50 µl centrifugāta vai apjoma, kas līdzvērtīgs 5 mg audu (ekstrahēšanas komplektam optimāls audu svars), pievieno DNS ekstrahēšanai paredzētā parauga mēģenē un ar G2 buferšķīdumu apjomu palielina līdz 200 µl.

4. **DNS ekstrahēšana**

Kopējo DNS ekstrahē saskaņā ar ražotāja norādījumiem, izmantojot DNS audu ekstrahēšanas komplektu un *EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen)*. Katrai paraugu partijai apstrādā ekstrahēšanas kontrolparaugu (*Calf Thymus* DNS) un negatīvo kontrolparaugu (G2 buferšķīdums). DNS eluē 50 µl tilpumā. Lai nodrošinātu, ka ekstrahēšana beigusies sekmīgi, ar *NanoDrop* aparāta palīdzību nosaka DNS koncentrāciju visos paraugos un kontrolparaugos. Ja ekstrahētā DNS nav tūlīt nepieciešama, to sasaldē – 20 °C temperatūrā.

5. **Polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*), ar ko konstatē *WSSV***

WSSV konstatēšanai izmantojamā metode ir turpmākajās šā punkta daļās aprakstītais protokols, kurš paredzēts *WSSV* konstatēšanai ar divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR* un kurā pirmajā un otrajā *PCR* raundā amplificē rRNS gēna 18 s 1 447 bp un 848 bp amplikonu.

Pirmā raunda *PCR* reakcijai jāsagatavo 50 µl tilpums, kurā galīgajās koncentrācijās ir 1 × *GoTaq Buffer* (*Promega*), 5mM $MgCl_2$, 1 pmol/µl *WSSV* praimera 146 F1, 1 pmol/µl *WSSV* praimera 146 R1 (1. tabula), 0,25 mM dNTPs, 1,25 U *Taq* polimerāzes un 2,5 µl DNS. Reakciju ar visiem paraugiem izpilda dublikātā kopā ar negatīvu ekstrahēšanas kontrolparaugu, negatīvu *PCR* kontrolparaugu (DNS vietā pievienoti 2,5 µl H_2O) un pozitīvu kontrolparaugu. Pozitīvais kontrolparaugs ir atšķaidīts *WSSV* plazmīds, kas saražots un validēts lietošanai attiecīgajā laboratorijā (pieejams no *EURL*).

Otrā raunda *WSSV PCR* reakciju sagatavo tāpat kā pirmā raunda reakciju, taču izmanto *WSSV* 146 F2/R2 praimeru komplektu un vēl vienu pozitīvu kontrolparaugu, ar kura palīdzību pārliecinās, vai šis *PCR* posms ir izdevies.

Praimeris	Sekvence
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Gan pirmā, gan otrā raunda *PCR* veic, izmantojot *DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler* (vai tam līdzvērtīgu DNS amplifikatoru) ar šādiem ciklēšanas nosacījumiem. Sākotnējais solis ir denaturācija ar 94 °C 2 min, kam seko 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, ko 30 ciklus atkārto, divu minūšu elongācijas solis ar 72 °C un turēšana pie 4 °C.

6. **Gela elektroforēze**

Gan pirmajā, gan otrajā *PCR* raundā iegūtos amplificētos *PCR* produktus padara redzamus 2 % agarozes gelos, kas pagatavoti, izmantojot *TAE* buferšķīdumu. 15 mikrolitrus no katra parauga apmēram 20 minūtes apstrādā pie sprieguma 120 volti un aplūko UV gaismā. Pozitīviem paraugiem pirmā raunda *PCR* produktiem intervāls būs 1 447 bp, savukārt otrā raunda *PCR* produktiem – 848 bp. Minētā lieluma paraugus izgriež un ievieto mikrofūgas mēģenē ar tilpumu 1,5 ml. Gela šķēlēs esošo DNS attīra, saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot *Promega Wizard® SV Gel and PCR clean-Up System*. Ar *NanoDrop* aparāta palīdzību DNS koncentrāciju novērtē skaitliski. Ja attīrīto DNS neizlieto tūlīt, to sasaldē – 20 °C temperatūrā.

7. ***PCR* produktu sekvenēšana**

DNS sekvenēšanai izmanto *Big Dye Terminator Kit* v3,1 (*Applied Biosystems*). Kopējais tilpums katrā reakcijā ir 20 µl, galīgās koncentrācijas ir 1 × *BigDye®Terminator*, 1 × sekvenēšanas buferšķīdums, 10 pmol/µl tiešā vai atgriezeniskā praimera un 10 µl attīrītas DNS (atšķaidīta līdz apmēram 10 ng/µl), un to veic, izmantojot *DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler* (vai tam līdzvērtīgu amplifikatoru) ar šādiem ciklēšanas nosacījumiem: 94 °C 30 s, pēc tam 96 °C 10 s, 50 °C 10 s un 60 °C 4 min, pēdējos trīs soļus atkārtojot 30 ciklus.

PCR produktus izgulsnē, izmantojot paņēmienu ar nātrija acetātu, kur 10 µl NaAc, 70 µl H_2O un 250 µl etilspirta pievieno 20 µl DNS, apstrādā virpuļmikserī un ar 13 000 rpm 20 minūtes centrifugē, centrifugātu izņem un stobriņu skalo ar 200 µl absolūtā spirta, piecas minūtes centrifugējot ar 13 000 rpm. Stobriņu piecas minūtes žāvē pie 37 °C. Stobriņos pievieno 25 µl *Hi-Di* formamīda, divas minūtes uzkarsē līdz 95 °C un labi apstrādā virpuļmikserī. Paraugus atbilstoši ražotāja norādījumiem sekvenē ar analizatora *ABI*3130xl *Avant Genetic* palīdzību. Sekvenēšanas rezultātus analizē, izmantojot sekvenēšanas programmatūru *Sequencher* un sekvences ar sekvencēm salāgo, izmantojot *BLAST* funkciju *NCBI* datubāzē.