II

(Ne teisėkūros procedūra priimami aktai)

SPRENDIMAI

KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO SPRENDIMAS (ES) 2015/1554

2015 m. rugsėjo 11 d.

kuriuo nustatomos Direktyvos 2006/88/EB taikymo taisyklės dėl priežiūros ir diagnostinių metodų taikymo reikalavimų

(pranešta dokumentu Nr. C(2015) 6188)

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2006 m. spalio 24 d. Tarybos direktyvą 2006/88/EB dėl gyvūnų sveikatos reikalavimų, taikomų akvakultūros gyvūnams ir jų produktams, ir dėl tam tikrų vandens gyvūnų ligų prevencijos ir kontrolės ([1]), ypač į jos 49 straipsnio 3 dalį, 50 straipsnio 4 dalį, 57 straipsnio b punktą ir 61 straipsnio 3 dalį,

kadangi:

(1) Direktyvoje 2006/88/EB nustatytos minimalios prevencinės priemonės, skirtos vandens gyvūnų priežiūrai dėl tos direktyvos IV priede išvardytų ligų (toliau – išvardytos ligos) ir taikomos siekiant kuo anksčiau aptikti tas ligas, ir kontrolės priemonės, taikytinos įtarus kurios nors iš išvardytų ligų protrūkį. Direktyvoje taip pat nustatyti reikalavimai dėl ligos neapimtos teritorijos statuso suteikimo valstybėms narėms ar tam tikroms jų zonoms arba teritoriniams vienetams;

(2) išvardytų ligų likvidavimas ir ligos neapimtos teritorijos statuso suteikimas valstybei narei ar tam tikrai zonai arba teritoriniam vienetui turėtų būti grindžiami tais pačiais principais ir tais pačiais moksliniais metodais visoje Sąjungoje. Todėl būtina Sąjungos lygmeniu nustatyti konkrečius reikalavimus dėl šių ligų likvidavimo ir priežiūros sistemų, taip pat mėginių ėmimo ir diagnostinius metodus, kuriuos turėtų taikyti valstybės narės, kad visai valstybei narei ar tam tikrai jos zonai arba teritoriniam vienetui būtų suteiktas ligos neapimtos teritorijos statusas;

(3) laboratoriniai tyrimai, atliekami tuo atveju, jeigu įtariamas arba patvirtinamas kurios nors iš išvardytų ligų buvimas, turėtų būti vienodi visoje Sąjungoje ir grindžiami tais pačiais moksliniais standartais bei protokolais. Pagal Direktyvą 2006/88/EB būtina nustatyti konkrečius diagnostinius metodus ir procedūras, kurie turėtų būti taikomi laboratorijose, šiuo tikslu paskirtose valstybių narių kompetentingų institucijų;

(4) Pasaulinės gyvūnų sveikatos organizacijos (OIE) priimtame Vandens gyvūnų sveikatos kodekse (toliau – Vandens gyvūnų kodeksas) nustatyti vandens gyvūnų sveikatos būklės gerinimo ir ūkiuose auginamų žuvų gerovės standartai, taikytini visame pasaulyje, įskaitant saugios tarptautinės prekybos vandens gyvūnais ir jų produktais standartus. Keliuose Vandens gyvūnų kodekso skyriuose pateikta rekomendacijų dėl tam tikrų diagnostinių tyrimų atlikimo. Šie OIE numatyti tyrimai yra nustatyti OIE Vandens gyvūnų diagnostinių tyrimų vadove (toliau – Vandens gyvūnų tyrimų vadovas). Siekiant užtikrinti, kad Sąjungos reikalavimai dėl vandens gyvūnų ligų diagnostikos atitiktų tarptautinius standartus, pagal šiame sprendime nustatytas taisykles reikėtų atsižvelgti į Vandens gyvūnų kodekse nustatytus standartus ir pateiktas rekomendacijas;

([1]) OL L 328, 2006 11 24, p. 14.

(5) šiuo atžvilgiu Vandens gyvūnų tyrimų vadove nurodyti keli tyrimo metodai ir procedūros, taikytini atliekant laboratorinius tyrimus dėl daugelio išvardytų ligų. Siekiant Sąjungos lygmeniu suvienodinti diagnostinio darbo dėl išvardytų ligų mokslinį pagrindą būtina rinktis OIE rekomenduojamus diagnostinius tyrimus ir procedūras ir nustatyti, kurie tyrimo metodai turėtų būti privalomi atliekant laboratorinį tyrimą įgyvendinant priežiūros programas ir siekiant paneigti įtarimus dėl išvardytų ligų arba patvirtinti jų buvimą. Nors taip pat reikės palikti galimybę tam tikrais atvejais rinktis alternatyvius metodus ir procedūras, turėtų būti pateikti jų aprašymai ir moksliškai paaiškinta, kada ir kaip galima taikyti alternatyvius metodus. Tai būtina ypač tuomet, kai atliekamos sudėtingesnės diagnostinės procedūros;

(6) siekiant gauti tikslius diagnostikos rezultatus, kuriuos būtų įmanoma pakartoti, svarbu, kad taikomos išsamios procedūros ir protokolai būtų patvirtinti pagal atitinkamus Direktyvos 2006/88/EB VI priedo I dalyje nurodytus kokybės standartus. Taikant daugelį šiame sprendime nurodytų diagnostinių metodų būtina naudoti tyrimams skirtus priemonių rinkinius, kurie parduodami rinkoje, pagal diagnostikos protokolus ir tų rinkinių tinkamumas atitinkamoms ligoms tirti yra patvirtintas akredituotais bandymais Europos Sąjungos etaloninėse laboratorijose. Dėl teisinio tikrumo šiame sprendime reikėtų nurodyti tų patvirtintų rinkoje parduodamų tyrimams skirtų priemonių rinkinių komercinius pavadinimus;

(7) kai kurioms valstybėms narėms gali būti sunku pasiekti, kad visai valstybės narės teritorijai ar tam tikrai jos zonai arba teritoriniam vienetui būtų suteiktas vienos arba kelių išvardytų ligų neapimtos teritorijos statusas. Tokiais atvejais valstybė narė gali nesiekti gauti arba išlaikyti tokio statuso dėl tų išvardytų ligų. Minimalios kontrolės priemonės, taikytinos tais atvejais, kai valstybė narė nesiekia gauti arba išlaikyti ligos neapimtos teritorijos statuso, turėtų būti tos pačios visoje Sąjungoje ir turėtų būti taikomos pagal tuos pačius kriterijus. Todėl būtina pagal Direktyvą 2006/88/EB nustatyti išsamias tų išvardytų ligų izoliavimo taisykles ir minimalius reikalavimus, kuriuos reikia tenkinti, kad tos izoliavimo priemonės nebebūtų taikomos;

(8) Komisijos sprendime 2001/183/EB ([1]) nustatyti reikalavimai dėl mėginių ėmimo planų ir diagnostinių metodų taikymo siekiant aptikti išvardytas ligas – infekcinę hematopoetinę nekrozę ir virusinę hemoraginę septicemiją ir patvirtinti jų buvimą. Komisijos sprendime 2003/466/EB ([2]) nustatyti reikalavimai dėl mėginių ėmimo planų ir diagnostinių metodų taikymo siekiant aptikti infekcinę lašišų anemiją, taip pat zonų nustatymo ir oficialios priežiūros kriterijai įtarus ir patvirtinus šios ligos buvimą. Komisijos sprendime 2002/878/EB ([3]) nustatyti reikalavimai dėl mėginių ėmimo planų ir diagnostinių metodų taikymo nustatant ir patvirtinant moliuskų ligų bonamiozės ir marteiliozės buvimą. Siekiant atnaujinti šiuos reikalavimus, tie trys sprendimai turėtų būti pakeisti šiuo sprendimu. Todėl Sprendimai 2001/183/EB, 2002/878/EB ir 2003/466/EB turėtų būti panaikinti;

(9) kadangi kai kurioms valstybėms narėms reikia daugiau laiko nacionalinėms etaloninėms laboratorijoms atnaujinti, kad jos atitiktų šiame sprendime nustatytus reikalavimus, jis turėtų būti taikomas nuo 2016 m. balandžio 1 d.;

(10) šiame sprendime nustatytos priemonės atitinka Augalų, gyvūnų, maisto ir pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

1 straipsnis

Dalykas

Šiame sprendime nustatytos taisyklės dėl:

a) priežiūros, apsaugos zonų, mėginių ėmimo ir diagnostinių metodų taikymo valstybėse narėse dėl neegzotinių vandens gyvūnų ligų, išvardytų Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje (toliau – išvardytos ligos), padėties tose valstybėse narėse ar tam tikrose jų zonose arba teritoriniuose vienetuose;

([1]) 2001 m. vasario 22 d. Komisijos sprendimas 2001/183/EB, nustatantis mėginių ėmimo planus ir diagnostinius metodus, taikomus diagnozuoti ir patvirtinti tam tikras žuvų ligas, ir panaikinantis Sprendimą 92/532/EEB (OL L 67, 2001 3 9, p. 65).

([2]) 2003 m. birželio 13 d. Komisijos sprendimas 2003/466/EB dėl zonavimo ir savanoriškos priežiūros, vykdomos, įtarus arba patvirtinus infekcinės lašišų anemijos (ILA) buvimą, kriterijų nustatymo (OL L 156, 2003 6 25, p. 61).

([3]) 2002 m. lapkričio 6 d. Komisijos sprendimas 2002/878/EB, nustatantis mėginių ėmimo planus ir diagnostinius metodus moliuskų ligoms bonamiozei (*Bonamia ostreae*) ir marteiliozei (*Marteilia refringens*) aptikti ir patvirtinti (OL L 305, 2002 11 7, p. 57).

b) diagnostinių metodų, taikytinų atliekant laboratorinius tyrimus įtariant arba patvirtinant kurių nors iš išvardytų ligų buvimą; ir

c) minimalių kontrolės priemonių, taikytinų tuo atveju, kai įtariamas arba patvirtinamas kurios nors iš išvardytų ligų buvimas valstybėje narėje, zonoje ar teritoriniame vienete, kuris nėra paskelbtas tos ligos neapimta teritorija.

2 straipsnis

Sąvokų apibrėžtys

Šiame sprendime vartojamų terminų apibrėžtys:

a) virusinė hemoraginė septicemija (VHS) – liga, kurią sukelia virusinės hemoraginės septicemijos virusas (VHSV), taip pat vadinamas Egtvedo virusu, priklausantis *Rhabdoviridae* šeimos *Novirhabdovirus* genčiai;

b) infekcinė hematopoetinė nekrozė (IHN) – liga, kurią sukelia infekcinės hematopoetinės nekrozės virusas (IHNV), priklausantis *Rhabdoviridae* šeimos *Novirhabdovirus* genčiai;

c) koi herpeso virusinė (KHV) infekcija – liga, kurią sukelia koi herpeso virusas (KHV), priklausantis *Alloherpesviridae* šeimai. Jo mokslinis pavadinimas – karpinių žuvų 3 herpeso virusas (CyHV-3);

d) infekcinė lašišų anemija (ILA) – liga, kuria susergama užsikrėtus HPR genotipo su iškrita labai polimorfinėje srityje lašišų anemijos virusu (ILAV), priklausančiu *Orthomyxoviridae* šeimos *Isavirus* genčiai;

e) *Marteilia refringens* sukelta infekcija – liga, kurią sukelia užkrėtimas *Paramyxea* pirmuonimis *Marteilia refringens*;

f) *Bonamia ostreae* sukelta infekcija – liga, kurią sukelia užkrėtimas *Haplosporea* pirmuonimis *Bonamia ostreae*;

g) baltmė (vitiligo) – liga, sukeliama baltmės sindromo viruso, kuris yra dvigrandės spiralės struktūros DNR virusas, priklausantis *Nimaviridae* šeimos *Whispovirus* genčiai.

3 straipsnis

Minimalūs reikalavimai dėl likvidavimo ir priežiūros programų

Valstybės narės užtikrina, kad I priede nustatytų taisyklių dėl ligų priežiūros ir likvidavimo programų, apsaugos zonų, mėginių ėmimo ir diagnostinių metodų ir II priede nustatytų konkrečių metodų bei išsamių procedūrų būtų laikomasi suteikiant, panaikinant arba grąžinant ligos neapimtos teritorijos statusą valstybei narei ar tam tikrai jos zonai arba teritoriniam vienetui dėl vienos arba daugiau išvardytų ligų.

4 straipsnis

Minimalūs reikalavimai dėl diagnostinių metodų ir konkrečių procedūrų

Valstybės narės užtikrina, kad I priede nustatytų kontrolės metodų ir II priede nustatytų konkrečių diagnostinių metodų bei išsamių procedūrų būtų laikomasi atliekant laboratorinius tyrimus siekiant patvirtinti arba paneigti kurios nors iš išvardytų ligų buvimą.

5 straipsnis

Minimalios kontrolės priemonės, taikomos izoliuojant išvardytomis ligomis užkrėstas teritorijas, ir minimalūs reikalavimai dėl izoliavimo priemonių panaikinimo valstybėse narėse, zonose arba teritoriniuose vienetuose, kurie nėra paskelbti išvardytų ligų neapimtomis teritorijomis

Valstybės narės užtikrina, kad I priede nustatytų minimalių kontrolės priemonių ir minimalių reikalavimų dėl izoliavimo priemonių panaikinimo būtų laikomasi taikant kontrolės priemones ir panaikinant taikytas izoliavimo priemones dėl vienos arba daugiau išvardytų ligų valstybėje narėje ar tam tikroje jos zonoje arba teritoriniame vienete, kuris nėra paskelbtas tų ligų neapimta teritorija.

6 straipsnis

Panaikinimas

Sprendimai 2001/183/EB, 2002/878/EB ir 2003/466/EB yra panaikinami.

7 straipsnis

Taikymo pradžios data

Šis sprendimas taikomas nuo 2016 m. balandžio 1 d.

8 straipsnis

Adresatai

Šis sprendimas skirtas valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje 2015 m. rugsėjo 11 d.

Komisijos vardu
Vytenis ANDRIUKAITIS
Komisijos narys

I PRIEDAS

PRIEŽIŪROS IR KONTROLĖS METODAI

I. **Įžanga**

Šiame priede nustatyti:

a) reikalavimai dėl likvidavimo ir priežiūros programų, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 44 straipsnyje, ir mėginių ėmimo bei diagnostiniai metodai, taikytini suteikiant ligos neapimtos teritorijos statusą valstybėms narėms arba tam tikroms jų zonoms ar teritoriniams vienetams, kaip numatyta tos direktyvos VII skyriuje;

b) mėginių ėmimo ir diagnostiniai metodai, taikytini atliekant laboratorinius tyrimus įtariant ir siekiant patvirtinti Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų neegzotinių ligų (toliau – išvardytos ligos) buvimą, kaip numatyta tos direktyvos 28 straipsnio a punkte ir 57 straipsnio b punkte;

c) izoliavimo priemonės, kurių reikia imtis, jei patvirtinamas kurios nors iš išvardytų ligų buvimas, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 39 straipsnyje, ir priemonės, taikytinos nustatant III kategorijos sveikatos būklę valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame pirmiau nustatyta V kategorijos sveikatos būklė.

Šiame priede nustatyti reikalavimai taikomi toliau išvardytoms ligoms.

1.	Virusinė hemoraginė septicemija (VHS)	1 dalis
2.	Infekcinė hematopoezinė nekrozė (IHN)	1 dalis
3.	Koi herpeso virusinė (KHV) infekcija	2 dalis
4.	Infekcinė lašišų anemija (ILA)	3 dalis
5.	Marteiliozės (*Marteilia refringens*) infekcija	4 dalis
6.	Bonamiozės (*Bonamia ostreae*) infekcija	5 dalis
7.	Baltmė (vitiligo)	6 dalis

II. **Sąvokų apibrėžtys**

I ir II prieduose vartojamų sąvokų apibrėžtys:

a) žemyninis teritorinis vienetas – vienas ar daugiau ūkių, esančių vienos arba kelių valstybių narių teritorijos žemyninėje dalyje, turinčių bendrą biologinės saugos sistemą ir kuriuose esančios vandens gyvūnų populiacijos sveikatos būklė, susijusi su tam tikra liga, yra aiškiai nustatyta;

b) žemyninis ūkis – vienos valstybės narės teritorijos žemyninėje dalyje esantis akvakultūros gyvūnų ūkis;

c) žemyninė zona – aiškiai apibrėžta geografinė teritorija vienos arba kelių valstybių narių teritorijos žemyninėje dalyje su vientisa hidrologine sistema, kurią sudaro vandens baseino dalys nuo jo ištakų iki natūralios arba dirbtinės užtvankos, per kurią vandens gyvūnai iš žemutinės vandens baseino dalies negali migruoti į viršų, visas vandens baseinas nuo ištakų iki žiočių arba keli vandens baseinai, įskaitant jų žiotis, per kurias susidaro vandens baseinų epidemiologinės sąsajos;

d) oficialiai paskelbtas užkrėstas ūkis – ūkis, kuriame auginami vandens gyvūnai ir kuriame vienos arba daugiau išvardytų ligų buvimas patvirtinamas kompetentingos institucijos pagal Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnio a punktą, 29 straipsnį ir 57 straipsnio b punktą;

e) sąlyčio ūkis – ūkis, kuriame auginami vandens gyvūnai ir kokiu nors būdu yra įrodyta arba įtariama, kad jis yra užterštas infekcine medžiaga iš oficialiai užkrėstu paskelbto ūkio.

1 DALIS

VIRUSINĖS HEMORAGINĖS SEPTICEMIJOS (VHS) IR INFEKCINĖS HEMATOPOETINĖS NEKROZĖS (IHN) PRIEŽIŪROS IR KONTROLĖS METODAI

I. **Reikalavimai dėl priežiūros ir likvidavimo programų, įgyvendinamų siekiant gauti ir išlaikyti ligų (VHS ir IHN) neapimtos teritorijos statusą, ir šių išvardytų ligų izoliavimo priemonių**

I.1. Bendri sveikatos tikrinimo ir mėginių ėmimo dėl VHS ir IHN reikalavimai:

a) žuvų sveikata tikrinama ir, kai tinka, mėginiai imami tuo metų laiku, kai vandens temperatūra nesiekia 14 °C, arba bet kada, kai tikėtina, kad vandens temperatūra siekia žemiausią metų temperatūros lygį;

b) kai reikia vykdyti kryptingą laukinių populiacijų priežiūrą pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą, mėginių ėmimo vietų skaičius ir geografinė padėtis nustatomi taip, kad būtų patikimai aprėpta tos valstybės narės teritorija, zona arba teritorinis vienetas. Mėginių ėmimo vietos turi atitikti įvairias ekosistemas, kuriose yra laukinių šioms ligoms imlių rūšių populiacijų;

c) kai tikrinti ūkių ar laukinių populiacijų žuvų sveikatą arba imti mėginius reikia dažniau nei kartą per metus, tarp sveikatos tikrinimų ir tarp mėginių ėmimo darbų turi būti bent keturių mėnesių pertraukos ir reikėtų stengtis, kad juos skirtų kuo didesnis laiko tarpas, atsižvelgiant į a papunktyje nustatytus reikalavimus dėl temperatūros;

d) visuose gamybos vienetuose, kaip antai tvenkiniuose, rezervuaruose ir žuvidėse, tikrinama žuvų sveikata, ar juose nėra negyvų, silpnų arba neįprastai besielgiančių žuvų. Ypač atidžiai reikia tikrinti vandens išleidimo kanalus, kuriuose paprastai renkasi vandens srovės atneštos silpnos žuvys;

e) šioms ligoms imlių rūšių žuvys mėginiams atrenkamos taip:

i) jei auginami vaivorykštiniai upėtakiai, mėginiams atrenkamos tik šios rūšies žuvys, nebent būtų ir kitų šioms ligoms imlių rūšių žuvų, turinčių VHS ar IHN būdingų požymių. Jei vaivorykštiniai upėtakiai neauginami, reikia imti tipinį visų kitų auginamų šioms ligoms imlių rūšių žuvų mėginį;

ii) jei randama silpnų, neįprastai besielgiančių arba ką tik nugaišusių, bet dar nesuirusių žuvų, mėginiams atrenkamos šios žuvys; jei žuvims auginti naudojamas ne vienas, o daugiau vandens telkinių, į mėginį turi patekti visų šių vandens telkinių žuvų pavyzdžių;

iii) atrenkant žuvis į mėginį turi proporcingomis dalimis patekti žuvų iš visų ūkio vietų, taip pat iš visų klasių pagal metus.

I.2. Konkretūs reikalavimai siekiant gauti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su VHS ir IHN, statusą

I.2.1. Priežiūros programos.

a) valstybei narei, zonai arba teritoriniam vienetui, kuriame nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN arba abiem ligomis, kaip nurodyta Direktyvos 2006/88/EB III priedo B dalyje, gali būti suteiktas I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su šiomis išvardytomis ligomis, statusas, jeigu visi tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiai, kuriuose auginamos direktyvos IV priedo II dalyje išvardytų šioms ligoms imlių rūšių žuvys, atitinka direktyvos V priede nustatytus reikalavimus ir visuose tuose ūkiuose, o kai privaloma pagal V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą – ir laukinių populiacijų mėginių ėmimo vietose, pasirinktose pagal tos dalies nuostatas, įgyvendinama viena iš šių priežiūros programų:

i) A modelis – dvejų metų priežiūros programa

Ūkiuose arba mėginių ėmimo vietose turi būti tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent dvejus iš eilės metus, kaip nustatyta II skirsnio 1A lentelėje.

Tuo dvejų metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nurodytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami tyrimų dėl VHS, IHN ar abiejų ligų rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl VHS, IHN ar abiejų ligų taikant II.3 punkte nustatytus mėginių ėmimo ir diagnostinius metodus;

ii) B modelis – ketverių metų priežiūros programa, pagal kurią imami mažesni mėginiai

Ūkiuose arba mėginių ėmimo vietose turi būti tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent ketverius iš eilės metus, kaip nustatyta II skirsnio 1B lentelėje.

Tuo ketverių metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nurodytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami tyrimų dėl VHS, IHN ar abiejų ligų rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl VHS, IHN ar abiejų ligų pagal II.3 punkte nustatytus mėginių ėmimo ir diagnostinius metodus;

b) jeigu įgyvendinant a papunktyje nurodytą priežiūros programą patvirtinama, kad į tą priežiūros programą įtrauktas ūkis yra užkrėstas VHS, IHN ar abiem ligomis, todėl jo sveikatos būklės II kategorijos statusas panaikintas, tokiam ūkiui gali būti iškart grąžintas II kategorijos sveikatos būklės statusas ir toliau įgyvendinama priežiūros programa siekiant suteikti ligų neapimtos teritorijos statusą, o I.2.2 punkte nurodytos likvidavimo programos įgyvendinti nereikia, kai ūkis atitinka šias sąlygas:

i) tai žemyninis ūkis, kurio gyvūnų sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN ar abiem ligomis, nėra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių vandens gyvūnų populiacijų sveikatos būklės, susijusios su tomis išvardytomis ligomis, pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 3 punktą;

ii) ūkis ištuštinamas, išvalomas, išdezinfekuojamas ir jame paliekamas pūdymas; pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės;

iii) ūkio ištekliai atkuriami tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN ar abiem ligomis.

I.2.2. Likvidavimo programos

I.2.2.1. Bendrieji reikalavimai

Valstybei narei, zonai arba teritoriniam vienetui, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN ar abiem ligomis, gali būti suteiktas I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su šiomis išvardytomis ligomis, jeigu visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šioms ligoms imlių rūšių žuvys, įgyvendinama likvidavimo programa, atitinkanti tolesnių a–e papunkčių nuostatas:

a) turi būti veiksmingai taikomos Direktyvos 2006/88/EB V skyriaus 4 skirsnyje nustatytos minimalios kontrolės priemonės ir turi būti nustatytas izoliuotas plotas pagal direktyvos 32 straipsnio b punktą, sudarytas iš apsaugos zonos ir priežiūros zonos arti oficialiai paskelbto VHS, IHN ar abiem iš šių išvardytų ligų užkrėsto ūkio arba ūkių.

Izoliuotas plotas turi būti nustatytas kiekvienu konkrečiu atveju atsižvelgiant į veiksnius, nuo kurių priklauso šių išvardytų ligų plitimo tarp ūkyje auginamų ir laukinių žuvų rizika, kaip antai: VHS, IHN ar abiem ligomis užkrėstų nugaišusių žuvų skaičių, dažnį ir paplitimą ūkyje; atstumus iki kaimynystėje esančių ūkių ir jų išsidėstymo tankį; skerdyklų artumą; sąlyčio ūkius; ūkiuose auginamų žuvų rūšis; ūkininkavimo praktiką užkrėstuose ūkiuose ir gretimuose ūkiuose, esančiuose prie užkrėstų ūkių; hidrodinamines sąlygas ir kitus nustatytus epidemiologiniu požiūriu svarbius veiksnius.

Nustatant apsaugos ir priežiūros zonas taikomi šie minimalūs jų geografinių ribų apibrėžties reikalavimai:

i) apsaugos zona nustatoma prie pat oficialiai paskelbto VHS, IHN ar abiem iš šių išvardytų ligų užkrėsto ūkio.

1. Ji yra: pakrantėse – plotas, apie kurį apibrėžto apskritimo spindulys siekia mažiausiai vieną potvynio zoną arba bent 5 km (pasirenkamas didesnis) ir kurio centre yra oficialiai paskelbtas VHS, IHN ar abiem ligomis užkrėstas ūkis, arba lygiavertis plotas, nustatytas pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis;

2. sausumos teritorijose – visas vandens baseinas, kuriame yra oficialiai paskelbtas VHS, IHN ar abiem ligomis užkrėstas ūkis; kompetentinga institucija gali apriboti šios zonos plotą iki tam tikrų vandens baseino dalių arba tik paties ūkio teritorijos su sąlyga, kad tai netrukdytų sustabdyti VHS, IHN ar abiejų ligų plitimo;

ii) priežiūros zoną kompetentinga institucija nustato už apsaugos zonos ribų. Ji yra:

1. Ji yra: pakrantėse – aplink apsaugos zoną esantis plotas, kuriame sutampa kelios potvynių zonos, arba zona aplink apsaugos zoną, kurios spindulys 10 km atstumu nuo apsaugos zonos; arba lygiavertis plotas, nustatytas pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis;

2. sausumos teritorijose – didesnis plotas aplink nustatytą apsaugos zoną;

b) visuose apsaugos zonoje esančiuose ūkiuose, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šioms ligoms imlių rūšių žuvys, °tačiau kurie nėra oficialiai paskelbti VHS, IHN ar abiem ligomis užkrėsti ūkiai, turi būti atliktas oficialus tyrimas, per kurį mažų mažiausiai būtų:

i) tyrimams paimti 10 žuvų mėginiai, jei pastebėta VHS, IHN ar abiem infekcijoms būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, arba bent 30 žuvų mėginiai, jei klinikinių ar patanatominių požymių nepastebėta;

ii) vieną kartą patikrinta žuvų sveikata: tuose ūkiuose, kuriuose gauti neigiami i papunktyje nurodytų tyrimų rezultatai; sveikata toliau tikrinama kartą per mėnesį tuo metų laiku, kai vandens temperatūra nesiekia 14 °C, išskyrus laikotarpį, kuriuo žuvų tvenkiniai ar žuvidės yra padengti ledu, iki apsaugos zonos panaikinimo pagal I.2.2.1 punkto c papunktį;

c) visi oficialiai paskelbti VHS, IHN ar abiem ligomis užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas. Pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės. Ištuštinus visus oficialiai paskelbtus užkrėstus ūkius toje pačioje apsaugos zonoje, bent trys savaitės skiriamos suderintam pūdymui. Šios pastraipos nuostatos taikomos ir naujiems ūkiams, kurie oficialiai paskelbti užkrėstais ūkiais įgyvendinant likvidavimo programą.

Po pūdymo oficialiai paskelbtuose užkrėstuose ūkiuose apsaugos zonos tampa priežiūros zonomis.

Kompetentinga institucija gali nuspręsti, kad ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir palikti kaip pūdymą reikia ir kitus nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančius ūkius. Pūdymo laikotarpio trukmę tuose ūkiuose kompetentinga institucija nustato kiekvienu atveju atlikusi rizikos vertinimą;

d) visų oficialiai paskelbtų VHS, IHN ar abiem iš šių išvardytų ligų užkrėstų ūkių ir visų kitų nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančių ūkių, kuriuose paliktas pūdymas, kaip nurodyta c papunktyje, ištekliai atkuriami tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN ar abiem ligomis.

Ūkių ištekliai atkuriami tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas pagal I.2.2.1 punkto c papunktį;

e) visuose Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šioms ligoms imlių rūšių žuvų auginimo ūkiuose, esančiuose valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame įgyvendinama likvidavimo programa, o kai būtina vykdyti laukinių populiacijų priežiūrą – ir pagal I.1 punktą pasirinktose mėginių ėmimo vietose vėliau taikoma I.2.1 punkte nustatyta priežiūros sistema.

I.2.2.2. Reikalavimai dėl ligos neapimtos teritorijos statuso grąžinimo žemyniniams teritoriniams vienetams, kuriuose yra vienintelis ūkis, pirmiau paskelbtas IHN, VHS ar abiem ligomis neužkrėstu ūkiu

Kai žemyniniame teritoriniame vienete yra vienintelis ūkis, pirmiau paskelbtas VHS, IHN ar abiem šiomis išvardytomis ligomis neužkrėstu ūkiu, kurio žuvų sveikatos būklė, susijusi su šiomis išvardytomis ligomis, nėra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 3 punktą, tačiau jo sveikatos būklės I kategorijos statusas panaikintas pagal direktyvos 53 straipsnio 3 dalį, I kategorijos sveikatos būklės statusas jam gali būti grąžintas iškart, kai tik kompetentinga institucija įsitikina, kad tenkinamos šios sąlygos:

a) oficialiai patvirtintas VHS, IHN ar abiem ligomis užkrėstas ūkis turi būti ištuštintas, išvalytas, išdezinfekuotas ir jame paliktas pūdymas; pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės;

b) oficialiai patvirtinto VHS, IHN ar abiem ligomis užkrėsto ūkio ištekliai atkuriami tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN ar abiem ligomis.

I.3. Konkretūs reikalavimai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su VHS, IHN ar abiem ligomis, statusą

Kai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės statusą turi būti vykdoma kryptinga priežiūra, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 52 straipsnyje, visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginamos direktyvos IV priedo II dalyje išvardytų šioms ligoms imlių rūšių žuvys, tikrinama sveikata ir imami žuvų mėginiai pagal šios dalies II skirsnyje pateiktą 1C lentelę, atsižvelgiant į to ūkio užkrėtimo VHS, IHN ar abiem šiomis išvardytomis ligomis rizikos lygį.

Nustatant, kaip dažnai turi būti tikrinama sveikata žemyninių zonų teritoriniuose vienetuose, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN ar abiem ligomis, ir kurių žuvų sveikatos būklė, susijusi su VHS arba IHN, yra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių vandens gyvūnų populiacijų sveikatos būklės pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 2 punktą, laikoma, kad užkrėtimo VHS, IHN ar abiem ligomis rizika yra didelė.

Ligos neapimtos teritorijos statusas išlaikomas tik tol, kol visų mėginių tyrimų II.2 punkte nustatytais diagnostiniais metodais dėl VHS, IHN ar abiejų iš šių išvardytų ligų rezultatai yra neigiami ir visi įtarimai dėl VHS, IHN ar abiejų ligų paneigiami taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus.

I.4. Reikalavimai norint nebetaikyti Direktyvos 2006/88/EC 39 straipsnyje nurodytų izoliavimo priemonių, t. y. pakeisti sveikatos būklės kategoriją iš V į III

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN arba abiem ligomis, gali būti nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šiomis išvardytomis ligomis, jeigu:

a) laikomasi reikalavimų, nustatytų I.2.2.1 punkto a, b ir c papunkčiuose. Tuo atveju, jeigu palikti pūdymo techniškai neįmanoma, tuose ūkiuose taikoma alternatyvi priemonė, kuria beveik taip pat patikimai garantuojama, kad IHN, VHS ar abiejų ligų virusai bus išnaikinti iš ūkio aplinkos;

b) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių ir visų kitų ūkių, kuriuose paliktas pūdymas arba pagal a papunktį taikytos alternatyvios priemonės, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkurti tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I, II arba III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su VHS, IHN ar abiem ligomis;

c) ūkių ištekliai atkurti tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir juose paliktas pūdymas arba imtasi alternatyvių priemonių pagal a papunktį.

II. **Diagnostiniai ir mėginių ėmimo metodai**

II.1. Organų mėginių ėmimas

Audinių medžiaga, kurią reikia tirti, yra blužnies, inkstų priekinės dalies ir širdies arba galvos smegenų audiniai. Imant veislinių žuvų mėginius galima tyrimui paimti ir kiaušidžių arba sėklidžių skysčio.

Kai žuvys yra smulkios, visą trumpesnę nei 4 cm žuvį galima susmulkinti steriliomis žirklėmis arba skalpeliu prieš tai pašalinus kūno dalį, esančią už žarnos angos. Jei mėginį sudaro visa žuvis, kurios kūno ilgis 4–6 cm, surenkami visi vidaus organai, įskaitant inkstus.

Kartu į bendrą mėginį galima sudėti daugiausia 10 žuvų organų gabalėlius.

II.2. Diagnostiniai metodai, taikomi siekiant gauti ir išlaikyti ligos (VHS, IHN ar abiejų ligų) neapimtos teritorijos statusą

Pagal II priedo 1 dalies I punkte patvirtintus diagnostinius metodus ir procedūras, siekiant gauti arba išlaikyti ligos (VHS, IHN ar abiejų ligų) neapimtos teritorijos statusą, taikomas kuris nors iš šių diagnostinių metodų:

a) viruso išskyrimas ląstelių kultūrose ir vėlesnis viruso identifikavimas taikant imunofermentinės analizės (IFA) metodą, atliekant netiesiogiai fluorescuojančių antikūnų tyrimą (NFAT), virusų neutralizacijos tyrimą arba atvirkštinės transkripcijos tikralaikę polimerazės grandininę reakciją (AT qPGR); arba

b) atvirkštinės transkripcijos tikralaikė polimerazės grandininė reakcija (AT qPGR).

II.3. Mėginių ėmimo ir diagnostiniai metodai, taikomi siekiant paneigti arba patvirtinti VHS arba IHN buvimą

Kai reikia patvirtinti arba paneigti kilusį įtarimą dėl VHS, IHN ar abiejų ligų pagal Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnį, turi būti atliekamos šios tikrinimo, mėginių ėmimo ir tyrimo procedūros:

a) įtartiname ūkyje bent kartą patikrinama žuvų sveikata ir paimamas vienas 10 žuvų mėginys, jei pastebėta VHS, IHN ar abiem infekcijoms būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, arba bent 30 žuvų mėginys, jei klinikinių ar patanatominių požymių nepastebėta. Mėginiai ištiriami taikant vieną arba kelis iš i ir ii papunkčiuose nurodytų diagnostinių metodų pagal II priedo 1 dalies II skirsnyje išsamiai aprašytus diagnostinius metodus ir procedūras:

   i) įprastas viruso išskyrimas ląstelių kultūroje ir vėlesnis imunocheminis arba molekulinis viruso identifikavimas;

   ii) viruso aptikimas AT qPGR būdu;

   iii) kiti patvirtinto panašaus efektyvumo diagnostiniai metodai, kaip antai netiesiogiai fluorescuojančių antikūnų tyrimas, imunofermentinė analizė (IFA), AT PGR ir imunohistocheminis (IHC) metodas;

b) VHS buvimas patvirtinamas gavus teigiamą taikant vieną ar kelis iš šių diagnostinių metodų atlikto VHS viruso tyrimo rezultatą. IHN buvimas patvirtinamas gavus teigiamą taikant vieną ar kelis iš šių diagnostinių metodų atlikto IHN viruso tyrimo rezultatą. VHS arba IHN aptikimas pirmą kartą valstybėse narėse, zonose arba teritoriniuose vienetuose, kuriuose šių ligų užkrato iki tol nebūta, patvirtinamas įprastu būdu išskiriant virusą ląstelių kultūroje arba atliekant AT qPGR;

c) dėl VHS, IHN ar abiejų virusų kilusį įtarimą galima paneigti, jei atlikus auginamų ląstelių arba AT qPGR tyrimus negaunama daugiau jokių VHS, IHN ar abiejų virusų buvimo įrodymų.

1A lentelė.

Zonų ir teritorinių vienetų priežiūros sistema I.2.1 punkto a papunkčio i įtraukoje nurodytu dvejų metų kontrolės laikotarpiu, po kurio jiems suteikiamas ligos (VHS arba IHN) neapimtos teritorijos statusas

Ūkio tipas	Sveikatos tikrinimų skaičius per metus (dvejus metus)	Kiek kartų per metus imami mėginiai (dvejus metus)	Žuvų skaičius mėginyje (1)	
			Augančių žuvų skaičius	Veislinių žuvų skaičius (2)
a) Ūkiai, kuriuose auginamos veislinės žuvys	2	2	50 (tikrinant pirmą kartą) 75 (tikrinant antrą kartą)	30 (tikrinant pirmą ar antrą kartą) 0 (tikrinant pirmą ar antrą kartą)
b) Ūkiai, kuriuose auginamos tik veislinės žuvys	2	1	0	75 (tikrinant pirmą ar antrą kartą)
c) Ūkiai, kuriuose veislinių žuvų nėra	2	2	75 (3) (tikrinant pirmą ir antrą kartą)	0

Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 10

(1) Mėginiai turi būti imami praėjus bent trims savaitėms po to, kai žuvys perkeltos iš gėlo į sūrų vandenį.
(2) Veislinių žuvų kiaušidžių arba sėklidžių skysčio mėginiai imami žuvims subrendus, atliekant dirbtinį veisimą.
(3) Mėginiams reikia paimti pakankamai žuvų, kad būtų užtikrintas VHS arba IHN viruso aptikimo 95 % patikimumas, kai numatytas viruso paplitimas yra 5 %.

1B lentelė.

Priežiūros sistema imant mažesnius mėginius I.2.1 punkto a papunkčio ii įtraukoje nurodytu ketverių metų kontrolės laikotarpiu, po kurio suteikiamas ligos (VHS arba IHN) neapimtos teritorijos statusas

Ūkio tipas	Sveikatos tikrinimų skaičius per metus	Kiek kartų per metus imami mėginiai	Žuvų skaičius mėginyje (1)	
			Augančių žuvų skaičius	Veislinių žuvų skaičius (2)
Pirmi dveji priežiūros laikotarpio metai				
a) Ūkiai, kuriuose auginamos veislinės žuvys	2	1	0 (tikrinant pirmą kartą) 30 (tikrinant antrą kartą)	0 (tikrinant pirmą kartą) 0 (tikrinant antrą kartą)
b) Ūkiai, kuriuose auginamos tik veislinės žuvys	2	1	0	30 (tikrinant pirmą ar antrą kartą)
c) Ūkiai, kuriuose veislinių žuvų nėra	2	1	30 (3) (tikrinant pirmą ar antrą kartą)	0
Paskutiniai dveji priežiūros laikotarpio metai				
a) Ūkiai, kuriuose auginamos veislinės žuvys	2	2	30 (tikrinant pirmą kartą) 0 (tikrinant antrą kartą)	0 (tikrinant pirmą kartą) 30 (tikrinant antrą kartą)

Ūkio tipas	Sveikatos tikrinimų skaičius per metus	Kiek kartų per metus imami mėginiai	Žuvų skaičius mėginyje (1)	
			Augančių žuvų skaičius	Veislinių žuvų skaičius (2)
b) Ūkiai, kuriuose auginamos tik veislinės žuvys	2	2		30 (tikrinant pirmą ir antrą kartą)
c) Ūkiai, kuriuose veislinių žuvų nėra	2	2	30 (3) (tikrinant pirmą ir antrą kartą)	

Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 10

(1) Mėginiai turi būti imami praėjus bent trims savaitėms po to, kai žuvys perkeltos iš gėlo į sūrų vandenį.
(2) Veislinių žuvų kiaušidžių arba sėklidžių skysčio mėginiai imami žuvims subrendus, atliekant dirbtinį veisimą.
(3) Mėginiams reikia paimti pakankamai žuvų, kad būtų užtikrintas VHS arba IHN viruso aptikimo 95 % patikimumas, kai numatytas viruso paplitimas yra 10 %.

1C lentelė.

Priežiūros sistemos, taikomos siekiant išlaikyti ligos (VHS arba IHN) neapimtų zonų arba teritorinių vienetų statusą, kaip nurodyta I.3 punkte

Rizikos lygis	Sveikatos tikrinimų skaičius	Žuvų skaičius mėginyje (3)
Didelis	2 kartus per metus	30 (1) (2)
Vidutinis	1 kartus per metus	30 (1)
Mažas	1 kartą per 2 metus	30 (1)

Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 10

(1) Mėginiai turi būti imami praėjus bent trims savaitėms po to, kai žuvys perkeltos iš gėlo į sūrų vandenį.
(2) Mėginiams reikia paimti pakankamai žuvų, kad būtų užtikrintas VHS arba IHN viruso aptikimo 95 % patikimumas, kai numatytas viruso paplitimas yra 10 %.
(3) Bent po vieną mėginį paimama kiekvieno sveikatos tikrinimo metu.

2 DALIS

KOI HERPESO VIRUSINĖS (KHV) INFEKCIJOS PRIEŽIŪROS IR KONTROLĖS METODAI

I. **Reikalavimai dėl priežiūros ir likvidavimo programų, įgyvendinamų siekiant gauti ir išlaikyti koi herpeso viruso sukeltos ligos neapimtos teritorijos statusą ir sustabdyti koi herpeso virusinę (KHV) infekciją**

I.1. Bendrieji reikalavimai

Kai reikia vykdyti kryptingą laukinių populiacijų priežiūrą pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą, mėginių ėmimo vietų skaičius ir geografinė padėtis nustatomi taip, kad būtų patikimai aprėpta tos valstybės narės teritorija, zona arba teritorinis vienetas. Mėginių ėmimo vietos taip pat turi atitikti įvairias ekosistemas, kuriose yra laukinių šiai ligai imlių rūšių populiacijų, t. y. upių sistemas ir ežerus.

Vykdant kryptingą priežiūrą turi būti reguliariai stebimos tokios vietos, kuriose yra šiai ligai imlių rūšių žuvų. Šios vietos stebimos, kai vandens temperatūra pakyla iki šiai ligai vystytis palankaus lygio (> 15 °C), ir pradedamos stebėti ne anksčiau kaip po dviejų savaičių nuo tos dienos, kurią vandens temperatūra pasiekė šį lygį. Tokioje vietoje radus bet kokių sergančių arba neįprastai besielgiančių žuvų, būtina paimti ir ištirti jų mėginius.

Kai įmanoma, imami ilgesnį laiką virusui palankioje temperatūroje (t. y. dvi – tris savaites 15–26 °C) laikytų žuvų mėginiai. Toks metodas vis dėlto gali būti priimtinas:

a) kai tam tikra žuvų populiacijos dalis atskiriama perkeliant žuvis iš žiemos į vasaros tvenkinius. Atskirtos žuvys laikomos tame pačiame vandens telkinyje (vasaros tvenkinyje) iki jo temperatūra pasieks nurodytą minimalų lygį; arba

b) mėginiai imami surenkant produkciją arba kitaip tvarkant žuvis pagal įprastą ūkio tvarkymo praktiką. Jei įmanoma, mėginiai paimami 24–72 valandų laikotarpiu po tokių tvarkymo darbų, nes taip labiau tikėtina, kad pavyks aptikti KHV.

Kai ūkiuose auginamų arba laukinių populiacijų žuvų sveikatą tikrinti arba mėginius imti reikia dažniau nei kartą per metus, tarp sveikatos tikrinimo arba mėginių ėmimo darbų turi būti kuo ilgesnė pertrauka, tai darant tuo metų laiku, kai tikėtina, kad vandens temperatūra siekia aukščiausią metų temperatūros lygį, tačiau neviršija 28 °C ribos.

Visuose gamybos vienetuose, kaip antai tvenkiniuose ir rezervuaruose, turi būti tikrinama žuvų sveikata, ar juose nėra negyvų, silpnų arba neįprastai besielgiančių žuvų.

Kai ūkyje auginamos *Cyprinus carpio* rūšies ir iš jos išvestos hibridinės žuvys, kaip antai *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, tyrimams imami šių žuvų mėginiai.

Mėginiams žuvys atrenkamos taip:

i) jei randama silpnų, neįprastai besielgiančių arba ką tik nugaišusių, bet dar nesuirusių žuvų, mėginiams reikia atrinkti šias žuvis;

ii) jei žuvims auginti naudojamas ne vienas, o daugiau vandens telkinių, į mėginį turi patekti visų šių vandens telkinių žuvų pavyzdžių;

iii) atrenkant žuvis į mėginį turi proporcingomis dalimis patekti žuvų iš visų ūkio vietų, taip pat iš visų klasių pagal metus.

I.2. Konkretūs reikalavimai siekiant gauti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su KHV infekcija, statusą

I.2.1. Priežiūros programos

a) valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, kai visi tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiai, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, atitinka direktyvos V priede nustatytus reikalavimus dėl ligos neapimtos teritorijos statuso suteikimo ir visuose tuose ūkiuose, o kai privaloma pagal to priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą – ir pagal tos dalies nuostatas pasirinktose laukinių populiacijų mėginių ėmimo vietose įgyvendinama viena iš šių priežiūros programų:

i) A modelis – dvejų metų priežiūros programa

Ūkiuose arba mėginių ėmimo vietose turi būti tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent dvejus iš eilės metus, kaip nustatyta III skirsnio 2A lentelėje.

Tuo dvejų metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nurodytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami tyrimų dėl KHV rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl KHV infekcijos taikant III.2 punkte nustatytus diagnostinius metodus;

ii) B modelis – ketverių metų priežiūros programa, pagal kurią imami mažesni mėginiai

Ūkiuose arba mėginių ėmimo vietose turi būti tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent ketverius iš eilės metus, kaip nustatyta III skirsnio 2B lentelėje.

Tuo ketverių metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nurodytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami tyrimų dėl KHV rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl KHV infekcijos taikant III.2 punkte nustatytus diagnostinius metodus;

b) jeigu įgyvendinant a papunktyje nurodytą ketverių metų priežiūros programą patvirtinama, kad į tą priežiūros programą įtrauktas ūkis yra užkrėstas KHV, todėl jo sveikatos būklės II kategorijos statusas panaikintas, tokiam ūkiui gali būti iškart grąžintas II kategorijos sveikatos būklės statusas ir toliau įgyvendinama priežiūros programa siekiant suteikti ligos neapimtos teritorijos statusą, o I.2.2 punkte nurodytos likvidavimo programos įgyvendinti nereikia, kai ūkis atitinka šias sąlygas:

i) tai žemyninis ūkis, kurio gyvūnų sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, nėra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių vandens gyvūnų populiacijų sveikatos būklės, susijusios su šia viena iš išvardytų ligų, pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 3 punktą;

ii) jis yra ištuštintas, išvalytas, išdezinfekuotas ir jame paliktas pūdymas; pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės;

iii) ūkio ištekliai atkurti tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija.

I.2.2. Likvidavimo programos

I.2.2.1. Bendrieji reikalavimai

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, įgyvendinama bent tokia likvidavimo programa:

a) veiksmingai taikomos Direktyvos 2006/88/EB V skyriaus 4 skirsnyje nustatytos minimalios kontrolės priemonės ir nustatomas izoliuotas plotas, kaip nurodyta direktyvos 32 straipsnio b punkte, sudarytas iš apsaugos zonos ir priežiūros zonos arti oficialiai paskelbto KHV užkrėsto ūkio arba ūkių.

Izoliuotas plotas turi būti nustatytas kiekvienu konkrečiu atveju atsižvelgiant į veiksnius, nuo kurių priklauso KHV infekcijos plitimo tarp ūkyje auginamų ir laukinių žuvų rizika, kaip antai: KHV užkrėstų nugaišusių žuvų skaičių, dažnį ir paplitimą ūkyje; atstumus iki kaimynystėje esančių ūkių ir jų išsidėstymo tankį; skerdyklų artumą; sąlyčio ūkius; ūkius, su kuriais palaikomi ryšiai; ūkininkavimo praktiką užkrėstuose ir kaimyniniuose ūkiuose; hidrodinamines sąlygas ir kitus nustatytus epidemiologiniu požiūriu svarbius veiksnius.

Nustatant apsaugos ir priežiūros zonas taikomi šie minimalūs jų geografinių ribų apibrėžties reikalavimai:

i) apsaugos zona nustatoma prie pat oficialiai paskelbto KHV užkrėsto ūkio ir apima visą vandens baseiną, kuriame yra oficialiai paskelbtas KHV užkrėstas ūkis; kompetentinga institucija gali apriboti šios zonos plotą iki tam tikrų vandens baseino dalių su sąlyga, kad tai netrukdytų sustabdyti KHV infekcijos plitimo;

ii) priežiūros zona nustatoma už apsaugos zonos ribų ir užima didesnį plotą nustatytos apsaugos zonos išorėje;

b) visuose apsaugos zonoje esančiuose ūkiuose, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, tačiau kurie nėra oficialiai paskelbti KHV užkrėsti ūkiai, turi būti atliktas oficialus tyrimas, per kurį mažų mažiausiai būtų:

i) tyrimams paimti 10 žuvų mėginiai, jei pastebėta KHV infekcijai būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, arba 30 žuvų mėginiai, jei klinikinių ar patanatominių požymių nepastebėta;

ii) vieną kartą patikrinta žuvų sveikata; tuose ūkiuose, kuriuose gauti neigiami III.2 punkte nurodytų tyrimų rezultatai; sveikata toliau tikrinama kartą per mėnesį tuo metų laiku, kai vandens temperatūra paprastai siekia > 15 °C, iki apsaugos zonos panaikinimo pagal I.2.2.1 punkto c papunktį;

c) visi oficialiai paskelbti KHV užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas. Pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės. Ištuštinus visus oficialiai paskelbtus užkrėstus ūkius toje pačioje apsaugos zonoje, bent trys savaitės skiriamos suderintam pūdymui. Šios pastraipos nuostatos taikomos ir naujiems ūkiams, kurie oficialiai paskelbti užkrėstais ūkiais įgyvendinant likvidavimo programą.

Po pūdymo oficialiai paskelbtuose užkrėstuose ūkiuose apsaugos zonos tampa priežiūros zonomis.

Kompetentinga institucija gali nuspręsti, kad ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir palikti kaip pūdymą reikia ir kitus nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančius ūkius. Pūdymo laikotarpio trukmę kompetentinga institucija nustato kiekvienu atveju atlikusi rizikos vertinimą;

d) visų oficialiai paskelbtų KHV užkrėstų ūkių ir visų kitų nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančių ūkių, kuriuose paliktas pūdymas, ištekliai atkuriami:

i) tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija; arba

ii) pereinamuoju laikotarpiu iki 2020 m. gruodžio 31 d. tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose įgyvendinama patvirtinta KHV infekcijų priežiūros programa.

Ūkių ištekliai atkuriami tik po to, kai visi oficialiai paskelbti KHV užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas pagal I.2.2.1 punkto c papunktį;

e) visuose Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvų auginimo ūkiuose, esančiuose valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame įgyvendinama likvidavimo programa, o kai būtina vykdyti laukinių populiacijų priežiūrą – ir pagal I.1 punktą pasirinktose mėginių ėmimo vietose vėliau įgyvendinama bent tokia priežiūros programa, kaip nustatyta I.2.1 punkte.

I.2.2.2. Reikalavimai dėl ligos neapimtos teritorijos statuso grąžinimo žemyniniams teritoriniams vienetams, kuriuose yra vienintelis ūkis, pirmiau paskelbtas KHV neužkrėstu ūkiu

Kai žemyniniame teritoriniame vienete yra vienintelis ūkis, kuriame nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, ir kurio žuvų sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, nėra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 3 punktą, tačiau jo sveikatos būklės I kategorijos statusas panaikintas pagal direktyvos 53 straipsnio 3 dalį, I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su KHV infekcija, statusas jam gali būti grąžintas iškart, kai tik kompetentinga institucija įsitikina, kad ūkis atitinka šias sąlygas:

a) jis yra ištuštintas, išvalytas, išdezinfekuotas ir jame paliktas pūdymas; pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės;

b) jo ištekliai atkurti tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, arba iš teritorinių vienetų, kuriuose taikoma patvirtinta KHV infekcijų priežiūros programa (II kategorijos sveikatos būklė).

I.3. Konkretūs reikalavimai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su KHV infekcija, statusą

Kai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės statusą turi būti vykdoma kryptinga priežiūra, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 52 straipsnyje, visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginamos direktyvos IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, tikrinama žuvų sveikata ir imami mėginiai pagal šios dalies III skirsnyje pateiktą 2B lentelę, atsižvelgiant į to ūkio užkrėtimo KHV rizikos lygį.

Žuvų sveikatos tikrinimo žemyninių zonų teritoriniuose vienetuose, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, ir kuriuos sudaro vienas arba daugiau ūkių, kurių žuvų sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, priklauso nuo to, ar aplinkiniai gamtiniai vandens telkiniai užkrėsti šia viena iš išvardytų ligų, kaip nustatyta Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 2 punkte, dažnumas nurodytas 2C lentelėje (patikrinimų skaičius esant aukšto lygio rizikai).

Valstybėse narėse, zonose arba teritoriniuose vienetuose, kuriuose yra nedaug ūkių ir vykdant kryptingą priežiūrą tuose ūkiuose negaunama pakankamai epidemiologinių duomenų, į priežiūros sistemas, taikomas siekiant išlaikyti ligos neapimtos teritorijos statusą, įtraukiamos ir pagal I.1 punkte nustatytus reikalavimus pasirinktos mėginių ėmimo vietos.

Tos mėginių ėmimo vietos tikrinamos ir mėginiai jose imami kasmet pakaitomis po 50 % visų mėginių ėmimo vietų. Mėginiai paimami kaip apibūdinta III skirsnio 2C lentelėje. Jie atrenkami, paruošiami ir tiriami kaip nurodyta II skirsnyje, o jų laboratorinių tyrimų dėl KHV užkrato rezultatai turi būti neigiami.

Ligos neapimtos teritorijos statusas išlaikomas tik tol, kol visų mėginių tyrimų II.2 punkte nustatytais diagnostiniais metodais dėl KHV infekcijos rezultatai yra neigiami ir visi įtarimai dėl KHV infekcijos paneigiami taikant III.2 punkte nustatytus diagnostinius metodus.

I.4. Konkretūs reikalavimai norint nebetaikyti Direktyvos 2006/88/EB 39 straipsnyje nurodytų izoliavimo priemonių ir patvirtinti III kategorijos sveikatos būklę, susijusią su KHV infekcija valstybėse narėse, teritoriniuose vienetuose arba zonose, kuriuose nustatyta V kategorijos sveikatos būklė

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija, gali būti nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, jeigu:

a) laikomasi reikalavimų, nustatytų I.2.2.1 punkto a, b ir c papunkčiuose. Tuo atveju, jeigu palikti pūdymo techniškai neįmanoma, tuose ūkiuose taikoma alternatyvi priemonė, kuria beveik taip pat patikimai garantuojama, kad KHV bus išnaikintas iš ūkio aplinkos;

b) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių ir visų kitų ūkių, kuriuose paliktas pūdymas arba pagal a papunktį taikytos alternatyvios priemonės, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkurti tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I, II arba III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su KHV infekcija;

c) ūkių ištekliai atkurti tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir juose paliktas pūdymas arba imtasi alternatyvių priemonių pagal a papunktį.

II. **Diagnostiniai ir mėginių ėmimo metodai, taikomi vykdant priežiūrą siekiant gauti ir išlaikyti ligos (KHV infekcijos) neapimtos teritorijos statusą**

II.1. Mėginiai

Audinių medžiaga, kurią reikia tirti, yra žiaunų ir inkstų dalys. Kartu į bendrą mėginį galima sudėti daugiausia dviejų žuvų organų gabalėlius.

II.2. Diagnostiniai metodai, taikomi vykdant priežiūrą siekiant gauti ir išlaikyti ligos (KHV infekcijos) neapimtos teritorijos statusą

Pagal II priedo 2 dalies II punkte išsamiai aprašytus diagnostinius metodus ir procedūras, siekiant gauti arba išlaikyti ligos (KHV infekcijos) neapimtos teritorijos statusą, taikomas tikralaikės polimerazės grandininės reakcijos (qPGR) diagnostinis metodas.

III. **Diagnostiniai ir mėginių ėmimo metodai, taikomi atliekant oficialius tyrimus siekiant patvirtinti arba paneigti dėl KHV infekcijos kilusius įtarimus**

III.1. Mėginiai

Audinių medžiaga, kurią reikia tirti, yra žiaunų ir inkstų dalys. Kartu į bendrą mėginį galima sudėti daugiausia dviejų žuvų organų gabalėlius.

III.2. Oficialaus tyrimo ir diagnostiniai metodai, taikomi siekiant patvirtinti KHV infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus

Kai reikia patvirtinti arba paneigti kilusį įtarimą dėl KHV infekcijos pagal Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnį, turi būti atliekama tokia tikrinimo, mėginių ėmimo ir tyrimo procedūra:

a) atliekant oficialų tyrimą bent kartą patikrinama žuvų sveikata ir paimamas vienas 10 žuvų mėginys, jei pastebėta KHV infekcijai būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, arba bent 30 žuvų mėginys, jei klinikinių ar patanatominių požymių nepastebėta. Mėginiai ištiriami taikant b papunktyje nurodytą diagnostinį metodą pagal II priedo 2 dalies II punkte išsamiai aprašytus diagnostinius metodus ir procedūras;

b) KHV infekcija patvirtinama aptikus virusą polimerazės grandininės reakcijos (PGR) būdu;

dėl KHV infekcijos kilusį įtarimą galima paneigti, jei atlikus šį tyrimą negaunama daugiau jokių KHV buvimo įrodymų.

2A lentelė.

Zonų ir teritorinių vienetų priežiūros sistema dvejų metų kontrolės laikotarpiu, po kurio jiems suteikiamas ligos (KHV) neapimtos teritorijos statusas, kaip nurodyta I.2.1 punkte

		Klinikinių tikrinimų skaičius per metus (dvejus metus)	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus (dvejus metus)	Žuvų skaičius mėginyje
Ūkiai, mėginių ėmimo vietos	Pirmi dveji priežiūros laikotarpio metai	2	2	75 [1]
	Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 2			

[1] Mėginiams reikia paimti pakankamai žuvų, kad būtų užtikrintas KHV aptikimo 95 % patikimumas, kai numatytas viruso paplitimas yra 5 %.

2B lentelė.

Zonų ir teritorinių vienetų priežiūros sistema ketverių metų kontrolės laikotarpiu, po kurio jiems suteikiamas ligos (KHV infekcijos) neapimtos teritorijos statusas, kaip nurodyta I.2.1 punkte

		Klinikinių tikrinimų skaičius per metus	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus	Žuvų skaičius mėginyje
Ūkiai, mėginių ėmimo vietos	Pirmi dveji priežiūros laikotarpio metai	1	1	30
Ūkiai, mėginių ėmimo vietos	Paskutiniai dveji priežiūros laikotarpio metai	2	2	30
	Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 2			

2C lentelė.

Priežiūros sistemos, taikomos siekiant išlaikyti ligos (KHV infekcijos) neapimtų zonų arba teritorinių vienetų statusą, kaip nurodyta I.3 punkte

Rizikos lygis	Sveikatos tikrinimų skaičius	Žuvų skaičius mėginyje
Didelis	2 kartus per metus	30
Vidutinis	1 kartą per metus	30
Mažas	1 kartą per 2 metus	30

Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 2

2D lentelė.

Priežiūros sistema, taikoma siekiant išlaikyti ligos (KHV infekcijos) neapimtos teritorijos statusą valstybėse narėse, zonose arba teritoriniuose vienetuose, kuriuose yra nedaug ūkių ir vykdant kryptingą priežiūrą tuose ūkiuose negaunama pakankamai epidemiologinių duomenų, kaip nurodyta I.3 punkte

	Klinikinių tikrinimų skaičius per metus	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus	Žuvų skaičius mėginyje
Mėginių ėmimo vietos	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 2 metus	30

Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 2

3 DALIS

INFEKCINĖS LAŠIŠŲ ANEMIJOS (ILA) PRIEŽIŪROS IR KONTROLĖS METODAI

I. **Reikalavimai dėl priežiūros ir likvidavimo programų, įgyvendinamų siekiant gauti ir išlaikyti ligos (ILA) neapimtos teritorijos statusą ir sustabdyti HPR genotipo su iškrita ILA viruso infekciją**

I.1. Bendrieji reikalavimai

Kai tikrinti žuvų sveikatą ir imti mėginius ūkiuose pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą reikia dažniau nei kartą per metus, tarp sveikatos tikrinimo arba mėginių ėmimo darbų turi būti kuo ilgesnės pertraukos.

Kai reikia vykdyti kryptingą laukinių populiacijų priežiūrą pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą, mėginių ėmimo vietų skaičius ir geografinė padėtis nustatomi taip, kad būtų patikimai aprėpta tos valstybės narės teritorija, zona arba teritorinis vienetas. Mėginių ėmimo vietos taip pat turi atitikti įvairias ekosistemas, kuriose yra laukinių šiai ligai imlių žuvų populiacijų.

Visuose gamybos vienetuose, kaip antai tvenkiniuose, rezervuaruose ir žuvidėse, tikrinama žuvų sveikata, ar juose nėra negyvų, silpnų arba neįprastai besielgiančių žuvų. Ypač atidžiai reikia tikrinti vandens išleidimo kanalus, kuriuose paprastai renkasi vandens srovės atneštos silpnos žuvys.

Mėginiams žuvys atrenkamos taip:

a) atrenkamos tik gaištančios arba ką tik nugaišusios, bet dar nesuirusios žuvys; pirmiausia reikėtų rinktis žuvis, turinčias anemijos, kraujavimo ar kitokių kraujotakos sutrikimų klinikinių požymių;

b) jeigu viena iš šiai ligai imlių rūšių toje vietoje yra atlantinė lašiša, pirmiausia imami atlantinių lašišų mėginiai. Jei atlantinių lašišų tame žuvininkystės ūkyje nėra, būtina imti kitų šiai ligai imlių rūšių žuvų mėginius;

c) jei žuvims auginti naudojamas ne vienas, o daugiau vandens telkinių, į mėginį turi patekti visų šių vandens telkinių žuvų pavyzdžių;

d) atrenkant žuvis į mėginį turi proporcingomis dalimis patekti žuvų iš visų ūkio gamybos vienetų, kaip antai žuvidžių, rezervuarų ir tvenkinių, ir iš visų klasių pagal metus.

I.2. Konkretūs reikalavimai nustatant I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su ILA, statusą

I.2.1. Priežiūros programos

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA, pagal Direktyvos 2006/88/EB III priedo B dalį, gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visi tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiai, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, atitinka reikiamus direktyvos V priede nustatytus reikalavimus ir visuose tuose ūkiuose, o kai privaloma pagal tos direktyvos V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą – ir pagal to punkto nuostatas pasirinktose laukinių populiacijų mėginių ėmimo vietose įgyvendinama tokia priežiūros programa:

a) ūkiuose arba mėginių ėmimo vietose tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent dvejus iš eilės metus, kaip nustatyta II skirsnio 3A lentelėje;

b) tuo dvejų metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nurodytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami HPR genotipo su iškrita ILA viruso tyrimo rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl ILA taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus;

c) jeigu įgyvendinant priežiūros programą patvirtinama, kad į tą priežiūros programą įtrauktas ūkis yra užkrėstas ILA, todėl jo sveikatos būklės II kategorijos statusas panaikintas, turi būti įgyvendinama likvidavimo programa pagal I.2.2 punktą.

I.2.2. Likvidavimo programos

I.2.2.1. Bendrieji reikalavimai

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA, gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, įgyvendinama likvidavimo programa pagal tolesnių a–e papunkčių nuostatas:

a) veiksmingai taikomos Direktyvos 2006/88/EB V skyriaus 3 skirsnyje nustatytos minimalios kontrolės priemonės ir visų pirma nustatomas izoliuotas plotas, kaip nurodyta direktyvos 32 straipsnio b punkte, sudarytas iš apsaugos zonos ir priežiūros zonos arti oficialiai paskelbto HPR genotipo su iškrita ILA virusu arba patvirtinta ILA infekcija užkrėsto ūkio arba ūkių.

Izoliuotas plotas turi būti nustatytas kiekvienu konkrečiu atveju atsižvelgiant į veiksnius, nuo kurių priklauso ILA plitimo tarp ūkyje auginamų arba laukinių žuvų rizika, kaip antai: HPR genotipo su iškrita ILA virusu užkrėstų nugaišusių žuvų arba patvirtintų ILA atvejų skaičių, dažnį ir paplitimą ūkyje; atstumus iki kaimynystėje esančių ūkių ir jų išsidėstymo tankį; skerdyklų artumą; sąlyčio ūkius; ūkius, su kuriais palaikomi ryšiai; ūkininkavimo praktiką užkrėstuose ir kaimyniniuose ūkiuose; hidrodinamines sąlygas ir kitus nustatytus epidemiologiniu požiūriu svarbius veiksnius.

Nustatant apsaugos ir priežiūros zonas taikomi šie minimalūs jų geografinių ribų apibrėžties reikalavimai:

i) apsaugos zona nustatoma prie pat oficialiai paskelbto ILA užkrėsto ūkio ir yra:

(1) Ji yra: pakrantėse – plotas, apie kurį apibrėžto apskritimo spindulys siekia mažiausiai vieną potvynio zoną arba bent 5 km (pasirenkamas didesnis iš šių atstumų) ir kurio centre yra oficialiai paskelbtas ILA užkrėstas ūkis arba lygiavertis plotas, nustatytas pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis;

(2) sausumos teritorijose – visas vandens baseinas, kuriame yra oficialiai paskelbtas ILA užkrėstas ūkis; kompetentinga institucija gali apriboti šios zonos plotą iki tam tikrų vandens baseino dalių su sąlyga, kad tai netrukdytų sustabdyti ILA plitimo;

ii) priežiūros zona nustatoma už apsaugos zonos ribų ir yra:

(1) pakrantėse – aplink apsaugos zoną esantis plotas, kuriame sutampa kelios potvynių zonos, arba zona aplink apsaugos zoną, kurios spindulys 10 km atstumu nuo apsaugos zonos; arba lygiavertis plotas, nustatytas pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis; arba

(2) sausumos teritorijose – didesnis plotas aplink nustatytą apsaugos zoną;

b) visuose apsaugos zonoje esančiuose ūkiuose, kuriuose auginamos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, tačiau kurie nėra oficialiai paskelbti ILA užkrėsti ūkiai, turi būti atliktas oficialus tyrimas, per kurį mažų mažiausiai būtų:

i) tyrimams paimti bent 10 gaištančių žuvų mėginiai, jei pastebėta ILA būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, arba bent 30 žuvų mėginiai, jei klinikinių ar patanatominių požymių nepastebėta;

ii) vieną kartą patikrinta žuvų sveikata; tuose ūkiuose, kuriuose gauti neigiami i papunktyje nurodytų tyrimų rezultatai, sveikata toliau tikrinama kartą per mėnesį iki apsaugos zonos panaikinimo pagal I.2.2.1 punkto c papunktį;

c) visi oficialiai paskelbti HPR genotipo su iškrita ILA virusu arba patvirtinta ILA infekcija užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir bent trims mėnesiams juose paliekamas pūdymas. Apsaugos ir priežiūros zonas galima panaikinti tada, kai visi apsaugos zonoje esantys ūkiai yra ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir po to bent šešios savaitės juose skirtos suderintam pūdymui.

Po pūdymo oficialiai paskelbtuose užkrėstuose ūkiuose apsaugos zonos tampa priežiūros zonomis.

Kompetentinga institucija gali nuspręsti, kad ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir palikti kaip pūdymą reikia ir kitus nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančius ūkius. Pūdymo laikotarpio trukmę tuose ūkiuose kompetentinga institucija nustato kiekvienu atveju atlikusi rizikos vertinimą;

d) visų oficialiai paskelbtų HPR genotipo su iškrita ILA virusu arba patvirtinta ILA infekcija užkrėstų ūkių ir visų kitų ūkių, kuriuose paliktas pūdymas, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkuriami tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA.

Ūkių ištekliai atkuriami tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas pagal I.2.2.1 punkto c papunktį;

e) visuose Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvų auginimo ūkiuose, esančiuose valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame įgyvendinama likvidavimo programa, o kai būtina vykdyti laukinių populiacijų priežiūrą – ir pagal I.1 punktą pasirinktose mėginių ėmimo vietose vėliau taikoma I.2.1 punkte nustatyta priežiūros sistema.

I.2.2.2. Reikalavimai dėl ligos neapimtos teritorijos statuso grąžinimo žemyniniams teritoriniams vienetams, kuriuose yra vienintelis ūkis, kuriame pirmiau buvo nustatyta I kategorijos sveikatos būklė

Kai žemyniniame teritoriniame vienete yra vienintelis ūkis, kuriame nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA, ir kurio žuvų sveikatos būklė nėra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 3 punktą, tačiau jo sveikatos būklės I kategorijos statusas panaikintas pagal direktyvos 53 straipsnio 3 dalį, šis statusas jam gali būti grąžintas iškart, kai tik kompetentinga institucija įsitikina, kad ūkis atitinka šias sąlygas:

a) jis yra ištuštintas, išvalytas, išdezinfekuotas ir jame paliktas pūdymas; pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės;

b) ūkio ištekliai atkuriami tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA.

I.3. Minimalios kontrolės priemonės, taikomos siekiant išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su ILA, statusą

Kai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės statusą turi būti vykdoma kryptinga priežiūra, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 52 straipsnyje, visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginamos direktyvos IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių žuvys, tikrinama žuvų sveikata ir imami mėginiai pagal šios dalies II skirsnyje pateiktą 3B lentelę ([1]), atsižvelgiant į to ūkio užkrėtimo ILA rizikos lygį.

Nustatant, kaip dažnai turi būti tikrinama sveikata žemyninių zonų teritoriniuose vienetuose, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA, ir kurių žuvų sveikatos būklė, susijusi su ILA, yra priklausoma nuo sveikatos būklės aplinkiniuose gamtiniuose vandens telkiniuose, kuriuose yra atlantinių lašišų (*Salmo salar*), laikoma, kad užkrėtimo ILA rizika yra didelė.

Ligos neapimtos teritorijos statusas išlaikomas tik tol, kol visų mėginių tyrimų II.2 punkte nustatytais diagnostiniais metodais dėl HPR genotipo su iškrita ILA viruso rezultatai yra neigiami ir visi įtarimai dėl ILA paneigiami taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus.

I.4. Konkretūs reikalavimai norint dėl HPR genotipo su iškrita ILA viruso buvimo nustatyti III kategorijos sveikatos būklę valstybėse narėse, zonose arba teritoriniuose vienetuose, kuriuose iki tol buvo nustatyta V kategorijos sveikatos būklė

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA, gali būti nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, jeigu:

a) laikomasi reikalavimų, nustatytų, I.2.2.1 punkto a, b ir c papunkčiuose. Tuo atveju, jei palikti pūdymo techniškai neįmanoma, ūkiuose taikoma alternatyvi priemonė, kuria beveik taip pat patikimai garantuojama, kad ILA virusas bus išnaikintas iš ūkio aplinkos;

b) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių ir visų kitų ūkių, kuriuose paliktas pūdymas arba pagal a papunktį taikytos alternatyvios priemonės, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkurti tiekiant žuvis iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I, II arba III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su ILA;

c) ūkių ištekliai atkurti tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir juose paliktas pūdymas arba imtasi alternatyvių priemonių pagal a papunktį;

d) dvejų metų laikotarpiu po to, kai baigtos taikyti a, b ir c papunkčiuose nurodytos priemonės, nepatvirtinta jokių užkrėtimo HPR genotipo su iškrita ILA virusu atvejų, o tuo laikotarpiu kilę įtarimai dėl ILA paneigti pagal II.3 punkte nustatytas procedūras.

([1]) Netaikoma ūkiams, kuriuose auginami tik vaivorykštiniai upėtakiai (*Oncorhynchus mykiss*), upėtakiai (*Salmo trutta*) ar abiejų rūšių žuvys ir kuriuose naudojamas vanduo tik iš gėlo vandens telkinių, kuriuose nėra atlantinių lašišų (*Salmo salar*).

II. **Diagnostiniai metodai ir oficialūs tyrimai**

II.1. Mėginiai

Audinių medžiaga, kuri turi būti ištirta:

a) atliekant histologinį tyrimą – viršutinė inkstų dalis, kepenys, širdis, kasa, žarnynas, blužnis ir žiaunos;

b) atliekant imunohistocheminį tyrimą – vidurinė inkstų dalis ir širdis su vožtuvais ir *bulbus arteriosus*;

c) atliekant AT qPGR tyrimą– širdis ir inkstų vidurinė dalis;

d) atliekant virusų kultūros tyrimą – vidurinė inkstų dalis, širdis, kepenys ir blužnis.

Kartu į bendrą mėginį galima sudėti daugiausia penkių žuvų organų gabalėlius.

II.2. Diagnostiniai metodai, taikomi siekiant gauti arba išlaikyti ligos (ILA) neapimtos teritorijos statusą

Siekiant suteikti arba išlaikyti ligos (ILA) neapimtos teritorijos statusą pagal I.2 ir I.3 punktus taikomas AT qPGR diagnostinis metodas, po kurio nustatoma teigiamų mėginių genų seka pagal II priedo 3 dalyje išsamiai aprašytus metodus ir procedūras.

Gavus teigiamą AT qPGR tyrimo rezultatą, prieš imantis Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnyje nurodytų pradinių kontrolės priemonių reikia ištirti papildomus mėginius.

Tie mėginiai ištiriami pagal II priedo 3 dalyje išsamiai aprašytus metodus ir procedūras tokia tvarka:

a) atliekamas mėginių atrankos tyrimas AT qPGR būdu, įskaitant HE geno sekos nustatymą siekiant patvirtinti HPR genotipo iškritą;

ir

b) ištiriami audinių preparatai naudojant specifinius antikūnus prieš ILA virusą (t. y. taikant IHC metodą užfiksuotiems segmentams arba NFAT metodą audinių atspaudams); arba

c) ILA virusas išskiriamas ir identifikuojamas ląstelių kultūroje iš bent vieno mėginio, paimto iš bet kurios tame ūkyje mėginiams pasirinktos žuvies;

II.3. Oficialaus tyrimo ir diagnostiniai metodai, taikomi siekiant paneigti arba patvirtinti ILA

Kai reikia patvirtinti arba paneigti kilusį įtarimą dėl ILA pagal Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnį, turi būti atliekama tokia tikrinimo, mėginių ėmimo ir tyrimo procedūra:

a) atliekant oficialų tyrimą bent kartą patikrinama žuvų sveikata ir paimamas vienas 10 gaištančių žuvų mėginys, jei pastebėta ILA būdingų klinikinių arba patanatominių požymių. Jei ILA būdingų klinikinių ar patanatominių požymių nepastebima, patikrinus žuvų sveikatą paimamas tikslinis mėginys iš bent 30 gaištančių žuvų arba ką tik nugaišusių, bet dar nepradėjusių irti žuvų pagal I.1 punktą. Mėginiai ištiriami pagal b papunktyje nustatytus diagnostinius metodus;

b) jei gaunamas teigiamas AT qPGR rezultatas, patvirtinantis HPR genotipo su iškrita ILA viruso buvimą, prieš imantis Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnyje nurodytų pradinių kontrolės priemonių reikia ištirti papildomus mėginius. Įtariamas ILA infekcijos atvejis turi būti patvirtintas pagal toliau nurodytus kriterijus, taikant II priedo 3 dalyje išsamiai aprašytus metodus ir procedūras:

i) ILA virusas aptinkamas AT qPGR būdu ir, siekiant patvirtinti HPR genotipo iškritą, nustatoma HE geno seka, ILA virusas taip pat aptinkamas audinių preparatuose naudojant specifinius antikūnus prieš šį virusą (t. y. taikant IHC metodą užfiksuotiems segmentams arba NFAT metodą audinių atspaudams);

arba

ii) ILA virusas aptinkamas AT qPGR būdu ir, siekiant patvirtinti HPR genotipo iškritą, nustatoma HE geno seka; ir

ILA virusas išskiriamas ir identifikuojamas ląstelių kultūroje iš bent vieno mėginio, paimto iš bet kurios tiriamo ūkio žuvies;

c) pastebėjus klinikinių ar didelių patologinių pakitimų arba gavus histopatologinių duomenų, iš kurių galima spręsti apie užkrėtimą ILA, šiuos duomenis būtina patvirtinti nustatant virusą dviem diagnostiniais metodais, pagal kuriuos jis aptinkamas iš esmės skirtingai, kaip antai AT qPGR ir IHC metodu, pagal II priedo 3 dalį.

Dėl ILA infekcijos kilusį įtarimą galima paneigti, jei atliekant tyrimus ir tikrinimus per 12 mėnesių nuo tos dienos, kurią kilo įtarimas, negaunama daugiau jokių ILA buvimo įrodymų.

3A lentelė.

Zonų ir teritorinių vienetų priežiūros sistema dvejų metų kontrolės laikotarpiu, po kurio jiems suteikiamas ligos (ILA) neapimtos teritorijos statusas, kaip nurodyta I.2.1 punkte

Priežiūros metai	Sveikatos tikrinimų skaičius per metus (dvejus metus)	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus (dvejus metus)	Per metus mėginiams imamų žuvų skaičius
pirmi metai	6	2 (1)	2 * 75 (2)
antri metai	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Mėginiai turi būti renkami, laikomi ir tiriami du mėnesio trukmės tyrimo laikotarpius per metus (t. y. pavasarį ir rudenį) arba kitu praktiškai tinkamu laiku.
(2) Didžiausias žuvų skaičius bendrame mėginyje: 5

3B lentelė.

Priežiūros sistemos, taikomos siekiant išlaikyti ligos (ILA) neapimtų zonų arba teritorinių vienetų statusą, kaip nurodyta I.3 punkte (2)

Rizikos lygis	Sveikatos tikrinimų skaičius per metus	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus	Per metus mėginiams imamų žuvų skaičius
Didelis	2	2 (1)	2 * 30
Vidutinis	1	1 (1)	30
Mažas	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 2 metus	30 kartų per 2 metus

(1) Mėginiai turi būti renkami ir tiriami du mėnesio trukmės tyrimo laikotarpius per metus (t. y. pavasarį ir rudenį) arba kitu praktiškai tinkamu laiku.
(2) Netaikoma ūkiams, kuriuose auginami tik vaivorykštiniai upėtakiai (*Oncorhynchus mykiss*), upėtakiai (*Salmo trutta*) ar abiejų rūšių žuvys ir kuriuose naudojamas vanduo tik iš gėlo vandens telkinių, kuriuose nėra atlantinių lašišų (*Salmo salar*).

4 DALIS

MARTEILIOZĖS (*MARTEILIA REFRINGENS*) INFEKCIJOS PRIEŽIŪROS IR KONTROLĖS METODAI

I. **Reikalavimai dėl priežiūros ir likvidavimo programų, įgyvendinamų siekiant gauti ir išlaikyti ligos (marteiliozės (*Marteilia refringens*) infekcijos) neapimtos teritorijos statusą**

I.1. Bendrieji reikalavimai

Gyvūnų sveikata tikrinama ir, kai tinka, mėginiai laboratoriniam tyrimui imami tuo metų laiku, kai, turimomis žiniomis, šio parazito paplitimas toje valstybėje narėje, zonoje ar teritoriniame vienete yra didžiausias. Jei tokių duomenų neturima, mėginiai imami iškart po to, kai vandens temperatūra viršija 17 °C.

Kai moliuskų mėginius reikia imti pagal 4 dalyje nustatytus reikalavimus, taikomi šie kriterijai:

a) jei gamybos vienetuose arba moliuskų auginimo plote yra *Ostrea* spp. ir *Mytilus* spp. moliuskų, abiejų genčių moliuskų kiekis mėginyje turi būti vienodas. Jei yra tik vienos iš šių genčių moliuskų, imami tos genties moliuskų mėginiai. Jei nei *Ostrea*, nei *Mytilus* moliuskų nėra, reikia imti tipinį mėginį iš visų kitų esamų šiai ligai imlių rūšių moliuskų;

b) jei gamybos vienetuose randama silpnų, prasivėrusių arba ką tik nugaišusių, bet dar nesuirusių moliuskų, mėginiams pirmiausia atrenkami šie moliuskai. Jei tokių moliuskų nėra, mėginiams atrenkami seniausi sveiki moliuskai;

c) imant mėginius moliuskų ūkiuose, kuriuose moliuskams auginti naudojamas ne vienas, o daugiau vandens telkinių, imami visų vandens telkinių moliuskų mėginiai taip, kad į mėginį proporcingomis dalimis patektų moliuskų iš visų ūkio vietų;

d) imant mėginius moliuskų auginimo plotuose mėginys sudaromas iš moliuskų, paimtų iš pakankamai mėginių ėmimo vietų taip, kad į mėginį proporcingomis dalimis patektų moliuskų iš visų to auginimo ploto dalių. Svarbiausi veiksniai, į kuriuos reikia atsižvelgti renkantis šias mėginių ėmimo vietas, yra tai, kuriose mėginių ėmimo vietose pirmiau buvo aptikta *Marteilia refringens* parazitų, moliuskų išsidėstymo tankis, vandens srovės, šiai ligai imlių rūšių buvimas, ją pernešančių rūšių buvimas, batimetrija ir ūkininkavimo praktika. Mėginiai imami ir iš natūralių moliuskų augimviečių.

I.2. Konkretūs reikalavimai nustatant I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su marteilioze (*Marteilia refringens*), statusą

I.2.1. Priežiūros programos

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Marteilia refringens* infekcija, gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose ir moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, įgyvendinama bent tokia priežiūros programa, pagal kurią atliekami sveikatos tikrinimai ir imami mėginiai tyrimams.

Dvejų metų priežiūros programa:

a) ūkiuose arba moliuskų auginimo plotuose tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent dvejus iš eilės metus, kaip nustatyta II skirsnio 4A lentelėje;

b) tuo dvejų metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nurodytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami *Marteilia refringens* tyrimo rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl *Marteilia refringens* taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus;

c) kai reikia paimti *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* arba *Mytilus galloprovincialis* rūšies moliuskų, kilusių iš I kategorijos sveikatos būklės valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto, mėginius, tie moliuskai turi būti tame ūkyje arba moliuskų auginimo plote introdukuoti bent tų metų pavasarį prieš pat laikotarpį, kuriuo įgyvendinama priežiūros programa.

I.2.2. Likvidavimo programos

Manoma, kad *Marteilia refringens* visiškai išnaikinti daugeliu atvejų neįmanoma, tačiau valstybei narei nutarus, kad galima tai padaryti, joje įgyvendinama likvidavimo programa pagal toliau aprašytą pavyzdį.

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Marteilia refringens* infekcija, gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose arba moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, įgyvendinama bent tokia likvidavimo programa:

a) veiksmingai taikomos Direktyvos 2006/88/EB V skyriaus 3 skirsnyje nustatytos priemonės ir visų pirma nustatomas izoliuotas plotas, kaip nurodyta Direktyvos 2006/88/EB 32 straipsnio b punkte, sudarytas iš apsaugos zonos ir priežiūros zonos arti oficialiai paskelbto *Marteilia refringens* užkrėsto ūkio ar ūkių arba moliuskų auginimo ploto (-ų).

Izoliuotas plotas nustatomas kiekvienu konkrečiu atveju atsižvelgiant į veiksnius, nuo kurių priklauso *Marteilia refringens* plitimo rizika, kaip antai: *Marteilia refringens* užkrėstų nugaišusių moliuskų skaičių, amžių, dažnį ir paplitimą ūkyje arba moliuskų auginimo plote, įskaitant ir laukinius moliuskus; atstumus iki kaimynystėje esančių ūkių arba moliuskų auginimo plotų, įskaitant ir laukinių moliuskų plotus, ir jų išsidėstymo tankį; perdirbimo įmonių ir ūkių arba moliuskų auginimo plotų, su kuriais palaikomi ryšiai, artumą; tuose ūkiuose arba moliuskų auginimo plotuose esamų moliuskų rūšis, ypač tas, kurios imlios šiai ligai arba ją perneša; ūkininkavimo praktiką užkrėstuose ir kaimyniniuose ūkiuose bei moliuskų auginimo plotuose; hidrodinamines sąlygas ir kitus nustatytus epidemiologiniu požiūriu svarbius veiksnius.

Nustatant apsaugos ir priežiūros zonas taikomi šie minimalūs reikalavimai:

i) apsaugos zona nustatoma prie pat oficialiai paskelbto *Marteilia refringens* užkrėsto ūkio arba moliuskų auginimo ploto ir apima pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis nustatytą plotą;

ii) priežiūros zona nustatoma apsaugos zonos išorėje kaip aplink apsaugos zoną esantis plotas pagal atitinkamus hidrodinaminius arba epidemiologinius duomenis;

b) visuose apsaugos zonoje esančiuose ūkiuose ir moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, tačiau kurie nėra oficialiai paskelbti *Marteilia refringens* užkrėsti ūkiai, atliekamas oficialus tyrimas, kurio metu *Marteilia refringens* plitimo laikotarpiui prasidėjus tyrimams mažų mažiausiai paimami 150 moliuskų mėginiai. Jei *Marteilia refringens* plitimo laikotarpis nežinomas, mėginiai pradedami imti tuo metų laiku, kai vandens temperatūra viršija 17 °C;

c) visi oficialiai paskelbti *Marteilia refringens* užkrėsti ūkiai ir moliuskų auginimo plotai ištuštinami, juose paliekamas pūdymas ir, jei įmanoma, jie išvalomi ir išdezinfekuojami.

Pūdymo laikotarpis trunka ne mažiau kaip:

i) du mėnesius tuo atveju, kai ūkiai ir moliuskų auginimo plotai nedaug siejasi su aplinkiniais vandens telkiniais (pavyzdžiui, inkubatoriai ir augyklos);

ii) du mėnesius nuo aplinkinių vandens telkinių visiškai neatskirtuose ūkiuose ir moliuskų auginimo plotuose, jeigu užkrėsti šiai ligai imlių rūšių moliuskai ir epidemiologiniais ryšiais su užkrėstu ūkiu arba moliuskų auginimo plotu susiję šiai ligai imlių rūšių moliuskai surinkti kaip produkcija arba pašalinti iki to metų laiko, kuriuo, turimomis žiniomis, *Marteilia refringens* paplitimas yra didžiausias, o jei tas laikotarpis nežinomas, iki metų laiko, kuriuo vandens temperatūra viršija 17 °C, pradžios;

iii) keturiolika mėnesių nuo aplinkinių vandens telkinių visiškai neatskirtuose ūkiuose ir moliuskų auginimo plotuose, jeigu užkrėsti šiai ligai imlių rūšių moliuskai arba epidemiologiniais ryšiais su užkrėstu ūkiu ar moliuskų auginimo plotu susiję šiai ligai imlių rūšių moliuskai nebuvo surinkti kaip produkcija arba pašalinti iki to metų laiko, kuriuo, turimomis žiniomis, *Marteilia refringens* paplitimas yra didžiausias, o kai tokių duomenų neturima, jeigu šiai ligai imlių rūšių moliuskai nebuvo surinkti kaip produkcija arba pašalinti iki metų laiko, kuriuo vandens temperatūra viršija 17 °C, pradžios.

Ištuštinus visus oficialiai paskelbtus užkrėstus ūkius ir moliuskų auginimo plotus, bent keturios savaitės skiriamos suderintam pūdymui.

Kompetentinga institucija gali nuspręsti, kad ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir palikti kaip pūdymą reikia ir kitus nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančius ūkius arba moliuskų auginimo plotus. Pūdymo laikotarpio trukmę kompetentinga institucija nustato kiekvienu atveju atlikusi rizikos vertinimą;

d) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių arba moliuskų auginimo plotų ir visų kitų nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančių ūkių arba moliuskų auginimo plotų, kuriuose paliktas pūdymas, ištekliai atkuriami tiekiant moliuskus iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Marteilia refiringens* sukelta infekcija.

Ištekliai atkuriami tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas pagal I.2.2 punkto c papunktį;

e) visuose Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskų ūkiuose ir auginimo plotuose, esančiuose valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame įgyvendinama likvidavimo programa, vėliau taikoma šios dalies I.2.1 punkte nustatyta priežiūros sistema.

I.3. Konkretūs reikalavimai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su marteiliioze (*Marteilia refringens*), statusą

Kai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės statusą turi būti vykdoma kryptinga priežiūra, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 52 straipsnyje, visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose ar moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, tikrinama sveikata ir imami mėginiai pagal II skirsnyje pateiktą 4B lentelę, atsižvelgiant į to ūkio arba moliuskų auginimo ploto užkrėtimo *Marteilia refringens* rizikos lygį.

Ligos neapimtos teritorijos statusas išlaikomas tik tol, kol visų mėginių tyrimų II.2 punkte nustatytais diagnostiniais metodais dėl *Marteilia refringens* rezultatai yra neigiami ir visi įtarimai dėl *Marteilia refringens* paneigiami taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus.

I.4. Reikalavimai norint nebetaikyti Direktyvos 2006/88/EB 39 straipsnyje nurodytų izoliavimo priemonių dėl *Marteilia refringens* infekcijos (pakeisti sveikatos būklės kategoriją iš V į III)

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Marteilia refringens* infekcija, gali būti nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, jeigu:

a) laikomasi reikalavimų, nustatytų I.2.2 punkto a, b ir c papunkčiuose. Tuo atveju, jei palikti pūdymo techniškai neįmanoma, tuose ūkiuose taikoma alternatyvi priemonė, kuria beveik taip pat patikimai garantuojama, kad *Marteilia refringens* parazitai bus išnaikinti iš ūkio aplinkos;

b) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių arba moliuskų auginimo plotų ir visų kitų ūkių arba moliuskų auginimo plotų, kuriuose paliktas pūdymas arba pagal a papunktį taikytos alternatyvios priemonės, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkurti tiekiant moliuskus iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I, II arba III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Marteilia refringens* infekcija;

c) ištekliai atkurti tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai arba moliuskų auginimo plotai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas arba taikomos alternatyvios priemonės pagal a papunktį;

d) dvejų metų laikotarpiu po to, kai baigtos taikyti a, b ir c papunkčiuose nurodytos priemonės, nepatvirtinta jokių užkrėtimo *Marteilia refringens* atvejų, o tuo laikotarpiu kilę įtarimai dėl šios infekcijos paneigti pagal II.3 punkte nustatytas procedūras.

II. **Diagnostiniai metodai ir oficialūs tyrimai**

II.1. Mėginiai

Į laboratoriją II.2 ir II.3 punktuose nurodytiems diagnostiniams tyrimams pristatomas visas gyvūnas.

II.2. Diagnostiniai metodai, taikomi siekiant gauti arba išlaikyti ligos (*Marteilia refringens* infekcijos) neapimtos teritorijos statusą

Siekiant gauti arba išlaikyti ligos (*Marteilia refringens* infekcijos) neapimtos teritorijos statusą pagal II priedo 4 dalyje išsamiai aprašytus diagnostinius metodus ir procedūras taikomi diagnostiniai metodai yra histopatologinis tyrimas, audinių atspaudų tyrimas arba polimerazės grandininė reakcija (PGR).

II.3. Oficialaus tyrimo ir diagnostiniai metodai, taikomi siekiant patvirtinti *Marteilia refringens* infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus

Kai reikia patvirtinti arba paneigti kilusį įtarimą dėl *Marteilia refringens* infekcijos pagal Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnį, turi būti atliekama tokia tikrinimo, mėginių ėmimo ir tyrimo procedūra:

a) atliekant oficialų tyrimą paimamas bent vienas 30 šiai ligai imlios rūšies moliuskų mėginys, jei įtarimas dėl jos kilo gavus pranešimą apie moliuskų gaištamumą, o jei ne, paimamas 150 šiai ligai imlios rūšies moliuskų mėginys *Marteilia refringens* plitimo laikotarpiui prasidėjus. Jei *Marteilia refringens* plitimo laikotarpis nežinomas, mėginiai pradedami imti tuo metų laiku, kai vandens temperatūra viršija 17 °C;

b) mėginiai ištiriami taikant i papunktyje nurodytus diagnostinius metodus pagal II priedo 4 dalies I skirsnyje išsamiai aprašytus diagnostinius metodus ir procedūras:

i) *Marteilia refringens* buvimas patvirtinamas gavus teigiamą histopatologinio, audinių atspaudų arba hibridizacijos *in situ* tyrimo rezultatą kartu su teigiamu polimerazės grandininės reakcijos (PGR), įskaitant genų sekos nustatymą, rezultatu;

ii) dėl *Marteilia refringens* infekcijos kilusius įtarimus galima paneigti, jei atlikus i papunktyje nurodytus tyrimus negaunama daugiau jokių *Marteilia refringens* buvimo įrodymų.

4A lentelė.

Valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų priežiūros sistema kontrolės laikotarpiu, po kurio jiems suteikiamas ligos (marteiliozės (*Marteilia refringens* infekcijos)) neapimtos teritorijos statusas, kaip nurodyta I.2.1 punkte

	Sveikatos tikrinimų skaičius per metus	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus	Moliuskų skaičius mėginyje
Ūkiai, moliuskų auginimo plotai	1	1	150

4B lentelė.

Valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų priežiūros sistemos, taikomos siekiant išlaikyti ligos (marteiliozės (*Marteilia refringens* infekcijos)) neapimtos teritorijos statusą, kaip nurodyta I.3 punkte

Rizikos lygis	Sveikatos tikrinimų skaičius	Laboratorinių tyrimų skaičius	Moliuskų skaičius mėginyje
Didelis	1 kartą per metus	1 kartą per 2 metus	150
Vidutinis	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 2 metus	150
Mažas	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 4 metus	150

5 DALIS

BONAMIOZĖS (*BONAMIA OSTREAE*) INFEKCIJOS PRIEŽIŪROS IR KONTROLĖS METODAI

I. **Reikalavimai dėl priežiūros arba likvidavimo programų, įgyvendinamų siekiant gauti ir išlaikyti ligos (bonamiozės (*Bonamia ostreae* infekcijos)) neapimtos teritorijos statusą**

I.1. Bendrieji reikalavimai

Gyvūnų sveikata tikrinama ir, kai tinka, mėginiai iš gamybos vienetų imami tuo metų laiku, kai, turimomis žiniomis, *Bonamia ostreae* paplitimas toje valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete yra didžiausias. Jei tokių duomenų neturima, mėginiai imami žiemą arba pavasario pradžioje.

Kai moliuskų mėginius reikia imti pagal 5 dalyje nustatytus reikalavimus, taikomi šie kriterijai:

a) jei auginamos *Ostrea edulis*, mėginiams atrenkamos tik šios rūšies austrės. Jei *Ostrea edulis* neauginamos, reikia imti tipinį visų kitų auginamų šiai ligai imlių rūšių moliuskų mėginį;

b) jei randama silpnų, prasivėrusių arba ką tik nugaišusių, bet dar nesuirusių moliuskų, mėginiams pirmiausia atrenkami šie moliuskai. Jei tokių moliuskų nėra, mėginiams atrenkami seniausi sveiki moliuskai;

c) imant mėginius ūkiuose, kuriuose moliuskams auginti naudojamas ne vienas, o daugiau vandens telkinių, imami visų vandens telkinių moliuskų mėginiai taip, kad į mėginį proporcingomis dalimis patektų moliuskų iš visų ūkio vietų;

d) imant mėginius moliuskų auginimo plotuose mėginys sudaromas iš moliuskų, paimtų iš pakankamai mėginių ėmimo vietų. Svarbiausi veiksniai, į kuriuos reikia atsižvelgti renkantis šias mėginių ėmimo vietas, yra tai, kuriose vietose pirmiau buvo aptikta *Bonamia ostreae* parazitų, moliuskų išsidėstymo tankis, vandens srovės, šiai ligai imlių rūšių buvimas, ją pernešančių rūšių buvimas, batimetrija ir ūkininkavimo praktika. Mėginiai imami ir iš natūralių moliuskų augimviečių, esančių moliuskų auginimo plotuose ar greta jų.

I.2. Konkretūs reikalavimai nustatant I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su *Bonamia ostreae* infekcija, statusą

I.2.1. Priežiūros programos

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Bonamia ostreae* infekcija, gali būti vėl nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, įgyvendinama bent toliau nurodyta priežiūros programa, pagal kurią atliekami sveikatos tikrinimai ir imami mėginiai tyrimams.

Dvejų metų priežiūros programa:

a) ūkiuose ir moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent dvejus iš eilės metus, kaip nustatyta šios dalies 5A lentelėje;

b) tuo dvejų metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nustatytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami *Bonamia ostreae* tyrimo rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl *Bonamia ostreae* taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus;

c) kai reikia paimti *Ostrea edulis* rūšies austrių, kilusių iš I kategorijos sveikatos būklės valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto, mėginius, jos turi būti tame ūkyje arba moliuskų auginimo plote introdukuotos bent praėjusį rudenį prieš pat laikotarpį, kuriuo įgyvendinama priežiūros programa.

I.2.2. Likvidavimo programos

Manoma, kad *Bonamia ostreae* visiškai išnaikinti daugeliu atvejų neįmanoma, tačiau valstybei narei nutarus, kad galima tai padaryti, įgyvendinama likvidavimo programa pagal toliau aprašytą pavyzdį.

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Bonamia ostreae* infekcija, gali būti vėl nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose arba moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, įgyvendinama bent tokia likvidavimo programa:

a) veiksmingai taikomos Direktyvos 2006/88/EB V skyriaus 3 skirsnyje nustatytos minimalios kontrolės priemonės ir visų pirma nustatomas izoliuotas plotas, kaip nurodyta direktyvos 32 straipsnio b punkte, sudarytas iš apsaugos zonos ir priežiūros zonos arti oficialiai paskelbto *Bonamia ostreae* užkrėsto ūkio ar ūkių arba moliuskų auginimo ploto (-ų).

Izoliuotas plotas nustatomas kiekvienu konkrečiu atveju atsižvelgiant į veiksnius, nuo kurių priklauso šios vienos iš išvardytų ligų, plitimo rizika, kaip antai: *Bonamia ostreae* užkrėstų nugaišusių moliuskų skaičių, dažnį, amžių ir paplitimą ūkyje arba moliuskų auginimo plote, įskaitant ir laukinius moliuskus; atstumus iki kaimynystėje esančių ūkių arba moliuskų auginimo plotų, įskaitant laukinių moliuskų plotus, ir jų išsidėstymo tankį; perdirbimo įmonių ir ūkių arba moliuskų auginimo plotų, su kuriais palaikomi ryšiai, artumą; tuose ūkiuose ar moliuskų auginimo plotuose esamas moliuskų rūšis, ypač tas, kurios imlios šiai ligai arba ją perneša; ūkininkavimo praktiką užkrėstuose ir kaimyniniuose ūkiuose arba moliuskų auginimo plotuose; hidrodinamines sąlygas ir kitus nustatytus epidemiologiniu požiūriu svarbius veiksnius.

Nustatant apsaugos ir priežiūros zonas taikomi šie minimalūs reikalavimai:

i) apsaugos zona nustatoma prie pat oficialiai paskelbto *Bonamia* ostreae užkrėsto ūkio arba moliuskų auginimo ploto ir apima pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis nustatytą plotą;

ii) priežiūros zona nustatoma apsaugos zonos išorėje kaip aplink apsaugos zoną esantis plotas pagal atitinkamus hidrodinaminius arba epidemiologinius duomenis;

b) visuose apsaugos zonoje esančiuose ūkiuose ir moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, tačiau kurie nėra oficialiai paskelbti kaip užkrėsti *Bonamia ostreae*, atliekamas oficialus tyrimas, kurio metu *Bonamia ostreae* plitimo laikotarpiui prasidėjus tyrimams mažų mažiausiai paimami 150 šiai ligai imlių rūšių moliuskų mėginiai. Jei *Bonamia ostreae* plitimo laikotarpis nežinomas, mėginiai pradedami imti žiemą arba pavasario pradžioje;

c) visi oficialiai paskelbti *Bonamia ostreae* užkrėsti ūkiai ir moliuskų auginimo plotai ištuštinami, juose paliekamas pūdymas ir, jei įmanoma, jie išvalomi ir išdezinfekuojami. Pūdymo laikotarpio trukmė – bent šeši mėnesiai.

Ištuštinus visus oficialiai paskelbtus užkrėstus ūkius arba moliuskų auginimo plotus, bent keturios savaitės skiriamos suderintam pūdymui.

Kompetentinga institucija gali nuspręsti, kad ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir palikti kaip pūdymą reikia ir kitus nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančius ūkius arba moliuskų auginimo plotus. Pūdymo laikotarpio trukmę kompetentinga institucija nustato kiekvienu atveju atlikusi rizikos vertinimą;

d) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių arba moliuskų auginimo plotų ir visų kitų ūkių arba moliuskų auginimo plotų, kuriuose paliktas pūdymas, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkuriami tiekiant moliuskus iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Bonamia ostreae* infekcija. Ištekliai atkuriami tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas pagal I.2.2 punkto c papunktį;

e) visuose Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskų ūkiuose, zonose ir auginimo plotuose, esančiuose valstybėse narėje arba teritoriniame vienete, kuriame įgyvendinama likvidavimo programa, vėliau turi būti įgyvendinta I.2 punkte nustatyta priežiūros programa.

I.3. Konkretūs reikalavimai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su bonamioze (*Bonamia ostreae* infekcija), statusą

Kai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės statusą turi būti vykdoma kryptinga priežiūra, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 52 straipsnyje, visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose ar moliuskų auginimo plotuose, kuriuose auginami direktyvos IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių moliuskai, tikrinama sveikata ir imami mėginiai pagal šios dalies II skirsnyje pateiktą 5B lentelę, atsižvelgiant į to ūkio arba moliuskų auginimo ploto užkrėtimo *Bonamia ostreae* rizikos lygį.

Ligos (*Bonamia ostreae* infekcijos) neapimtos teritorijos statusas išlaikomas tik tol, kol visų mėginių tyrimų II.2 punkte nustatytais diagnostiniais metodais dėl *Bonamia ostreae* rezultatai yra neigiami ir visi įtarimai dėl *Bonamia ostreae* paneigiami taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus.

I.4. Reikalavimai norint nebetaikyti Direktyvos 2006/88/EB 39 straipsnyje nurodytų izoliavimo priemonių dėl *Bonamia ostreae* infekcijos (pakeisti sveikatos būklės kategoriją iš V į III).

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Bonamia ostreae* infekcija, gali būti nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia liga, jeigu:

a) laikomasi reikalavimų, nustatytų I.2.2 punkto a, b ir c papunkčiuose. Tuo atveju, jei palikti pūdymo techniškai neįmanoma, tuose ūkiuose taikoma alternatyvi priemonė, kuria beveik taip pat patikimai garantuojama, kad *Bonamia ostreae* parazitai bus išnaikinti iš ūkio aplinkos;

b) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių arba moliuskų auginimo plotų ir visų kitų ūkių arba moliuskų auginimo plotų, kuriuose paliktas pūdymas arba pagal a papunktį taikytos alternatyvios priemonės, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkuriami tiekiant moliuskus iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I, II arba III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su *Bonamia ostreae* infekcija;

c) ištekliai atkurti tik po to, kai visi oficialiai paskelbti užkrėsti ūkiai arba moliuskų auginimo plotai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas arba taikomos alternatyvios priemonės pagal a papunktį;

d) dvejų metų laikotarpiu po to, kai baigtos taikyti a, b ir c papunkčiuose nurodytos priemonės, nepatvirtinta jokių užkrėtimo *Bonamia ostreae* atvejų, o tuo laikotarpiu kilę įtarimai dėl šios infekcijos paneigti pagal II.3 punkte nustatytas procedūras.

II. **Diagnostiniai metodai ir diagnostiniai kriterijai**

II.1. Mėginiai

Į laboratoriją II.2 ir II.3 punktuose nurodytiems diagnostiniams tyrimams pristatomas visas gyvūnas.

II.2. Diagnostiniai metodai, taikomi siekiant gauti arba išlaikyti ligos (*Bonamia ostreae* infekcijos) neapimtos teritorijos statusą

Siekiant gauti arba išlaikyti ligos (*Bonamia ostreae* infekcijos) neapimtos teritorijos statusą taikomi diagnostiniai metodai yra histopatologinis tyrimas, audinių atspaudų tyrimas arba polimerazės grandininė reakcija (PGR). Taikant šiuos diagnostinius metodus būtina laikytis atitinkamų II priedo 5 dalyje išsamiai aprašytų metodų ir procedūrų.

II.3. Diagnostiniai kriterijai, taikomi siekiant patvirtinti *Bonamia ostreae* infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus

Kai reikia patvirtinti arba paneigti kilusį įtarimą dėl *Bonamia ostreae* infekcijos pagal Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnį, turi būti atliekama toliau nurodyta tikrinimo, mėginių ėmimo ir tyrimo procedūra.

Atliekant oficialų tyrimą paimamas bent vienas 30 šiai ligai imlios rūšies moliuskų mėginys, jei įtarimas dėl jos kilo gavus pranešimą apie moliuskų gaištamumą, o jei ne, paimamas 150 šiai ligai imlios rūšies moliuskų mėginys *Bonamia ostreae* plitimo laikotarpiui prasidėjus. Jei *Bonamia ostreae* plitimo laikotarpis nežinomas, mėginiai pradedami imti žiemą arba pavasario pradžioje. Mėginiai ištiriami taikant i papunktyje nurodytus diagnostinius metodus pagal II priedo 5 dalies I skirsnyje išsamiai aprašytus diagnostinius metodus ir procedūras.

i) *Bonamia ostreae* buvimas patvirtinamas gavus teigiamą histopatologinio, audinių atspaudų arba hibridizacijos *in situ* tyrimo rezultatą kartu su teigiamu polimerazės grandininės reakcijos (PGR), įskaitant genų sekos nustatymą, rezultatu pagal II priedo 5 dalyje nustatytus patvirtintus metodus ir procedūras;

ii) dėl *Bonamia ostreae* infekcijos kilę įtarimai paneigiami, jei atlikus tuos tyrimus negaunama daugiau jokių *Bonamia ostreae* buvimo įrodymų.

5A lentelė.

Valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų priežiūros sistema kontrolės laikotarpiu, po kurio jiems suteikiamas ligos (bonamiozės (*Bonamia ostreae* infekcijos)) neapimtos teritorijos statusas, kaip nurodyta I.2.1 punkte

	Sveikatos tikrinimų skaičius per metus	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus	Moliuskų skaičius mėginyje
Ūkiai, moliuskų auginimo plotai	1	1	150

5B lentelė.

Valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų priežiūros sistemos, taikomos siekiant išlaikyti ligos (bonamiozės (*Bonamia ostreae* infekcijos)) neapimtos teritorijos statusą, kaip nurodyta I.3 punkte

Rizikos lygis	Sveikatos tikrinimų skaičius	Laboratorinių tyrimų skaičius	Moliuskų skaičius mėginyje
Didelis	1 kartą per metus	1 kartą per 2 metus	150
Vidutinis	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 2 metus	150
Mažas	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 4 metus	150

6 DALIS

BALTMĖS (VITILIGO) PRIEŽIŪROS IR KONTROLĖS METODAI

I. **Reikalavimai dėl priežiūros ir likvidavimo programų, įgyvendinamų siekiant gauti ir išlaikyti ligos (baltmės (vitiligo)) neapimtos teritorijos statusą ir sustabdyti baltmės (vitiligo) infekciją**

I.1. Bendri sveikatos tikrinimo ir mėginių ėmimo reikalavimai

Vėžiagyvių mėginiai laboratoriniam tyrimui imami bet kuriuo metu, kai tikėtina, kad vandens temperatūra siekia aukščiausią metų temperatūros lygį. Ši reikalavimo dėl vandens temperatūros, kai įmanoma ir kai tinka, reikia laikytis ir atliekant sveikatos tikrinimus.

Kai auginamų vėžiagyvių mėginius reikia imti pagal šioje dalyje nustatytus reikalavimus, taikomi tokie kriterijai:

a) jei gamybos vienetuose randama silpnų arba gaištančių vėžiagyvių, mėginiams pirmiausia atrenkami šie vėžiagyviai. Jei tokių vėžiagyvių nėra, į mėginį proporcingomis dalimis atrenkama pasirinktų šiai ligai imlių rūšių įvairaus dydžio grupių, t. y. jauniklių ir suaugusių, vėžiagyvių;

b) jei vėžiagyviams auginti naudojamas ne vienas, o daugiau vandens telkinių, šiai ligai imlių vėžiagyvių mėginiai imami iš visų vandens telkinių.

Kai reikia vykdyti kryptingą laukinių populiacijų priežiūrą pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą, mėginių ėmimo vietų skaičius ir geografinė padėtis nustatomi taip, kad būtų patikimai aprėpta tos valstybės narės teritorija, zona arba teritorinis vienetas. Mėginių ėmimo vietos taip turi atitikti įvairias ekosistemas, kuriose yra laukinių šiai ligai imlių rūšių populiacijų, t. y. jūrų, estuarijų, upių ir ežerų sistemas.

Kai reikia vykdyti kryptingą laukinių populiacijų priežiūrą pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą, vėžiagyviai mėginiams atrenkami taip:

i) jūrų ir estuarijų sistemų teritorijose reikia rinktis vėžiagyvius, priklausančius vienai ar daugiau iš šių rūšių: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* arba šakotažiaunių krevečių rūšims, t. y. *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Jei šių rūšių nėra, reikia imti tipinį mėginį iš kitoms rūšims priklausančių šiai ligai imlių dešimtkojų vėžiagyvių toje vietoje. Turint omenyje didelę šiai ligai imlių šeimininkų įvairovę, galima rinktis šeimininkus iš tų *Decapoda* genčių arba šeimų, kurių imlumas šiai ligai įrodytas bandymais arba gamtinėmis sąlygomis;

ii) upių ir ežerų sistemose reikia rinktis vėžiagyvius, priklausančius vienai ar daugiau iš šių rūšių: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* arba *Orconectes limosus*. Jei šių rūšių nėra, reikia imti tipinį mėginį iš kitoms rūšims priklausančių šiai ligai imlių dešimtkojų vėžiagyvių toje vietoje. Turint omenyje didelę šiai ligai imlių šeimininkų įvairovę, galima rinktis šeimininkus iš tų *Decapoda* genčių arba šeimų, kurių imlumas šiai ligai įrodytas bandymais arba gamtinėmis sąlygomis;

iii) jei randama silpnų arba gaištančių vėžiagyvių, mėginiams pirmiausia atrenkami šie vėžiagyviai. Jei tokių vėžiagyvių nėra, į mėginį proporcingomis dalimis atrenkama pasirinktų šiai ligai imlių rūšių įvairaus dydžio grupių, t. y. jauniklių ir suaugusių, vėžiagyvių.

I.2. Konkretūs reikalavimai nustatant I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su baltme (vitiligo), statusą

I.2.1. Priežiūros programos

a) valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo), pagal Direktyvos 2006/88/EB III priedo B dalį, gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visi tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiai, kuriuose auginami tos direktyvos IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių vėžiagyviai, atitinka tos direktyvos V priede nustatytus reikalavimus ir visuose tuose ūkiuose, o kai privaloma pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą – ir pagal to punkto nuostatas pasirinktose laukinių populiacijų mėginių ėmimo vietose įgyvendinama toliau nurodyta dvejų metų priežiūros programa, pagal kurią atliekami sveikatos tikrinimai ir imami mėginiai tyrimams.

Ūkiuose arba mėginių ėmimo vietose tikrinama sveikata ir imami mėginiai bent dvejus iš eilės metus, kaip nustatyta II skirsnio 6.A lentelėje.

Tuo dvejų metų laikotarpiu tiriant visus mėginius II.2 punkte nurodytais diagnostiniais metodais turi būti gauti neigiami tyrimo dėl baltmės (vitiligo) rezultatai ir paneigti visi įtarimai dėl šios ligos taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus;

b) jeigu įgyvendinant a papunktyje nurodytą priežiūros programą patvirtinama, kad į tą priežiūros programą įtrauktas ūkis yra užkrėstas baltmės (vitiligo) virusu, todėl jo sveikatos būklės II kategorijos statusas panaikintas, tokiam ūkiui gali būti iškart grąžintas II kategorijos sveikatos būklės statusas ir toliau įgyvendinama priežiūros programa siekiant suteikti ligų neapimtos teritorijos statusą, o I.2.2 punkte nurodytos likvidavimo programos įgyvendinti nereikia, jeigu:

i) tai žemyninis ūkis, kurio gyvūnų sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo), nėra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių gyvūnų sveikatos būklės, susijusios su šia viena iš išvardytų ligų, kaip nustatyta Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 3 punkte;

ii) jis yra ištuštintas, išvalytas, išdezinfekuotas ir jame paliktas pūdymas; pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės;

iii) ūkio ištekliai atkurti tiekiant vėžiagyvius iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo).

I.2.2. Likvidavimo programos

I.2.2.1. Bendrieji reikalavimai

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo), gali būti nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, kai visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių vėžiagyviai, įgyvendinama bent tokia likvidavimo programa:

a) veiksmingai taikomos Direktyvos 2006/88/EB V skyriaus 4 skirsnyje nustatytos minimalios kontrolės priemonės ir visų pirma nustatomas izoliuotas plotas, kaip nurodyta direktyvos 32 straipsnio b punkte, sudarytas iš apsaugos zonos ir priežiūros zonos arti oficialiai paskelbto baltme (vitiligo) užkrėsto ūkio arba ūkių.

Izoliuotas plotas turi būti nustatytas kiekvienu konkrečiu atveju atsižvelgiant į veiksnius, nuo kurių priklauso baltmės (vitiligo) plitimo tarp ūkyje auginamų ir laukinių vėžiagyvių rizika, kaip antai: baltme (vitiligo) užkrėstų nugaišusių vėžiagyvių skaičių, dažnį ir paplitimą ūkyje; atstumus iki kaimynystėje esančių ūkių ir jų išsidėstymo tankį; sąlyčio ūkius; ūkius, su kuriais palaikomi ryšiai; ūkininkavimo praktiką užkrėstuose ir kaimyniniuose ūkiuose; hidrodinamines sąlygas ir kitus nustatytus epidemiologiniu požiūriu svarbius veiksnius.

Nustatant apsaugos ir priežiūros zonas taikomi šie minimalūs reikalavimai:

i) apsaugos zona nustatoma prie pat oficialiai paskelbto baltme (vitiligu) užkrėsto ūkio ir yra:

(1) jūrų ir upių žiočių vietose – plotas, apie kurį apibrėžto apskritimo spindulys siekia mažiausiai vieną potvynio zoną arba bent 5 km (pasirenkamas didesnis iš šių atstumų) ir kurio centre yra oficialiai paskelbtas baltme (vitiligo) užkrėstas ūkis arba lygiavertis plotas, nustatytas pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis; arba

(2) gėluosiuose vandenyse – visas vandens baseinas, kuriame yra oficialiai paskelbtas baltme (vitiligo) užkrėstas ūkis; kompetentinga institucija gali apriboti šios apsaugos zonos plotą iki tam tikrų vandens baseino dalių su sąlyga, kad tai netrukdytų sustabdyti baltmės (vitiligo) plitimo;

ii) priežiūros zona nustatoma už apsaugos zonos ribų ir yra:

(1) jūrų plotuose – aplink apsaugos zoną esantis plotas, kuriame sutampa kelios potvynių zonos; arba zona aplink apsaugos zoną, kurios spindulys 10 km atstumu nuo apsaugos zonos; arba lygiavertis plotas, nustatytas pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis; arba

(2) gėluosiuose vandenyse – didesnis plotas aplink nustatytą apsaugos zoną;

b) visuose apsaugos zonoje esančiuose ūkiuose, kuriuose auginami Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių vėžiagyviai, tačiau kurie nėra oficialiai paskelbti baltme (vitiligo) užkrėsti ūkiai, turi būti atliktas oficialus tyrimas, per kurį mažų mažiausiai būtų:

i) tyrimams paimti 10 vėžiagyvių mėginiai, jei pastebėta baltmės (vitiligo) infekcijai būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, arba 150 vėžiagyvių mėginiai, jei klinikinių ar patanatominių požymių nepastebėta; ir

ii) vieną kartą patikrinta vėžiagyvių sveikata; tuose ūkiuose, kuriuose gauti neigiami i papunktyje nurodytų tyrimų rezultatai, sveikata toliau tikrinama kartą per mėnesį tuo metų laiku, kai vandens temperatūra paprastai siekia aukščiausią metų temperatūros lygį, iki apsaugos zonos panaikinimo pagal I.2.2.1 punkto c papunktį.

c) visi oficialiai paskelbti baltme (vitiligo) užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas. Pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės. Ištuštinus visus oficialiai paskelbtus užkrėstus ūkius, bent trys savaitės skiriamos suderintam pūdymui. Šios pastraipos nuostatos taikomos ir naujiems ūkiams, kurie oficialiai paskelbti užkrėstais ūkiais įgyvendinant likvidavimo programą.

Po pūdymo oficialiai paskelbtuose užkrėstuose ūkiuose apsaugos zonos tampa priežiūros zonomis.

Kompetentinga institucija gali nuspręsti, kad ištuštinti, išvalyti, išdezinfekuoti ir palikti kaip pūdymą reikia ir kitus nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančius ūkius. Pūdymo laikotarpio trukmę kompetentinga institucija nustato kiekvienu atveju atlikusi rizikos vertinimą;

d) visų oficialiai paskelbtų užkrėstų ūkių ir visų kitų nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose esančių ūkių, kuriuose paliktas pūdymas, ištekliai atkuriami:

i) tiekiant vėžiagyvius iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo); arba

ii) pereinamuoju laikotarpiu iki 2020 m. gruodžio 31 d. tiekiant vėžiagyvius iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose įgyvendinama patvirtinta baltmės (vitiligo) priežiūros programa.

Ūkių ištekliai atkuriami tik po to, kai visi oficialiai paskelbti baltme (vitiligo) užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas pagal I.2.2.1 punkto c papunktį;

e) visuose Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių vėžiagyvių auginimo ūkiuose, esančiuose valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame įgyvendinama likvidavimo programa, o kai būtina vykdyti laukinių populiacijų priežiūrą – ir pagal tos direktyvos V priedo I dalies 2 punkto antrą pastraipą pasirinktose laukinių populiacijų mėginių ėmimo vietose vėliau turi būti įgyvendinama bent I.2.1 punkte nurodyta programa.

I.2.2.2. Reikalavimai dėl ligos neapimtos teritorijos statuso grąžinimo žemyniniams teritoriniams vienetams, kuriuose yra vienintelis ūkis, pirmiau paskelbtas baltme (vitiligo) neužkrėstu ūkiu

Kai žemyniniame teritoriniame vienete yra vienintelis ūkis, kuriame nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo) ir kurio gyvūnų sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, nėra priklausoma nuo aplinkinių gamtinių vandens telkinių pagal Direktyvos 2006/88/EB V priedo II dalies 3 punktą, tačiau jo sveikatos būklės I kategorijos statusas panaikintas pagal direktyvos 53 straipsnio 3 dalį, I kategorijos sveikatos būklės statusas jam gali būti grąžintas iškart, kai tik kompetentinga institucija įsitikina, kad tenkinamos šios sąlygos:

a) baltme (vitiligo) užkrėstas ūkis yra ištuštintas, išvalytas, išdezinfekuotas ir jame paliktas pūdymas; pūdymo laikotarpio trukmė – bent šešios savaitės;

b) baltme (vitiligo) užkrėsto ūkio ištekliai atnaujinti tiekiant vėžiagyvius iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo).

I.3. Konkretūs reikalavimai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės, susijusios su baltme (vitiligo), statusą

Kai norint išlaikyti I kategorijos sveikatos būklės statusą turi būti vykdoma kryptinga priežiūra, kaip numatyta Direktyvos 2006/88/EB 52 straipsnyje, visuose tos valstybės narės, zonos arba teritorinio vieneto ūkiuose, kuriuose auginami direktyvos IV priedo II dalyje išvardytų šiai ligai imlių rūšių vėžiagyviai, tikrinama sveikata ir imami mėginiai pagal II skirsnyje pateiktą 6B lentelę, atsižvelgiant į to ūkio užkrėtimo baltme (vitiligo) rizikos lygį.

Valstybėse narėse, zonose arba teritoriniuose vienetuose, kuriuose yra nedaug ūkių ir vykdant kryptingą priežiūrą tuose ūkiuose negaunama pakankamai epidemiologinių duomenų, į priežiūros programas, įgyvendinamas siekiant išlaikyti ligos neapimtos teritorijos statusą, įtraukiamos ir pagal I.1 punkte nustatytus reikalavimus pasirinktos mėginių ėmimo vietos.

Tos mėginių ėmimo vietos tikrinamos ir mėginiai jose imami kasmet pakaitomis po 50 % visų mėginių ėmimo vietų. Mėginiai imami kaip nurodyta II skirsnio 6B lentelėje. Mėginiai atrenkami, paruošiami ir ištiriami taikant II skirsnyje nustatytus diagnostinius ir mėginių ėmimo metodus, o jų laboratorinių tyrimų dėl baltmės (vitiligo) užkrato rezultatai turi būti neigiami.

Ligos neapimtos teritorijos statusas išlaikomas tik tol, kol visų mėginių tyrimų II.2 punkte nustatytais diagnostiniais ir mėginių ėmimo metodais dėl baltmės (vitiligo) rezultatai yra neigiami ir visi įtarimai dėl šios ligos buvimo paneigiami atlikus oficialų tyrimą ir taikant II.3 punkte nustatytus diagnostinius metodus.

I.4. Reikalavimai norint nebetaikyti Direktyvos 2006/88/EB 39 straipsnyje nurodytų izoliavimo priemonių dėl baltmės (vitiligo), t. y. pakeisti sveikatos būklės kategoriją iš V į III

Valstybėje narėje, zonoje arba teritoriniame vienete, kuriame nustatyta V kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo), gali būti nustatyta III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su šia viena iš išvardytų ligų, jeigu:

a) laikomasi reikalavimų, nustatytų I.2.2.1 punkto a, b ir c papunkčiuose. Tuo atveju, jei palikti pūdymo techniškai neįmanoma, tuose ūkiuose taikoma alternatyvi priemonė, kuria beveik taip pat patikimai garantuojama, kad baltmės (vitiligo) virusas bus išnaikintas iš ūkio aplinkos;

b) visų oficialiai paskelbtų baltme (vitiligo) užkrėstų ūkių ir visų kitų ūkių, kuriuose paliktas pūdymas arba pagal a papunktį taikytos alternatyvios priemonės, esančių nustatytose apsaugos ir priežiūros zonose, ištekliai atkurti tiekiant vėžiagyvius iš valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų, kuriuose nustatyta I, II arba III kategorijos sveikatos būklė, susijusi su baltme (vitiligo);

c) ištekliai atkurti tik po to, kai visi oficialiai paskelbti baltme (vitiligo) užkrėsti ūkiai ištuštinami, išvalomi, išdezinfekuojami ir juose paliekamas pūdymas arba taikomos alternatyvios priemonės pagal a papunktį;

d) dvejų metų laikotarpiu po to, kai baigtos taikyti a ir b papunkčiuose nurodytos priemonės, neaptikta jokių užkrėtimo baltme (vitiligo) atvejų, o tuo laikotarpiu kilę įtarimai dėl šios infekcijos paneigti pagal II.3 punkte nustatytas procedūras.

II. **Diagnostiniai ir mėginių ėmimo metodai**

II.1. Mėginiai

Bandomojo gyvūno išorinio epidermio, išpjauto arba paimto iš vaikščiojamųjų kojų, pleopodijų, burnos organų arba žiaunų, pavyzdžiai prieš ruošiant mėginius dviejų etapų polimerazės grandininei reakcijai (PGR) užfiksuojami 95 % etanoliu.

Kitus histologiniam tyrimui ir tyrimui peršviečiamuoju elektroniniu mikroskopu užfiksuotus mėginius galima naudoti PGR diagnostiniams duomenims patvirtinti.

II.2. Diagnostiniai metodai, taikomi siekiant gauti arba išlaikyti ligos (baltmės (vitiligo)) neapimtos teritorijos statusą

Siekiant gauti arba išlaikyti ligos (baltmės (vitiligo)) neapimtos teritorijos statusą pagal II priedo 6 dalyje išsamiai aprašytus metodus ir procedūras taikomas diagnostinis metodas yra dviejų etapų PGR.

Gautą teigiamą dviejų etapų PGR rezultatą, prieš imantis Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnyje nurodytų pradinių kontrolės priemonių, reikia patvirtinti nustatant amplikono genų seką ir, kai įmanoma praktinėmis sąlygomis, histologiniu tyrimu ir tyrimu peršviečiamuoju elektroniniu mikroskopu įrodant, kad atrinkti šiai ligai imlūs šeimininkai turi patognominių užkrėtimo baltme (vitiligo) požymių.

II.3. Oficialaus tyrimo ir diagnostiniai metodai, taikomi siekiant patvirtinti baltmės (vitiligo) infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus

Kai reikia patvirtinti arba paneigti kilusį įtarimą dėl baltmės (vitiligo) infekcijos pagal Direktyvos 2006/88/EB 28 straipsnį, turi būti atliekama tokia tikrinimo, mėginių ėmimo ir tyrimo procedūra:

a) atliekant oficialų tyrimą bent kartą patikrinama vėžiagyvių sveikata ir paimamas vienas 10 vėžiagyvių mėginys, jei pastebėta baltmės (vitiligo) infekcijai būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, arba bent 150 vėžiagyvių mėginys, jei klinikinių ar patanatominių požymių nepastebėta. Mėginiai ištiriami taikant II.2 punkte nustatytus diagnostinius metodus (dviejų etapų PGR);

b) baltmės (vitiligo) buvimas patvirtinamas, kai atlikus dviejų etapų PGR, įskaitant sekos nustatymą, pagal šioje II priedo 6 dalyje išsamiai aprašytus metodus ir procedūras gaunamas teigiamas baltmės (vitiligo) viruso buvimą patvirtinantis rezultatas ir kai tyrimui atrinkti šeimininkai turi patognominių užkrėtimo baltme (vitiligo) požymių.

Dėl baltmės (vitiligo) kilusį įtarimą galima paneigti, jei atlikus tuos tyrimus negaunama daugiau jokių baltmės (vitiligo) buvimo įrodymų.

6A lentelė.

Valstybių narių, zonų ir teritorinių vienetų priežiūros sistema dvejų metų kontrolės laikotarpiu, po kurio jiems suteikiamas ligos (baltmės (vitiligo)) neapimtos teritorijos statusas, kaip nurodyta I.2.1 punkte

	Klinikinių tikrinimų skaičius per metus	Laboratorinių tyrimų skaičius per metus	Vėžiagyvių skaičius mėginyje
Ūkiai, mėginių ėmimo vietos	1	1	150

6B lentelė.

Valstybių narių, zonų arba teritorinių vienetų priežiūros sistemos, taikomos siekiant išlaikyti ligos (baltmės (vitiligo)) neapimtos teritorijos statusą, kaip nurodyta I.3 punkte

Rizikos lygis	Sveikatos tikrinimų skaičius	Laboratorinių tyrimų skaičius	Vėžiagyvių skaičius mėginyje
Didelis	1 kartą per metus	1 kartą per 2 metus	150
Vidutinis	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 2 metus	150
Mažas	1 kartą per 2 metus	1 kartą per 4 metus	150

II PRIEDAS

IŠSAMŪS DIAGNOSTINIAI METODAI IR PROCEDŪROS

I. **Įžanga**

Šiame priede nustatytos išsamios diagnostinių metodų taikymo procedūros atliekant laboratorinį tyrimą pagal šio sprendimo I priede nustatytas likvidavimo ir priežiūros programas ir siekiant patvirtinti arba paneigti įtarimą dėl toliau nurodytų neegzotinių ligų, kurios išvardytos Direktyvos 2006/88/EB IV priedo II dalyje (toliau – išvardytos ligos), pagal direktyvos 57 straipsnio b punktą:

1.	Virusinė hemoraginė septicemija (VHS)	1 dalis
2.	Infekcinė hematopoetinė nekrozė (IHN)	1 dalis
3.	Koi herpeso virusinė (KHV) infekcija	2 dalis
4.	Infekcinė lašišų anemija (ILA)	3 dalis
5.	Marteiliozės (*Marteilia refringens*) infekcija	4 dalis
6.	Bonamiozės (*Bonamia ostreae*) infekcija	5 dalis
7.	Baltmė (vitiligo)	6 dalis

II. **Sąvokų apibrėžtys**

Šiame priede gabenimo terpe vadinama ląstelių kultūros terpė, į kurios 1 ml dėta 10 % veršelio serumo ir 200 TV penicilino, 200 μg streptomicino ir 200 μg kanamicino arba kitų patvirtinto veiksmingumo antibiotikų.

1 DALIS

INFEKCINĖS HEMATOPOETINĖS NEKROZĖS (IHN) IR VIRUSINĖS HEMORAGINĖS SEPTICEMIJOS (VHS) PRIEŽIŪROS IR BUVIMO PATVIRTINIMO IŠSAMŪS DIAGNOSTINIAI METODAI IR PROCEDŪROS

I. **VHS ir IHN priežiūros diagnostiniai metodai ir procedūros**

Imant mėginius ir atliekant laboratorinį tyrimą, kai siekiama gauti arba išlaikyti ligos (IHN arba VHS) neapimtos teritorijos statusą, kaip nustatyta I priedo 1 dalies I skirsnyje, to paties priedo 1 dalies II.1 ir II.2 punktuose nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi tolesniuose I.1–I.6 punktuose išsamiai aprašyti diagnostiniai metodai ir procedūros.

I.1. Žuvų mėginių paruošimas ir gabenimas

I.1.1. Audiniai virusologiniam ląstelių kultūros tyrimui

Organų, kuriuos reikia ištirti, dalys prieš išgabenant arba perduodant laboratorijai išimamos iš žuvies steriliais skrodimo įrankiais ir įdedamos į sterilius plastikinius mėgintuvėlius, į kuriuos įpilta gabenimo terpės.

Virusologiniam tyrimui ląstelių kultūroje ir AT qPGR metodu tinkamos žuvies medžiagos kiekis priklauso nuo žuvies dydžio. Taigi, mėginiams imami šie audiniai: visa lerva su trynio maišeliu (kūno ilgis < 4 cm), vidaus organai, įskaitant inkstus (kai žuvies kūno ilgis 4–6 cm), o kai žuvys didesnės, imami inkstai, blužnis, širdis ir (arba) galvos smegenys; iš veisimui skirtų žuvų neršto metu paimama kiaušidžių skysčio.

Kiaušidžių ar sėklidžių skystį arba organų gabalėlius, paimtus iš daugiausia 10 žuvų, galima dėti į vieną sterilų mėgintuvėlį, į kurį įpilta bent 4 ml gabenimo terpės ir iš kurių sudaromas vienas bendras mėginys. Kiekvieno mėginio audiniai kartu turi sverti ne mažiau kaip 0,5 g.

Virusologinį ląstelių kultūros tyrimą būtina pradėti kuo greičiau, ne vėliau kaip per 48 valandas po mėginių paėmimo. Išimtiniais atvejais virusologinį tyrimą galima pradėti vėliausiai per 72 valandas po to, kai surinkta medžiaga, su sąlyga, kad tyrimui skirta medžiaga būtų apsaugota naudojant gabenimo terpę ir kad ją gabenant būtų įmanoma laikytis reikalavimų dėl temperatūros.

I. 1.2. Atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos (AT PGR arba AT qPGR) analizei imami mėginiai

Žuvų mėginiai I.1.1 punkte aprašyta tvarka paimami steriliu instrumentu ir įdedami į sterilų plastikinį mėgintuvėlį, į kurį įpilta gabenimo terpės. Į vieną mėgintuvėlį galima dėti daugiausia 10 žuvų audinių mėginius, iš kurių bus sudarytas vienas bendras mėginys. Tačiau tuo atveju, kai naudojamas mažas pasėlio kiekis, galima naudoti daugiausia penkių žuvų audinius. Kitu atveju mėginius galima sujungti naudojant RNR stabilizavimo reagentus, kaip antai 0,2 g audinio/ml reagentą pagal gamintojų rekomendacijas, nors kiekviena žuvis turi būti apdorojama atskirai ir mėginiuose jų sujungti negalima, nes RNR išskyrimui naudojamas nedidelis medžiagos kiekis.

Į laboratoriją galima siųsti ir visą žuvį.

I.2. Žuvų mėginių siuntimas

Mėgintuvėliai su ląstelėms auginti arba AT PGR ar AT qPGR analizei skirtais žuvų audiniais gabenimo terpėje sudedami į izoliuotas talpyklas, kaip antai polistireno dėžes storomis sienelėmis, kartu įdedant pakankamai ledo arba kitos panašaus aušinamojo poveikio aušinimo terpės, kad būtų užtikrinta, jog mėginiai į laboratoriją bus gabenami atšaldyti. Tačiau būtina stengtis mėginių neužšaldyti. Mėginio temperatūra gabenimo metu niekada neturi viršyti 10 °C, o gavus gabenimo dėžę joje vis dar turi būti ledo arba vienas ar keli iš dalies arba visiškai užšalę šaldymo blokai.

Į laboratoriją galima siųsti visą žuvį, jei ją gabenant įmanoma laikytis pirmoje pastraipoje nurodytų reikalavimų dėl temperatūros. Visa žuvis suvyniojama į sugeriamąjį popierių ir galiausiai gabenama plastikiniame maiše. Galima gabenti ir gyvas žuvis.

I.3. Papildomos diagnostikai skirtos medžiagos rinkimas

Jei diagnostikos laboratorija sutinka, galima rinkti ir kitus žuvų audinius ir juos ruošti papildomiems tyrimams.

I.4. Mėginių paruošimas ląstelių kultūros tyrimui ir AT qPGR

I.4.1. Užšaldymas išimtiniais atvejais

Jei kyla praktinių sunkumų, dėl kurių mėginių neįmanoma apdoroti per 48 valandas po to, kai surinkti žuvų audiniai, gali būti tinkama užšaldyti audinių pavyzdžius gabenimo terpėje – 20 °C arba žemesnėje temperatūroje ir atlikti virusologinį tyrimą per 14 dienų. Tačiau prieš tyrimą audiniai užšaldomi ir atšildomi tik vieną kartą. Dokumentuose būtina išsamiai užrašyti priežastis, dėl kurių žuvų audinių mėginiai kiekvienu atveju buvo užšaldyti.

I.4.2. Organų homogenizavimas

Laboratorijoje žuvų audiniai mėgintuvėliuose turi būti visiškai homogenizuoti smulkintuvu, maišytuvu arba grūstuvu piestoje su steriliu smėliu ir tada suspenduoti naudotoje gabenimo terpėje.

Jei mėginį sudaro visa žuvis, trumpesnė nei 4 cm, ji susmulkinama steriliomis žirklėmis arba skalpeliu, prieš tai pašalinus kūno dalį, esančią už žarnos angos. Jei mėginį sudaro visa žuvis, kurios kūno ilgis 4–6 cm, surenkami visi vidaus organai, įskaitant inkstus. Jeigu mėginį sudaro visa žuvis, ilgesnė nei 6 cm, audinių pavyzdžiai imami taip, kaip apibūdinta I.1 punkte. Audinių pavyzdžiai susmulkinami steriliomis žirklėmis arba skalpeliu, homogenizuojami šio punkto pirmoje pastraipoje aprašytu būdu ir suspenduojami gabenimo terpėje.

Galutinis audinio medžiagos ir gabenimo terpės santykis laboratorijoje turi būti patikslintas iki 1:10.

I.4.3. Homogenato centrifugavimas

Homogenatas 15 minučių centrifuguojamas 2 000–4 000 × g šaldomoje centrifugoje, 2–5 °C temperatūroje; taip gaunamas supernatantas, kurį galima apdoroti antibiotikais 4 valandas 15 °C temperatūroje arba per naktį 4–8 °C temperatūroje. Jei mėginys atgabentas gabenimo terpėje, supernatanto antibiotikais apdoroti nebūtina.

Jei dėl praktinių sunkumų, pvz., inkubatoriaus gedimo ar dėl ląstelių kultūrų kilusių problemų, ląstelių neįmanoma inokuliuoti per 48 valandas po to, kai surinkti žuvų audinių mėginiai, galima užšaldyti supernatantą – 80 °C temperatūroje; tokiu atveju galima atlikti virusologinį tyrimą per 14 dienų.

Jei gautas supernatantas per 48 valandas po to, kai paimti mėginiai, užšaldomas iki – 80 °C temperatūros, jį virusologiniam tyrimui galima pakartotinai panaudoti tik vieną kartą.

Prieš inokuliuojant ląsteles supernatantas lygiomis dalimis sumaišomas su tinkamai atskiestų imuninių serumų, veikiančių prieš vietinės kilmės serologinių tipų infekcinės kasos nekrozės (IKN) virusus, mišiniu ir inkubuojamas bent vieną valandą 15 °C arba ilgiausiai 18 val. 4 °C temperatūroje. Atliekant 50 % plokštelių neutralizacijos testą imuninio serumo titras turi būti bent 1/2 000.

Visus pasėlius apdorojant IKN viruso imuniniu serumu siekiama išvengti citopatinio efekto (CPE) dėl IKN viruso buvimo inokuliuotose ląstelių kultūrose. Taip sutrumpėja virusologinių tyrimų trukmė ir sumažėja atvejų, kai pastebėtą citopatinį efektą reikėtų laikyti potencialiu VHS arba IHN viruso buvimo požymiu.

Gavus mėginius iš gamybos vienetų, laikomų neužkrėstais IKN, pasėlių imuniniu serumu dėl IKN viruso galima neapdoroti.

I.4.4. Mėginių paruošimas pagal AT PGR ir AT qPGR grindžiamos priežiūros programas

Jei mėginiai sudėti į gabenimo terpę, atliekama I.4.2 ir I.4.3 punktuose nurodyta procedūra. Po centrifugavimo gaunamas supernatantas ir iš jo išskiriama RNR. Jei tolesnio tyrimo iškart po centrifugavimo atlikti nenumatoma, mėginiai iškart užšaldomi – 20 °C ar žemesnėje temperatūroje.

Ruošiant analizei RNR stabilizavimo reagente užkonservuotus žuvų audinius, tolesni darbai atliekami per toliau nurodytus terminus priklausomai nuo to, kokioje temperatūroje laikomi mėginiai:

kai mėginiai laikomi 37 °C temperatūroje – viena diena;

kai mėginiai laikomi 25 °C temperatūroje – viena savaitė;

kai mėginiai laikomi 4 °C temperatūroje – vienas mėnuo;

kai mėginiai laikomi – 20 °C temperatūroje – neribotą laiką.

Sujungti bendri mėginiai RNR stabilizavimo reagente tvarkomi taip pat, kaip ir pavieniai RNR stabilizavimo reagente užkonservuoti mėginiai. Naudojant RNR stabilizavimo reagente sujungtus bendrus mėginius, mėginio kiekis neturi viršyti RNR išskyrimo priemonių rinkinių gamintojo rekomenduojamo kiekio naudojant tokius rinkinius, kaip antai „RneasyMini“ („Qiagen“) ar pan. Jei didesni mėginiai sujungiami, ekstrahavimo rinkinių ar metodai turi atspindėti šį sujungimą.

RNR stabilizavimo reagentuose užkonservuoti mėginiai nenaudojami ląstelėms auginti.

I.4.5. AT qPGR naudojamų mėginių sujungimas

Kadangi AT qPGR metodo pagal nustatytus protokolus jautris yra panašus arba dar didesnis negu ląstelių auginimo metodų, gali būti tinkama naudoti supernatantą iš homogenizuotos žuvų audinių medžiagos, gautos kartu sudėjus daugiausia 10 žuvų organus į PGR skirtą ląstelių kultūros terpę. Tačiau kadangi PGR naudojama kur kas mažiau pasėlio negu auginant ląsteles, prieš sujungiant DNR išskyrimui skirtą medžiagą visi žuvų audiniai turi būti kruopščiai homogenizuoti.

Tas pats principas taikomas ir tada, kai surinkti mėginiai laikomi RNR stabilizavimo reagentuose. Tačiau tokiu atveju dažnai sunku viename mėgintuvėlyje surinkti tipinę medžiagą iš žuvų, kurių gali būti iki 10, todėl žuvų skaičius bendrame mėginyje sumažinamas nuo 5 iki 2.

I.5. Virusologinis ląstelių kultūros tyrimas

I.5.1. Ląstelių kultūros ir terpės

Melsvažiaunių saulešerių mailiaus ląstelių linijos -2 (BF-2) arba vaivorykštinio upėtakio lytinių liaukų ląstelių linijos -2 (RTG-2) ir *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) arba juodųjų drūtagalvių rainių (FHM) ląstelės auginamos 20–30 °C temperatūroje tinkamoje terpėje, t. y. minimalioje pagrindinėje terpėje Eagle MEM arba modifikuotuose jos variantuose, papildomai įdėjus 10 % galvijų vaisiaus serumo ir standartinės koncentracijos antibiotikų.

Kai ląstelės auginamos uždengtuose indeliuose, į terpę įpilama hidrokarbonato buferinio tirpalo. Auginant ląsteles atviruose induose į terpę galima įpilti tris(hidroksimetil)aminometan-HCl (Tris-HCl) (23 mM) ir natrio hidrokarbonato (6 mM) buferinio tirpalo. Terpės pH turi būti 7,6 ± 0,2.

Žuvų audinių medžiaga inokuliuojamos ląstelių kultūros, kai įmanoma, turėtų būti sudarytos iš jaunų, paprastai vienos dienos ląstelių kultūros monosluoksnių; tačiau gali būti tinkama naudoti 4–48 val. amžiaus ląsteles. Ląstelės inokuliavimo metu turi būti aktyviai augančios.

I.5.2. Ląstelių kultūrų inokuliavimas

Ląstelių kultūros inokuliuojamos antibiotikais apdorota organų suspensija atskiedžiant dviem skirtingais santykiais, t. y. praskiedžiant pirmą kartą ir papildomai iki 1:10; taip, siekiant išvengti homologinės interferencijos, gaunamos galutinės audinio medžiagos koncentracijos ląstelių kultūros terpėje santykiu 1:100 ir 1:1 000. Inokuliuojamos bent dviejų linijų ląstelės, kaip nurodyta I.5.1 punkte. Pasėlio dydžio ir ląstelių kultūros terpės tūrio santykis turi būti apie 1:10.

Kiekvienos koncentracijos atskiestam mėginiui ir kiekvienai ląstelių linijai reikalingas bent apie 2 cm^2 dydžio ląstelių plotas (tam tinka viena duobutė 24 duobučių laboratorinėje plokštelėje, skirtoje ląstelių kultūroms auginti). Kai įmanoma, reikia naudoti laboratorines plokšteles.

I.5.3. Ląstelių kultūrų inkubavimas

Inokuliuotos ląstelių kultūros 7–10 dienų inkubuojamos 15 °C temperatūroje. Jeigu ląstelių kultūros terpės spalva pasikeičia iš raudonos į geltoną (tai reiškia, kad terpė parūgštėjo), pH tikslinamas įpilant sterilaus hidrokarbonato tirpalo ar lygiaverčio poveikio medžiagų, kad būtų užtikrintas ląstelių imlumas viruso užkratui.

Bent kas šešis mėnesius arba jei įtariamas ląstelių imlumo užkratui sumažėjimas, atliekamas užšaldytų VHS ir IHN virusų atsargų titravimas tikrinant ląstelių kultūrų imlumą užkratui. Jei įmanoma, atliekama III skirsnyje nurodyta procedūra.

I.5.4. Mikroskopija

Inokuliuotos ląstelių kultūros reguliariai, bent tris kartus per savaitę, apžiūrimos 40–150 kartų didinančiu mikroskopu siekiant pastebėti citopatinį efektą. Pastebėjus citopatinį efektą iškart pradedamos viruso identifikavimo procedūros pagal I.6 punktą.

I.5.5. Persėjimas

Jei citopatinis efektas nepasireiškia po pirmųjų 7–10 inkubavimo dienų, atliekamas persėjimas į naujas ląstelių kultūras, kurių ląstelių užimamas plotas turi būti toks pats kaip ir pradinės kultūros.

Po inokuliavimo praėjus 7–10 dienų sujungiami daliniai terpės (supernatanto) mėginiai iš visų kultūrų arba laboratorinės plokštelės duobučių, kuriose laikoma pradinė kultūra, pagal ląstelių liniją. Tada šiais bendrais mėginiais inokuliuojamos homologinių ląstelių kultūros, neatskiedžiant ir atskiedžiant santykiu 1:10 (galutinis supernatanto atskiedimas atitinkamai turi būti 1:10 ir 1:100), kaip apibūdinta I.5.2 punkte. Kitu atveju daliniais mėginiais, kuriuose yra 10 % pradinės kultūros terpės, tiesiogiai inokuliuojama laboratorinės plokštelės duobutė su naujų ląstelių kultūra (persėjimas iš duobutės į duobutę). Prieš inokuliavimą gali būti atliekamas išankstinis inkubavimas tinkamu santykiu atskiedus tirpalus IKN virusui skirtu imuniniu serumu, kaip apibūdinta I.4.3 punkte.

Tada inokuliuotos kultūros 7–10 dienų inkubuojamos 15 °C temperatūroje ir patikrinamos pagal I.5.4 punktą.

Jei toksinis citopatinis efektas pasireiškia per pirmas tris inkubavimo dienas, persėjimas atliekamas šiame etape, tačiau tokiu atveju ląstelės inkubuojamos septynias dienas, dar kartą persėjamos ir inkubuojamos dar septynias dienas. Jei toksinis citopatinis efektas pasireiškia po trijų dienų, ląstelės persėjamos vieną kartą ir inkubuojamos iš viso 14 dienų po pradinio inokuliavimo. Paskutines septynias inkubavimo dienas neturi būti toksinio poveikio požymių.

Jei užkrėtimas bakterijomis įvyksta nepaisant apdorojimo antibiotikais, prieš persėjimą atliekamas centrifugavimas 15–30 minučių 2 000–4 000 × g 2–5 °C temperatūroje arba supernatantas perkošiamas per 0,45 µm dydžio akučių filtrą, arba atliekamos abi šios procedūros (naudojama nedidelio molekulinio svorio baltymus prijungianti membrana). Be to, persėjimas atliekamas pagal tas pačias procedūras kaip ir toksinio citopatinio efekto atveju, kaip aprašyta šio punkto ketvirtoje pastraipoje.

Jei citopatinio efekto nėra, galima patvirtinti, kad tyrimo rezultatas yra neigiamas.

I.6. Viruso identifikavimas

Nustačius citopatinį efektą ląstelių kultūroje, jos terpė (supernatantas) paimama ir ištiriama taikant vieną arba kelis iš šių metodų: imunofermentinę analizę (IFA), imunofluorescencinį (IF) metodą, neutralizacijos metodą, AT PGR arba AT qPGR. Jei šiais tyrimais nepavyksta patikimai identifikuoti viruso per vieną savaitę, supernatantas siunčiamas nedelsiant identifikuoti į nacionalinę etaloninę laboratoriją arba ES etaloninę laboratoriją, kurioje atliekami žuvų ligų tyrimai, kaip nurodyta Direktyvos 2006/88/EB VI priede.

I.6.1. Imunofermentinė analizė (IFA)

Identifikuojant viruso izoliatą atliekama daugiasluoksnė imunofermentinė analizė (IFA) su dvejopais antikūnais. Mikrotitravimo plokštelės padengiamos į kiekvieną duobutę įpilant po 50 µl (0,9 pg) patvirtintos kokybės A baltymu išgrynintų imunoglobulinų (Ig) iš triušio imuninių serumų, veikiančių prieš INH arba VHS virusą, atskiestų karbonato buferiniu tirpalu (pH – 9,6), į kurį dėta 15 mM natrio azido, ir nuo 18 valandų iki 2 savaičių inkubuojamos 4 °C temperatūroje.

Skiedimo lėkštelėje kiekvienas mėginys, į kurį dėta 1 % „Triton" X-100, ir teigiami kontroliniai mėginiai atskiedžiami buferiniu tirpalu (t. y. fosfato buferiniu druskų tirpalu (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) keturiomis skirtingomis koncentracijomis: neskiestas mėginys, 1:4, 1:16 ir 1:64 santykiu atskiestas mėginys. IFA plokštelės nuplaunamos fosfato buferiniu druskų tirpalu, į kurį dėta 0,05 % „Tween-20" (PBS-T), ir po 50 µl kiekvienos koncentracijos atskiesto mėginio iš skiedimo lėkštelės paskirstoma ant nuplautos ir, kaip pirmiau aprašyta, padengtos IFA plokštelės.

Tada IFA plokštelės 30 minučių inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Po to plokštelės nuplaunamos ir 30 minučių inkubuojamos 37 °C temperatūroje su specifiniais monokloniniais antikūnais (t. y. identifikuojant VHS virusą – Mab IP5B11, identifikuojant IHN virusą – Hyb 136–3). Ant IFA plokštelės paskirstoma po 50 µl triušio antikūnų veikiamų pelės antikūnų krienų peroksidazės (HRP) konjugato, 1:1 000 santykiu praskiesto PBS-T-BSA.

Galiausiai po pakartotinio plovimo, į kiekvieną plokštelės duobutę įpylus po 50 µl orto-fenilendiamino (OPD), vyksta reakcijos. IFA plokštelės 20 minučių inkubuojamos tamsoje, kambario temperatūroje ir reakcija sustabdoma į kiekvieną duobutę įpilant po 100 µl 0,5 M H_2SO_4.

Sugerties geba stebima IFA analizatoriumi (bangų ilgis 492 ir 620 nm). Mėginiai pripažįstami teigiamais arba neigiamais palyginus tyrimo rezultatus su teigiamų ir neigiamų kontrolinių mėginių sugerties vertėmis. Apskritai neigiamais laikomi tie mėginiai, kurių bendra sugerties geba (A) < 0,5 (neatskiestos medžiagos), įtartinais – mėginiai, kurių A vertės yra nuo 0,5 iki 1,0, o teigiamais – mėginiai, kurių A vertės > 1,0.

Vietoj šiame punkte nurodytų variantų galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo IFA variantus.

I.6.2. Imunofluorescencinis (IF) tyrimas

Į sąrašą įtrauktų VHS ir IHN virusų užkratas identifikuojamas jais užkrečiant ląsteles 96 duobučių „Black" plokštelėse, įprastose 24 duobučių plokštelėse arba naudojant dengiamąsias stiklo plokšteles su 24 duobučių plokštelėmis. Kai IHN, VHS ar abu virusai identifikuojami jais užkrečiant ląsteles dengiamųjų stiklo plokštelių paviršiuje, taikomas toks protokolas:

a) dengiamosios plokštelės užsėjamos ląstelėmis tokiu tankiu, kad nuo auginimo pradžios praėjus 24 valandoms jos ištisai dengtų 60–90 % ploto. Kai įmanoma, šiam tikslui reikėtų naudoti EPC ląsteles, nes jos tvirtai prikimba prie stiklo paviršiaus, tačiau galima naudoti ir kitas ląstelių linijas, kaip antai BF-2, RTG-2 arba FHM. Naudojant 150 µl ląstelių kultūros supernatanto, atskiesto dviem skirtingais santykiais (1:10 ir 1:1 000), inokuliuojamos vienos dienos monosluoksnio ląstelių kultūros po du porinius mėginius ir 24 valandas inkubuojama 15 °C temperatūroje;

b) po to ląstelių kultūros terpė pašalinama ir užkrėsti ląstelių monosluoksniai užfiksuojami 0,5 ml ledo šaltumo vandeninio acetono tirpalo (80 %, tūrio proc.). Fiksuojama po traukos gaubtu 15 minučių kambario temperatūroje, tada acetono tirpalas pašalinamas ir dengiamieji stikleliai bent 30 minučių džiovinami ore. Šiame etape plokštelės apdorojamos iškart arba laikomos – 20 °C temperatūroje iki tolesnio naudojimo;

c) specifiniai monokloniniai antikūnai (t. y. identifikuojant VHS virusą – MAb IP5B11, identifikuojant IHN virusą – Hyb 136–3) atskiedžiami 0,01 M PBS-T (pH – 7,2) tokiu santykiu, kokį rekomenduoja tų monokloninių antikūnų tiekėjas; po 50–100 µl įpilama į kiekvieną užfiksuotos monokultūros duobutę ir plokštelės vieną valandą inkubuojamos didelio drėgnio kameroje 37 °C temperatūroje;

d) dengiamieji stikleliai atsargiai tris kartus nuplaunami fosfato buferiniu druskų tirpalu, į kurį dėta 0,05 % „Tween-20“ (PBS-T); po paskutinio plovimo buferinis tirpalas turi būti visiškai pašalintas. Po to ląstelės vieną valandą inkubuojamos 37 °C temperatūroje su fluoresceino izotiocianatu (FITC) arba tetrametilrodamin-5-(ir-6-) izotiocianatu (TRITC) konjuguotais antikūnais, kaip pirminį antikūną panaudojus pelių imunoglobuliną, atskiedus pagal gamintojo nurodymus, tada dar kartą nuplaunamos PBS-T ir išdžiovinamos. Nudažytos kultūros uždedamos ant stiklo plokštelių naudojant glicerolio druskos tirpalą ir apžiūrimos ultravioletiniu (UV) mikroskopu. Tam naudojamas 10 ar 12 kartų didinantis okuliaras ir 25 ar 40 kartų didinantis objektyvas, kurio apertūros skaičius atitinkamai > 0,7 ir > 1,3.

Priklausomai nuo naudojamų ląstelių kultūrų, fiksavimo ir kontrolinės kokybės antikūnų galima taikyti ir kitus patvirtinto panašaus efektyvumo IF metodus.

I.6.3. Neutralizacija

Iš surinkto supernatanto ląstelės pašalinamos centrifuguojant (2 000–4 000 × g) arba filtruojant per membraninį (0,45 μm dydžio akučių) filtrą su nedidelio molekulinio svorio baltymus prijungiančia membrana, tada supernatantas 1:100 ir 1:10 000 santykiu praskiedžiamas ląstelių kultūros terpe.

Bent dviem skirtingais santykiais praskiesto supernatanto mėginiai sumaišomi ir inkubuojami 60 minučių 15 °C temperatūroje lygiomis dalimis su šiais reagentais, kiekvienu iš jų atskirai:

a) serumu, kurio sudėtyje yra VHS viruso antikūno, specifinio tam tikrai grupei, praskiedžiama (tūrio) santykiu 1:50;

b) serumu, kurio sudėtyje yra IHN viruso antikūno, specifinio tam tikrai grupei, praskiedžiama (tūrio) santykiu 1:50;

c) vietinės kilmės serologinių tipų IKN viruso imuninių serumų mišiniu, praskiedžiama (tūrio) santykiu 1:50;

d) gryna terpe (teigiamas kontrolinis mėginys).

Mažiausiai dvi ląstelių kultūros inokuliuojamos naudojant po 50 μl kiekvieno viruso supernatanto serumo mišinio kiekvienai ir inkubuojamos 15 °C temperatūroje. Citopatinio efekto pasireiškimas tikrinamas kaip aprašyta I. 5.4 punkte.

VHS viruso padermės ir izoliatai, kurie nereaguoja į neutralizacijos testus, identifikuojami taikant IF arba ELISA (IFA) metodus.

Vietoj šio tyrimo galima atlikti kitokius patvirtinto panašaus efektyvumo neutralizacijos tyrimus.

I.6.4. AT PGR, AT qPGR

I.6.4.1. Viruso RNR paruošimas

Visi darbai su RNR atliekami ant ledo; būtina mūvėti pirštines.

RNR išskiriama taikant fenolio-chloroformo metodą arba naudojant RNR gimiringumo sukamąsias kolonėles pagal gamintojo nurodymus. Galima naudoti RNR išskyrimo priemonių rinkinius, kurie parduodami rinkoje ir kuriuos naudojant gaunama aukštos kokybės RNR, tinkama naudoti pagal AT PGR protokolus, kaip aprašyta tolesniuose punktuose.

RNR pakartotinai suspenduojama distiliuotame vandenyje be ribonukleazių (t. y. vandenyje, į kurį dėta 0,1 % dietilpirokarbonato) arba tinkamame eliuavimo buferiniame tirpale.

I.6.4.2. AT PGR

IHN virusui aptikti naudojami šie pradmenys:

tiesioginis pradmuo 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

atvirkštinis pradmuo 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

Atliekami tokie ciklai (vieno etapo AT PGR): 1 ciklas: 30 minučių 50 °C temperatūroje; 1 ciklas: 2 minučių 95 °C temperatūroje; 30 ciklų: 30 sekundžių 95 °C temperatūroje, 30 sekundžių 50 °C temperatūroje, 60 sekundžių 72 °C temperatūroje; 1 ciklas: 7 minutės 72 °C temperatūroje; po to palaikoma 4 °C temperatūroje.

VHS virusui aptikti naudojami šie pradmenys:

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

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

Atliekami tokie ciklai (vieno etapo AT PGR): 30 minučių 50 °C temperatūroje, 15 minučių 95 °C temperatūroje, 35 ciklai po 30 sekundžių 94 °C temperatūroje, 30 sekundžių 55 °C temperatūroje ir 60 sekundžių 68 °C temperatūroje. Po to reakcijos produktas 7 minutes laikomas 68 °C temperatūroje.

AT PGR reakcijų produktų kiekis ir specifiškumas vertinamas gelio elektroforezės būdu naudojant 1,5 % agarozės gelį, į kurį dėta etidžio bromido, ir apžiūrint peršvietus ultravioletine (UV) šviesa. IHN viruso atveju galima apžiūrėti iki 693 bp PGR būdu gautą amplikoną. VHS viruso amplikono dydis – 505 bp.

PGR rezultatai gali priklausyti nuo to, kokiomis sąlygomis ji vyksta, t. y. atsižvelgiant į tai, koks termocikleris naudojamas, gali reikėti patikslinti šiluminio apdorojimo protokolus. Be to, galima gauti klaidingai teigiamų rezultatų dėl klaidingo pradmenų surišimo arba užteršimo laboratorijoje. Todėl, kad neliktų abejonių, reikia naudoti pakankamai tinkamų teigiamų ir neigiamų kontrolinių mėginių ir padaugintų genų sekų. Su VHS viruso pradmenimis BF-2 ląsteles reikia naudoti ypač atsargiai, nes šie pradmenys gali reaguoti su ląstelių linijos DNR arba RNR ir taip galima gauti klaidingai teigiamus panašaus dydžio rezultatus. Tiriant iš BF-2 ląstelių gautą supernatantą nustatoma bet kokių padaugintų PGR fragmentų genų seka.

I.6.4.3. VHS viruso nustatymas AT qPGR būdu

VHS viruso amplifikacijai naudojami šie pradmenys ir zondas:

Tiesioginis pradmuo: 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′;

atvirkštinis pradmuo: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′;

ir zondas: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Vieno etapo AT qPGR

Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Ciklinio apdorojimo sąlygos: 30 minučių 50 °C temperatūroje, 15 minučių 95 °C temperatūroje, 40 ciklų po 15 sekundžių 94 °C temperatūroje, 40 sekundžių 60 °C temperatūroje, 20 sekundžių 72 °C temperatūroje; prireikus ciklas tikslinamas. Vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo AT PGR arba AT qPGR variantus.

I.6.4.4. IHN viruso nustatymas AT qPGR būdu

IHN viruso amplifikacijai naudojami šie pradmenys ir zondas:

Tiesioginis pradmuo: 5′- AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′;

atvirkštinis pradmuo: 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3′;

ir zondas: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Dviejų etapų AT qPGR

Kadangi tolesnė analizė priklauso nuo dviejų etapų amplifikacijos, reikia ypač atsargiai tvarkyti mėgintuvėlius nuo vienos reakcijos iki kitos, stengiantis jų neužteršti.

Ciklinio apdorojimo sąlygos (po atvirkštinės transkripcijos etapo): 2 minutės 50 °C temperatūroje, 10 minučių 95 °C temperatūroje, po to 40 ciklų po 15 sekundžių 95 °C temperatūroje ir 1 minutę 60 °C temperatūroje; prireikus ciklas tikslinamas.

Vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo AT PGR arba AT qPGR variantus.

II. **Išsamūs diagnostiniai metodai ir procedūros siekiant patvirtinti arba paneigti VHS, IHN ar abiejų virusų buvimą įtariamų šių ligų protrūkių atvejais**

Kai reikia atlikti laboratorinį tyrimą pagal Direktyvos 2006/88/EB 57 straipsnio b punktą siekiant patvirtinti arba paneigti INH, VHS ar abi ligas I priedo 1 dalies II.3 punkte nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi toliau išsamiai aprašyti diagnostiniai metodai ir procedūros:

a) įprastas viruso išskyrimas ir vėlesnė neutralizacija serumu, imunocheminis arba molekulinis viruso identifikavimas;

b) viruso aptikimas AT PGR arba AT qPGR būdu;

c) kiti diagnostiniai metodai, kaip antai netiesiogiai fluorescuojančių antikūnų tyrimas, imunofermentinė analizė, AT PGR, imunohistocheminis tyrimas.

II.1. Viruso išskyrimas įprastu būdu ir vėlesnis viruso identifikavimas

II.1.1. Mėginių atranka

Tyrimui atrenkama bent 10 žuvų, turinčių IHN arba VHS būdingų požymių.

II.1.2. Žuvų mėginių paruošimas ir gabenimas

Mėginiai, iš kurių virusas bus išskiriamas įprastu būdu, ruošiami ir gabenami pagal I.2 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.1.3. Papildomos diagnostikai skirtos medžiagos rinkimas

Papildoma medžiaga virusui išskirti įprastu būdu renkama pagal I.3 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.1.4. Mėginių paruošimas ląstelių kultūros tyrimui

Mėginiai ląstelių kultūros tyrimui, siekiant išskirti virusą įprastu būdu, ruošiami pagal I.4 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.1.5. Virusologinis ląstelių kultūros tyrimas

Virusologinis tyrimas išskiriant virusą įprastu būdu atliekamas pagal I.5 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.1.6. Viruso identifikavimas

Viruso identifikavimas išskiriant virusą įprastu būdu atliekamas pagal I.6 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.2. Viruso aptikimas AT qPGR būdu

II.2.1. Mėginių atranka

Siekiant aptikti virusą AT qPGR būdu mėginiai atrenkami pagal I.1.2 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.2.2. Žuvų mėginių paruošimas ir gabenimas

Siekiant aptikti virusą AT qPGR būdu mėginiai ruošiami ir gabenami pagal I.2 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.2.3. Papildomos diagnostikai skirtos medžiagos rinkimas

Siekiant aptikti virusą AT qPGR būdu papildoma medžiaga diagnostikai renkama pagal I.3 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.2.4. Mėginių paruošimas AT qPGR

Siekiant aptikti virusą AT qPGR būdu mėginiai ruošiami pagal I.6.4.1 punkte aprašytus metodus ir procedūras.

II.2.5. AT qPGR

Aptinkant virusą AT qPGR būdu reikia laikytis I.6.4.1, I.6.4.3 ir I.6.4.4 punktuose aprašytų metodų ir procedūrų.

II.3. Kiti diagnostiniai metodai

I.4.3 punkte aprašytu būdu paruoštą supernatantą galima naudoti atliekant imunofermentinę analizę (IFA), netiesiogiai fluorescuojančių antikūnų tyrimą (NFAT) arba AT PGR atitinkamai pagal I.6.1, I.6.2 arba I.6.4 punktą. Audinių medžiagą galima tirti ir kitais diagnostiniais metodais, kaip antai atlikti užšaldytų audinių atpjovų NFAT arba imunohistocheminiu metodu tirti formalinu užfiksuotus audinius. Kartu su šiais greitais tyrimais turi būti atliekamas virusologinis tyrimas pagal II punkto a arba b papunktį per 48 valandas po to, kai paimti mėginiai, jeigu:

a) gaunamas neigiamas rezultatas; arba

b) gaunamas teigiamas rezultatas tiriant medžiagą, kurioje aptinkamas pirmas IHN arba VHS atvejis.

III. **Titravimo procedūra tikrinant ląstelių kultūrų imlumą užkratui**

Atliekant titravimą siekiant patikrinti ląstelių kultūrų imlumą užkratui, kaip nurodyta I.5.3 punkte, reikia laikytis šio punkto tolesnėse pastraipose nurodytų procedūrų. Naudojami bent du VHS viruso izoliatai ir vienas IHN viruso izoliatas.

Izoliatai imami iš pagrindinių Europos Sąjungoje aptinkamų virusų grupių, t. y. VHS viruso atveju – vienas patogeniškas izoliatas, gautas iš gėlavandenio vaivorykštinio upėtakio, ir vienas jūrinis izoliatas, patogeniškas otui, o IHN viruso atveju – viena vaivorykštiniam upėtakiui Europos Sąjungoje patogeniška padermė. Reikia naudoti gerai žinomus izoliatus, gautus iš ES valstybių narių. Viruso partijos su mažu ląstelių kultūrų skaičiumi dauginamos ląstelių kultūrų mėgintuvėliuose; VHS virusui naudojamos BF-2 arba RTG-2 linijos ląstelės, o IHN virusui – EPC arba FHM linijos ląstelės. Naudojamoje ląstelių kultūros terpėje turi būti bent 10 % serumo. Inokuliuojant kultūras infekcijos pasikartojamumo koeficientas turi būti žemas (< 1).

Esant bendram citopatiniam efektui virusas koncentruojamas centrifuguojant ląstelių kultūros supernatantą 2 000 × g 15 minučių, sterilizuotas filtruojamas per 0,45 μm dydžio akučių membraninį filtrą ir išpilstomas į etiketėmis paženklintus kriostatinius mėgintuvėlius. Virusas laikomas – 80 °C temperatūroje.

Praėjus savaitei po užšaldymo, trys kiekvieno viruso kartotiniai buteliukai atitirpinami šaltame vandenyje ir titruojant tiriamos atitinkamos ląstelių linijos. Bent kas šešis mėnesius arba įtarus, kad ląstelių linijos imlumas virusui sumažėjo, reikia atitirpinti ir titruoti kiekvieną viruso izoliatą.

Titravimo procedūros turi būti išsamiai aprašytos ir kiekvieną kartą būtina laikytis tos pačios procedūros.

Titravimui iki galutinio atskiedimo naudojami ne mažiau kaip šeši kartotiniai mėginiai kiekviename skiedimo etape. Gauti titrai palyginami su pirmiau gautais titrais. Jei bet kurio iš trijų virusų izoliatų titras sumažėja 2 log arba daugiau, palyginti su pradiniu titru, ta ląstelių linija kontrolei nebenaudojama.

Jeigu laboratorijoje laikomos įvairios ląstelių linijos, kiekviena iš jų tiriama atskirai.

Užrašyti duomenys saugomi ne trumpiau kaip 10 metų.

2 DALIS

KOI HERPESO VIRUSINĖS (KHV) INFEKCIJOS PRIEŽIŪROS IR PATVIRTINIMO IŠSAMŪS DIAGNOSTINIAI METODAI IR PROCEDŪROS

I. **Siekiant patvirtinti KHV infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus taikomi išsamūs diagnostiniai metodai ir procedūros**

Kai reikia atlikti laboratorinį tyrimą pagal Direktyvos 2006/88/EB 57 straipsnio b punktą siekiant patvirtinti KHV infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus I priedo 2 dalies III skirsnyje nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi šios dalies I.1–I.2 punktuose išsamiai aprašyti diagnostiniai metodai ir procedūros.

I.1. Žuvų mėginių paruošimas

Diagnostikos tikslais žuvis (gyvas arba paskerstas ir atskirai supakuotas sandariose steriliose talpose) arba, kitu atveju, užšaldytus žuvų organus ar organų gabalėlius, užkonservuotus (nuo 80 % stiprumo iki absoliutaus) etanolyje arba virusų mėginių gabenimo terpėje (jie turi būti apdoroti per 48 valandas po surinkimo), galima naudoti tyrimams įprastine PGR arba qPGR pagrįstais metodais.

Siekiant aptikti KHV tyrimams renkamos žuvų žiaunos ir inkstai; kaip papildomą atskirą mėginį galima pridėti žuvies blužnį, galvos smegenis ir žarnyną. Neatidėliotinais atvejais galima į vieną bendrą mėginį sudėti daugiausia penkių žuvų audinius.

Be to, kai kuriais atvejais galima imti ir gyvų žuvų mėginius, kaip antai kraują, žiaunų tepinėlius, mėginius žiaunų biopsijos būdu, gleivių nuograndas (taip galima naudoti labai vertingų žuvų mėginius tais atvejais, kai įtariama KHV infekcija).

I.1.1. DNR išskyrimas

DNR išskiriama pagal standartines procedūras.

Galima naudoti DNR išskyrimo priemonių rinkinius, kurie parduodami rinkoje ir kuriuos naudojant gaunama aukštos kokybės DNR, tinkama naudoti pagal I.2 punkte nurodytus protokolus.

I.2. Užkrato aptikimas ir identifikavimas polimerazės grandinine reakcija (PGR) grindžiamais metodais

I.2.1. KHV aptikimas qPGR būdu

Siekiant aptikti KHV qPGR būdu, naudojamas toks qPGR analizės priemonių rinkinys:

Tiesioginis pradmuo (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

atvirkštinis pradmuo (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

zondas (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Ciklinio apdorojimo sąlygos: 1 ciklas – 15 minučių 95 °C temperatūroje, po to 40 ciklų po 15 sekundžių 94 °C temperatūroje ir 60 sekundžių 60 °C temperatūroje. Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Vis dėlto vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo qPGR variantus.

I.2.2. KHV aptikimas įprastos PGR būdu

Atliekama šiame punkte aprašyta analizė, kuria siekiama aptikti KHV timino kinazės (TK) geną. Tačiau vietoj to galima atlikti ir kitokio pobūdžio PGR analizes, kurios, kaip patvirtinta, specifiškumu ir jautriu prilygsta čia aprašytai analizei.

Tiesioginis pradmuo (KHV-TKf): 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′;

atvirkštinis pradmuo (KHV-TKr): 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Ciklinio apdorojimo sąlygos: 1 ciklas – 5 minutės 95 °C temperatūroje, po to 35 ciklai po 30 sekundžių 95 °C temperatūroje, 30 sekundžių 52 °C temperatūroje, 1 minutė 72 °C temperatūroje ir 1 ciklas 10 minučių 72 °C temperatūroje. Produkto dydis turėtų būti 409 bazių poros (bp).

PGR rezultatai gali priklausyti nuo to, kokiomis sąlygomis ji vyksta, t. y. atsižvelgiant į tai, koks termocikleris naudojamas, gali reikėti patikslinti šiluminio apdorojimo protokolus. Be to, galima gauti klaidingai teigiamų rezultatų dėl klaidingo pradmenų surišimo arba užteršimo. Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Vis dėlto vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo PGR variantus.

Pirmą kartą aptikus virusą tam tikrame plote, jo aptikimas patvirtinamas nustatant genų seką arba nusiunčiant jo mėginį nedelsiant identifikuoti į nacionalinę etaloninę laboratoriją arba ES etaloninę laboratoriją, kurioje atliekami žuvų ligų tyrimai, kaip nurodyta Direktyvos 2006/88/EB VI priede.

II. **KHV infekcijos priežiūrai taikomi išsamūs diagnostiniai metodai ir procedūros**

Imant mėginius ir atliekant laboratorinį tyrimą, kai siekiama gauti arba išlaikyti tam tikros žuvų sveikatos būklės, susijusios su KHV infekcija, statusą, kaip nustatyta I priedo 2 dalies I skirsnyje, to paties priedo 2 dalies II arba III skirsnyje nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi šios dalies II.1 ir II.2 punktuose išsamiai aprašyti diagnostiniai metodai ir procedūros.

II.1. Žuvų mėginių paruošimas

Kai įmanoma, imami ilgesnį laiką virusui palankioje temperatūroje (t. y. 2–3 savaites 15–26 °C) laikytų žuvų mėginiai. Jei įmanoma, siekiant padidinti tikimybę, kad pavyks aptikti KHV, mėginiai paimami per 24 valandas, bet ne vėliau kaip per 72 valandas po tvarkymo, kaip antai gaudymo tinklais ar pervežimo darbų, dėl kurių virusas gali vėl suaktyvėti žuvyse, tapusiose jo nešiotojomis.

KHV viruso priežiūros tikslais atliekamiems tyrimams galima siųsti gyvas arba paskerstas žuvis, atskirai supakuotas sandariose steriliose talpose, arba, kitu atveju, galima naudoti užšaldytus organus ar organų gabalėlius, užkonservuotus 80–100 % alkoholyje arba virusų mėginių gabenimo terpėje (jie turi būti apdoroti per 48 valandas po surinkimo), tyrimams, kurie atliekami PGR pagrįstais metodais. KHV infekcijos priežiūros reikmėms imami žiaunų ir inkstų audinių mėginiai.

Imant mėginius KHV infekcijos priežiūros tikslais jų sujungimo, kiek tai įmanoma, turi būti vengiama. Jeigu sujungimas būtinas, jungiami ne daugiau kaip dviejų žuvų audinių medžiagos mėginiai. Didesni mėginiai homogenizuojami grūstuvu piestoje arba smulkintuvu ir prieš nuskaidrinant iš jų paimami papildomi mėginiai, iš kurių bus išskirta DNR. Kitu atveju papildomus mėginius galima imti iš kiekvieno į mėginį dedamo audinio ir dėti į lizės mėgintuvėlius.

II.1.1. DNR išskyrimas

DNR išskiriama pagal standartines procedūras. Galima naudoti DNR išskyrimo priemonių rinkinius, kurie parduodami rinkoje ir kuriuos naudojant gaunama aukštos kokybės DNR, tinkama naudoti pagal II.2 punkte nurodytus PGR protokolus.

Tinkamas audinio masės ir terpės tūrio santykis yra 1:9. Tyrimams naudojama 20–25 mg audinio medžiagos.

II.2. KHV infekcijos priežiūra PGR grindžiamais metodais

KHV priežiūros tikslais taikomas qPGR metodas. Jei gaunami teigiami rezultatai ištyrus mėginius iš tam tikro ploto, kurio užkrėtimas KHV iki tol nebuvo patvirtintas, šie tyrimo rezultatai patvirtinami:

a) nustatant mėginių PGR arba lizdinės PGR produkto genų seką.

Gauta gryna patvirtinta genų seka turi sutapti (bent 98 %) su šiomis etaloninėmis genų sekomis;

b) arba, kitu atveju, mėginius galima nusiųsti į nacionalinę etaloninę laboratoriją patvirtinti.

II.2.1. KHV aptikimas qPGR būdu

qPGR eiga turi būti tokia, kaip aprašyta toliau.

Tiesioginis pradmuo (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

atvirkštinis pradmuo (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′;

zondas (KHV-109p): 5′-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3′.

Ciklinio apdorojimo sąlygos: 1 ciklas – 15 minučių 95 °C temperatūroje, po to 50 ciklų po 15 sekundžių 94 °C temperatūroje ir 60 sekundžių 60 °C temperatūroje.

qPGR rezultatai gali priklausyti nuo to, kokiomis sąlygomis ji vyksta, t. y. atsižvelgiant į tai, koks termocikleris naudojamas, gali reikėti patikslinti šiluminio apdorojimo protokolus. Be to, galima gauti klaidingai teigiamų rezultatų dėl klaidingo pradmenų surišimo arba užteršimo laboratorijoje. Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Vis dėlto vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo qPGR variantus.

II.2.2. KHV aptikimo patvirtinimas įprastos PGR būdu

Siekiant patvirtinti KHV infekcijos buvimą atliekama įprasta lizdinė PGR, kaip parodyta 2.1 lentelėje, ir nustatoma jos amplifikacijos produkto genų seka.

2.1 lentelė.

Atliekant lizdinės PGR analizę visų karpinių žuvų herpeso virusų (CyHV-1, CyHV-2 ir CyHV-3) atvejais naudojami pradmenys ir jos atlikimo sąlygos

Pradmens pavadinimas	Seka	Ciklinio apdorojimo sąlygos	Produkto dydis
CyHVpol- tiesioginis	5′ -CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	Pirmojo etapo PGR *1 ciklas:* 95 °C 2 minutes *40 ciklų:* 95 °C 30 sekundes 55 °C 30 sekundes 72 °C 45 sekundes *1 ciklas:* 72 °C 10 minučių	362 bp
CyHVpol- atvirkštinis	5′ -CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Pradmens pavadinimas	Seka	Ciklinio apdorojimo sąlygos	Produkto dydis
CyHVpol- vidinis tiesioginis	5′ -CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	Antrojo etapo PGR *1 ciklas:* 95 °C 2 minutes, *40 ciklų:* 95 °C 30 sekundes 55 °C 30 sekundes 72 °C 45 sekundes *1 ciklas:* 72 °C 10 minučių	339 bp
CyHVpol- vidinis atvirkštinis	5′ -GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

PGR rezultatai gali priklausyti nuo to, kokiomis sąlygomis ji vyksta, t. y. atsižvelgiant į tai, koks termocikleris naudojamas, gali reikėti patikslinti šiluminio apdorojimo protokolus. Be to, galima gauti klaidingai teigiamų rezultatų dėl klaidingo pradmenų surišimo arba užteršimo laboratorijoje. Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo PGR variantus.

Genų seka gali būti nustatyta laboratorijoje arba nepriklausomų įmonių, kurių specializacija – genų sekos nustatymas. Genų sekos nustatymo rezultatai išanalizuojami gretinant gautas sekas su žinomomis etaloninėmis KHV genų sekomis („Gen Bank“ prieigos numeriai AP008984, DQ657948 ir DQ177346). Gauta gryna patvirtinta genų seka turi bent 98 % sutapti su tomis etaloninėmis sekomis.

3 DALIS

INFEKCINĖS LAŠIŠŲ ANEMIJOS (ILA) PRIEŽIŪROS IR BUVIMO PATVIRTINIMO IŠSAMŪS DIAGNOSTINIAI METODAI IR PROCEDŪROS

I. **Mėginių ėmimo procedūros vykdant ILA priežiūrą ir kontrolę**

Imant mėginius ir atliekant laboratorinį tyrimą pagal I priedo 3 dalyje nustatytas priežiūros ar likvidavimo programas arba siekiant patvirtinti arba paneigti įtarimą dėl ILA pagal Direktyvos 2006/88/EB 57 straipsnio b punktą, taikomi šio skirsnio I.1, I.2 ir I.3 punktuose išsamiai aprašyti metodai ir procedūros.

I.1. Žuvų mėginių paruošimas

Imant žuvų mėginius laboratoriniams tyrimams dėl ILA jie, kiek tai įmanoma, neturi būti sujungiami. Vis dėlto, imant mėginius ILA priežiūros tikslais, 2–5 žuvų mėginių sujungimas yra priimtinas.

Mėginiai AT PGR analizei paimami iš visų mėginiams atrinktų žuvų. Vidurinės inkstų dalies gabalėlis išimamas iš žuvies steriliu instrumentu ir įdedamas į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį, į kurį įpilta 1 ml patvirtinto efektyvumo RNR konservuojančiojo tirpalo. Į vieną mėgintuvėlį, į kurį įpilta mėginiams gabenti skirto tirpalo, galima dėti daugiausia penkių žuvų audinių mėginius, iš kurių bus sudarytas vienas bendras mėginys. Vieno mėginio audinio masė turi būti 0,5 g. Kai žuvys yra per mažos, kad iš jų būtų galima gauti reikiamos masės mėginius, 0,5 g masės mėginį galima surinkti iš inkstų, širdies, blužnies, kepenų arba prievarčio aklųjų žarnų gabalėlių (renkantis organus čia nurodyta pirmumo tvarka).

Histologiniam tyrimui imami ką tik paskerstų normalios būklės žuvų, turinčių ILA būdingų klinikinių arba patanatominių požymių, audiniai. Jei yra kokių nors išorinių ar vidinių pažeidimų, paimami jų mėginiai, taip pat visais atvejais imami inkstų vidurinės dalies, širdies, kepenų, kasos, žarnyno, žiaunų ir blužnies mėginiai, kurie iš kiekvienos žuvies išpjaunami skalpeliu ir įdedami į 8–10 % (tūrio proc.) buferinį formalino druskos tirpalą. Siekiant užtikrinti, kad audiniai būtų patikimai užkonservuoti, fiksavimo tirpalo ir audinio santykis turi būti bent 20:1. Imunohistocheminiam (IHC) tyrimui imami inkstų vidurinės dalies ir širdies mėginiai.

Virusologiniam ląstelių kultūros tyrimui paimama visos mėginiams skirtos žuvies audinių. Kepenų, inkstų priekinės arba vidurinės dalies, širdies ir blužnies gabalėliai išimami iš žuvies steriliu instrumentu ir įdedami į plastikinius mėgintuvėlius, į kuriuos įpilta 9 ml gabenimo terpės. Į vieną mėgintuvėlį, į kurį įpilta audiniams gabenti skirto tirpalo, galima dėti daugiausia penkių žuvų audinius, iš kurių sudaromas vienas bendras mėginys. Vieno mėginio audinio masė turi būti 1,0 ± 0,5 g.

I.2. Žuvų mėginių gabenimas

Į laboratoriją galima gabenti visą žuvį, jei ją gabenant įmanoma laikytis šio punkto 3 pastraipoje nurodytų reikalavimų dėl temperatūros. Visa žuvis suvyniojama į sugeriamąjį popierių ir gabenama plastikiniame maiše atšaldyta, kaip aprašyta toje pastraipoje.

Galima gabenti ir gyvas žuvis, tačiau tik nacionalinei etaloninei žuvų ligų tyrimo laboratorijai prižiūrint ir atsižvelgiant į papildomus su gyvų žuvų gabenimu susijusius dezinfekavimo ir biologinio saugumo aspektus.

Kraujo mėginiai ir mėgintuvėliai su virusologiniam tyrimui arba AT PGR analizei skirtais žuvų audiniais sudedami į izoliuotas talpyklas, kaip antai polistireno dėžes storomis sienelėmis, kartu įdedant pakankamai ledo arba šaldymo blokų, kad būtų užtikrinta, jog mėginiai į laboratoriją bus gabenami atšaldyti. Tačiau reikia stengtis mėginių neužšaldyti, o gavus gabenimo dėžę joje vis dar turėtų būti ledo arba vienas ar keli iš dalies arba visiškai užšalę šaldymo blokai. Išimtiniais atvejais AT PGR ir virusologiniam tyrimui skirtus mėginius galima staigiai užšaldyti ir gabenti į laboratoriją – 20 °C ar žemesnėje temperatūroje.

AT PGR analizei skirtus mėginius užkonservavus RNR stabilizavimo reagente, Ribonucleic acid(RNA)later, RNR išskyrimas turi būti atliktas per toliau nurodytus terminus priklausomai nuo to, kokioje temperatūroje laikomi mėginiai:

kai mėginiai laikomi 37 °C temperatūroje – viena diena;

kai mėginiai laikomi 25 °C temperatūroje – viena savaitė;

kai mėginiai laikomi 4 °C temperatūroje – vienas mėnuo;

kai mėginiai laikomi – 20 °C temperatūroje – neribotą laiką.

Jei histologiniam tyrimui skirti žuvų mėginiai gabenami fiksavimo tirpale, jie sudedami į skysčiui nelaidžius mėgintuvėlius smūgiams atspariose talpyklose. Būtina stengtis tų mėginių neužšaldyti.

Virusologinį ląstelių kultūros tyrimą būtina pradėti kuo greičiau, ne vėliau kaip per 48 valandas po mėginių paėmimo. Išimtiniais atvejais virusologinį tyrimą galima pradėti vėliausiai per 72 valandas po to, kai surinkta medžiaga, su sąlyga, kad tyrimui skirta medžiaga būtų apsaugota naudojant gabenimo terpę ir kad ją gabenant būtų įmanoma laikytis reikalavimų dėl temperatūros.

I.3. Papildomos diagnostikai skirtos medžiagos rinkimas

Jei diagnostikos laboratorija sutinka, galima rinkti ir kitus, ne tik I.1 punkte nurodytus žuvų audinius ir juos ruošti papildomiems tyrimams.

II. **Išsamūs diagnostiniai metodai ir procedūros vykdant stebėseną ir siekiant patvirtinti ILA buvimą arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus**

Atliekant laboratorinį tyrimą, kai siekiama gauti arba išlaikyti tam tikrą žuvų sveikatos būklės, susijusios su ILA, statusą, kaip nustatyta I priedo 3 dalies I skirsnyje, arba pagal Direktyvos 2006/88/EB 57 straipsnio b punktą siekiant patvirtinti arba paneigti įtarimą dėl ILA I priedo 3 dalies II skirsnyje nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi tolesniuose II.1–II.5 punktuose išsamiai aprašyti metodai ir procedūros.

II.1. Mėginių tyrimas AT PGR metodu

Atrankinis tyrimas dėl ILAV atliekamas taikant AT qPGR diagnostinį metodą. Kadangi AT qPGR rezultatai gali būti skirtingi priklausomai nuo sąlygų, kuriomis ji atliekama, kad neliktų abejonių, reikėtų naudoti pakankamai tinkamų teigiamų ir neigiamų kontrolinių mėginių ir amplikonų.

II.1.1. Visos RNR išskyrimas

Visi darbai su RNR atliekami ant ledo; būtina mūvėti pirštines.

Visa RNR išskiriama taikant fenolio-chloroformo metodą arba naudojant RNR gimininguмo sukamąsias kolonėles pagal gamintojo nurodymus.

Išgryninta RNR resuspenduojama distiliuotame vandenyje be ribonukleazių (t. y. vandenyje, į kurį dėta 0,1 % dietilpirokarbonato).

Ekstrahuotos RNR grynumas ir koncentracija apskaičiuojami matuojant optinį tankį esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiui. Galima taikyti alternatyvų metodą – įtraukti vidaus kontrolę, pagrįstą priešprieša viruso genomui, kaip nurodyta II.1.3 punkte.

II.1.2. ILAV aptikimas AT PGR metodu

ILAV genomo amplifikacija gali būti atliekama keliais AT PGR metodais. Galima rinktis dviejų etapų AT PGR, per kurią AT ir PGR etapų reakcijos vyksta dviejuose atskiruose mėgintuvėliuose. Tačiau galima rinktis ir vieno etapo reakciją, kai abi reakcijos vyksta viename mėgintuvėlyje. Kai tik įmanoma, reikėtų rinktis pastarąjį vieno etapo metodą, nes atliekant analizę viename mėgintuvėlyje, kai jo turinio nereikia perkelti kitur, sumažinama kryžminės taršos rizika, be to, manoma, kad šio metodo jautris yra ne mažesnis negu dviejų etapų metodo.

Pradmenys naudojami ir analizė atliekama taip, kaip aprašyta šiame punkte, t. y. naudojama ILA1 arba ILA2 pradmenų pora, skirta 8 segmentui; nustatyta, kad šie pradmenys tinka ILAV aptikti šios ligos protrūkių metu ir žuvyse, kurios yra šio viruso nešiotojos. Atvirkštinis pradmuo ILA2 netinka izoliatams iš Šiaurės Amerikos; tokiais atvejais reikia naudoti kitokius pradmenis.

Tiesioginis pradmuo (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′;

atvirkštinis pradmuo (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Ciklinio apdorojimo sąlygos: vienas ciklas – 30 minučių 50 °C temperatūroje, 1 ciklas – 15 minučių 94 °C temperatūroje, 40 ciklų po 30 sekundžių 94 °C temperatūroje, 30 sekundžių 55 °C temperatūroje, 60 sekundžių 72 °C temperatūroje; vienas ciklas – 5 minutes 72 °C temperatūroje. Produkto dydis 155 bp.

PGR rezultatai gali priklausyti nuo to, kokiomis sąlygomis ji vyksta, t. y. atsižvelgiant į tai, koks termocikleris naudojamas, gali reikėti patikslinti šiluminio apdorojimo protokolus. Be to, galima gauti klaidingai teigiamų rezultatų dėl klaidingo pradmenų surišimo arba užteršimo laboratorijoje. Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Vis dėlto vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo AT PGR variantus.

II.1.3. ILAV aptikimas AT qPGR metodu

Taikant AT qPGR metodą įmanoma padidinti tyrimo specifiškumą ir tikriausiai jautrį. Tyrimas šiuo metodu gali vykti greičiau, nes nereikia atlikti gelio elektroforezės ir, kadangi įmanoma apytikriai nustatyti viruso genominės RNR kiekį mėgintuvėlyje su mėginiu, sumažėja kryžminės taršos rizika. AT qPGR analizės trūkumas yra toks, kad dažnai neįmanoma nustatyti amplifikacijos produktų genų sekos. Tačiau jei abejojama dėl amplifikacijos produkto specifiškumo, gautam rezultatui patvirtinti būtina atlikti dar vieną specialiai ILAV skirtą analizę.

Atliekama šiame punkte aprašyta analizė (speciali 8 segmento analizė). Ši analizė tinka izoliatams iš Europos Sąjungos, Europos laisvosios prekybos asociacijos ir Šiaurės Amerikos. Kai tik įmanoma, reikėtų rinktis vieno etapo metodą, nes atliekant analizę viename mėgintuvėlyje sumažėja kryžminės taršos rizika.

Tiesioginis pradmuo: 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;

atvirkštinis pradmuo: 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;

ir zondas: 5′-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – MGBNFQ-3′.

Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Ciklinio apdorojimo sąlygos: 1 ciklas 30 minučių 50 °C temperatūroje, vienas ciklas 15 minučių 95 °C temperatūroje, 40 ciklų po 15 sekundžių 94 °C temperatūroje, 60 sekundžių 60 °C temperatūroje; prireikus ciklas tikslinamas. Vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo AT PGR arba AT qPGR variantus.

II.1.4. PGR amplifikacijos produktų genų sekos nustatymas

Tiesioginis pradmuo (ILAs6–3F): 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;

atvirkštinis pradmuo (ILAs6–2R): 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.

Kartu su kiekviena tyrimo plokštele reikia naudoti neigiamus šablono kontrolinius mėginius ir teigiamus kontrolinius mėginius. Ciklinio apdorojimo sąlygos (vieno etapo AT PGR): 1 ciklas 30 minučių 50 °C temperatūroje, 1 ciklas 15 minučių 94 °C temperatūroje, 40 ciklų po 30 sekundžių 94 °C temperatūroje, 30 sekundžių 55 °C temperatūroje, 60 sekundžių 72 °C temperatūroje ir 1 ciklas – 5 minutes 72 °C temperatūroje; prireikus ciklas tikslinamas. Vietoj šio varianto galima rinktis kitus patvirtinto panašaus efektyvumo AT PGR arba AT qPGR variantus.

HPR genotipo genų sekai 6 segmente nustatyti galima rinktis tokį alternatyvų metodą:

Tiesioginis pradmuo: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′;

atvirkštinis pradmuo: 5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′.

Produkto dydis 304 NT, jei HPR 0.

Galima atlikti ir kitokio pobūdžio AT PGR analizes, specifiškumu ir jautriu prilygstančias šiame punkte aprašytoms analizėms.

AT PGR amplifikacijos produkto grynumas prieš nustatant genų seką patikrinamas gelio elektroforezės būdu. Jei nustatomas tik vienas grynas fragmentas, jis išgryninamas tiesiai iš PGR reakcijos produkto. Jei padaugintų fragmentų yra daugiau, reikiamas fragmentas išgryninamas gelio elektroforezės būdu. PGR fragmentai iš tirpalų ar agarozės gelių išgryninami naudojant PGR fragmentų gimininguмo sukamąsias kolonėles pagal gamintojo nurodymus.

Genų seka nustatoma naudojant amplifikacijos pradmenis, gautus iš nepriklausomų įmonių, gaminančių specialius genų sekai nustatyti skirtus produktus. Rezultatai turi būti analizuojami naudojant paieškos priemonę BLAST, o sekos lyginamos su kitomis žinomomis sekomis JAV nacionalinio informacijos centro (NCBI) nukleotidų duomenų bazėje.

Nustačius genų seką neturi likti jokių abejonių dėl AT PGR amplifikacijos produkto specifiškumo.

II.2. ILAV išskyrimas ląstelių kultūrose

II.2.1. Mėginių paruošimas

Audinys gali būti laikomas – 80 °C temperatūroje. Audinys turi būti užšaldomas ir atšildomas tik vieną kartą prieš tyrimą. Priežiūros ir kontrolės tikslais tyrimą reikia atlikti kiek įmanoma greičiau.

Kiekvienas mėginys (bendras audinių mėginys gabenimo tirpale) visiškai homogenizuojamas patvirtintu tinkamu homogenizatoriumi, 15 minučių centrifuguojamas 2 000–4 000 × g 0–6 °C temperatūroje, supernatantas perkošiamas (0,45 µm dydžio akučių filtru) ir inkubuojamas įpylus tokį patį kiekį tinkamai atskiesto imuninių serumų, veikiančių prieš vietinės kilmės serologinių tipų infekcinės kasos nekrozės (IKN) virusus, mišinio. Imuninio serumo titras atliekant 50 % plokštelių neutralizacijos testą turi būti bent 1:2 000. Mišinys inkubuojamas 1 valandą 15 °C temperatūroje ir gaunamas pasėlis.

Visus pasėlius apdorojant infekcinės kasos nekrozės viruso (kai kuriuose Europos regionuose šio viruso aptinkama net 50 % žuvų mėginių) imuniniu serumu siekiama išvengti citopatinio efekto (CPE) dėl IKN viruso buvimo pasėtose ląstelių kultūrose. Tokią procedūrą galima atlikti siekiant, kad sutrumpėtų virusologinių tyrimų trukmė ir sumažėtų atvejų, kai pastebėtą citopatinį efektą reikėtų laikyti potencialiu ILAV buvimo požymiu. Imant mėginius iš gamybos vienetų, laikomų neužkrėstais IKN, pasėlių imuniniu serumu dėl IKN viruso galima neapdoroti.

II.2.2. Ląstelių kultūrų inokuliavimas

Pradiniam ILAV išskyrimui naudojamos atlantinių lašišų inkstų (ALI) ląstelės. Galima naudoti ir kitų ląstelių linijas, kurių efektyvumas ir jautris išskiriant ILAV yra patvirtinti, atsižvelgiant į viruso padermių kintamumą ir įvairių padermių gebėjimą daugintis įvairių linijų ląstelėse. Atrodo, kad ALI ląstelės yra tinkamos iki šiol žinomiems viruso izoliatams išskirti ir auginti, jei ribojamas perėjimas iš vienos būsenos į kitą. ALI ląstelėse citopatinis efektas (CPE) gali būti pastebimesnis nei kitose šiam virusui imlių ląstelių linijose, kaip antai SHK-1 (lašišų galva inkstai -1, anglų k. *Salmon head kidney-1*).

ALI ląstelės (atlikus 65 arba mažiau persėjimų) auginamos duobutinėse plokštelėse L-15 terpėje, kurios sudėtyje yra 10 % galvijų vaisiaus serumo, 2 % (tūrio proc.) 200 mM L-glutamino, ir 0,08 % (tūrio proc.) 50 mM 2-merkaptoetanolio. Jaunų aktyviai augančių ląstelių kultūros inokuliuojamos imuniniu serumu apdorota organų suspensija. Galutinis audinių medžiagos ir kultūros terpės kiekio santykis tirpale turi būti 1:1 000. Kiekvieno organo atveju į kiekvieną plokštelės duobutę, kurioje yra 2 ml kultūros terpės, įlašinama 40 µl pasėlio suspensijos. Kad sumažėtų kryžminės taršos rizika, iš įvairių žuvininkystės ūkio vietų paimtiems mėginiams naudojamos atskiros 12 arba 24 duobučių plokštelės.

Į vienos plokštelės duobutes pasėlio nededama – tai yra neigiamas kontrolinis mėginys. Atskira plokštelė inokuliuojama etaloniniu ILAV izoliatu; tai – teigiamas kontrolinis mėginys, kaip nurodyta toliau. 100 µl paruošto pradinio ILA viruso preparato (minimalus titras 10^7, audinio kultūros užkrečiamoji dozė – 50 % vertinamosios baigties (TCID50 ml^{-1})) pasėjama į pirmąją plokštelės duobutę ir sumaišoma. Dalis šios medžiagos perpilama iš pirmosios į antrąją duobutę, kad būtų gautas 1:10 santykiu praskiestas mišinys, ir sumaišoma. Šis veiksmas kartojamas apdorojant visą plokštelę, šešis kartus praskiedžiant jos turinį po 10 kartų. Pradinį ILAV preparatą galima bent dvejus metus laikyti – 80 °C temperatūroje, tačiau kai jis atitirpinamas, būtina jį panaudoti per tris dienas. Reikia stengtis išvengti kryžminės taršos tarp tiriamųjų plokštelių ir teigiamų kontrolinių mėginių medžiagos. Kad nebūtų tokio užteršimo rizikos, teigiami kontroliniai mėginiai ruošiami ir tvarkomi atskirai nuo tiriamųjų plokštelių. Užuot naudojus teigiamus kontrolinius mėginius su kiekvienu pasėliu, galima kas šešis mėnesius atlikti ALI ląstelių jautrio ILAV izoliatams bandymą.

Mėginiai inkubuojami 15 ± 2 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 15 dienų. Ląstelių kultūros du kartus, laikotarpiu nuo 5 iki 7 ir nuo 12 iki 14 tyrimo dienos po inokuliavimo, apžiūrimos mikroskopu siekiant pastebėti citopatinį efektą. Bet kuriame mėginyje pastebėjus citopatinį efektą, iškart pradedamos viruso identifikavimo procedūros pagal II.2.4 punktą. Jeigu jokio citopatinio efekto nepastebima iki 14 dienos, atliekamas netiesiogiai fluorescuojančių antikūnų tyrimas (NFAT), hemadsorbcija arba AT PGR.

II.2.3. Persėjimas

Persėjimas atliekamas 13–15 dieną. Kultūros supernatanto dedama į duobutinių plokštelių duobutes, kuriose yra naujų aktyviai augančių ląstelių, atskiedžiant tinkamu santykiu (1:10), ir inkubuojama iki 18 dienų 14 ± 2 °C temperatūroje. Ląstelių kultūros du kartus, laikotarpiu nuo 5 iki 7 ir nuo 14 iki 18 tyrimo dienos po inokuliavimo, apžiūrimos mikroskopu siekiant pastebėti citopatinį efektą. Bet kuriame mėginyje pastebėjus citopatinį efektą, iškart pradedamos viruso identifikavimo procedūros pagal II.2.4 punktą. Jei citopatinio efekto nepastebima 14–18 dienomis, atliekama hemadsorbcija arba AT PGR tyrimas.

Jei toksinis citopatinis poveikis pasireiškia per pirmas septynias inkubavimo dienas, persėjimas atliekamas šiame etape, ląstelės inkubuojamos 14–18 dienų, dar kartą persėjamos ir inkubuojamos dar 14–18 dienų laikotarpį. Jei po septynių dienų citotoksiškumo reakcija neįvyksta, ląstelės persėjamos vieną kartą ir inkubuojamos, kad nuo pradinio inkubavimo praeitų ne mažiau kaip 28–36 dienos.

Jei pirminė ląstelių kultūra užteršiama bakterijomis, tyrimas atliekamas pakartotinai naudojant audinių homogenatą, laikytą – 80 °C temperatūroje. Prieš inokuliavimą audinių homogenatas centrifuguojamas 4 000 × g 15–30 minučių esant 0–6 °C temperatūroje, o supernatantas perkošiamas naudojant 0,22 µm filtrą. Jei persėjant ląstelių kultūrą, ši užteršiama bakterijomis, viršnuosėdinis skystis filtruojamas per 0,22 µm skersmens filtrą, juo užkrečiamos jaunos ląstelės ir inkubuojamos paskiau 14–18 dienų.

II.2.4. Viruso identifikavimo tyrimai

Bet kuriame etape pastebėjus citopatinio efekto požymių arba gavus teigiamą hemadsorbcijos tyrimo rezultatą reikia identifikuoti virusą. Tinkami ILAV identifikavimo metodai yra AT PGR pagal II.1 punktą ir imunofluorescencinis (IF) metodas pagal II.2.6 punktą. Jei manoma, kad gali būti ir kitų virusų, atliekami papildomi virusų identifikavimo tyrimai. Jei tais tyrimais nepavyksta patikimai identifikuoti viruso per vieną savaitę, supernatantas siunčiamas nedelsiant identifikuoti į:

a) Pasaulinės gyvūnų sveikatos organizacijos (OIE) etaloninę ILA tyrimo laboratoriją arba

b) nacionalinę etaloninę laboratoriją arba ES etaloninę laboratoriją, kurioje tiriamos žuvų ligos, kaip nurodyta Direktyvos 2006/88/EB VI priede.

II.2.5. Hemadsorbcija

Kadangi ILAV dauginantis ląstelių kultūrose ne visada pasireiškia citopatinis efektas, turi būti atliktas kiekvienos duobutės turinio AT PGR ar hemadsorbcijos tyrimas pagal šį punktą arba imunofluorescencinis tyrimas pagal II.2.6 punktą.

Ląstelių kultūros terpė, įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius, išimama iš kiekvienos duobutės ir sudedama į etiketėmis paženklintus sterilius mėgintuvėlius. Į kiekvieną duobutę įpilama 500 µl 0,2 % (tūrio proc.) perplautų triušio arba arklio eritrocitų suspensijos arba 0,05 % (tūrio proc.) perplautų vaivorykštinio upėtakio ar atlantinės lašišos eritrocitų suspensijos ir 45 minutes inkubuojama kambario temperatūroje. Eritrocitai pašalinami ir kiekviena duobutė dukart išplaunama L-15 terpe. Kiekviena duobutė apžiūrima mikroskopu.

Iš eritrocitų sankaupų ALI ląstelių paviršiuje galima numanyti, kad jos yra užkrėstos ortomiksovirusu. Jei gaunamas teigiamas hemadsorbcijos tyrimo rezultatas, iškart atliekamas viruso identifikavimo tyrimas pagal II.2.4 punktą.

II.2.6. Imunofluorescencija (IF)

ALI ląstelės (atlikus 65 arba mažiau persėjimų) auginamos duobutinėse plokštelėse L-15 terpėje, kurios sudėtyje yra 10 % galvijų vaisiaus serumo, 2 % (tūrio proc.) 200 mM L-glutamino ir 0,08 % (tūrio proc.) 50 mM 2-merkaptoetanolio, ir naudojamos ląstelėmis ištisai padengiant daugiau kaip 50 % viso ploto. Galima naudoti ir kitas patvirtinto efektyvumo ląstelių linijas arba auginimo terpes. Į dvi duobutes įpilama po 225 µl ląstelių kultūros, kuri, kaip manoma, yra užkrėsta virusu, supernatanto, sumaišoma ir perpilama į kitas dvi duobutes praskiedžiant santykiu 1:5. Dar dvi papildomos duobutės neinokuliuojamos; tai – kontroliniai mėginiai. Iš įvairių žuvininkystės ūkio vietų paimtiems mėginiams ir viruso kontroliniams mėginiams naudojamos atskiros plokštelės. Viruso kontrolinis mėginys paruošiamas naudojant etaloninį ILAV izoliatą.

Plokštelės inkubuojamos 14 ± 2 °C temperatūroje ir stebimos mikroskopu daugiausia septynias dienas. Anksti pastebėjus citopatinį efektą arba jeigu jokio citopatinio efekto nepastebima per septynias dienas, atliekamas tolesnis veiksmas – fiksavimas. Duobutės išplaunamos fosfato buferiniu druskų tirpalu (FBDT) ir užfiksuojamos 20 minučių inkubuojant kambario temperatūroje įpylus 80 % acetono. Plokštelės išdžiovinamos ore ir iškart nudažomos arba 0–6 °C temperatūroje laikomos ne ilgiau kaip 24 valandas iki dažymo.

Į kartotines duobutes įpilama monokloninių antikūnų (MAb) 3H6F8 ir 1OC9F5, specialiai skirtų ILA virusui, arba kitų MAb antikūnų, kurių veiksmingumas ir specifiškumas patvirtinti, mišinio, atskiesto FBDT, ir 30 minučių inkubuojama 37 ± 4 °C temperatūroje. MAb pašalinami ir plokštelės tris kartus išplaunamos 0,05 % „Tween 20“ FBDT tirpalu. Į kiekvieną duobutę įpilama pelės antikūnų serumo IgG fluoresceino izotiocianato (FITC) konjugato, atskiesto FBDT, ir 30 minučių inkubuojama 37 ± 4 °C temperatūroje. Įvairių MAb ir FITC konjugato partijų skiedimo santykiai tikslinami kiekvienoje laboratorijoje. Antikūnai pašalinami ir plokštelės tris kartus nuplaunamos 0,05 % „Tween 20“ FBDT tirpalu.

Duobutės iškart apžiūrimos fluorescencinei mikroskopijai pritaikytu inversiniu mikroskopu su FITC sužadinti tinkamu filtru. Jei pastebima fluorescuojančių ląstelių, tyrimo rezultatas yra teigiamas. Tyrimas laikomas patikimu, kai teigiamų kontrolinių mėginių tyrimo rezultatai yra teigiami, o neigiamų kontrolinių mėginių rezultatai neigiami.

II.3. Kitų audinių tyrimas

II.2.6 punkte nurodytą metodą galima taikyti tiriant ir kitus žuvų audinius, kaip antai kepenis, blužnį ir širdį, jeigu juose yra pakankamai endotelio ląstelių, leukocitų arba limfocitų, kuriuos galima paskleisti ant mėginio plokštelės. Kiekvieno audinio dažymo procedūra yra tokia pati, nors kai kurių audinių galbūt geriau nedažyti propidiumo jodidu ir nustatyti audinio atspaude esančių ląstelių tipus fazinio kontrastinio apšvietimo būdu.

II.4. Histologinis tyrimas

Parafine esančios atpjovos supjaustomos 5 µm storio gabaliukais ir nudažomos hematoksilinu ir eozinu.

Klinikinių ligos požymių turinčių atlantinių lašišų ląstelių pokyčių būna įvairių; iš jų galima paminėti šiuos:

a) eritrocitų gausa centrinės venos sinuse ir žvyneliniuose kapiliaruose, įskaitant eritrocitų trombų susidarymą žiaunose;

b) daugiataškės arba susiliejančios kraujosrūvos, hepatocitų nekrozė ar abu šie reiškiniai kepenyse, atokiau nuo didesnių kraujagyslių; daugiataškė eritrocitų sankaupa išsiplėtusiose kepenų sinusoidėse;

c) eritrocitų kaupimasis žarnyno *lamina propria* kraujagyslėse ir galiausiai vidinis *lamina propria* kraujavimas;

d) dėl eritrocitų kaupimosi išsitempusi blužnies stroma;

e) nedidelis daugiataškis arba išplitęs pasklidasis intersticinis kraujavimas su vamzdelių nekroze kraujavimo vietose, eritrocitų kaupimasis inkstų glomeruluose;

f) eritrofagocitozė blužnyje, antrinis kraujavimas kepenyse ir inkstuose.

II.5. Imunohistocheminis (IHC) tyrimas

ILA viruso branduolio baltymus veikiančiu polikloniniu antikūnu apdorojamos formaline užfiksuoto audinio parafinuotos atpjovos. Taip tiriami organai – inkstų vidurinė dalis ir širdis (vidurio sritis, įskaitant visas tris kameras ir vožtuvus). Dėl patologinių požymių įtariami ligos atvejai patvirtinami gavus teigiamą IHC tyrimo rezultatą. Histologiniai pjūviai atliekami standartiniais metodais.

(1) Audinių atpjovų paruošimas

Audiniai bent vieną dieną laikomi užfiksuoti neutraliu 10 % formalino fosfato buferiniu tirpalu, dehidratuojami naudojant etanolio tirpalų seriją, nuskaidrinami ksilenu ir įterpiami į parafiną pagal standartinius protokolus. Maždaug 5 µm storio atpjovos (IHC mėginiams dedamos ant poli-L-lizinu padengtų plokštelių) 20 minučių kaitinamos 56–58 °C (daugiausia 60 °C) temperatūroje, deparafinuojamos ksilenu, rehidratuojamos naudojant etanolio tirpalų seriją ir nudažomos hematoksilinu ir eozinu patomorfologiniam ir IHC tyrimams pagal 2 punktą.

(2) Dažymo procedūra atliekant IHC tyrimą

Visos inkubavimo procedūros atliekamos kambario temperatūroje ant supamosios platformos, nebent šiame sprendime būtų nurodyta kitaip:

a) antigenai gaunami dukart po 6 minutes verdant audinių atpjovas 0,1 M citrato buferiniame tirpale (pH – 6,0), po to 20 minučių blokuojant 50 mM TBS tirpalo, į kurį dėta 5 % lieso pieno miltelių ir 2 % ožkos serumo (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH – 7,6) 20 minučių;

b) tada audinių atpjovos per naktį inkubuojamos su pirminiu antikūnu (ILAV branduolio baltymams skirtas monospecifinis triušio antikūnas), atskiedus TBS tirpalu, į kurį dėta 1 % lieso pieno miltelių, po to tris kartus perplaunamos 0,1 % „Tween 20“ TBS tirpalu;

c) siekiant aptikti prijungtus antikūnus audinių atpjovos 60 minučių inkubuojamos su triušio antikūnų IgG konjugato šarmine fosfataze. Paskutinį kartą perplovus įdedama „Fast Red“ (1 mg ml^{-1}) ir naftolio AS-MX fosfato (0,2 mg ml^{-1}) su 1 mM levamisolio 0,1 M TBS tirpale (pH – 8,2) ir paliekama 20 minučių. Tada audinių atpjovos nuplaunamos tekančiu vandentiekio vandeniu, perdažomos Harriso hematoksilinu ir uždedamos ant plokštelių naudojant tam skirtą vandeninę terpę. Kartu su kiekviena partija ruošiami kontroliniai mėginiai – ILAV teigiamų ir ILAV neigiamų audinių atpjovos.

(3) IHC tyrimo rezultato aiškinimas

IHC tyrimo rezultatas aiškinamas taip, kaip nurodyta a ir b punktuose:

a) kontrolinių audinių atpjovų tyrimo rezultatai yra teigiami pastebėjus, kad endokardo kraujagyslių endotelio ląstelių citoplazma ir branduolio vidus yra aiškiai raudonai nudažyti (rausva) spalva. Teigiamas tiriamojo audinio atpjovos mėginio rezultatas patvirtinamas tik aptikus endotelio ląstelių, kurių branduolio vidus nudažytas tokia aiškiai matoma raudona spalva;

b) kontrolinių audinių atpjovų tyrimo rezultatai laikomi neigiamais, jei nėra jokios reikšmingos spalvinės reakcijos.

Kadangi lokalizacija branduolio viduje yra būdinga ortomiksoviruso branduolio baltymui viruso dauginimosi etape, citoplazmos ir kitokio dažymo reiškiniai, kurie nėra lokalizuoti branduolio viduje, laikomi nespecifiniais arba negalutiniais.

Stipriausios teigiamos dažymo reakcijos paprastai pastebimos širdies ir inkstų endotelio ląstelėse. Jei hemoraginiai pažeidimai yra labai išplitę, endotelio dažymo reakcijos gali būti menkos arba jų gali visai nebūti, galbūt dėl užkrėstų endotelio ląstelių irimo (lizės).

4 DALIS

MARTEILIOZĖS (*MARTEILIA REFRINGENS* INFEKCIJOS) PRIEŽIŪROS IR BUVIMO PATVIRTINIMO IŠSAMŪS DIAGNOSTINIAI METODAI IR PROCEDŪROS

I. **Diagnozuojant marteiliozės (*Marteilia refringens*) infekciją taikomi išsamūs diagnostiniai metodai ir procedūros**

Imant mėginius ir atliekant laboratorinį tyrimą, kai siekiama gauti arba išlaikyti tam tikrą gyvūnų sveikatos būklės, susijusios su *Marteilia refringens* infekcija, statusą, kaip nustatyta I priedo 4 dalies I skirsnyje, arba pagal Direktyvos 2006/88/EB 57 straipsnio b punktą siekiant patvirtinti arba paneigti įtarimą dėl šios vienos iš išvardytų ligų I priedo 4 dalies II skirsnyje nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi šios dalies I.1, I.2 ir I.3 punktuose išsamiai aprašyti diagnostiniai metodai ir procedūros.

I.1. Mėginių ėmimo tvarka

Kad būtų didesnė tikimybė aptikti šia liga užkrėstų gyvūnų, imant mėginius pirmiausia renkami pavieniai prasivėrę arba ką tik nugaišę moliuskai.

Mėginiams surinktos austrės arba midijos laikomos 4 °C temperatūroje arba šaldytuve ant ledo ne ilgiau kaip 24 valandas, jei mėginiuose yra prasivėrusių moliuskų, arba ne ilgiau kaip 72 valandas, jei prasivėrusių moliuskų nėra. Moliuskai laikomi plastikiniame maiše su etikete, kurioje turi būti nurodyta, kokios tai austrės arba midijos ir iš kur jos paimtos. Prasivėrę arba ką tik nugaišę moliuskai laikomi atskirai nuo kitų moliuskų.

Histologiniam *Marteilia refringens* diagnostikos tyrimui naudojamos audinių, įskaitant žiaunas ir širdies audinį, 3–5 mm storio atpjovos. Kai kuriems tyrimams, įskaitant audinių atspaudų tyrimus ir polimerazės grandininę reakciją (PGR), naudojamas virškinamosios liaukos gabalėlis.

I.2. Mikroskopiniai metodai

I.2.1. Citologinis tyrimas (atspaudų citologinis tyrimas)

Nusausinus virškinamosios liaukos audinius sugeriamuoju popieriumi, padaromi keli jų atspaudai stiklo plokštelėje. Plokštelės išdžiovinamos ore, užfiksuojamos metanoliu arba absoliučiuoju etanoliu ir nudažomos naudojant rinkoje parduodamą rinkinį kraujui dažyti, pavyzdžiui, Diff-Quik®/Hemacolor®, pagal gamintojo nurodymus. Vandeniu iš čiaupo nuplautos ir išdžiovintos plokštelės uždengiamos dengiamosiomis plokštelėmis ir užsandarinamos tinkama sintetine derva. Plokštelės pirmiausia apžiūrimos 200 kartų didinančiu, o tada, naudojant imersinį aliejų, 1 000 kartų didinančiu mikroskopu.

Teigiamas šio tyrimo rezultatas gaunamas mėginyje pastebėjus iki 30–40 μm dydžio ląstelių. Nudažyta ląstelių citoplazma yra bazofilinė, o branduolys eozinofilinis. Pastebima blyškių ratilų aplink dideles, ryškiai nudažytas (šviesos spindulius laužiančias) granules, o didesnėse ląstelėse pastebima ir tokių darinių, kai viena ląstelė yra kitos viduje.

Šis tyrimo metodas nėra konkrečiai skirtas šios rūšies parazitams.

I.2.2. Histologinis tyrimas

Audinių, įskaitant žiaunas, virškinamąją liauką, mantiją ir lytinę liauką, atpjovos bent 24 valandas laikomos užfiksuotos Davidsono fiksatoriumi, o tada paruošiamos histologiniam tyrimui, kurio metu naudojamas parafinas, įprastu būdu ir nudažomos, pavyzdžiui, hematoksilinu ir eozinu. Mėginiai apžiūrimi didinant mikroskopu iki 1 000 kartų.

Teigiamas šio tyrimo rezultatas gaunamas mėginyje pastebėjus nuo 4 iki 40 μm dydžio ląstelių. Ankstyvuose etapuose ląstelės turi kelis branduolius ir yra rutulio arba pailgos formos. Jos paprastai aptinkamos stemplės ir skrandžio epitelyje, o kartais lūpų čiuptuvėliuose. Sporogenezė vyksta ląstelėms dalijantis ląstelių viduje virškinamosios liaukos vamzdeliuose ir latakuose. Refrakcinių kūnų (granulių) atsiranda sporogenezės procese, ankstesniuose etapuose jų nepastebima. Vėlyvuose infekcijos etapuose pastebima virškinamojo trakto ertmėje laisvai pasklidusių sporinių. Nudažyta ląstelių citoplazma yra bazofilinė, o branduolys eozinofilinis. Granulės gali būti nuo sodrios oranžinės iki sodrios raudonos spalvos.

Šis tyrimo metodas nėra konkrečiai skirtas šios rūšies parazitams.

I.3. Molekuliniai metodai

I.3.1. DNR išskyrimas

DNR išskiriama pagal standartines procedūras.

Galima naudoti DNR išskyrimo priemonių rinkinius, kurie parduodami rinkoje ir kuriuos naudojant paprastai gaunama aukštos kokybės DNR, tinkama naudoti pagal PGR protokolus, kaip aprašyta I.3.2 punkte.

I.3.2. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Yra parengti ir paskelbti keli PGR protokolai..

Turi būti naudojami vidinio transkribuojamo regiono (ITS1) sričiai skirti PGR pradmenys, nes jie geba dauginti tik *M. refringens*.

PGR atliekama 50 µl tūrio mėginyje. Naudojami PGR mišiniai, sudaryti iš buferinio tirpalo (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH – 9,0, 25 °C] ir 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP mišinio, 1 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų, 0,02 vnt. μl^{-1} Taq DNR polimerazės ir 10–100 ng išskirtos DNR. Po penkių minučių DNR denatūravimo 94 °C temperatūroje 30 kartų kartojamas toks ciklas: denatūravimas 94 °C temperatūroje – viena minutė, pradmenų surišimas 55 °C temperatūroje – viena minutė ir elongacija 72 °C temperatūroje – viena minutė kiekvienai kilobazių porai. Galutinis elongacijos etapas trunka 10 minučių 72 °C temperatūroje. *M. refringens* aptikti PGR naudojami ITS1 sričiai skirti pradmenys (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ ir 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Teigiami kontroliniai mėginiai ruošiami iš labai užkrėsto šeimininko genominės DNR arba plazmidžių DNR, įskaitant tikslinę sritį.

Neigiami kontroliniai mėginiai ruošiami iš neužkrėstų šeimininkų genominės DNR ir PGR reagentų be tikslinės DNR.

Teigiamas rezultatas yra teigiama PGR amplifikacija iki numatyto dydžio (412 bp); visų neigiamų kontrolinių mėginių rezultatai turi būti neigiami, o visų teigiamų kontrolinių mėginių rezultatai teigiami.

I.3.3. Hibridizacija in situ (ISH)

Yra parengti ir paskelbti keli ISH protokolai..

Naudojamas rRNR genų komplekso mažajam subvienetui skirtas zondas, nes jo tinkamumas patvirtintas histologiniais tyrimais.

Audinių, įskaitant žiaunas ir virškinamąją liauką, atpjovos bent 24 valandas laikomos užfiksuotos Davidsono fiksatoriumi, o tada paruošiamos histologiniam tyrimui, kurio metu naudojamas parafinas, įprastu būdu. 5 µm storio atpjovos dedamos ant aminoalkilsilanu padengtų plokštelių, kurios per naktį kaitinamos 40 °C temperatūros krosnyje, tada deparafinuojamos 10 minučių panardinant į ksileną. Šis veiksmas atliekamas dar kartą, tada tirpiklis pašalinamas po 10 minučių paeiliui panardinant mėginius į dvi voneles, į kurias įpilta absoliučiojo etanolio. Po to atpjovos dehidratuojamos panardinant į seriją etanolio tirpalų. Tada jos 30 minučių apdorojamos proteinaze K (100 µg ml–1) TE buferiniame tirpale (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) 37 °C temperatūroje. Plokštelės su atpjovomis dehidratuojamos panardinant į seriją etanolio tirpalų ir išdžiovinamos ore. Atpjovos inkubuojamos 100 µl hibridizacijos buferinio tirpalo (4× SSC [standartinio druskos citrato], 50 % formamido, 1 × Denhardto tirpalo, 250 µg ml–1 mielių tRNR, 10 % dekstrano sulfato), į kurį dėta 10 ng (1 µl PGR reagentų, paruoštų kaip aprašyta I.3.2 punkte, naudojant pradmenis CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG ir TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) digoksigeninu pažymėtą zondą. Atpjovos uždengiamos *in situ* plastikinėmis dengiamosiomis plokštelėmis ir penkias minutes laikomos padėtos ant kaitinimo įrenginio 95 °C temperatūroje. Plokštelės vieną minutę aušinamos padėtos ant ledo, po to per naktį atliekama hibridizacija didelio drėgnio kameroje 42 °C temperatūroje. Atpjovos dukart po penkias minutes plaunamos 2 × SSC (kambario temperatūros) ir vieną kartą 10 min. 0,4 × SSC (42 °C temperatūroje). Aptikimo veiksmai atliekami laikantis gamintojo nurodymų. Tada plokštelės nuplaunamos steriliu distiliuotu vandeniu (dH_2O). Atpjovos perdažomos naudojant dažus „Bismarck Brown Yellow“, nuplaunamos distiliuotu vandeniu ir uždengiamos dengiamosiomis plokštelėmis naudojant tam skirtą vandeninę terpę.

Teigiami ir neigiami kontroliniai mėginiai atitinkamai ruošiami iš žinomų užkrėstų ir neužkrėstų šeimininkų audinių atpjovų.

Teigiamas rezultatas patvirtinamas žinomuose tiksliniuose audiniuose pastebėjus pažymėtų juodai purpurinės spalvos *M. refringens* ląstelių; visų neigiamų kontrolinių mėginių rezultatai turi būti neigiami, o visų teigiamų kontrolinių mėginių rezultatai teigiami.

I.3.4. Sekos nustatymas

DNR sekos nustatymas atliekamas kaip vienas iš paskutinių patvirtinamosios diagnostinės procedūros etapų. Tikslinės sritys yra mažojo subvieneto rDNR ir ITS1.

II. **Išsamūs diagnostiniai metodai ir procedūros, taikomi prižiūrint ir patvirtinant *Marteilia refringens* infekciją**

Įgyvendinant priežiūros programas ir patvirtinant *Marteilia refringens* infekcijos buvimą arba paneigiant dėl šios vienos iš išvardytų ligų kilusius įtarimus pagal I priedo 4 dalies II skirsnyje nustatytus reikalavimus, taikomi diagnostiniai metodai ir atitinkamos procedūros pagal 4.1 lentelėje pateiktas gaires:

4.1 lentelė.

Gairės dėl diagnostinių metodų taikymo pagal priežiūros programas ir siekiant patvirtinti *Marteilia refringens* infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus

Metodas	Kryptinga priežiūra	Pirminė diagnozė	Patvirtinamoji diagnozė
Virškinamosios liaukos atspaudų tyrimas	X	X	X, arba
Histopatologinis tyrimas	X		X, arba
Hibridizacija *in situ*			X, ir
PGR	X	X	X, ir
Sekos nustatymas			X

5 DALIS

BONAMIOZĖS (*BONAMIA OSTREAE* INFEKCIJOS) PRIEŽIŪROS IR BUVIMO PATVIRTINIMO IŠSAMŪS DIAGNOSTINIAI METODAI IR PROCEDŪROS

I. **Bonamiozės (*Bonamia ostreae* infekcijos) diagnostikos procedūros**

Imant mėginius ir atliekant laboratorinį tyrimą. kai siekiama gauti arba išlaikyti tam tikros gyvūnų sveikatos būklės, susijusios su *Bonamia ostreae*, statusą, kaip nustatyta I priedo 5 dalies I skirsnyje, arba pagal Direktyvos 2006/88/EB 57 straipsnio b punktą siekiant patvirtinti arba paneigti įtarimą dėl šios vienos iš išvardytų ligų I priedo 5 dalies II skirsnyje nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi tolesniuose I.1, I.2 ir I.3 punktuose išsamiai aprašyti diagnostiniai metodai ir procedūros.

I.1. Mėginių ėmimo procesas

Kad būtų didesnė tikimybė aptikti šia liga užkrėstų gyvūnų, imant mėginius pirmiausia renkami pavieniai prasivėrę arba ką tik nugaišę moliuskai.

Mėginiams surinktos austrės laikomos 4 °C temperatūroje arba šaldytuve ant ledo ne ilgiau kaip 24 valandas, jei mėginiuose yra prasivėrusių moliuskų, arba 72 valandas, jei prasivėrusių moliuskų nėra. Moliuskai laikomi plastikiniame maiše su etikete, kurioje turi būti nurodyta, kokios tai austrės ir iš kur jos paimtos. Prasivėrę arba ką tik nugaišę moliuskai laikomi atskirai nuo kitų moliuskų.

Histologiniam *Bonamia ostreae* diagnostikos tyrimui naudojamos audinių, įskaitant žiaunas ir širdies audinį, 3–5 mm storio atpjovos. Kai kuriems tyrimams, įskaitant audinių atspaudų tyrimus ir polimerazės grandininę reakciją (PGR), naudojamas virškinamosios liaukos gabalėlis.

I.2. Mikroskopiniai metodai

I.2.1. Citologinis tyrimas (atspaudų citologinis tyrimas)

Nusausinus žiaunų arba širdies audinius sugeriamuoju popieriumi, padaromi keli jų atspaudai stiklo plokštelėje. Plokštelės išdžiovinamos ore, užfiksuojamos metanoliu arba absoliučiuoju etanoliu ir nudažomos naudojant rinkoje parduodamą rinkinį kraujui dažyti, pavyzdžiui, Diff-Quick®/Hemacolor®, pagal gamintojo nurodymus. Vandeniu iš čiaupo nuplautos ir išdžiovintos plokštelės uždengiamos dengiamosiomis plokštelėmis ir užsandarinamos tinkama sintetine derva. Plokštelės pirmiausia apžiūrimos per 200 kartų didinantį, o tada, naudojant imersinį aliejų, 1 000 kartų didinančiu mikroskopu.

Teigiamu šio tyrimo rezultatu laikomas mažų (2–5 μm skersmens) rutulio arba kiaušinio pavidalo organizmų buvimas hemocituose. Tačiau šių parazitų gali būti ne tik ląstelėse. Šie organizmai sudaryti iš bazofilinės citoplazmos ir eozinofilinio branduolio (kurių spalvos gali priklausyti nuo naudojamų dažų), o paskleisti ant stiklo plokštelės atspauduose gali atrodyti platesni negu histologinio tyrimo metu. Galima pastebėti ląstelių ir su keliais branduoliais. Šis tyrimo metodas nėra konkrečiai skirtas šios rūšies parazitams.

I.2.2. Histologinis tyrimas

Audinių, įskaitant žiaunas ir virškinamąją liauką, atpjovos bent 24 valandas laikomos užfiksuotos Davidsono fiksatoriumi, o tada paruošiamos histologiniam tyrimui, kurio metu naudojamas parafinas, įprastu būdu ir nudažomos, pavyzdžiui, hematoksilinu ir eozinu. Mėginiai apžiūrimi didinant mikroskopu iki 1 000 kartų.

Teigiamu šio tyrimo rezultatu laikomas parazitų, labai mažų 2–5 μm skersmens ląstelių, buvimas hemocituose; jų gali būti ir laisvai pasklidusių jungiamajame audinyje arba žiaunų, virškinamojo trakto ir mantijos epitelio fistulėse, kurios dažnai siejamos su stipria uždegimine reakcija. Kad neliktų abejonių, liga diagnozuojama tik aptikus šių parazitų hemocituose. Šis tyrimo metodas nėra konkrečiai skirtas šios rūšies parazitams.

I.3. Molekuliniai metodai

I.3.1. DNR išskyrimas

DNR išskiriama pagal standartines procedūras.

Galima naudoti DNR išskyrimo priemonių rinkinius, kurie parduodami rinkoje ir kuriuos naudojant paprastai gaunama aukštos kokybės DNR, tinkama naudoti pagal PGR protokolus, kaip aprašyta toliau.

I.3.2. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Yra parengti ir paskelbti keli PGR protokolai.

Galima taikyti du PGR protokolus, skirtus mažojo subvieneto rRNR:

a) pirmasis yra tradicinė PGR, kai amplifikuojami keli *Haplosporidia* fragmentai, įskaitant *Bonamia spp*. Pradmenys, pavadinti Bo and Boas, yra atitinkamai 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ ir 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′, o amplifikuojant gaunamas 300 bp produktas. PGR mišiniai sudaryti iš buferinio tirpalo (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH 9,0, 25 °C] ir 1 % Triton® X-100), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP mišinio, 1 μM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų, 0,02 vnt. μl–1 Taq DNR polimerazės ir 0,2 ng μl–1 DNR šablono; bendras tūris yra 50 μl. Mėginiai penkias minutes denatūruojami termocikleriu 94 °C temperatūroje, tada 30 kartų kartojamas toks ciklas: viena minutė 94 °C temperatūroje, viena minutė 55 °C temperatūroje ir viena minutė 72 °C temperatūroje, o baigiant mėginys 10 minučių palaikomas 72 °C temperatūroje.

Teigiami kontroliniai mėginiai ruošiami iš labai užkrėsto šeimininko genominės DNR arba plazmidžių DNR, įskaitant tikslinę sritį.

Neigiami kontroliniai mėginiai ruošiami iš neužkrėstų šeimininkų genominės DNR ir PGR reagentų be tikslinės DNR.

Teigiamas rezultatas yra teigiama PGR amplifikacija iki numatyto dydžio (t. y. 300 bp); visų neigiamų kontrolinių mėginių rezultatai turi būti neigiami, o visų teigiamų kontrolinių mėginių rezultatai teigiami;

b) pagal antrąjį PGR protokolą atliekama analizė naudojant priemonę „SYBR® Green Real time PCR assay“. Ji konkrečiai skirta *B. ostreae* rūšies parazitams aptikti (kaip aprašyta toliau); ją galima naudoti kartu su *B. exitiosa* aptikti skirta analizės priemone „SYBR® Green Real time PCR assay“ (Ramilo et al., 2013 m.).

Naudojant pradmenis BOSTRE-F (5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) ir BOSTRE-R (5′- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) amplifikuojamas 208 bp produktas. PGR skirtų mišinių sudėtyje yra „SYBR® Green Master Mix“ (1 vnt.), 0,3 μM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų ir 200 ng išskirtos DNR. Naudojant aptikimo tikruoju laiku sistemą mėginiai 10 minučių denatūruojami 95 °C temperatūroje, o tada 35 kartus kartojamas toks ciklas: 30 sekundžių 95 °C temperatūroje, 45 sekundės 55 °C temperatūroje ir viena minutė 72 °C temperatūroje. Lydymosi temperatūros kreivės analizė atliekama laipsniškai didinant temperatūrą po 0,5 °C per sekundę, pradedant nuo 55 °C ir baigiant ties 95 °C, ir užrašant su kiekvienu temperatūros pokyčiu susijusios fluorescencijos duomenis.

Teigiami kontroliniai mėginiai ruošiami iš labai užkrėsto šeimininko genominės DNR arba plazmidžių DNR, įskaitant tikslinę sritį.

Neigiami kontroliniai mėginiai ruošiami iš neužkrėstų šeimininkų genominės DNR ir PGR reagentų be tikslinės DNR.

Teigiamas rezultatas yra teigiama PGR amplifikacija su unikalia lydymosi temperatūros smaile (78,25 ± 0,25 °C tokiomis sąlygomis, kurios aprašytos Ramilo et al., 2013 m.); visų neigiamų kontrolinių mėginių rezultatai turi būti neigiami, o visų teigiamų kontrolinių mėginių rezultatai teigiami.

I.3.3. Hibridizacija *in situ* (ISH)

Yra parengti ir paskelbti keli ISH protokolai.

Naudojamas rDNR genų komplekso mažajam subvienetui skirtas zondas, nors ir pastebėta kryžminė jo reakcija su kai kuriais kitais *Haplosporidia* šeimos organizmais.

Audinių, įskaitant žiaunas ir virškinamąją liauką, atpjovos bent 24 valandas laikomos užfiksuotos Davidsono fiksatoriumi, o tada paruošiamos histologiniam tyrimui, kurio metu naudojamas parafinas, įprastu būdu. 5 μm storio atpjovos dedamos ant aminoalkilsilanu padengtų plokštelių, kurios per naktį kaitinamos 40 °C temperatūros krosnyje, tada deparafinuojamos 10 min. panardinant į ksileną. Šis veiksmas atliekamas dar kartą, tada tirpiklis pašalinamas po 10 minučių paeiliui panardinant mėginius į dvi voneles, į kurias įpilta absoliučiojo etanolio. Po to atpjovos dehidratuojamos panardinant į seriją etanolio tirpalų. Tada atpjovos dehidratuojamos panardinant į seriją etanolio tirpalų ir 30 minučių apdorojamos proteinaze K (100 μg ml^{-1}) TE buferiniame tirpale (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) 37 °C temperatūroje. Plokštelės su atpjovomis dehidratuojamos panardinant į seriją etanolio tirpalų ir išdžiovinamos ore. Atpjovos inkubuojamos 100 μl hibridizacijos buferinio tirpalo (4× SSC [standartinio druskos citrato], 50 % formamido, 1× Denhardto tirpalo, 250 μg ml^{-1} mielių tRNR, 10 % dekstrano sulfato), į kurį dėta 20 ng (2 μl PGR reakcijos mišinio, paruošto kaip aprašyta I.3.2 punkte, naudojant pradmenis Bo ir Boas) digoksigeninu pažymėtą zondą. Atpjovos uždengiamos *in situ* plastikinėmis dengiamosiomis plokštelėmis ir penkias minutes laikomos padėtos ant kaitinimo įrenginio 95 °C temperatūroje. Plokštelės vieną minutę aušinamos padėtos ant ledo, po to per naktį atliekama hibridizacija didelio drėgnio kameroje 42 °C temperatūroje. Atpjovos dukart po penkias minutes plaunamos 2 × SSC (kambario temperatūros) ir vieną kartą 10 minučių 0,4 × SSC (42 °C temperatūroje). Aptikimo veiksmai atliekami pagal gamintojo nurodymus. Tada plokštelės nuplaunamos steriliu distiliuotu vandeniu (dH_2O). Atpjovos perdažomos naudojant dažus „Bismarck Brown Yellow“, nuplaunamos distiliuotu vandeniu ir uždengiamos dengiamosiomis plokštelėmis naudojant tam skirtą vandeninę terpę.

Teigiami ir neigiami kontroliniai mėginiai atitinkamai ruošiami iš žinomų užkrėstų ir neužkrėstų šeimininkų audinių atpjovų.

Teigiamas rezultatas yra pažymėtų parazitų buvimas hemocituose; visų neigiamų kontrolinių mėginių rezultatai turi būti neigiami, o visų teigiamų kontrolinių mėginių rezultatai teigiami.

I.3.4. Sekos nustatymas

DNR sekos nustatymas atliekamas kaip vienas iš paskutinių patvirtinamosios diagnostinės procedūros etapų. Tikslinės sritys yra mažojo subvieneto rDNR ir ITS1.

II. ***Bonamia ostreae* infekcijos priežiūros ir patvirtinimo procedūros**

Vykdant *Bonamia ostreae* infekcijos priežiūrą ir patvirtinant šios infekcijos buvimą arba paneigiant dėl jos kilusius įtarimus pagal I priedo 5 dalies II skirsnyje nustatytus reikalavimus, taikomi diagnostiniai metodai ir atitinkamos procedūros pagal 5.1 lentelėje pateiktas gaires.

5.1 lentelė.

Gairės dėl diagnostinių metodų taikymo pagal priežiūros programas ir siekiant patvirtinti *Bonamia ostreae* infekciją arba paneigti dėl jos kilusius įtarimus

Metodas	Kryptinga priežiūra	Pirminė diagnozė	Patvirtinamoji diagnozė
Širdies arba žiaunų audinių atspaudų tyrimas	X	X	X, arba
Histopatologinis tyrimas	X		X, arba
Hibridizacija *in situ*			X, ir
PGR	X	X	X, ir
Sekos nustatymas			X

6 DALIS

BALTMĖS (VITILIGO) PRIEŽIŪROS IR BUVIMO PATVIRTINIMO IŠSAMŪS DIAGNOSTINIAI METODAI IR PROCEDŪROS

1. **Diagnostinės procedūros, pagal kurias aptinkamas baltmės (vitiligo) virusas**

Imant mėginius ir atliekant laboratorinį tyrimą pagal priežiūros ir likvidavimo programas, nustatytas I priedo 6 dalies I skirsnyje, ir pagal Direktyvos 2006/88/EB 57 straipsnio b punktą siekiant patvirtinti arba paneigti įtarimą dėl baltmės (vitiligo) virusinės infekcijos I priedo 6 dalies II skirsnyje nustatytais diagnostiniais metodais, taikomi šios dalies 2–7 punktuose išsamiai aprašyti diagnostiniai metodai ir procedūros.

Šioje II priedo dalyje aprašyti metodai ir procedūros yra pritaikyti remiantis Europos Sąjungos etaloninėje vėžiagyvių ligų tyrimo laboratorijoje atliekamu tyrimu, akredituotu pagal standartą ISO 17025. Vietoj jų galima taikyti alternatyvius metodus lygiavertėmis sąlygomis arba naudojant kitų gamintojų pagamintus tyrimų rinkinius, jautriu ir specifiškumu prilygstančius šioje dalyje aprašytiems rinkiniams. Siekiant patikimai identifikuoti baltmės (vitiligo) virusą visais atvejais nustatoma PGR amplifikacijos produkto DNR seka.

2. **Mėginių ėmimo procesas**

Baltmės (vitiligo) virusu užkrėstus vėžiagyvių audinius (pleopodijas ir žiaunas) galima laikyti etanolyje, „RNAlater“ tirpale arba iškart užšaldytus – 80 °C temperatūroje. Nustatant baltmės (vitiligo) virusą audinių mėginiuose privalomi procedūros etapai yra audinio homogenizavimas, DNR išskyrimas, speciali baltmės (vitiligo) viruso DNR amplifikacija PGR būdu, amplifikacijos produkto vizualizacija gelyje, DNR išgryninimas ir sekos nustatymas patikimai identifikuojant užkratą.

3. **Audinio homogenizavimas**

Audiniai suardomi ir homogenatas tinkamame buferiniame tirpale paruošiamas naudojant audinius ardantį prietaisą „Fast Prep“ ir mėgintuvėlius „Lysing Matrix A“ („MP Biomedicals“). Audinys pasveriamas, įdedamas į mėgintuvėlius „Lysing Matrix A“, atskiedžiamas, kad jo masės ir skiediklio tūrio santykis būtų 1:10, arba pagal gamintojo nurodymus, tinkamu buferiniu tirpalu (G2, į kurį dėta 10 µl proteinazės K, skirtu naudoti su gamintojo „Qiagen“ rinkiniu „DNA Tissue Kit“) ir homogenizuojamas dvi minutes apdorojant homogenizatoriumi „Fast Prep-24“. Homogenizuoti mėginiai bent keturias valandas arba per naktį inkubuojami 56 °C temperatūroje. Mėginiai sumaišomi sūkuriniu maišytuvu, dvi minutes centrifuguojami 9 000 sūkių/min., tada 50 µl supernatanto arba 5 mg audinio (optimali audinio masė naudojant DNR išskyrimo rinkinį) atitinkantis šio skysčio kiekis įpilamas į mėgintuvėlį su mėginiu, iš kurio bus išskiriama DNR, ir papildomas buferiniu tirpalu G2 iki 200 µl tūrio.

4. **DNR išskyrimas**

Išskiriama visa DNR naudojant DNR išskirti iš audinių skirtą rinkinį ir „EZ1 Advanced XL Biorobot“ („Qiagen“) pagal gamintojo nurodymus. Kartu su kiekviena mėginių partija imama po vieną DNR išskyrimo (veršelio užkrūčio liaukos DNR) kontrolinį mėginį ir neigiamą (buferinio tirpalo G2) kontrolinį mėginį. DNR išskiriama iki 50 µl tūrio. Siekiant įsitikinti, kad DNR išskyrimas atliktas sėkmingai, visuose mėginiuose ir kontroliniuose mėginiuose nustatoma DNR koncentracija naudojant prietaisą „Nano Drop“. Jei išskirta DNR nenaudojama iškart, ji užšaldoma – 20 °C temperatūroje.

5. **Baltmės (vitiligo) viruso polimerazės grandininė reakcija (PGR)**

Taikomas baltmės (vitiligo) viruso aptikimo metodas – tolesnėse pastraipose nustatytas baltmės (vitiligo) viruso aptikimo lizdinės PGR būdu protokolas, pagal kurį per pirmojo ir antrojo etapo PGR gaunami amplikonai atitinkamai iš 18S rRNR geno 1 447 ir 848 bazių porų (bp).

Pirmojo etapo PGR reakcijai paruošiamas 50 µl tūrio mėginys, kuriame yra tokios galutinės toliau nurodytų medžiagų koncentracijos: 1 vnt. buferinio tirpalo „GoTaq“ („Promega“), 5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/µl baltmės (vitiligo) viruso 146 F1 pradmens, 1 pmol/µl baltmės (vitiligo) viruso 146 R1 pradmens (1 lentelė), 0,25 mM dNTP mišinio, 1,25 vnt. Taq polimerazės ir 2,5 µl DNR. Kiekvieno mėginio procedūra atliekama du kartus, kartu naudojant neigiamą DNR išskyrimo kontrolinį mėginį, neigiamą PGR kontrolinį mėginį (į kurį vietoj DNR dėta 2,5 µl H_2O) ir teigiamą kontrolinį mėginį. Teigiamas kontrolinis mėginys atskiedžiamas įpilant baltmės (vitiligo) viruso plazmidės, pagamintos ir patvirtintos kaip tinkamos naudoti vidaus reikmėms (jos galima gauti iš ES etaloninės laboratorijos).

Atlikti antrojo etapo baltmės (vitiligo) viruso PGR pasiruošiama taip pat kaip ir pirmojo etapo PGR, tačiau naudojant baltmės (vitiligo) viruso pradmenų 146 F2/R2 rinkinį ir antrą teigiamą kontrolinį mėginį siekiant įsitikinti, kad šis PGR etapas užbaigtas sėkmingai.

Pradmuo	Seka
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Tiek pirmojo, tiek antrojo etapo PGR produktai apdorojami naudojant „DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler“ (arba lygiavertį) termociklerį tokio temperatūros ciklo sąlygomis: po pradinio denatūravimo etapo (kuris trunka 2 minutes 94 °C temperatūroje) 30 kartų kartojamas toks ciklas: 30 sekundžių 94 °C temperatūroje, 30 sekundžių 62 °C temperatūroje ir 30 sekundžių 72 °C temperatūroje, po to mėginys ilgiau (2 minutes) palaikomas 72 °C temperatūroje ir galiausiai laikomas 4 °C temperatūroje.

6. **Gelio elektroforezė**

Pirmo ir antro etapų PGR amplifikacijos produktų vizualizacijai naudojami 2 % agarozės geliai, pagaminti naudojant TAE buferinį tirpalą. Kiekvieno mėginio 15 µl kiekis maždaug 20 min. veikiamas 120 V elektros srovės ir apžiūrimas UV šviesoje. Teigiamuose mėginiuose per pirmojo etapo PGR susidarys 1 447 bp, o per antrojo etapo PGR – 848 bp juosta. Šio dydžio mėginiai išpjaunami ir įdedami į 1,5 ml tūrio mikrocentrifuginį mėgintuvėlį. Šiose gelio atpjovose esanti DNR išgryninama naudojant gelį „Promega Wizard® SV Gel“ ir „PCR Clean-Up System“ pagal gamintojo nurodymus. DNR koncentracija apytikriai nustatoma prietaisu „Nano Drop“. Jei išgryninta DNR nenaudojama iškart, ji užšaldoma – 20 °C temperatūroje.

7. **PGR amplifikacijos produktų genų sekos nustatymas**

DNR seka nustatoma naudojant rinkinį „Big Dye Terminator Kit v3,1“ („Applied Biosystems“). Kiekvienos reakcijos produkto bendras tūris – 20 µl, jame yra tokios galutinės medžiagų koncentracijos: 1 vnt. „Big Dye Terminator“, 1 vnt. DNR sekai nustatyti skirto buferinio tirpalo, 10 pmol/µl tiesioginio arba atvirkštinio pradmens ir 10 µl išgrynintos DNR (atskiestos iki maždaug 10 ng/µl koncentracijos). Produktas apdorojamas naudojant „DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler“ (arba lygiavertį) termociklerį tokio temperatūros ciklo sąlygomis: 30 sekundžių 94 °C temperatūroje, po to 10 sekundžių 96 °C temperatūroje, 10 sekundžių 50 °C temperatūroje ir keturios minutės 60 °C temperatūroje; paskutiniai trys ciklo etapai kartojami 30 kartų.

PGR produktai nusodinami taikant metodą, pagal kurį naudojamas natrio acetatas: į 10 µl NaAc, 70 µl H_2O ir 250 µl etanolio mišinį dedama 20 µl DNR, sumaišoma sūkuriniu maišytuvu ir 20 minučių centrifuguojama 13 000 sūkių/min. greičiu, supernatantas pašalinamas, o nuosėdų granulės nuplaunamos naudojant 200 µl absoliutaus etanolio ir 5 minutes centrifuguojama 13 000 sūkių/min. greičiu. Po to nuosėdų granulės penkias minutes džiovinamos 37 °C temperatūroje Ant nuosėdų granulių užpilama 25 µl Hi-Di formamido, dvi minutes pakaitinama iki 95 °C ir kruopščiai sumaišoma sūkuriniu maišytuvu. DNR seka mėginiuose nustatoma analizatoriumi „ABI3130xl Avant Genetic“ pagal gamintojo nurodymus. DNR sekos nustatymo rezultatai išanalizuojami naudojant programinę įrangą „Sequencher“ ir nustatytos sekos sutikrinamos su NCBI duomenų bazėje pateiktomis sekomis naudojant BLAST funkciją.