II

(Nelegislativní akty)

ROZHODNUTÍ

PROVÁDĚCÍ ROZHODNUTÍ KOMISE (EU) 2015/1554

ze dne 11. září 2015,

kterým se stanoví prováděcí pravidla ke směrnici 2006/88/ES, pokud jde o požadavky na metody dozoru a diagnostické metody

(oznámeno pod číslem C(2015) 6188)

(Text s významem pro EHP)

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na směrnici Rady 2006/88/ES ze dne 24. října 2006 o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a produkty akvakultury a o prevenci a tlumení některých nákaz vodních živočichů ([1]), a zejména na čl. 49 odst. 3, čl. 50 odst. 4, čl. 57 písm. b) a čl. 61 odst. 3 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Směrnice 2006/88/ES stanoví minimální preventivní opatření k dozoru nad nákazami uvedenými na seznamu v příloze IV této směrnice (dále jen „nákazy uvedené na seznamu“) a k jejich včasnému zjištění a tlumení, která mají být použita v případě podezření na nákazy uvedené na seznamu nebo potvrzení jejich ohniska. Stanoví také požadavky na dosažení statusu území prostého nákazy, pokud jde o členské státy či jejich oblasti nebo jednotky.

(2) Eradikace nákaz uvedených na seznamu a dosažení statusu území prostého nákazy určitým členským státem, jeho oblastí nebo jednotkou by měly v celé Unii vycházet z týchž zásad a řídit se týmž vědeckým přístupem. Je tedy nezbytné stanovit na úrovni Unie konkrétní požadavky na programy pro dozor a eradikaci a na metody odběru vzorků a diagnostické metody, jež mají členské státy používat za účelem dosažení statusu území prostého nákazy v členském státě jako celku či v jeho oblasti nebo jednotce.

(3) Laboratorní vyšetření, jež mají být prováděna v případě podezření na výskyt nákaz uvedených na seznamu nebo jejich potvrzení by měla být na úrovni Unie totožná a měla by se řídit týmiž vědeckými normami a protokoly. V souladu se směrnicí 2006/88/ES je nezbytné zavést konkrétní diagnostické metody a postupy, jež budou používat laboratoře určené pro tento účel příslušným orgánem členských států.

(4) Mezinárodní zákoník zdraví vodních živočichů (dále jen „Kodex zdraví vodních živočichů“) přijatý Světovou organizací pro zdraví zvířat (OIE) stanoví normy pro zlepšení zdraví vodních živočichů a dobré životní podmínky chovaných ryb v celosvětovém měřítku, včetně norem pro bezpečný mezinárodní obchod s vodními živočichy a jejich produkty. Řada kapitol Kodexu zdraví vodních živočichů obsahuje doporučení týkající se používání určitých diagnostických testů. Tyto testy stanovené OIE se popisují v Příručce diagnostických testů pro vodní živočichy OIE (dále jen „příručka testů pro vodní živočichy“). V zájmu zajištění toho, aby požadavky Unie na diagnostiku nákaz vodních živočichů odpovídaly mezinárodním normám, by pravidla stanovená v tomto rozhodnutí měla vzít v úvahu normy a doporučení Kodexu zdraví vodních živočichů.

([1]) Úř. věst. L 328, 24.11.2006, s. 14.

(5) V tomto ohledu uvádí Kodex zdraví vodních živočichů k mnoha nákazám uvedeným na seznamu některé testy a postupy, jež se použijí pro účely laboratorních vyšetření. V zájmu zajištění jednotného vědeckého východiska pro diagnostickou práci týkající se nákaz uvedených na seznamu na úrovni Unie je nezbytné z diagnostických testů a postupů doporučených OIE vybrat a konkrétně stanovit, které testy by měly být pro účely laboratorního vyšetření při provádění programů dozoru a k vyloučení podezření na výskyt nákaz uvedených na seznamu nebo jejich potvrzení povinné. Přestože v určitých případech bude také zapotřebí mít k dispozici alternativní metody a postupy, měly by se zajistit popisy a určitá vědecká vysvětlení ohledně toho, kdy a jak by se tyto alternativní metody mohly použít. Obzvláště důležité to je u podrobnějších diagnostických postupů.

(6) K dosažení přesných a reprodukovatelných diagnostických výsledků je důležité, aby byly podrobné postupy a protokoly, jež se mají používat, potvrzeny v souladu s příslušnými normami jakosti uvedenými v části I přílohy VI směrnice 2006/88/ES. U mnohých diagnostických metod, jež toto rozhodnutí stanoví, je používání komerčně dostupných testovacích sad nezbytnou součástí diagnostických protokolů, přičemž referenční laboratoře Evropské unie (EURL) pro příslušné nákazy tyto sady potvrdily akreditovanými testy. V zájmu právní jistoty by obchodní názvy těchto potvrzených komerčních sad měly být v tomto rozhodnutí uvedeny.

(7) Pro některé členské státy může být dosažení statusu území prostého nákazy, pokud jde o jednu nákazu uvedenou na seznamu nebo o více těchto nákaz, pro celý stát či jednu jeho oblast nebo jednotku obtížné. V těchto situacích si dotčený členský stát nemusí přát, aby status území prostého nákazy v souvislosti s nákazami uvedenými na seznamu získal či aby si jej obnovil. Minimální opatření ke tlumení nákaz, jež je třeba uplatňovat v případech, kdy si dotčený členský stát získat nebo obnovit status území prostého nákazy nepřeje, by měla být na úrovni Unie totožná a měla by se řídit týmiž kritérii. Je proto v souladu se směrnicí 2006/88/ES nezbytné stanovit podrobná pravidla pro zamezení šíření těchto nákaz uvedených na seznamu a minimální požadavky na zrušení těchto opatření k zamezení šíření nákaz.

(8) Rozhodnutí Komise 2001/183/ES ([1]) stanoví požadavky týkající se plánů odběru vzorků a diagnostických metod pro zjišťování a potvrzování nákaz uvedených na seznamu, a to infekční nekrózy krvetvorné tkáně a virové hemoragické septikémie. Rozhodnutí Komise 2003/466/ES ([2]) stanoví požadavky týkající se plánů odběru vzorků a diagnostických metod pro zjišťování výskytu nakažlivé chudokrevnosti lososů a rovněž kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor při podezření na výskyt této nákazy a po jejím potvrzení. Rozhodnutí Komise 2002/878/ES ([3]) stanoví požadavky týkající se plánů odběru vzorků a diagnostických metod pro zjišťování a potvrzování výskytu dvou nákaz měkkýšů, bonamiózy (*Bonamia ostreae*) a marteiliózy (*Marteilia refringens*). Za účelem aktualizace požadavků by výše uvedená tři rozhodnutí měla být nahrazena tímto rozhodnutím. Rozhodnutí 2001/183/ES, rozhodnutí 2002/878/ES a rozhodnutí 2003/466/ES by tedy měla být zrušena.

(9) Jelikož některé členské státy potřebují čas na modernizaci svých národních referenčních laboratoří, aby vyhověly požadavkům stanoveným v tomto rozhodnutí, mělo by se toto rozhodnutí použít od 1. dubna 2016.

(10) Opatření stanovená tímto rozhodnutím jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro rostliny, zvířata, potraviny a krmiva,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

Předmět

Toto rozhodnutí stanoví pravidla pro:

a) dozor, nárazníkové zóny, metody odběru vzorků a diagnostické metody, jež mají členské státy používat v souvislosti s nákazovým statusem členských států či jejich oblastí nebo jednotek v případě neexotických nákaz vodních živočichů uvedených na seznamu v části II přílohy IV směrnice 2006/88/ES (dále jen „nákazy uvedené na seznamu“);

([1]) Rozhodnutí Komise 2001/183/ES ze dne 22. února 2001, kterým se stanoví plány odběru vzorků a diagnostické metody pro zjišťování a potvrzování některých nákaz ryb a kterým se zrušuje rozhodnutí 92/532/EHS (Úř. věst. L 67, 9.3.2001, s. 65).

([2]) Rozhodnutí Komise 2003/466/ES ze dne 13. června 2003, kterým se stanoví kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor při podezření na výskyt nakažlivé chudokrevnosti lososů (ISA) nebo po jeho potvrzení (Úř. věst. L 156, 25.6.2003, s. 61).

([3]) Rozhodnutí Komise 2002/878/ES ze dne 6. listopadu 2002 o plánech odběru vzorků a diagnostických metodách pro zjišťování a potvrzování výskytu dvou nákaz měkkýšů, bonamiózy (*Bonamia ostreae*) a marteiliózy (*Marteilia refringens*) (Úř. věst. L 305, 7.11.2002, s. 57).

b) diagnostické metody, jež se mají používat pro laboratorní vyšetření v případě podezření na výskyt nákaz uvedených na seznamu nebo jejich potvrzení; a

c) minimální opatření ke tlumení nákaz, jež je třeba použít v případě podezření na výskyt nákazy uvedené na seznamu v členském státě, jeho oblasti nebo jednotce, které nebyly prohlášeny za prosté této nákazy uvedené na seznamu, nebo potvrzení uvedené nákazy.

Článek 2

Definice

Pro účely tohoto rozhodnutí se použijí tyto definice:

a) „virovou hemoragickou septikémií“ („VHS“) se rozumí nákaza způsobená virem hemoragické septikémie („VHSV“), známým také jako egtvedský virus, náležejícím k rodu *Novirhabdovirus* a čeledi *Rhabdoviridae*;

b) „infekční nekrózou krvetvorné tkáně“ („IHN“) se rozumí nákaza způsobená virem infekční nekrózy krvetvorné tkáně („IHNV“) náležejícím k rodu *Novirhabdovirus* a čeledi *Rhabdoviridae*;

c) „koi herpesvirózou“ („KHVD“) se rozumí nákaza způsobená koi herpesvirem („KHV“) náležejícím do čeledi *Alloherpesviridae*. Vědecký název tohoto viru je herpesvirus kaprovitých ryb 3 (CyHV-3);

d) „nakažlivou chudokrevností lososů“ („ISA“) se rozumí infekce způsobená virem chudokrevnosti lososů (ISAV) s delecí ve vysoce polymorfní oblasti, náležejícím k rodu *Isavirus* a čeledi *Orthomyxoviridae*;

e) „infekcí *Marteilia refringens*“ se rozumí nákaza způsobená infekcí paramyxovirem *Marteilia refringens* působícím protozoární nákazy;

f) „infekcí *Bonamia ostreae*“ se rozumí nákaza způsobená infekcí virem haplosporidie *Bonamia ostreae* působícím protozoární nákazy;

g) „běloskvrnitostí“ (white spot disease – „WSD“) se rozumí nákaza způsobená virem běloskvrnitosti (WSSV), což je virus napadající dvoušroubovici DNA z rodu *Whispovirus* a čeledi *Nimaviridae*.

Článek 3

Minimální požadavky na programy pro dozor a eradikaci

Členské státy zajistí, aby se při udělování, odebírání nebo obnově statusu území prostého nákazy týkajícího se jedné nebo více z nákaz uvedených na seznamu určitému členskému státu či jeho oblasti nebo jednotce dodržovala pravidla upravující programy pro dozor a eradikaci, nárazníkové zóny, metody odběru vzorků a diagnostické metody stanovené v příloze I a konkrétní metody a podrobné postupy stanovené v příloze II.

Článek 4

Minimální požadavky na diagnostické metody a konkrétní postupy

Členské státy zajistí, aby se při provádění laboratorních vyšetření za účelem potvrzení nebo vyloučení výskytu nákazy uvedené na seznamu dodržovaly metody tlumení stanovené v příloze I a konkrétní diagnostické metody a podrobné postupy stanovené v příloze II.

Článek 5

Minimální opatření ke tlumení nákaz k zamezení šíření nákaz uvedených na seznamu a minimální požadavky na zrušení těchto opatření v členských státech, oblastech nebo jednotkách, které nebyly prohlášeny za prosté nákaz uvedených na seznamu

Členské státy zajistí, aby se při provádění minimálních opatření ke tlumení nákaz a zrušení opatření k zamezení šíření nákaz týkajících se jedné či více z nákaz uvedených na seznamu v členském státě či v jeho oblasti nebo jednotce, jež nebyly prohlášeny za prosté těchto nákaz uvedených na seznamu, dodržovala minimální opatření ke tlumení nákaz a minimální požadavky na zrušení opatření k zamezení šíření nákaz stanovené v příloze I.

Článek 6

Zrušení

Rozhodnutí 2001/183/ES, 2002/878/ES a 2003/466/ES se zrušují.

Článek 7

Použitelnost

Toto rozhodnutí se použije ode dne 1. dubna 2016.

Článek 8

Určení

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

V Bruselu dne 11. září 2015.

Za Komisi
Vytenis ANDRIUKAITIS
člen Komise

PŘÍLOHA I

METODY DOZORU A TLUMENÍ NÁKAZ

I. **Úvod**

Tato příloha stanoví:

a) požadavky na programy pro dozor a eradikaci stanovené v článku 44 směrnice 2006/88/ES a metody odběru vzorků a diagnostické metody používané za účelem prohlášení členských států či oblastí nebo jednotek členských států za prosté nákazy, jak se stanoví v kapitole VII uvedené směrnice;

b) metody odběru vzorků a diagnostické metody, které se mají používat za účelem laboratorních vyšetření v případě podezření a k potvrzení výskytu neexotických nákaz uvedených v části II přílohy IV směrnice 2006/88/ES (dále jen „nákazy uvedené na seznamu"), jak se stanoví v čl. 28 písm. a) a čl. 57 písm. b) uvedené směrnice;

c) opatření k zamezení šíření nákazy, jež se přijmou v případě potvrzení výskytu nákazy uvedené na seznamu podle článku 39 směrnice 2006/88/ES, a opatření, jež se přijmou za účelem získání nákazového statusu kategorie III v případě členského státu, oblasti nebo jednotky, které mají nákazový status kategorie V.

Požadavky stanovené v této příloze se vztahují na tyto nákazy uvedené na seznamu:

1.	Virová hemoragická septikémie (VHS)	Část 1
2.	Infekční nekróza krvetvorné tkáně (IHN)	Část 1
3.	Koi herpesviróza (KHV)	Část 2
4.	Nakažlivá chudokrevnost lososů (ISA)	Část 3
5.	Marteilióza (*Marteilia refringens*)	Část 4
6.	Bonamióza (*Bonamia ostreae*)	Část 5
7.	Běloskvrnitost (White spot disease)	Část 6

II. **Definice**

Pro účely příloh I a II se použijí tyto definice:

a) „Kontinentální jednotkou" se rozumí jedno nebo více hospodářství nacházející se v kontinentální části jednoho či více členských států v rámci společného systému biologické bezpečnosti a obsahující populaci vodních živočichů s jednoznačným nákazovým statusem ve vztahu ke konkrétní nákaze.

b) „Kontinentálním hospodářstvím" se rozumí hospodářství chovající živočichy pocházející z akvakultury, které se nachází v kontinentální části některého z členských států.

c) „Kontinentální oblastí" se rozumí přesně zeměpisně vymezená oblast v kontinentální části jednoho nebo více členských států s jednotným hydrologickým systémem sestávajícím z částí povodí od pramene (pramenů) až po přírodní nebo umělou překážku zabraňující migraci vodních živočichů z níže položených úseků povodí proti proudu, celé povodí od pramene (pramenů) až k ústí do moře nebo více než jedno povodí, včetně příslušných ústí do moře, v důsledku epizootologické souvislosti mezi povodími prostřednictvím ústí.

d) „Hospodářstvím úředně prohlášeným za zamořené“ se rozumí hospodářství chovající vodní živočichy, kde byl příslušným orgánem potvrzen výskyt jedné nebo více nákaz uvedených na seznamu v souladu s čl. 28 písm. a), článkem 29 a čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES.

e) „Kontaktním hospodářstvím“ se rozumí hospodářství chovající vodní živočichy, u nějž bylo prokázáno nebo existuje silné podezření, že bylo kontaminováno infekčním materiálem z hospodářství úředně prohlášeného za zamořené.

ČÁST 1

METODY DOZORU A TLUMENÍ NÁKAZY V PŘÍPADĚ VIROVÉ HEMORAGICKÉ SEPTIKÉMIE (VHS) A INFEKČNÍ NEKRÓZY KRVETVORNÉ TKÁNĚ (IHN)

I. **Požadavky na programy pro dozor a eradikaci za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o VHS a IHN, a opatření k zamezení šíření těchto nákaz uvedených na seznamu**

I.1 Obecné požadavky na kontroly zdravotní nezávadnosti a odběr vzorků v případě VHS a IHN:

a) kontroly zdravotní nezávadnosti a případně odběr vzorků se provádějí v období, kdy je teplota vody nižší než 14 °C nebo kdykoliv je pravděpodobné, že teplota vody dosáhne svého nejnižšího bodu v roce;

b) je-li v souladu s přílohou V částí I bodem 2 odst. 2 směrnice 2006/88/ES zapotřebí cílený dozor u volně žijících populací, určí se počet a zeměpisné rozložení míst odběru vzorků tak, aby bylo dosaženo přiměřeného pokrytí členského státu, oblasti nebo jednotky. Místa odběru vzorků se vybírají tak, aby byly zastoupeny různé ekosystémy, kde se nacházejí volně žijící populace vnímavých druhů;

c) mají-li být hospodářství nebo volně žijící populace podrobeny kontrolám zdravotní nezávadnosti či odběru vzorků častěji než jednou ročně, činí intervaly mezi jednotlivými kontrolami zdravotní nezávadnosti a mezi odběry vzorků alespoň čtyři měsíce a jsou pokud možno co nejdelší s přihlédnutím k požadavkům na teplotu stanoveným v písmenu a);

d) u všech výrobních jednotek, např. rybníků, nádrží, síťových klecí, se kontroly zdravotní nezávadnosti zaměří na přítomnost mrtvých, slabých či abnormálně se chovajících ryb. Zvláštní pozornost je třeba věnovat oblasti odtoku vody, kde se zpravidla shromažďují slabé ryby, protože voda zde proudí;

e) ryby vnímavých druhů se k odběru vzorků vyberou takto:

i) je-li přítomen pstruh duhový, vyberou se k odběru vzorků pouze ryby náležející k uvedenému druhu, s výjimkou případů, kdy jsou přítomny jiné vnímavé druhy, které vykazují typické známky VHS nebo IHN; není-li přítomen pstruh duhový, musí být ve vzorku zastoupeny všechny ostatní vnímavé druhy, jež jsou přítomny;

ii) jsou-li přítomny slabé, abnormálně se chovající nebo čerstvě uhynulé, ale nerozkládající se ryby, vyberou se tyto ryby; pokud je pro produkci ryb využíván více než jeden vodní zdroj, zařadí se do vzorku ryby tak, aby byly zastoupeny všechny vodní zdroje;

iii) ryby se vyberou tak, aby ve vzorku byly poměrně zastoupeny všechny výrobní jednotky hospodářství i všechny ročníky.

I.2 Konkrétní požadavky na získání statusu území prostého nákazy (kategorie I), pokud jde o VHS a IHN

I.2.1 Programy dozoru:

a) členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie III uvedený v příloze III části B směrnice 2006/88/ES, pokud jde o VHS, IHN či o obě nákazy, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tyto nákazy uvedené na seznamu, za předpokladu, že všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II zmíněné směrnice v daném členském státě, oblasti nebo jednotce splňují požadavky stanovené v příloze V uvedené směrnice a že se tato hospodářství, a vyžaduje-li to příloha V část I bod 2 druhý pododstavec uvedené směrnice, i místa odběru vzorků u volně žijících populací vybraných v souladu s touto částí uvedené přílohy podrobila jednomu z těchto programů dozoru:

i) model A – dvouletý program dozoru:

Hospodářství nebo místa odběru vzorků musí být podrobena kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu dvou let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 1.A uvedené v oddíle II.

Za toto dvouleté období musí vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 dospět k negativním výsledkům, pokud jde buď o VHS, nebo IHN, či o obě nákazy a jakékoliv podezření buď na VHS, nebo na IHN či obě nákazy musí být vyloučeno metodami odběru vzorků a diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3;

ii) model B – čtyřletý program dozoru se sníženým množstvím vzorků:

Hospodářství nebo místa odběru vzorků musí být podrobena kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu čtyř let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 1.B uvedené v oddíle II.

Za toto čtyřleté období musí vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 dospět k negativním výsledkům, pokud jde buď o VHS, nebo IHN, či o obě nákazy a jakékoliv podezření buď na VHS, nebo na IHN či obě nákazy musí být vyloučeno metodami odběru vzorků a diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3;

b) bude-li v průběhu provádění programu dozoru uvedeného v písmenu a) v hospodářství zařazeném do uvedeného programu dozoru potvrzena infekce buď VHS, nebo IHN, nebo oběma nákazami, a bude-li tedy hospodářství odňat nákazový status kategorie II, může uvedené hospodářství okamžitě získat svůj nákazový status kategorie II zpět a pokračovat v provádění programu dozoru za účelem získání statusu území prostého nákazy bez provedení programu eradikace stanoveného v bodě I.2.2 za předpokladu, že splňuje tyto podmínky:

i) jedná se o kontinentální hospodářství, jehož nákazový status, pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, nebo o obě nákazy, je nezávislý na nákazovém statusu populací vodních živočichů v okolních přírodních vodách, pokud jde o tyto nákazy uvedené na seznamu, a to v souladu s přílohou V částí II bodem 3 směrnice 2006/88/ES;

ii) je vyklizeno, vyčištěno, vydezinfikováno a ponecháno ladem (bez obsádky); doba ponechání ladem činí alespoň šest týdnů;

iii) jsou do něj nově doplněny ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, či o obě nákazy.

I.2.2 Programy eradikace

I.2.2.1 Obecné požadavky

Členský stát, oblast nebo jednotka s nákazovým statusem kategorie V, pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, či o obě nákazy, může dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tyto nákazy uvedené na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobila programu eradikace, jenž splňuje písmena a) až e):

a) musí být účinně použita minimální opatření pro tlumení nákazy stanovená v kapitole V oddíle 4 směrnice 2006/88/ES a v blízkosti hospodářství úředně prohlášených za zamořená buď VHS, nebo IHN, nebo oběma těmito nákazami uvedenými na seznamu musí být vytvořena uzavřená oblast uvedená v čl. 32 písm. b) uvedené směrnice, která zahrnuje ochranné pásmo a pásmo dozoru.

Uzavřená oblast musí být vymezena případ od případu s ohledem na faktory ovlivňující rizika rozšíření této nákazy uvedené na seznamu na chované a volně žijící ryby, jako je počet, výskyt a rozložení ryb v hospodářství zamořeném buď VHS, nebo IHN, nebo oběma nákazami, vzdálenost a hustota sousedních hospodářství, blízkost jatek, kontaktní hospodářství, druhy přítomné v hospodářstvích, chovné postupy používané v postižených hospodářstvích a hospodářstvích sousedících s postiženými hospodářstvími, hydrodynamické podmínky a jiné určené faktory epizootologického významu.

Pro vytvoření ochranných pásem a pásem dozoru platí, pokud jde o jejich zeměpisné vymezení, tyto minimální požadavky:

i) ochranné pásmo se vytvoří v bezprostřední blízkosti hospodářství úředně prohlášeného za zamořené buď VHS, nebo IHN, nebo oběma těmito nákazami uvedenými na seznamu a odpovídá:

1) v pobřežních oblastech: oblasti kruhového půdorysu o poloměru přinejmenším jednoho posunu přílivu nebo přinejmenším 5 km, podle toho, který je větší, jejímž středem je hospodářství úředně prohlášené za zamořené buď VHS, nebo IHN, nebo oběma těmito nákazami, nebo obdobné oblasti určené na základě příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů;

2) ve vnitrozemských oblastech: celému povodí hospodářství úředně prohlášeného za zamořené VHS, IHN nebo oběma nákazami; příslušný orgán může omezit rozsah pásma na části povodí či na plochu hospodářství za předpokladu, že není ohrožena prevence šíření buď VHS, nebo IHN, nebo obou nákaz;

ii) příslušný orgán vytvoří vně ochranného pásma pásmo dozoru, které odpovídá:

1) v pobřežních oblastech: ploše, která kolem ochranného pásma přesahuje pásma posunu přílivu, nebo ploše, která kolem ochranného pásma přesahuje pásma posunu přílivu, nebo ploše kruhového půdorysu o poloměru 10 km od středu ochranného pásma nebo obdobné oblasti určené na základě příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů;

2) ve vnitrozemských oblastech: rozšířené oblasti vně vytvořeného ochranného pásma;

b) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci ochranného pásma, která nebyla úředně prohlášena za zamořená buď VHS, nebo IHN, nebo oběma nákazami, se podrobí úřednímu šetření, jehož součástí je alespoň:

i) odběr vzorků 10 ryb k vyšetření, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající infekci buď VHS, nebo IHN, či oběma nákazám, nebo minimálně 30 ryb, nejsou-li pozorovány klinické ani postmortální příznaky;

ii) jedna kontrola zdravotní nezávadnosti v hospodářstvích, kde vyšetření uvedená v bodě i) přinesla negativní výsledky; kontroly zdravotní nezávadnosti pokračují jednou měsíčně v období, kdy je teplota vody nižší než 14 °C, s výjimkou případů, kdy jsou rybníky nebo síťové klece pokryty ledem, a to až do odvolání ochranného pásma v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c);

c) všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená buď VHS, nebo IHN, nebo oběma nákazami se vyklidí, vyčistí, vydezinfikují a ponechají ladem. Doba ponechání ladem činí alespoň šest týdnů. Po vyklizení všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená v rámci téhož ochranného pásma následuje alespoň třítýdenní synchronizované ponechání ladem. Toto písmeno se také použije na nová hospodářství úředně prohlášená za zamořená v průběhu provádění programu eradikace.

Po ponechání hospodářství úředně prohlášených za zamořená ladem se ochranná pásma změní na pásma dozoru.

Příslušný orgán může požadovat, aby byla v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem další hospodářství. Dobu, po kterou jsou tato hospodářství ponechána ladem, určí příslušný orgán na základě posouzení rizika v jednotlivých konkrétních případech;

d) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená buď VHS, nebo IHN, nebo oběma těmito nákazami uvedenými na seznamu a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru uvedených v písmenu c) se nově doplní ryby z členských států, oblastí či jednotek se statusem území prostého nákazy (kategorie I), pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, nebo o obě nákazy.

K novému doplnění dojde pouze tehdy, byla-li všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c);

e) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, na které se vztahuje program eradikace, a je-li zapotřebí dozor u volně žijících populací, i místa odběru vzorků vybraná v souladu s bodem I.1 následně podléhají programu dozoru stanovenému v bodě I.2.1.

I.2.2.2 Požadavky na opětovné získání statusu území prostého nákazy v případě kontinentálních jednotek zahrnujících jedno jediné hospodářství, které bylo dříve prohlášeno za prosté nákazy buď IHN, nebo VHS, nebo obou nákaz

Kontinentální jednotka zahrnující jedno jediné hospodářství, které bylo dříve prohlášeno za prosté buď VHS, nebo IHN, nebo obou těchto nákaz uvedených na seznamu, jejíž nákazový status, pokud jde o tyto nákazy uvedené na seznamu, je nezávislý na okolních přírodních vodách v souladu s přílohou V částí II bodem 3 směrnice 2006/88/ES a jejíž nákazový status kategorie I byl odvolán v souladu s čl. 53 odst. 3 uvedené směrnice, může opět získat nákazový status kategorie I okamžitě poté, co příslušný orgán potvrdí, že byly splněny tyto podmínky:

a) hospodářství úředně potvrzené jako zamořené buď VHS, nebo IHN, nebo oběma nákazami se musí vyklidit, vyčistit, vydezinfikovat a ponechat ladem; doba ponechání ladem musí činit alespoň šest týdnů;

b) do hospodářství úředně potvrzeného jako zamořené buď VHS, nebo IHN, nebo oběma nákazami se nově doplní ryby z členských států, oblastí či jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, nebo o obě nákazy.

I.3 Konkrétní požadavky na zachování statusu území prostého nákazy (kategorie I), pokud jde buď o VHS, nebo o IHN

Je-li za účelem zachování nákazového statusu kategorie I zapotřebí cílený dozor, jak stanoví článek 52 směrnice 2006/88/ES, podrobí se všechna hospodářství v rámci dotčeného členského státu, oblasti nebo jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II zmíněné směrnice, kontrole zdravotní nezávadnosti a odeberou se vzorky ryb v souladu s tabulkou 1.C stanovenou v oddíle II této části, a to s ohledem na úroveň rizika zavlečení buď VHS, nebo IHN, či obou těchto nákaz uvedených na seznamu u daného hospodářství.

Při určování četnosti kontrol zdravotní nezávadnosti v případě jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, nebo o obě nákazy, které se nacházejí v kontinentálních celcích a jejichž nákazový status, pokud jde o VHS či IHN, závisí na nákazovém statusu populací vodních živočichů v okolních přírodních vodách v souladu s přílohou V částí II bodem 2 směrnice 2006/88/ES, je riziko zavlečení buď VHS, nebo IHN, nebo obou nákaz považováno za vysoké.

Status území prostého nákazy je zachován pouze tehdy, pokud jsou u všech zkoušených vzorků zjištěny pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 negativní výsledky, pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, nebo obě tyto nákazy uvedené na seznamu, a pokud je jakékoliv podezření buď na VHS, nebo IHN, či obě tyto nákazy vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3.

I.4 Požadavky na zrušení opatření k zamezení šíření nákazy stanovených v článku 39 směrnice 2006/88/ES, tedy změny nákazového statusu kategorie V na nákazový status kategorie III

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde buď o VHS, nebo IHN, či obě tyto nákazy, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie III, pokud jde o tyto nákazy uvedené na seznamu, za předpokladu, že:

a) byly splněny požadavky stanovené v bodě I.2.2.1 písm. a), b) a c). V případě, že ponechání ladem není technicky možné, podrobí se dotčená hospodářství alternativnímu opatření, které poskytne téměř obdobnou záruku vymýcení buď IHNV, nebo VHSV, nebo obou virů z prostředí hospodářství;

b) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem/podrobených alternativním opatřením v souladu s písmenem a) v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru byly nově doplněny ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, II či III, pokud jde buď o VHS, nebo o IHN, nebo o obě nákazy;

c) k novému doplnění došlo teprve poté, co byla všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem/podrobena alternativním opatřením v souladu s písmenem a).

II. **Diagnostické metody a metody odběru vzorků**

II.1 Odebírané orgány:

Zkoumají se slezina, předledvina a srdce nebo mozek. Je-li odebrána, může být také vyšetřena ovariální tekutina nebo semeno generačních ryb.

V případě malého potěru lze rybu kratší než 4 cm s pomocí sterilních nůžek nebo sterilního skalpelu po odstranění části těla, která se nachází za gastrointestinálním otvorem, nakrájet na malé kousky. Pokud se jedná o vzorek z celé ryby o délce 4 až 6 cm, odebírají se vnitřnosti včetně ledvin.

Smísit se smějí části orgánů maximálně z 10 ryb.

II.2 Diagnostické metody za účelem získání a zachování statusu území prostého buď VHS, nebo IHN, nebo obou nákaz

Diagnostickou metodou v souladu se schválenými diagnostickými metodami a postupy stanovenými v příloze II části 1 bodě I za účelem dosažení nebo zachování statusu prostého nákazy, pokud jde o VHS, IHN či obě nákazy, je:

a) izolace viru v buněčných kulturách s následnou identifikací pomocí enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA), nepřímého imunofluorescenčního testu (IFAT), virusneutralizačního testu či kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-qPCR); nebo

b) RT-qPCR.

II.3 Metody odběru vzorků a diagnostické metody za účelem vyloučení nebo potvrzení přítomnosti VHS či IHN

Je-li zapotřebí potvrdit nebo vyloučit podezření buď na VHS, nebo na IHN, nebo na obě nákazy v souladu s článkem 28 směrnice 2006/88/ES, dodrží se tyto postupy kontroly, odběru vzorků a vyšetření:

a) podezřelé hospodářství se podrobí alespoň jedné kontrole zdravotní nezávadnosti a jednomu odběru vzorků 10 ryb, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající infekci buď VHS, nebo IHN, či oběma nákazami, nebo minimálně 30 ryb, nejsou-li pozorovány klinické ani postmortální příznaky. Vzorky jsou vyšetřeny pomocí jedné nebo více diagnostických metod stanovených v bodech i) a ii) v souladu s podrobnými diagnostickými metodami a postupy stanovenými v příloze II části 1 oddíle II:

   i) obvyklá izolace viru v buněčné kultuře s následnou imunochemickou nebo molekulární identifikací viru;

   ii) zjišťování viru pomocí RT-qPCR;

   iii) jiné diagnostické techniky s prokázanou obdobnou účinností, například nepřímý imunofluorescenční test (IFAT), enzymová imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA), polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-PCR) a imunohistochemická analýza (IHC).

b) přítomnost VHS je považována za potvrzenou, jsou-li výsledky jedné nebo více z uvedených diagnostických metod pozitivní na VHSV. Přítomnost IHN je považována za potvrzenou, jsou-li výsledky jedné nebo více z uvedených diagnostických metod pozitivní na IHNV. První případ VHS nebo IHN v členských státech, oblastech či jednotkách, které předtím nebyly zamořené, se potvrzuje na základě obvyklé izolace viru v buněčné kultuře nebo z RT-qPCR;

c) podezření buď na VHSV, nebo IHNV, nebo oba viry lze vyloučit, jestliže kultivační vyšetření či testy RT-qPCR neodhalí další důkazy přítomnosti VHSV nebo IHNV.

Tabulka 1.A

Program dozoru v případě oblastí a jednotek na dvouleté kontrolní období uvedené v bodě I.2.1 písm. a) podbodě i) před získáním statusu území prostého nákazy VHS nebo IHN

Typ hospodářství	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti za rok (dva roky)	Počet odběrů vzorků za rok (dva roky)	Počet ryb ve vzorku (1)	
			Počet remontních ryb	Počet generačních ryb (2)
a) Hospodářství s generačními rybami	2	2	50 (první kontrola) 75 (druhá kontrola)	30 (první nebo druhá kontrola) 0 (první nebo druhá kontrola)
b) Hospodářství pouze s generačními rybami	2	1	0	75 (první nebo druhá kontrola)
c) Hospodářství bez generačních ryb	2	2	75 (3) (první a druhá kontrola)	0

Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 10

(1) Vzorky musí být odebírány nejdříve tři týdny po přenesení ryb ze sladké do slané vody.
(2) Ovariální tekutina nebo semeno generačních ryb se odebírá v době dozrávání při výtěru.
(3) Vzorky musí být odebírány z takového počtu ryb, který zajistí zjištění VHSV nebo IHNV s 95 % spolehlivostí, je-li předpokládaná prevalence 5 %.

Tabulka 1.B

Program dozoru se sníženým množstvím vzorků na čtyřleté kontrolní období uvedené v bodě I.2.1 písm. a) podbodě ii) před získáním statusu území prostého nákazy VHS nebo IHN

Typ hospodářství	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti za rok	Počet odběrů vzorků za rok	Počet ryb ve vzorku (1)	
			Počet remontních ryb	Počet generačních ryb (2)
První dva roky dozoru				
a) Hospodářství s generačními rybami	2	1	0 (první kontrola) 30 (druhá kontrola)	0 (první kontrola) 0 (druhá kontrola)
b) Hospodářství pouze s generačními rybami	2	1	0	30 (první nebo druhá kontrola)
c) Hospodářství bez generačních ryb	2	1	30 (3) (první nebo druhá kontrola)	0
Poslední dva roky dozoru				
a) Hospodářství s generačními rybami	2	2	30 (první kontrola) 0 (druhá kontrola)	0 (první kontrola) 30 (druhá kontrola)

Typ hospodářství	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti za rok	Počet odběrů vzorků za rok	Počet ryb ve vzorku (1)	
			Počet remontních ryb	Počet generačních ryb (2)
b) Hospodářství pouze s generačními rybami	2	2		30 (první a druhá kontrola)
c) Hospodářství bez generačních ryb	2	2	30 (3) (první a druhá kontrola)	

Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 10

(1) Vzorky musí být odebírány nejdříve tři týdny po přenesení ryb ze sladké do slané vody.
(2) Ovariální tekutina nebo semeno generačních ryb se odebírá v době dozrávání při výtěru.
(3) Vzorky musí být odebírány z takového počtu ryb, který zajistí zjištění VHSV nebo IHNV s 95 % spolehlivostí, je-li předpokládaná prevalence 10 %.

Tabulka 1.C

Program dozoru v případě oblastí nebo jednotek za účelem zachování statusu území prostého nákazy VHS či IHN podle bodu I.3

Úroveň rizika	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti	Počet ryb ve vzorku (3)
Vysoká	2 ročně	30 (1) (2)
Střední	1 ročně	30 (1)
Nízká	1 za 2 roky	30 (1)

Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 10

(1) Vzorky musí být odebírány nejdříve tři týdny po přenesení ryb ze sladké do slané vody.
(2) Vzorky musí být odebírány z takového počtu ryb, který zajistí zjištění VHSV nebo IHNV s 95 % spolehlivostí, je-li předpokládaná prevalence 10 %.
(3) U každé kontroly zdravotní nezávadnosti se odebírá minimálně jeden vzorek.

ČÁST 2

METODY DOZORU A TLUMENÍ NÁKAZY V PŘÍPADĚ KOI HERPESVIRÓZY (KHV)

I. **Požadavky na programy pro dozor a eradikaci za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o KHVD, a za účelem zamezení šíření infekce koi herpesvirem (KHV)**

I.1 Obecné požadavky

Je-li v souladu s přílohou V částí I bodem 2 odst. 2 směrnice 2006/88/ES zapotřebí cílený dozor u volně žijících populací, určí se počet a zeměpisné rozložení míst odběru vzorků tak, aby bylo dosaženo přiměřeného pokrytí členského státu, oblasti nebo jednotky. Místa odběru vzorků se vybírají také tak, aby byly zastoupeny různé ekosystémy, kde se nacházejí volně žijící vnímavé populace, a to říční systémy a jezera.

Cílený dozor se opírá o pravidelné sledování míst, kde se chovají vnímavé druhy. Místa jsou sledována, až teploty vody dosáhnou úrovní, které umožňují rozvinutí nákazy (teploty nad 15 °C), nejdříve však dva týdny od data dosažení těchto teplot. Odeberou a vyšetří se vzorky z veškerých nakažených ryb nebo ryb vykazujících abnormální chování nalezených na místě.

Je-li to možné, odeberou se vzorky z ryb, které byly delší dobu chovány v teplotním rozmezí příznivém pro virus, a to dva až tři týdny při teplotě 15 °C až 26 °C. Za přijatelné řešení lze však považovat i tento přístup:

a) odebrat subpopulaci při přenosu ze zimních do letních rybníků a chovat ryby ve stejné vodě jako v letním rybníce do dosažení minimálních teplotních požadavků; nebo

b) odebrat vzorky při výlovu nebo během jiné manipulace s rybami v rámci běžných řídicích postupů. Je-li to možné, odeberou se vzorky 24 až 72 hodin po provedení těchto řídicích postupů za účelem zvýšení pravděpodobnosti zjištění KHV.

Musí-li se hospodářství nebo volně žijící populace podrobit kontrolám zdravotní nezávadnosti či musí-li být vzorky odebírány častěji než jednou ročně, jsou intervaly mezi kontrolami zdravotní nezávadnosti nebo mezi odběry vzorků v ročním období, kdy teplota vody pravděpodobně dosáhne svého nejvyššího bodu v roce, aniž by překročila hranici 28 °C, co nejdelší.

U všech výrobních jednotek, např. rybníků, nádrží, síťových klecí, se kontroly zdravotní nezávadnosti zaměří na přítomnost mrtvých, slabých či abnormálně se chovajících ryb.

Odebírají se vzorky z jedinců druhu *Cyprinus carpio* a z jeho kříženců, například *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, pokud se tyto druhy v hospodářství nacházejí.

Ryby se k odběru vzorků vyberou takto:

i) pokud jsou přítomny slabé, abnormálně se chovající či čerstvě uhynulé (nerozkládající se) ryby, vyberou se tyto ryby;

ii) pokud je pro produkci ryb využíván více než jeden vodní zdroj, zařadí se do vzorku ryby tak, aby byly zastoupeny všechny vodní zdroje;

iii) ryby se vyberou tak, aby ve vzorku byly poměrně zastoupeny všechny výrobní jednotky hospodářství i všechny ročníky.

I.2 Konkrétní požadavky na získání statusu území prostého nákazy (kategorie I), pokud jde o KHV

I.2.1 Programy dozoru

a) Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie III, pokud jde o KHV, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v uvedeném členském státě, oblasti nebo jednotce splňují požadavky na status území prostého nákazy stanovené v příloze V zmíněné směrnice a pokud se tato hospodářství, a vyžaduje-li to druhý pododstavec bodu 2 části I uvedené přílohy, i místa odběru vzorků u volně žijících populací vybraných v souladu s danou částí podrobila jednomu z těchto programů dozoru:

i) model A – dvouletý program dozoru:

Hospodářství nebo místa odběru vzorků musí být podrobena kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu dvou let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 2.A uvedené v oddíle III.

Za toto dvouleté období musí vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 dospět k negativním výsledkům, pokud jde o KHV, a jakékoliv podezření na KHVD musí být vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě III.2;

ii) model B – čtyřletý program dozoru se sníženým množstvím vzorků:

Hospodářství nebo místa odběru vzorků musí být podrobena kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu čtyř let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 2.B uvedené v oddíle III.

Za toto čtyřleté období musí vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 dospět k negativním výsledkům, pokud jde o KHV, a jakékoliv podezření na KHV musí být vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě III.2;

b) bude-li v průběhu provádění čtyřletého programu dozoru stanoveného v písmenu a) v hospodářství zařazeném do uvedeného programu dozoru potvrzena infekce KHV, a bude-li mu tedy odňat nákazový status kategorie II, může uvedené hospodářství okamžitě získat nákazový status kategorie II zpět a pokračovat v provádění programu dozoru za účelem získání statusu území prostého nákazy bez provedení programu eradikace popsaného v bodě I.2.2 za předpokladu, že splňuje tyto podmínky:

i) jedná se o kontinentální hospodářství, jehož nákazový status, pokud jde o KHVD, je nezávislý na nákazovém statusu populací vodních živočichů v okolních přírodních vodách, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, v souladu s přílohou V částí II bodem 3 směrnice 2006/88/ES;

ii) byla vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem; doba ponechání ladem činí alespoň šest týdnů;

iii) byly do něj nově doplněny ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o KHVD.

I.2.2 Programy eradikace

I.2.2.1 Obecné požadavky

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o KHV, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství v rámci členského státu, oblasti či jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobila alespoň tomuto programu eradikace:

a) musí být účinně použita minimální opatření pro tlumení nákazy stanovená v kapitole V oddíle 4 směrnice 2006/88/ES a v blízkosti hospodářství úředně prohlášených za zamořená KHV musí být vytvořena uzavřená oblast uvedená v čl. 32 písm. b) uvedené směrnice, která zahrnuje ochranné pásmo a pásmo dozoru.

Uzavřená oblast musí být vymezena případ od případu s ohledem na faktory ovlivňující rizika rozšíření KHV na chované a volně žijící ryby, jako je počet, výskyt a rozložení uhynulých ryb v hospodářství zamořeném KHV, vzdálenost a hustota sousedních hospodářství, blízkost jatek, kontaktní hospodářství, druhy přítomné v hospodářstvích, chovné postupy používané v postižených a sousedních hospodářstvích, hydrodynamické podmínky a jiné určené faktory epizootologického významu.

Pro vytvoření ochranných pásem a pásem dozoru platí, pokud jde o jejich zeměpisné vymezení, tyto minimální požadavky:

i) ochranné pásmo se vytvoří v bezprostřední blízkosti hospodářství úředně prohlášeného za zamořené KHV a odpovídá celému povodí hospodářství úředně prohlášeného za zamořené KHV; příslušný orgán může omezit rozsah pásma na části povodí za předpokladu, že není ohrožena prevence šíření KHVD;

ii) mimo ochranné pásmo se vytvoří pásmo dozoru, které odpovídá rozšířené oblasti obklopující vytvořené ochranné pásmo;

b) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci ochranného pásma, která nebyla úředně prohlášena za zamořená KHV, se podrobí úřednímu šetření, jehož součástí je alespoň:

i) odběr vzorků 10 ryb k vyšetření, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající KHV, či minimálně 30 ryb, nejsou-li pozorovány klinické ani postmortální příznaky;

ii) jedna kontrola zdravotní nezávadnosti; v hospodářstvích, kde vyšetření uvedená v bodě III.2 přinesla negativní výsledky; kontroly zdravotní nezávadnosti pokračují jednou měsíčně v ročním období, kdy teplota vody pravděpodobně přesáhne 15 °C, a to až do odvolání ochranného pásma v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c);

c) všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená KHV se vyklidí, vyčistí, vydezinfikují a ponechají ladem. Doba ponechání ladem činí alespoň šest týdnů. Po vyklizení všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená v rámci téhož ochranného pásma následuje alespoň třítýdenní synchronizované ponechání ladem. Toto písmeno se také použije na nová hospodářství úředně prohlášená za zamořená v průběhu provádění programu eradikace.

Po ponechání hospodářství úředně prohlášených za zamořená ladem se ochranná pásma změní na pásma dozoru.

Příslušný orgán může požadovat, aby byla v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem další hospodářství. Dobu ponechání ladem určí příslušný orgán na základě posouzení rizika v jednotlivých konkrétních případech;

d) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená KHV a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru se nově doplní:

i) ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o KHVD; nebo

ii) na přechodné období do 31. prosince 2020 ryby z členských států, oblastí nebo jednotek se schváleným programem dozoru pro KHVD.

K novému doplnění dojde pouze tehdy, byla-li všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená KHV vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c);

e) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, na které se vztahuje program eradikace, a je-li zapotřebí dozor u volně žijících populací, i místa odběru vzorků vybraná v souladu s bodem I.1 následně podléhají alespoň takovému programu dozoru, jak je stanoven v bodě I.2.1.

I.2.2.2 Požadavky na opětovné získání statusu území prostého nákazy v případě kontinentálních jednotek zahrnujících jedno jediné hospodářství, které bylo dříve prohlášeno za prosté nákazy KHV

Kontinentální jednotka zahrnující jedno jediné hospodářství, které má nákazový status kategorie I, pokud jde o KHV, jejíž nákazový status, pokud jde o KHV, je nezávislý na okolních přírodních vodách v souladu s přílohou V částí II bodem 3 směrnice 2006/88/ES a jejíž status kategorie I byl odvolán v souladu s čl. 53 odst. 3 uvedené směrnice, může opět získat nákazový status kategorie I, pokud jde o KHV, okamžitě poté, co příslušný orgán potvrdí, že splnila tyto podmínky:

a) byla vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem; doba ponechání ladem musela být alespoň šest týdnů;

b) byly do ní nově doplněny ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I či z jednotek s nákazovým statusem podle schváleného programu dozoru pro KHV (kategorie II).

I.3 Konkrétní požadavky na zachování statusu kategorie I, pokud jde o KHV

Je-li za účelem zachování nákazového statusu kategorie I zapotřebí cílený dozor, jak stanoví článek 52 směrnice 2006/88/ES, podrobí se všechna hospodářství v rámci dotčeného členského státu, oblasti nebo jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II zmíněné směrnice, kontrole zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků v souladu s tabulkou 2.B stanovenou v oddíle III této části, a to s ohledem na úroveň rizika zavlečení KHV u daného hospodářství.

Četnost kontrol zdravotní nezávadnosti jednotek kategorie I, pokud jde o KHV, umístěných v kontinentálních celcích a zahrnujících jedno nebo více hospodářství, jejichž nákazový status, pokud jde o KHV, je závislý na nákazovém statusu okolních přírodních vod, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, v souladu s přílohou V částí II bodem 2 směrnice 2006/88/ES, odpovídá počtu stanovenému pro vysokou úroveň rizika v tabulce 2.C.

V členských státech, oblastech nebo jednotkách, ve kterých je počet hospodářství omezený a cílený dozor nad těmito hospodářstvími neposkytuje dostatečné epizootologické údaje, zahrnuje dozor za účelem zachování statusu území prostého nákazy místa odběru vzorků vybraná v souladu s požadavky stanovenými v bodě I.1.

V uvedených místech odběru vzorků se kontroly a odběr vzorků provádějí rotačně vždy u 50 % míst odběru vzorků každý rok. Odběr vzorků se provádí v souladu s tabulkou 2.C uvedenou v oddíle III. Vzorky se vybírají, připravují a testují podle popisu v oddíle II a laboratorní vyšetření na infekční činitel KHV musí být negativní.

Status území prostého nákazy je zachován pouze tehdy, pokud jsou u všech vzorků zkoušených pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 zjištěny negativní výsledky, pokud jde o KHV, a pokud je jakékoliv podezření na KHV vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě III.2.

I.4 Konkrétní požadavky na zrušení opatření k zamezení šíření nákazy stanovených v článku 39 směrnice 2006/88/ES s cílem získat nákazový status kategorie III, pokud jde o KHV, v členských státech, jednotkách nebo oblastech, které mají nákazový status kategorie V

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o KHV, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie III, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že:

a) byly splněny požadavky stanovené v bodě I.2.2.1 písm. a), b) a c). V případě, že ponechání ladem není technicky možné, podrobí se dotčená hospodářství alternativnímu opatření, které poskytne téměř obdobnou záruku vymýcení KHV z prostředí hospodářství;

b) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem/podrobených alternativním opatřením v souladu s písmenem a) v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru byly nově doplněny ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, II či III, pokud jde o KHV;

c) k novému doplnění došlo teprve poté, co byla všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem/podrobena alternativním opatřením v souladu s písmenem a).

II. **Diagnostické metody a metody odběru vzorků pro dozor za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o KHV**

II.1 Vzorky

Tkáňový materiál, který má být vyšetřen, tvoří části žaber a ledvin. Smísit se smějí části orgánů maximálně ze dvou ryb.

II.2 Diagnostické metody pro dozor za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o KHV

Diagnostickou metodou za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o KHV, je kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (qPCR), jež je v souladu s podrobnými diagnostickými metodami a postupy stanovenými v příloze II části 2 bodě II.

III. **Diagnostické metody a metody odběru vzorků pro úřední šetření za účelem potvrzení nebo vyloučení podezření na KHV**

III.1 Vzorky

Tkáňový materiál, který má být vyšetřen, tvoří části žaber a ledvin. Smísit se smějí části orgánů maximálně ze dvou ryb.

III.2 Metody úředního šetření a diagnostické metody za účelem vyloučení a potvrzení přítomnosti infekce KHV

Je-li zapotřebí potvrdit nebo vyloučit podezření na KHV v souladu s článkem 28 směrnice 2006/88/ES, dodrží se tyto postupy kontroly, odběru vzorků a vyšetření:

a) úřední šetření zahrnuje alespoň jednu kontrolu zdravotní nezávadnosti a jeden odběr vzorků 10 ryb, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající infekci KHV, či 30 ryb, nejsou-li pozorovány klinické ani postmortální příznaky. Vzorky jsou vyšetřeny pomocí diagnostické metody stanovené v písmenu b) v souladu s podrobnými diagnostickými metodami a postupy stanovenými v příloze II části 2 bodě II;

b) přítomnost infekce KHV se považuje za potvrzenou, zjistí-li se KHV technikou PCR.

Podezření na KHV lze vyloučit, jestliže toto vyšetření neodhalí další důkazy přítomnosti KHV.

Tabulka 2.A

Program dozoru v případě oblastí a jednotek na dvouleté kontrolní období před dosažením statusu území prostého nákazy KHV podle bodu I.2.1

		Počet klinických kontrol za rok (dva roky)	Počet laboratorních vyšetření za rok (dva roky)	Počet ryb ve vzorku
Hospodářství/místa odběru vzorků	První dva roky dozoru	2	2	75 [1]
	Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 2			

[1] Vzorky musí být odebrány z takového počtu ryb, který zajistí zjištění KHV s 95 % spolehlivostí, je-li předpokládaná prevalence 5 %.

Tabulka 2.B

Program dozoru v případě oblastí a jednotek na čtyřleté kontrolní období před dosažením statusu území prostého nákazy KHV podle bodu I.2.1

		Počet klinických kontrol za rok	Počet laboratorních vyšetření za rok	Počet ryb ve vzorku
Hospodářství/místa odběru vzorků	První dva roky dozoru	1	1	30
Hospodářství/místa odběru vzorků	Poslední dva roky dozoru	2	2	30
	Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 2			

Tabulka 2.C

Program dozoru v případě oblastí nebo jednotek za účelem zachování statusu území prostého nákazy KHV podle bodu I.3

Úroveň rizika	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti	Počet ryb ve vzorku
Vysoká	2 ročně	30
Střední	1 ročně	30
Nízká	1 za 2 roky	30

Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 2

Tabulka 2.D

Program dozoru za účelem zachování statusu území prostého nákazy KHV v členských státech, oblastech nebo jednotkách, kde je počet hospodářství omezený a cílený dozor nad těmito hospodářstvími neposkytuje dostatečné epizootologické údaje, jak je uvedeno v bodě I.3

	Počet klinických kontrol za rok	Počet laboratorních vyšetření za rok	Počet ryb ve vzorku
Místa odběru vzorků	1 za 2 roky	1 za 2 roky	30

Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 2

ČÁST 3

METODY DOZORU A TLUMENÍ NÁKAZY V PŘÍPADĚ NAKAŽLIVÉ CHUDOKREVNOSTI LOSOSŮ (ISA)

I. **Požadavky na programy pro dozor a eradikaci za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o nákazu ISA, a za účelem zamezení šíření infekce ISAV s HPR s delecí**

I.1 Obecné požadavky

Mají-li být kontroly zdravotní nezávadnosti a odběry vzorků v hospodářstvích v souladu s přílohou V částí I bodem 2 odst. 2 směrnice 2006/88/ES prováděny častěji než jednou ročně, musí být intervaly mezi kontrolami zdravotní nezávadnosti nebo odběry vzorků co nejdelší.

Je-li v souladu s přílohou V částí I bodem 2 odst. 2 směrnice 2006/88/ES zapotřebí cílený dozor u volně žijících populací, určí se počet a zeměpisné rozložení míst odběru vzorků tak, aby bylo dosaženo přiměřeného pokrytí členského státu, oblasti nebo jednotky. Místa odběru vzorků se vybírají také tak, aby byly zastoupeny různé ekosystémy, kde se nacházejí volně žijící vnímavé populace.

Ve všech výrobních jednotkách, jako jsou rybníky, nádrže a síťové klece, se provádějí kontroly zdravotní nezávadnosti, aby se zjistilo, zda se zde nenacházejí mrtvé, slabé nebo abnormálně se chovající ryby. Zvláštní pozornost je třeba věnovat oblasti odtoku vody, kde se zpravidla shromažďují slabé ryby, protože voda zde proudí.

Ryby se k odběru vzorků vyberou takto:

a) vyberou se pouze umírající nebo čerstvě uhynulé, ale nerozkládající se ryby; při odběru mají přednost zejména ryby, u kterých se projevuje chudokrevnost, krvácení či jiné klinické příznaky naznačující oběhové poruchy;

b) je-li mezi vnímavými druhy na místě losos obecný, odeberou se přednostně jeho vzorky. Není-li v hospodářství s chovem ryb žádný losos obecný, musí být odebrány vzorky jiných vnímavých druhů;

c) pokud je pro produkci ryb využíván více než jeden vodní zdroj, zařadí se do vzorku ryby tak, aby byly zastoupeny všechny vodní zdroje;

d) ryby se vyberou tak, aby ve vzorku byly poměrně zastoupeny všechny výrobní jednotky hospodářství, jako jsou síťové klece, nádrže a rybníky, i všechny ročníky.

I.2 Konkrétní požadavky na dosažení nákazového statusu kategorie I, pokud jde o nákazu ISA

I.2.1 Programy dozoru

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie III v souladu s přílohou III částí B směrnice 2006/88/ES, pokud jde o nákazu ISA, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, jestliže všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v členském státě, oblasti nebo jednotce splňují příslušné požadavky stanovené v příloze V zmíněné směrnice a že se daná hospodářství, a vyžaduje-li to příloha V část I bod 2 odst. 2 uvedené směrnice, i místa odběru vzorků u volně žijících populací vybraných v souladu s daným bodem podrobila tomuto programu dozoru:

a) hospodářství nebo místa odběru vzorků byla podrobena kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu dvou let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 3.A uvedené v oddíle II;

b) za toto dvouleté období musí vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 dospět k negativním výsledkům, pokud jde o ISAV s HPR s delecí, a jakékoliv podezření na infekci ISA musí být vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3;

c) byla-li v průběhu provádění programu dozoru v hospodářství zařazeném do uvedeného programu dozoru potvrzena nákaza ISA, a byl-li mu tedy odňat nákazový status kategorie II, musel být proveden program eradikace v souladu s bodem I.2.2.

I.2.2 Programy eradikace

I.2.2.1 Obecné požadavky

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o nákazu ISA, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství v rámci členského státu, oblasti či jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobila programu eradikace, jenž splňuje alespoň tato písmena a) až e):

a) musí být účinně použita minimální opatření pro tlumení nákazy stanovená v kapitole V oddíle 3 směrnice 2006/88/ES, a zejména musí být v blízkosti hospodářství úředně prohlášených za zamořená nákazou ISAV s HPR s delecí nebo potvrzenou nákazou ISA vytvořena uzavřená oblast uvedená v čl. 32 písm. b) zmíněné směrnice, která zahrnuje ochranné pásmo a pásmo dozoru.

Uzavřená oblast musí být vymezena případ od případu s ohledem na faktory ovlivňující rizika rozšíření ISA na chované nebo volně žijící ryby, jako je počet, výskyt a rozložení uhynulých ryb v hospodářství zamořeném nákazou ISAV s HPR s delecí nebo potvrzenou nákazou ISA, vzdálenost a hustota sousedních hospodářství, blízkost jatek, kontaktní hospodářství, druhy přítomné v hospodářstvích, chovné postupy používané v postižených a sousedních hospodářstvích, hydrodynamické podmínky a jiné určené faktory epizootologického významu.

Pro vytvoření ochranných pásem a pásem dozoru platí, pokud jde o jejich zeměpisné vymezení, tyto minimální požadavky:

i) ochranné pásmo se vytvoří v bezprostřední blízkosti hospodářství úředně prohlášeného za zamořené nákazou ISA a odpovídá:

1) v pobřežních oblastech: oblasti kruhového půdorysu o poloměru přinejmenším jednoho posunu přílivu nebo přinejmenším 5 km podle toho, který je větší, jejímž středem je hospodářství úředně prohlášené za zamořené ISA, nebo obdobné oblasti určené na základě příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů;

2) ve vnitrozemských oblastech: celému povodí hospodářství úředně prohlášeného za zamořené nákazou ISA; příslušný orgán může omezit rozsah pásma na části povodí za předpokladu, že není ohrožena prevence šíření nákazy ISA;

ii) pásmo dozoru se vytvoří vně ochranného pásma a odpovídá:

1) v pobřežních oblastech: ploše, která kolem ochranného pásma přesahuje pásma posunu přílivu, nebo ploše, která kolem ochranného pásma přesahuje pásma posunu přílivu, nebo ploše kruhového půdorysu o poloměru 10 km od středu ochranného pásma nebo obdobné oblasti určené na základě příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů; nebo

2) ve vnitrozemských oblastech: rozšířené oblasti vně vytvořeného ochranného pásma;

b) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci ochranného pásma, která nebyla úředně prohlášena za zamořená nákazou ISA, se podrobí úřednímu šetření, jehož součástí je alespoň:

i) odběr vzorků minimálně 10 umírajících ryb k vyšetření, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající nákaze ISA, či minimálně 30 ryb, nejsou-li pozorovány žádné klinické ani postmortální příznaky;

ii) jedna kontrola zdravotní nezávadnosti; v hospodářstvích, kde vyšetření uvedená v bodě i) přinesla negativní výsledky, kontroly zdravotní nezávadnosti pokračují jednou měsíčně, a to až do odvolání ochranného pásma v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c);

c) všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená nákazou ISAV s HPR s delecí nebo potvrzenou nákazou ISA musí být vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem alespoň po dobu tří měsíců. Ochranná pásma a pásma dozoru mohou být zrušena, budou-li všechna hospodářství v rámci ochranného pásma vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a poté synchronizovaně ponechána ladem alespoň po dobu šesti týdnů.

Po ponechání hospodářství úředně prohlášených za zamořená ladem se ochranná pásma změní na pásma dozoru.

Příslušný orgán může požadovat, aby byla v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem další hospodářství. Dobu, po kterou jsou tato hospodářství ponechána ladem, určí příslušný orgán na základě posouzení rizika v jednotlivých konkrétních případech;

d) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená nákazou ISAV s HPR s delecí nebo potvrzenou nákazou ISA, a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru se nově doplní ryby z členských států, oblastí nebo jednotek kategorie I, pokud jde o nákazu ISA.

K novému doplnění dojde pouze tehdy, byla-li všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c);

e) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, na které se vztahuje program eradikace, a je-li zapotřebí dozor u volně žijících populací, i místa odběru vzorků vybraná v souladu s bodem I.1 následně podléhají programu dozoru stanovenému v bodě I.2.1.

I.2.2.2 Požadavky na opětovné získání statusu území prostého nákazy v případě kontinentálních jednotek zahrnujících jedno jediné hospodářství, které bylo předtím prohlášeno za území s nákazovým statusem kategorie I

Kontinentální jednotka zahrnující jedno jediné hospodářství, které má nákazový status kategorie I, pokud jde o nákazu ISA, jejíž nákazový status je nezávislý na okolních přírodních vodách v souladu s přílohou V částí II bodem 3 směrnice 2006/88/ES a jejíž nákazový status kategorie I byl odvolán v souladu s čl. 53 odst. 3 uvedené směrnice, jej může opět získat okamžitě poté, co příslušný orgán potvrdí, že splňuje tyto podmínky:

a) byla vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem; doba ponechání ladem činí alespoň šest týdnů;

b) byly do ní nově doplněny ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o nákazu ISA.

I.3 Minimální opatření k tlumení nákazy za účelem zachování statusu kategorie I, pokud jde o nákazu ISA

Je-li za účelem zachování nákazového statusu kategorie I zapotřebí cílený dozor, jak stanoví článek 52 směrnice 2006/88/ES, podrobí se všechna hospodářství v rámci dotčeného členského státu, oblasti nebo jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II uvedené směrnice, kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků v souladu s tabulkou 3.B ([1]) stanovenou v oddíle II této části, a to s ohledem na úroveň rizika zavlečení nákazy ISA u daného hospodářství.

Při určování četnosti kontrol zdravotní nezávadnosti pro jednotky s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o nákazu ISA, které se nacházejí v kontinentálních celcích a jejichž nákazový status, pokud jde o nákazu ISA, závisí na nákazovém statusu okolních přírodních vod, v nichž se nachází losos obecný (*Salmo salar*), je riziko zavlečení nákazy ISA považováno za vysoké.

Status území prostého nákazy, pokud jde o nákazu ISA, může být zachován pouze tehdy, pokud byly u všech vzorků zkoušených pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 zjištěny negativní výsledky, pokud jde o infekci ISAV s HPR s delecí, a pokud bylo jakékoliv podezření na nákazu ISA vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3.

I.4 Konkrétní požadavky na dosažení nákazového statusu kategorie III, pokud jde o infekci ISAV s HPR s delecí, v členských státech, oblastech nebo jednotkách, které dříve měly nákazový status kategorie V

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o nákazu ISA, mohou dosáhnout statusu kategorie III za předpokladu, že:

a) byly splněny požadavky stanovené v bodě I.2.2.1 písm. a), b) a c). V případě, že ponechání ladem není technicky možné, podrobí se hospodářství alternativnímu opatření, které poskytne téměř obdobnou záruku vymýcení ISAV z prostředí hospodářství;

b) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem nebo podrobených alternativním opatřením v souladu s písmenem a) v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru byly nově doplněny ryby z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, II či III, pokud jde o ISA;

c) k tomuto novému doplnění došlo teprve poté, co byla všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem/podrobena alternativním opatřením v souladu s písmenem a).

d) v období dvou let, které následuje po splnění opatření uvedených v písmenech a), b) a c), nedošlo k potvrzení infekce ISAV s HPR s delecí a podezření v průběhu tohoto období byla vyloučena postupy stanovenými v bodě II.3.

([1]) Nevztahuje se na hospodářství chovající pouze pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), pstruha obecného (*Salmo trutta*) nebo oba druhy, kde zdroj vody pochází výlučně ze sladkovodních zdrojů, ve kterých se nenachází losos obecný (*Salmo salar*).

II. **Diagnostické metody a úřední šetření**

II.1 Vzorky

Tkáňový materiál, který má být vyšetřen, tvoří:

a) histologie: předledvina, játra, srdce, slinivka břišní, střevo, slezina a žábry;

b) imunohistochemická analýza: prvoledvina a srdce včetně chlopní a tepenného násadce (*bulbus arteriosus*);

c) analýza RT-qPCR: prvoledvina a srdce;

d) virová kultura: prvoledvina, srdce, játra a slezina.

Smísit se smějí části orgánů maximálně z pěti ryb.

II.2 Diagnostické metody za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o nákazu ISA

Diagnostickou metodou, která se použije za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o nákazu ISA, v souladu s body I.2 a I.3, je RT-qPCR; poté následuje sekvenování pozitivních vzorků podrobnými metodami a postupy stanovenými v části 3 přílohy II.

V případě pozitivního výsledku RT-qPCR se před provedením počátečních opatření pro tlumení nákazy stanovených v článku 28 směrnice 2006/88/ES vyšetří další vzorky.

Uvedené vzorky se vyšetří podrobnými metodami a postupy stanovenými v části 3 přílohy II takto:

a) screening vzorků pomocí RT-qPCR, včetně sekvenování genu HE za účelem ověření HPR s delecí;

a

b) vyšetření tkáňových preparátů prostřednictvím specifických protilátek proti infekci ISAV (tedy imunohistochemická analýza fixovaných řezů či IFAT otisků tkáně); nebo

c) izolace a identifikace ISAV alespoň z jednoho vzorku z jakékoliv ryby odebrané z hospodářství v buněčné kultuře.

II.3 Metody úředního šetření a diagnostické metody za účelem vyloučení nebo potvrzení přítomnosti nákazy ISA

Má-li být potvrzeno nebo vyloučeno podezření na nákazu ISA v souladu s článkem 28 směrnice 2006/88/ES, dodrží se tyto postupy kontroly, odběru vzorků a vyšetření:

a) úřední šetření, jež sestává přinejmenším z jedné kontroly zdravotní nezávadnosti a, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající nákaze ISA, přinejmenším z jednoho odběru vzorků 10 umírajících ryb. Nejsou-li pozorovány žádné klinické příznaky ani postmortální příznaky odpovídající nákaze ISA, následuje po kontrole zdravotní nezávadnosti cílený odběr vzorků minimálně 30 umírajících ryb nebo čerstvě uhynulých ryb s normální konstitucí v souladu s bodem I.1. Vzorky se vyšetří diagnostickými metodami stanovenými v písmenu b);

b) v případě pozitivního výsledku RT-qPCR na ISAV s HPR s delecí jsou před provedením počátečních opatření pro tlumení nákazy stanovených v článku 28 směrnice 2006/88/ES vyšetřeny další vzorky. Případ podezření na nákazu ISA se pomocí podrobných metod a postupů stanovených v části 3 přílohy II potvrdí v souladu s těmito kritérii:

   i) zjišťování infekce ISAV pomocí RT-qPCR, včetně sekvenování genu HE za účelem ověření HPR s delecí, a zjišťování infekce ISAV v preparátech tkáně prostřednictvím specifických protilátek proti infekci ISAV (tedy imunohistochemická analýza fixovaných řezů či IFAT otisků tkáně);

   nebo

ii) zjišťování infekce ISAV pomocí RT-qPCR, včetně sekvenování genu HE za účelem ověření HPR s delecí, a

izolace a identifikace ISAV alespoň z jednoho vzorku z jakékoliv ryby z hospodářství v buněčné kultuře;

c) je-li pozorována přítomnost klinických, makroskopických patologických nebo histopatologických nálezů odpovídajících nákaze ISA, musí být nálezy potvrzeny zjištěním viru pomocí dvou diagnostických metod s nezávislými zásadami zjišťování, jako je RT-qPCR a imunohistochemická analýza, a to v souladu s částí 3 přílohy II.

Podezření na nákazu ISA lze vyloučit, zjistí-li se, že vyšetření a kontroly v období 12 měsíců od data podezření neodhalily žádné další důkazy přítomnosti nákazy ISA.

Tabulka 3.A

Program dozoru v případě oblastí a jednotek na dvouleté kontrolní období před dosažením statusu území prostého nákazy ISA podle bodu I.2.1

Rok dozoru	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti za rok (dva roky)	Počet laboratorních vyšetření za rok (dva roky)	Počet ryb, jež se mají za rok odebrat
Rok 1	6	2 [1]	2 * 75 [2]
Rok 2	6	2 [1]	2 * 75 [2]

[1] Vzorky musí být každoročně odebrány, uchovávány a vyšetřeny ve dvou měsíčních zkušebních dobách (a to na jaře a na podzim) nebo případně jak se v praxi jeví zapotřebí.
[2] Nejvyšší počet ryb na směsný vzorek: 5.

Tabulka 3.B

Program dozoru v případě oblastí a jednotek za účelem zachování statusu území prostého nákazy ISA podle bodu I.3 [2]

Úroveň rizika	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti za rok	Počet laboratorních vyšetření za rok	Počet ryb, jež se mají za rok odebrat
Vysoká	2	2 [1]	2 * 30
Střední	1	1 [1]	30
Nízká	1 za 2 roky	1 za 2 roky	30 za 2 roky

[1] Vzorky musí být každoročně odebrány a vyšetřeny ve dvou měsíčních zkušebních dobách (a to na jaře a na podzim) nebo případně jak se v praxi jeví zapotřebí.
[2] Nevztahuje se na hospodářství chovající pouze pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), pstruha obecného (*Salmo trutta*) nebo oba druhy, kde zdroj vody pochází výlučně ze sladkovodních zdrojů, ve kterých se nenachází losos obecný (*Salmo salar*).

ČÁST 4

METODY DOZORU A TLUMENÍ V PŘÍPADĚ INFEKCE MARTEILIÓZOU (*MARTEILIA REFRINGENS*)

I. **Požadavky na programy pro dozor a eradikaci za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*)**

I.1 Obecné požadavky

Kontroly zdravotní nezávadnosti a popřípadě odběr vzorků k laboratornímu vyšetření se provádějí v ročním období, kdy je známo, že prevalence tohoto parazita v členském státě, oblasti nebo jednotce je maximální. Nejsou-li tyto údaje dostupné, provede se odběr vzorků ihned poté, co teplota vody překročí 17 °C.

Mají-li být měkkýši odebráni v souladu s požadavky stanovenými v části 4, použijí se tato kritéria:

a) jsou-li ve výrobní jednotce nebo produkční oblasti přítomny ústřice (*Ostrea* spp.) a slávky (*Mytilus* spp.), jsou oba rody zastoupeny v odebraném vzorku rovnoměrně. Je-li přítomen pouze jeden z uvedených rodů, odebere se vzorek uvedeného rodu. Není-li přítomen rod *Ostrea* ani *Mytilus*, musí být ve vzorku zastoupeny všechny ostatní přítomné vnímavé druhy;

b) jsou-li ve výrobních jednotkách přítomni slabí, rozevření nebo čerstvě uhynulí, ale nerozkládající se měkkýši, jsou v prvé řadě vybráni oni. Nejsou-li tito měkkýši přítomni, zahrnují vybraní měkkýši nejstarší zdravé měkkýše;

c) pokud se vzorky odebírají v hospodářstvích, kde se k produkci používá více vodních zdrojů, musí být součástí vzorků měkkýši ze všech vodních zdrojů, aby byly ve vzorku poměrně zastoupeny všechny části hospodářství;

d) při odběru vzorků v chovných oblastech měkkýšů jsou do vzorku zařazeni měkkýši z dostatečného počtu míst odběru vzorků tak, aby byly ve vzorku poměrně zastoupeny všechny části chovné oblasti měkkýšů. Hlavními faktory, které je při výběru těchto míst odběru vzorků třeba vzít v úvahu, jsou předchozí místa odběru vzorků, kde byla zjištěna marteilióza (*Marteilia refringens*), intenzita chovu, vodní toky, přítomnost vnímavých druhů, přítomnost druhů přenašečů, hloubkové poměry a řídicí postupy. Vzorky se odebírají také na místech, kde se měkkýši vyskytují přirozeně.

I.2 Konkrétní požadavky na dosažení nákazového statusu kategorie I, pokud jde o marteiliózu (*Marteilia refringens*)

I.2.1 Programy dozoru

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie III, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*), mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství či chovné oblasti měkkýšů v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, které chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobily alespoň tomuto programu dozoru, jenž zahrnuje kontroly zdravotní nezávadnosti a odběr vzorků k vyšetření.

Dvouletý program dozoru:

a) hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů byly podrobeny kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu dvou let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 4.A uvedené v oddíle II;

b) během uvedeného dvouletého období dospělo vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 k negativním výsledkům, pokud jde o marteiliózu (*Marteilia refringens*), a jakékoliv podezření na marteiliózu bylo vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3;

c) mají-li být do vzorku zařazeny druhy *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* nebo *Mytilus galloprovincialis* z členského státu, oblasti či jednotky s nákazovým statusem kategorie I, musely být do hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů uvedeny alespoň na jaře těsně předcházejícím období provádění programu dozoru.

I.2.2 Programy eradikace

Eradikace marteiliózy (*Marteilia refringens*) je ve většině případů považována za nemožnou, ale bude-li to členský stát považovat za proveditelné, použije se tento model programu eradikace.

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*), mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství či chovné oblasti měkkýšů v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, které chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobily alespoň tomuto programu eradikace:

a) byla účinně použita opatření stanovená v kapitole V oddíle 3 směrnice 2006/88/ES a zejména musí být v blízkosti hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené marteiliózou (*Marteilia refringens*) vytvořena uzavřená oblast určená v čl. 32 písm. b) směrnice 2006/88/ES, která zahrnuje ochranné pásmo a pásmo dozoru.

Uzavřená oblast se vymezí případ od případu s ohledem na faktory ovlivňující rizika rozšíření marteiliózy (*Marteilia refringens*), jako je: počet, stáří výskyt a rozložení uhynulých měkkýšů v hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů zamořené marteiliózou včetně volně žijících měkkýšů, vzdálenost a hustota sousedních hospodářství či chovných oblastí měkkýšů včetně volně žijících měkkýšů, blízkost ke zpracovatelským zařízením, kontaktním hospodářstvím nebo chovným oblastem měkkýšů, druhy, zvlášť vnímavé druhy a druhy přenašečů přítomné v hospodářstvích či chovných oblastech měkkýšů, chovné postupy používané v postižených a sousedních hospodářstvích a chovných oblastech měkkýšů, hydrodynamické podmínky a jiné určené faktory epizootologického významu.

Pro vytvoření ochranných pásem a pásem dozoru platí tyto minimální požadavky:

i) ochranné pásmo se vytvoří v bezprostřední blízkosti hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů úředně prohlášených za zamořené marteiliózou (*Marteilia refringens*) a odpovídá oblasti určené podle příslušných hydrodynamických či epizootologických údajů;

ii) pásmo dozoru se vytvoří vně ochranného pásma a odpovídá oblasti obklopující ochranné pásmo určené podle příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů;

b) všechna hospodářství a chovné oblasti měkkýšů chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci ochranného pásma, které nebyly úředně prohlášeny za zamořené marteiliózou (*Marteilia refringens*), podléhají úřednímu šetření, jež zahrnuje přinejmenším odběr vzorků 150 měkkýšů k vyšetření po začátku období přenosu marteiliózy. Není-li období přenosu známo, začne odběr vzorků poté, co teplota vody překročí 17 °C;

c) všechna hospodářství a chovné oblasti měkkýšů úředně prohlášené za zamořené marteiliózou (*Marteilia refringens*) se vyklidí, ponechají ladem a pokud možno vyčistí a vydezinfikují.

Doba ponechání ladem činí alespoň:

i) dva měsíce v případě hospodářství a chovných oblastí měkkýšů s omezeným propojením s okolními vodami, například líhní a sádek;

ii) dva měsíce v případě hospodářství a chovných oblastí měkkýšů s neomezeným propojením s okolními vodami za předpokladu, že nakažení měkkýši vnímavých druhů a měkkýši vnímavých druhů epizootologicky související se zamořeným hospodářstvím nebo chovnou oblastí měkkýšů byli sebráni či odstraněni před ročním obdobím, kdy je známo, že prevalence marteiliózy (*Marteilia refringens*) je maximální, nebo není-li uvedené období známo, před obdobím, kdy teplota vody překročí 17 °C;

iii) čtrnáct měsíců u hospodářství a chovných oblastí měkkýšů s neomezeným propojením s okolními vodami za předpokladu, že nakažení měkkýši vnímavých druhů a měkkýši vnímavých druhů epizootologicky související se zamořeným hospodářstvím nebo chovnou oblastí měkkýšů nebyli sebráni či odstraněni před ročním obdobím, kdy je známo, že prevalence marteiliózy (*Marteilia refringens*) je maximální, nebo nejsou-li tyto údaje známy, za předpokladu, že měkkýši vnímavých druhů nebyli sebráni či odstraněni před obdobím, kdy teplota vody překročí 17 °C.

Po vyklizení všech hospodářství a chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené následuje alespoň čtyřtýdenní synchronizované ponechání ladem.

Příslušný orgán může požadovat, aby byla v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem další hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů. Dobu ponechání ladem určí příslušný orgán na základě posouzení rizika v jednotlivých konkrétních případech;

d) do všech hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené a do všech ostatních hospodářství či chovných oblastí měkkýšů ponechaných ladem v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru se nově doplní měkkýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*).

Nové doplnění se provede pouze tehdy, byla-li všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem v souladu s bodem I.2.2 písm. c);

e) všechna hospodářství a chovné oblasti měkkýšů chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, na které se vztahuje program eradikace, následně podléhají dozoru stanovenému v bodě I.2.1 této části.

I.3 Konkrétní požadavky na zachování statusu území prostého nákazy (kategorie I), pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*)

Je-li za účelem zachování nákazového statusu kategorie I zapotřebí cílený dozor, jak stanoví článek 52 směrnice 2006/88/ES, podrobí se všechna hospodářství či chovné oblasti měkkýšů v rámci dotčeného členského státu, oblasti nebo jednotky, které chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků v souladu s tabulkou 4.B stanovenou v oddíle II této části, a to s ohledem na úroveň rizika zavlečení marteiliózy (*Marteilia refringens*) u daného hospodářství či chovné oblasti měkkýšů.

Status území prostého nákazy smí být zachován pouze tehdy, pokud jsou u všech vzorků zjištěny pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 negativní výsledky, pokud jde o marteiliózu (*Marteilia refringens*), a za předpokladu, že je jakékoliv podezření na marteiliózu vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3.

I.4 Požadavky na zrušení opatření k zamezení šíření nákazy stanovených v článku 39 směrnice 2006/88/ES (změna nákazového statusu kategorie V na nákazový status kategorie III), pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*)

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*), mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie III, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že:

a) byly splněny požadavky stanovené v bodě I.2.2 písm. a), b) a c). V případě, že ponechání ladem není technicky možné, podrobí se hospodářství alternativnímu opatření, které poskytne téměř obdobnou záruku vymýcení marteiliózy (*Marteilia refringens*) z prostředí hospodářství;

b) do všech hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené a do všech ostatních hospodářství či chovných oblastí měkkýšů ponechaných ladem/podrobených alternativním opatřením v souladu s písmenem a) v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru byli nově doplněni měkkýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, II či III, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*);

c) k novému doplnění došlo až poté, co všechna hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů úředně prohlášené za zamořené byly vyklizeny, vyčištěny, vydezinfikovány a ponechány ladem nebo podrobeny alternativním opatřením v souladu s písmenem a);

d) v období dvou let, které následuje po splnění opatření uvedených v písmenech a), b) a c), nedošlo k potvrzení infekce marteiliózou (*Marteilia refringens*) a podezření v průběhu tohoto období byla vyloučena postupy stanovenými v bodě II.3.

II. **Diagnostické metody a úřední šetření**

II.1 Vzorky

K diagnostickým vyšetřením stanoveným v bodech II.2 a II.3 se do laboratoře zasílá celý živočich.

II.2 Diagnostické metody za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*)

Diagnostickými metodami, které se podle podrobných diagnostických metod a postupů stanovených v části 4 přílohy II použijí za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*) jsou histopatologické vyšetření, otisky tkáně či PCR.

II.3 Úřední šetření a diagnostické metody za účelem potvrzení nebo vyloučení podezření na infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*)

Je-li zapotřebí potvrdit nebo vyloučit podezření na infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*) v souladu s článkem 28 směrnice 2006/88/ES, dodrží se tento postup kontroly, odběru vzorků a vyšetření:

a) součástí úředního šetření je alespoň jeden odběr vzorku 30 měkkýšů vnímavých druhů, vychází-li podezření ze zprávy o úhynu, a pokud tomu tak není, odběr vzorku 150 měkkýšů vnímavých druhů, a to po začátku období přenosu marteiliózy (*Marteilia refringens*). Není-li období přenosu známo, začne odběr vzorků poté, co teplota vody překročí 17 °C;

b) vzorky se vyšetří pomocí diagnostických metod stanovených v bodě i) podle podrobných diagnostických metod a postupů stanovených v příloze II části 4 oddíle I:

i) přítomnost marteiliózy (*Marteilia refringens*) se považuje za potvrzenou v případě kombinace pozitivního výsledku histopatologického vyšetření, otisku tkáně nebo hybridizace in situ s pozitivním výsledkem metody PCR doplněné sekvenováním;

ii) podezření na infekci marteiliózou (*Marteilia refringens*) lze vyloučit, jestliže vyšetření uvedená v bodě i) neodhalí žádné další důkazy přítomnosti marteiliózy.

Tabulka 4.A

Program dozoru v případě členských států, oblastí nebo jednotek na kontrolní období před dosažením statusu území prostého nákazy marteiliózou (*Marteilia refringens*) podle bodu I.2.1

	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti za rok	Počet laboratorních vyšetření za rok	Počet měkkýšů ve vzorku
Hospodářství/chovné oblasti měkkýšů	1	1	150

Tabulka 4.B

Program dozoru v případě členských států, oblastí nebo jednotek za účelem zachování statusu území prostého nákazy marteiliózou (*Marteilia refringens*) podle bodu I.3

Úroveň rizika	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti	Počet laboratorních vyšetření	Počet měkkýšů ve vzorku
Vysoká	1 ročně	1 za 2 roky	150
Střední	1 za 2 roky	1 za 2 roky	150
Nízká	1 za 2 roky	1 za 4 roky	150

ČÁST 5

METODY DOZORU A TLUMENÍ V PŘÍPADĚ INFEKCE BONAMIÓZOU (*BONAMIA OSTREAE*)

I. **Požadavky na programy pro dozor nebo eradikaci za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*)**

I.1 Obecné požadavky

Kontroly zdravotní nezávadnosti a popřípadě odběr vzorků u výrobních jednotek se provádějí v ročním období, kdy je známo, že prevalence bonamiózy (*Bonamia ostreae*) v členském státě, oblasti nebo jednotce je maximální. Nejsou-li tyto údaje dostupné, provede se odběr vzorků v zimě nebo na začátku jara.

Mají-li být měkkýši odebráni v souladu s požadavky stanovenými v části 5, použijí se tato kritéria:

a) pokud jsou přítomny ústřice jedlé (*Ostrea edulis*), vyberou se k odběru vzorků pouze ústřice tohoto druhu. Pokud ústřice jedlé (*Ostrea edulis*) přítomny nejsou, musí být ve vzorku zastoupeny všechny ostatní přítomné vnímavé druhy;

b) jsou-li přítomni slabí, rozevření nebo čerstvě uhynulí, ale nerozkládající se měkkýši, jsou přednostně vybráni oni. Nejsou-li tito měkkýši přítomni, zahrnují vybraní měkkýši nejstarší zdravé měkkýše;

c) pokud se vzorky odebírají v hospodářstvích, kde se k produkci používá více vodních zdrojů, musí být součástí vzorků měkkýši ze všech vodních zdrojů, aby byly ve vzorku poměrně zastoupeny všechny části hospodářství;

d) při odběru vzorků v chovných oblastech měkkýšů se do vzorku zařadí měkkýši z dostatečného počtu míst odběru vzorků. Hlavními faktory, které je při výběru míst odběru vzorků třeba vzít v úvahu, jsou předchozí místa, kde byla zjištěna bonamióza (*Bonamia ostreae*), intenzita chovu, vodní toky, přítomnost vnímavých druhů, přítomnost druhů přenašečů, hloubkové poměry a řídicí postupy. Vzorky se odebírají na místech, kde se měkkýši vyskytují přirozeně, v rámci chovných oblastí nebo oblastí s nimi sousedících.

I.2 Konkrétní požadavky na dosažení nákazového statusu kategorie I, pokud jde o bonamiózu (*Bonamia ostreae*)

I.2.1 Programy dozoru

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie III, pokud jde o bonamiózu (*Bonamia ostreae*), mohou opět dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství v rámci členského státu, oblasti či jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobila alespoň tomuto programu dozoru, jenž zahrnuje kontroly zdravotní nezávadnosti a odběr vzorků k vyšetření.

Dvouletý program dozoru:

a) hospodářství a chovné oblasti měkkýšů, které chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, byly podrobeny kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu dvou let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 5.A uvedené v této části;

b) vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 dospělo za dvouleté období k negativním výsledkům, pokud jde o bonamiózu (*Bonamia ostreae*), a jakékoliv podezření na bonamiózu bylo vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3;

c) má-li být do vzorku zařazena *Ostrea edulis* z členského státu či jednotky s nákazovým statusem kategorie I, musela být do hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů uvedena nejpozději na podzim, jenž těsně předcházel období provádění programu dozoru.

I.2.2 Programy eradikace

Eradikace bonamiózy (*Bonamia ostreae*) je ve většině případů považována za nemožnou, ale bude-li to členský stát považovat za proveditelné, použije se tento model programu eradikace.

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o bonamiózu (*Bonamia ostreae*), mohou opět dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství či chovné oblasti měkkýšů v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobila alespoň tomuto programu eradikace:

a) byla účinně použita minimální opatření pro tlumení nákazy stanovená v kapitole V oddíle 3 směrnice 2006/88/ES a zejména byla v blízkosti hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené bonamiózou (*Bonamia ostreae*) vytvořena uzavřená oblast uvedená v čl. 32 písm. b) uvedené směrnice, která zahrnuje ochranné pásmo a pásmo dozoru.

Uzavřená oblast se vymezí případ od případu s ohledem na faktory ovlivňující rizika rozšíření této nákazy uvedené na seznamu, jako je: počet, výskyt, stáří a rozložení uhynulých měkkýšů v hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů zamořené infekcí *Bonamia ostreae* včetně volně žijících měkkýšů, vzdálenost a hustota sousedních hospodářství či chovných oblastí měkkýšů včetně volně žijících měkkýšů, blízkost ke zpracovatelským zařízením, kontaktním hospodářstvím nebo chovným oblastem měkkýšů, druhy přítomné v hospodářstvích či chovných oblastech měkkýšů, zvlášť vnímavé druhy a druhy přenašečů, chovné postupy používané v postižených a sousedních hospodářstvích nebo chovných oblastech měkkýšů, hydrodynamické podmínky a jiné určené faktory epizootologického významu.

Pro vytvoření ochranných pásem a pásem dozoru platí tyto minimální požadavky:

i) ochranné pásmo se vytvoří v bezprostřední blízkosti hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů úředně prohlášených za zamořené bonamiózou (*Bonamia ostreae*) a odpovídá oblasti určené podle příslušných hydrodynamických či epizootologických údajů;

ii) pásmo dozoru se vytvoří vně ochranného pásma a odpovídá oblasti obklopující ochranné pásmo určené podle příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů;

b) všechna hospodářství a chovné oblasti měkkýšů chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci ochranného pásma, které nebyly úředně prohlášeny za zamořené bonamiózou (*Bonamia ostreae*), podléhají úřednímu šetření, jež přinejmenším zahrnuje odběr vzorku 150 měkkýšů vnímavých druhů k vyšetření po začátku období přenosu bonamiózy. Není-li období přenosu známo, začne odběr vzorků v zimě nebo na začátku jara;

c) všechna hospodářství a chovné oblasti měkkýšů úředně prohlášené za zamořené bonamiózou (*Bonamia ostreae*) jsou vyklizeny, ponechány ladem a pokud možno vyčištěny a vydezinfikovány. Doba ponechání ladem činí alespoň šest měsíců.

Po vyklizení všech hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené následuje alespoň čtyřtýdenní synchronizované ponechání ladem.

Příslušný orgán může požadovat, aby byla v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem další hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů. Dobu ponechání ladem určí příslušný orgán na základě posouzení rizika v jednotlivých konkrétních případech;

d) do všech hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené a do všech ostatních hospodářství či chovných oblastí měkkýšů ponechaných ladem v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru se nově doplní měkkýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*). Nové doplnění se provede pouze tehdy, byla-li všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem v souladu s bodem I.2.2 písm. c);

e) všechna hospodářství a chovné oblasti měkkýšů chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, na které se vztahuje program eradikace, musí následně podléhat programu dozoru stanovenému v bodě I.2.

I.3 Konkrétní požadavky na zachování statusu území prostého nákazy (kategorie I), pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*)

Je-li za účelem zachování nákazového statusu kategorie I zapotřebí cílený dozor, jak stanoví článek 52 směrnice 2006/88/ES, podrobí se všechna hospodářství či chovné oblasti měkkýšů v rámci dotčeného členského státu, oblasti nebo jednotky, které chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II uvedené směrnice, kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků v souladu s tabulkou 5.B stanovenou v oddíle II této části, a to s ohledem na úroveň rizika zavlečení infekce bonamiózou (*Bonamia ostreae*) u daného hospodářství či chovné oblasti měkkýšů.

Status území prostého nákazy, pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*), může být zachován pouze tehdy, pokud byly u všech vzorků zjištěny pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 negativní výsledky, pokud jde o bonamiózu, a pokud bylo jakékoliv podezření na bonamiózu vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3.

I.4 Požadavky na zrušení opatření k zamezení šíření nákazy stanovených v článku 39 směrnice 2006/88/ES (změna nákazového statusu z kategorie V na nákazový status kategorie III), pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*).

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*), mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie III, pokud jde o uvedenou nákazu, za předpokladu, že:

a) byly splněny požadavky stanovené v bodě I.2.2 písm. a), b) a c). V případě, že ponechání ladem není technicky možné, podrobí se hospodářství alternativnímu opatření, které poskytne téměř obdobnou záruku vymýcení bonamiózy (*Bonamia ostreae*) z prostředí hospodářství;

b) do všech hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů úředně prohlášených za zamořené a do všech ostatních hospodářství či chovných oblastí měkkýšů ponechaných ladem/podrobených alternativním opatřením v souladu s písmenem a) v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru byli nově doplněni měkkýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, II či III, pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*);

c) k novému doplnění došlo až poté, co všechna hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů úředně prohlášené za zamořené byly vyklizeny, vyčištěny, vydezinfikovány a ponechány ladem/podrobeny alternativním opatřením v souladu s písmenem a);

d) v období dvou let, které následuje po splnění opatření uvedených v písmenech a), b) a c), nedošlo k potvrzení infekce bonamiózou (*Bonamia ostreae*) a podezření v průběhu tohoto období byla vyloučena postupy stanovenými v bodě II.3.

II. **Diagnostické metody a diagnostická kritéria**

II.1 Vzorky

K diagnostickým vyšetřením stanoveným v bodech II.2 a II.3 se do laboratoře zasílá celý živočich.

II.2 Diagnostické metody za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*)

Diagnostickými metodami, které mají být použity za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*), jsou histopatologické vyšetření, otisky tkáně či PCR. Při uplatňování těchto diagnostických metod musí být použity odpovídající podrobné metody a postupy stanovené v příloze II části 5.

II.3 Diagnostická kritéria za účelem potvrzení nebo vyloučení podezření na infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*)

Je-li zapotřebí potvrdit nebo vyloučit podezření na infekci bonamiózou (*Bonamia ostreae*) v souladu s článkem 28 směrnice 2006/88/ES, dodrží se tento postup kontroly, odběru vzorků a vyšetření:

Součástí úředního šetření je v případě, že podezření vychází ze zprávy o úhynu, alespoň jeden odběr vzorku 30 měkkýšů vnímavých druhů; pokud tomu tak není, vybere se k odběru vzorku 150 měkkýšů vnímavých druhů, a to po začátku období přenosu bonamiózy (*Bonamia ostreae*). Není-li období přenosu známo, začne odběr vzorků v zimě nebo na začátku jara. Vzorky se vyšetří pomocí diagnostických metod stanovených v bodě i) podle podrobných diagnostických metod a postupů stanovených v příloze II části 5 oddíle I.

i) přítomnost bonamiózy (*Bonamia ostreae*) se považuje za potvrzenou v případě kombinace pozitivního výsledku histopatologického vyšetření, otisku tkáně nebo hybridizace *in situ* s pozitivním výsledkem metody PCR doplněné sekvenováním v souladu se schválenými metodami a postupy stanovenými v části 5 přílohy II;

ii) podezření na přítomnost infekce bonamiózou (*Bonamia ostreae*) se vyloučí, jestliže uvedená vyšetření neodhalí žádné další důkazy přítomnosti bonamiózy.

Tabulka 5.A

Program dozoru v případě členských států, oblastí nebo jednotek na kontrolní období před dosažením statusu území prostého nákazy bonamiózou (*Bonamia ostreae*) podle bodu I.2.1

	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti za rok	Počet laboratorních vyšetření za rok	Počet měkkýšů ve vzorku
Hospodářství/chovné oblasti měkkýšů	1	1	150

Tabulka 5.B

Program dozoru v případě členských států, oblastí nebo jednotek za účelem zachování statusu území prostého nákazy bonamiózou (*Bonamia ostreae*) podle bodu I.3

Úroveň rizika	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti	Počet laboratorních vyšetření	Počet měkkýšů ve vzorku
Vysoká	1 ročně	1 za 2 roky	150
Střední	1 za 2 roky	1 za 2 roky	150
Nízká	1 za 2 roky	1 za 4 roky	150

ČÁST 6

METODY DOZORU A TLUMENÍ NÁKAZY V PŘÍPADĚ BĚLOSKVRNITOSTI (WHITE SPOT DISEASE)

I. **Požadavky na programy pro dozor a eradikaci za účelem získání a zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o běloskvrnitost, a za účelem zamezení šíření infekce WSSV**

I.1 Obecné požadavky na kontroly a odběr vzorků

Odběr vzorků korýšů k laboratornímu vyšetření se provede, kdykoliv je pravděpodobné, že teplota vody dosáhne svého nejvyššího bodu v roce. Požadavek na teplotu vody se také vztahuje, je-li to proveditelné a vhodné, na kontroly zdravotní nezávadnosti,.

Mají-li být chovaní korýši odebráni v souladu s požadavky stanovenými v této části, použijí se tato kritéria:

a) jsou-li ve výrobních jednotkách přítomni slabí nebo umírající korýši, jsou přednostně vybráni oni. Nejsou-li tito korýši přítomni, vybere se vzorek tak, aby v něm byli poměrně zastoupeni korýši vybraných vnímavých druhů z různých velikostních kohort, tedy nedospělí i dospělí jedinci;

b) pokud je pro produkci korýšů využíván více než jeden vodní zdroj, musí se korýši do vzorku vybrat tak, aby byly zastoupeny všechny vodní zdroje.

Je-li v souladu s přílohou V částí I bodem 2 odst. 2 směrnice 2006/88/ES zapotřebí cílený dozor u volně žijících populací, určí se počet a zeměpisné rozložení míst odběru vzorků tak, aby bylo dosaženo přiměřeného pokrytí členského státu, oblasti nebo jednotky. Místa odběru vzorků se také vybírají tak, aby byly zastoupeny různé ekosystémy, kde se nacházejí populace volně žijících vnímavých druhů, a to mořské systémy, ústí a říční a jezerní systémy.

Je-li v souladu s přílohou V částí I bodem 2 směrnice 2006/88/ES zapotřebí cílený dozor u volně žijících populací, vyberou se korýši k odběru vzorků takto:

i) v oblastech s mořskými systémy a ústími je vybrán jeden nebo více těchto druhů: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* nebo druhy garnelovitých (čeledi *Penaeidae*), a to *Penaeus japonicus, Penaeus kerathurus, Penaeus semisulcatus*. Nejsou-li uvedené druhy přítomny, musí být ve vzorku zastoupeny jiné přítomné vnímavé druhy desetinohých korýšů. Vzhledem k široké řadě vnímavých hostitelů lze hostitele vybrat z rodů nebo čeledí řádu *Decapoda*, u kterých byla experimentálně či přirozeně prokázána vnímavost;

ii) v říčních a jezerních systémech je vybrán jeden nebo více těchto druhů: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* nebo *Orconectes limosus*. Nejsou-li uvedené druhy přítomny, musí být ve vzorku zastoupeny jiné přítomné vnímavé druhy desetinohých korýšů. Vzhledem k široké řadě vnímavých hostitelů lze hostitele vybrat z rodů nebo čeledí řádu *Decapoda*, u kterých byla experimentálně či přirozeně prokázána vnímavost;

iii) jsou-li přítomni slabí nebo umírající korýši, jsou přednostně vybráni oni. Nejsou-li tito korýši přítomni, vybere se vzorek tak, aby v něm byli poměrně zastoupeni korýši vybraných vnímavých druhů z různých velikostních kohort, tedy nedospělí i dospělí jedinci.

I.2 Konkrétní požadavky na dosažení nákazového statusu kategorie I, pokud jde o běloskvrnitost

I.2.1 Programy dozoru

a) Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie III, pokud jde o běloskvrnitost, mohou v souladu s přílohou III částí B směrnice 2006/88/ES dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, jestliže všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II zmíněné směrnice v členském státě, oblasti nebo jednotce splňují příslušné požadavky stanovené v příloze V uvedené směrnice a jestliže daná hospodářství, a vyžaduje-li to příloha V část I bod 2 odst. 2 směrnice 2006/88/ES, i místa odběru vzorků u volně žijících populací vybraných v souladu s daným bodem podléhají tomuto dvouletému programu dozoru zahrnujícímu kontroly zdravotní nezávadnosti a odběr vzorků k vyšetření.

Hospodářství nebo místa odběru vzorků byla podrobena kontrolám zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků minimálně po dobu dvou let po sobě, jak je stanoveno v tabulce 6.A uvedené v oddíle II.

Za toto dvouleté období dospělo vyšetření všech vzorků pomocí diagnostických metod stanovených v bodě II.2 k negativním výsledkům, pokud jde o infekci běloskvrnitostí, a jakékoliv podezření na běloskvrnitost bylo vyloučeno diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3;

b) bude-li v průběhu provádění programu dozoru uvedeného v písmenu a) v hospodářství zařazeném do uvedeného programu dozoru potvrzena infekce WSSV, a bude-li mu tedy odňat nákazový status kategorie II, může uvedené hospodářství okamžitě získat nákazový status kategorie II zpět a pokračovat v provádění programu dozoru za účelem získání statusu území prostého nákazy bez provedení programu eradikace stanoveného v bodě I.2.2 za předpokladu, že:

i) se jedná o kontinentální hospodářství, jehož nákazový status, pokud jde o běloskvrnitost, je nezávislý na nákazovém statusu okolních přírodních vod, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, v souladu s přílohou V částí II bodem 3 směrnice 2006/88/ES;

ii) byla vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem; doba ponechání ladem musí činit alespoň šest týdnů;

iii) byli do něj nově doplněni korýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o běloskvrnitost.

I.2.2 Programy eradikace

I.2.2.1 Obecné požadavky

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o běloskvrnitost, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie I, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že se všechna hospodářství v rámci členského státu, oblasti či jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES, podrobila alespoň tomuto programu eradikace:

a) musí být účinně použita minimální opatření pro tlumení nákazy stanovená v kapitole V oddíle 4 směrnice 2006/88/ES a v blízkosti hospodářství úředně prohlášených za zamořená běloskvrnitostí musí být vytvořena uzavřená oblast uvedená v čl. 32 písm. b) zmíněné směrnice, která zahrnuje ochranné pásmo a pásmo dozoru.

Uzavřená oblast musí být vymezena případ od případu s ohledem na faktory ovlivňující rizika rozšíření běloskvrnitosti na chované a volně žijící korýše, jako je počet, výskyt a rozložení uhynulých korýšů v hospodářství zamořeném běloskvrnitostí, vzdálenost a hustota sousedních hospodářství, kontaktní hospodářství, druhy přítomné v hospodářstvích, chovné postupy používané v postižených a sousedních hospodářstvích, hydrodynamické podmínky a jiné určené faktory epizootologického významu.

Pro vytvoření ochranných pásem a pásem dozoru platí tyto minimální požadavky:

i) ochranné pásmo se vytvoří v bezprostřední blízkosti hospodářství úředně prohlášeného za zamořené běloskvrnitostí a odpovídá:

1) v mořských oblastech a v oblastech v ústí: oblasti kruhového půdorysu o poloměru přinejmenším jednoho posunu přílivu nebo přinejmenším 5 km podle toho, který je větší, jejímž středem je hospodářství úředně prohlášené za zamořené běloskvrnitostí, nebo obdobné oblasti určené na základě příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů; nebo

2) ve sladkých vodách: celému povodí hospodářství úředně prohlášeného za zamořené běloskvrnitostí; příslušný orgán může omezit rozsah ochranného pásma na části povodí za předpokladu, že není ohrožena prevence šíření běloskvrnitosti;

ii) pásmo dozoru se vytvoří vně ochranného pásma a odpovídá:

1) v mořských oblastech: ploše, která kolem ochranného pásma přesahuje pásma posunu přílivu, nebo ploše, která kolem ochranného pásma přesahuje pásma posunu přílivu, nebo ploše kruhového půdorysu o poloměru 10 km od středu ochranného pásma nebo obdobné oblasti určené na základě příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů; nebo

2) ve sladkých vodách: rozšířené oblasti vně vytvořeného ochranného pásma;

b) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci ochranného pásma, která nebyla úředně prohlášena za zamořená běloskvrnitostí, se podrobí úřednímu šetření, jehož součástí je alespoň:

i) odběr vzorku 10 korýšů k vyšetření, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající infekci běloskvrnitostí, či minimálně 150 korýšů, nejsou-li pozorovány klinické ani postmortální příznaky; a

ii) jedna kontrola zdravotní nezávadnosti; v hospodářstvích, kde vyšetření uvedená v bodě i) přinesla negativní výsledky, kontroly zdravotní nezávadnosti pokračují jednou měsíčně v ročním období, kdy teplota vody pravděpodobně dosáhne svého nejvyššího bodu v roce, a to až do odvolání ochranného pásma v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c);

c) všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená běloskvrnitostí jsou vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem. Doba ponechání ladem činí alespoň šest týdnů. Po vyklizení všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená následuje alespoň třítýdenní synchronizované ponechání ladem. Toto písmeno se také použije na nová hospodářství úředně prohlášená za zamořená v průběhu provádění programu eradikace.

Po ponechání hospodářství úředně prohlášených za zamořená ladem se ochranná pásma změní na pásma dozoru.

Příslušný orgán může požadovat, aby byla v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem další hospodářství. Dobu ponechání ladem určí příslušný orgán na základě posouzení rizika v jednotlivých konkrétních případech;

d) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru se nově doplní:

i) korýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o běloskvrnitost; nebo

ii) po přechodné období do 31. prosince 2020 korýši z členských států, oblastí nebo jednotek se schváleným programem dozoru pro běloskvrnitost.

K novému doplnění dojde pouze tehdy, byla-li všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená běloskvrnitostí vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem v souladu s bodem I.2.2.1 písm. c).

e) všechna hospodářství chovající vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES v rámci členského státu, oblasti nebo jednotky, na které se vztahuje program eradikace, a je-li požadován dozor u volně žijících populací, místa odběru vzorků vybraná v souladu s přílohou V částí I bodem 2 odst. 2 uvedené směrnice následně podléhala alespoň takovému programu, jaký je stanoven v bodě I.2.1.

I.2.2.2 Požadavky na opětovné získání statusu území prostého nákazy, pokud jde o běloskvrnitost, pro kontinentální jednotky zahrnující jedno jediné hospodářství, které bylo dříve prohlášeno za prosté nákazy běloskvrnitostí

Kontinentální jednotka zahrnující jedno jediné hospodářství, které má nákazový status kategorie I, pokud jde o běloskvrnitost, jejíž nákazový status, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, je nezávislý na okolních přírodních vodách v souladu s přílohou V částí II bodem 3 směrnice 2006/88/ES a jejíž status kategorie I byl odvolán v souladu s čl. 53 odst. 3 uvedené směrnice, může opět získat nákazový status kategorie I okamžitě poté, co příslušný orgán potvrdí, že byly splněny tyto podmínky:

a) hospodářství s běloskvrnitostí bylo vyklizeno, vyčištěno, vydezinfikováno a ponecháno ladem; doba ponechání ladem musela být alespoň šest týdnů;

b) do hospodářství s běloskvrnitostí byli nově doplněni korýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, pokud jde o běloskvrnitost.

I.3 Konkrétní požadavky na zachování statusu území prostého nákazy (kategorie I), pokud jde o běloskvrnitost

Je-li za účelem zachování nákazového statusu kategorie I zapotřebí cílený dozor, jak stanoví článek 52 směrnice 2006/88/ES, podrobí se všechna hospodářství v rámci dotčeného členského státu, oblasti nebo jednotky, která chovají vnímavé druhy uvedené v příloze IV části II zmíněné směrnice, kontrole zdravotní nezávadnosti a odběru vzorků v souladu s tabulkou 6.B stanovenou v oddíle II, a to s ohledem na úroveň rizika zavlečení běloskvrnitosti u daného hospodářství.

V členských státech, oblastech nebo jednotkách, kde je počet hospodářství omezený a cílený dozor nad uvedenými hospodářstvími neposkytuje dostatečné epizootologické údaje, zahrnují programy dozoru za účelem zachování statusu území prostého nákazy místa odběru vzorků vybraná v souladu s požadavky stanovenými v bodě I.1.

V uvedených místech odběru vzorků se kontroly a odběr vzorků provádějí rotačně vždy u 50 % míst odběru vzorků každý rok. Odběr vzorků se provádí v souladu s tabulkou 6.B uvedenou v oddíle II. Vzorky jsou vybrány, připraveny a vyšetřeny diagnostickými metodami a metodami odběru vzorků stanovenými v oddíle II a laboratorní vyšetření musí dospět k negativním výsledkům, pokud jde o původce běloskvrnitosti.

Status území prostého nákazy je zachován pouze tehdy, pokud byly u všech vzorků zkoušených pomocí diagnostických metod a metod odběru vzorků stanovených v bodě II.2 zjištěny negativní výsledky, pokud jde o běloskvrnitost, a pokud bylo jakékoliv podezření na běloskvrnitost vyloučeno úředním šetřením a diagnostickými metodami stanovenými v bodě II.3.

I.4 Požadavky na zrušení opatření k zamezení šíření nákazy stanovených v článku 39 směrnice 2006/88/ES (změna z nákazového statusu kategorie V na nákazový status kategorie III), pokud jde o běloskvrnitost

Členský stát, oblast nebo jednotka, které mají nákazový status kategorie V, pokud jde o běloskvrnitost, mohou dosáhnout nákazového statusu kategorie III, pokud jde o tuto nákazu uvedenou na seznamu, za předpokladu, že:

a) byly splněny požadavky stanovené v bodě I.2.2.1 písm. a), b) a c). V případě, že ponechání ladem není technicky možné, podrobí se hospodářství alternativnímu opatření, které poskytne téměř obdobnou záruku vymýcení WSSV z prostředí hospodářství;

b) do všech hospodářství úředně prohlášených za zamořená běloskvrnitostí a do všech ostatních hospodářství ponechaných ladem/podrobených alternativním opatřením v souladu s písmenem a) v rámci vytvořených ochranných pásem a pásem dozoru byli nově doplněni korýši z členských států, oblastí nebo jednotek s nákazovým statusem kategorie I, II či III, pokud jde o běloskvrnitost;

c) k novému doplnění došlo až poté, co všechna hospodářství úředně prohlášená za zamořená běloskvrnitostí byla vyklizena, vyčištěna, vydezinfikována a ponechána ladem/podrobena alternativním opatřením v souladu s písmenem a);

d) v období dvou let, které následuje po splnění opatření uvedených v písmenech a) a b), nedošlo ke zjištění běloskvrnitosti a podezření v průběhu tohoto období byla vyloučena postupy stanovenými v bodě II.3.

II. **Diagnostické metody a metody odběru vzorků**

II.1 Vzorky

Před přípravou vzorků na dvoustupňovou polymerázovou řetězovou reakci se vzorky integumentární epidermis, buď resekované, nebo obsažené na kráčivých končetinách, na pleopodách, v ústním ústrojí či v žábrách pokusného zvířete, fixují v 95 % ethanolu.

Za účelem podložení diagnostických údajů vzešlých z PCR lze odebrat další vzorky, které se fixují pro účely histologie a transmisní elektronové mikroskopie.

II.2 Diagnostické metody za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o běloskvrnitost

Diagnostickou metodou, která má být použita za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o běloskvrnitost, podle podrobných metod a postupů stanovených v části 6 přílohy II, je dvoustupňová polymerázová řetězová reakce.

V případě pozitivního výsledku dvoustupňové polymerázové řetězové reakce je výsledek před provedením počátečních opatření pro tlumení nákazy stanovených v článku 28 směrnice 2006/88/ES potvrzen sekvenováním amplikonu, je-li to v praktických podmínkách proveditelné, prokázáním patognomonických příznaků běloskvrnitosti u uvedených vybraných hostitelů prostřednictvím histologie a transmisní elektronové mikroskopie.

II.3 Metody úředního šetření a diagnostické metody za účelem vyloučení podezření na přítomnost infekce běloskvrnitostí nebo jejího potvrzení

Je-li zapotřebí potvrdit přítomnost infekce běloskvrnitostí nebo vyloučit podezření na tuto nákazu v souladu s článkem 28 směrnice 2006/88/ES, dodrží se tyto postupy kontroly, odběru vzorků a vyšetření:

a) úřední šetření zahrnuje alespoň jednu kontrolu zdravotní nezávadnosti a jeden odběr vzorků 10 korýšů, jsou-li pozorovány klinické nebo postmortální příznaky odpovídající infekci běloskvrnitosti, či 150 korýšů, nejsou-li pozorovány klinické ani postmortální příznaky. Vzorky se vyšetří diagnostickou metodou stanovenou v bodě II.2 (dvoustupňová polymerázová řetězová reakce);

b) přítomnost běloskvrnitosti se považuje za potvrzenou, je-li dvoustupňová polymerázová řetězová reakce následovaná sekvenováním podle podrobných metod a postupů stanovených v části 6 přílohy II pozitivní a jsou-li u vybraných hostitelů přítomny patognomonické příznaky běloskvrnitosti.

Podezření na běloskvrnitost lze vyloučit, jestliže uvedená vyšetření neodhalí další důkazy přítomnosti běloskvrnitosti.

Tabulka 6.A

Program dozoru v případě členských států, oblastí nebo jednotek na dvouleté kontrolní období před dosažením statusu území prostého nákazy běloskvrnitostí podle bodu I.2.1

	Počet klinických kontrol za rok	Počet laboratorních vyšetření za rok	Počet korýšů ve vzorku
Hospodářství/místa odběru vzorků	1	1	150

Tabulka 6.B

Program dozoru v případě členských států, oblastí nebo jednotek za účelem zachování statusu území prostého nákazy běloskvrnitostí podle bodu I.3

Úroveň rizika	Počet kontrol zdravotní nezávadnosti	Počet laboratorních vyšetření	Počet korýšů ve vzorku
Vysoká	1 ročně	1 za 2 roky	150
Střední	1 za 2 roky	1 za 2 roky	150
Nízká	1 za 2 roky	1 za 4 roky	150

PŘÍLOHA II

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY

I. **Úvod**

Tato příloha stanoví podrobné postupy diagnostických metod, které se použijí k laboratornímu vyšetření v rámci programů pro dozor a eradikaci stanovených v příloze I tohoto rozhodnutí a za účelem potvrzení nebo vyloučení podezření na přítomnost následujících neexotických nákaz uvedených v příloze IV části II směrnice 2006/88/ES (dále jen „nákazy uvedené na seznamu“) v souladu s čl. 57 písm. b) zmíněné směrnice:

1.	Virová hemoragická septikémie (VHS)	Část 1
2.	Infekční nekróza krvetvorné tkáně (IHN)	Část 1
3.	Koi herpesviróza (KHV)	Část 2
4.	Nakažlivá chudokrevnost lososů (ISA)	Část 3
5.	Marteilióza (*Marteilia refringens*)	Část 4
6.	Bonamióza (*Bonamia ostreae*)	Část 5
7.	Běloskvrnitost (White spot disease)	Část 6

II. **Definice**

Pro účely této přílohy se „transportním médiem“ rozumí kultivační médium s 10 % telecím sérem a s 200 mj. penicilinu, 200 μg streptomycinu a 200 μg kanamycinu na mililitr nebo s jinými antibiotiky, jejichž účinnost byla prokázána.

ČÁST 1

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY ZA ÚČELEM DOZORU NAD IHN A VHS A JEJICH POTVRZENÍ

I. **Diagnostické metody a postupy za účelem dozoru nad VHS a IHN**

Při odběru vzorků a laboratorním vyšetření za účelem získání nebo zachování statusu území prostého nákazy, pokud jde o IHN či VHS, podle části 1 oddílu I přílohy I, pomocí diagnostických metod stanovených v části 1 bodech II.1 a II.2 uvedené přílohy se použijí podrobné diagnostické metody a postupy stanovené v následujících bodech I.1 až I.6.

I.1 Příprava a zaslání vzorků ryb

I.1.1 Tkáně pro virologické vyšetření na buněčné kultuře

Před zasláním či přepravou do kontrolní laboratoře k vyšetření se dotčené části orgánů musí rybě odebrat sterilními resekčními nástroji a musí se uložit do sterilních plastových zkumavek s transportním médiem.

Množství materiálu vhodného k virologickému vyšetření na buněčné kultuře a vyšetření pomocí RT-qPCR závisí na velikosti ryb. Tkáněmi, které se odeberou, jsou tedy celé váčkové plůdky (při délce menší než 4 cm), vnitřnosti včetně ledvin (při délce větší než 4 cm ale menší než 6 cm), nebo u větších ryb ledviny, slezina, srdce a/nebo mozek a z generačních ryb v době tření ovariální tekutina.

Do jedné sterilní zkumavky s minimálně 4 ml transportního média lze odebrat ovariální tekutinu, semeno nebo části orgánů maximálně deseti ryb, které pak představují jeden směsný vzorek. Každý vzorek tkáně musí vážit nejméně 0,5 g.

Virologické vyšetření na buněčné kultuře je třeba zahájit co nejdříve, nejpozději 48 hodin po odběru vzorků. Ve výjimečných případech jej však lze zahájit do 72 hodin po odběru materiálu, a to pokud je materiál chráněn transportním médiem a během přepravy mohou být splněny teplotní požadavky.

I.1.2. Vzorky pro polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-PCR nebo RT-qPCR)

Vzorky se z ryb odebírají postupem popsaným v bodě I.1.1 pomocí sterilního nástroje a přenáší se do sterilních plastových zkumavek, které obsahují transportní médium. Do jedné zkumavky lze odebrat tkáň nejvýše deseti ryb, která pak představuje jeden směsný vzorek. V případě malého množství inokula však smí být použita tkáň až z pěti ryb. Alternativně lze vzorky smísit v činidlech pro stabilizaci RNA, například v poměru 0,2 g tkáně na 1 ml činidla podle doporučení výrobce, ačkoliv v případě malého množství materiálu k extrakci se každá ryba zpracuje samostatně a vzorky se nemísí.

Do laboratoře lze také odeslat celou rybu.

I.2 Odeslání vzorků ryb

Zkumavky s tkáněmi ryb v transportním médiu určenými k buněčné kultivaci nebo RT-PCR/RT-qPCR se umístí do izolovaných nádob, například do polystyrénových krabic se silnými stěnami, spolu s dostatečným množstvím ledu či jiného chladicího média s obdobným chladicím účinkem, aby se zajistilo chlazení vzorků během přepravy do laboratoře. Je však třeba zamezit zmrazení vzorků. Během přepravy nesmí teplota vzorku nikdy překročit 10 °C, přičemž při příjmu musí být v transportní nádobě stále přítomen led nebo musí být minimálně jeden chladicí blok částečně či úplně zmrzlý.

Celé ryby lze do laboratoře zasílat, pokud mohou být během přepravy splněny teplotní požadavky uvedené v prvním odstavci. Celé ryby se zabalí do savého papíru, přičemž nakonec musí být zaslány v plastovém sáčku. Ryby lze také zaslat živé.

I.3 Odběr doplňkového diagnostického materiálu

Na základě souhlasu diagnostické laboratoře může být z ryb odebrán a k doplňkovým vyšetřením připraven i další tkáňový materiál.

I.4 Příprava vzorků ke kultivačnímu vyšetření a RT-qPCR

I.4.1 Zmrazení ve výjimečných případech

Pokud se vyskytnou praktické problémy, které znemožní zpracování vzorků během 48 hodin po odběru tkání z ryb, může být přípustné zmrazit vzorky tkáně v transportním médiu při minimálně – 20 °C a virologický test může být proveden během příštích 14 dnů. Tkáň ryb lze však před vyšetřením zmrazit a rozmrazit pouze jednou. Je třeba vést záznamy s podrobným odůvodněním každého případu.

I.4.2 Homogenizace orgánů

V laboratoři se vzorek tkáně plně homogenizuje (stomacherem, mixérem nebo v třecí misce paličkou za použití sterilního písku) a poté se suspenduje v původním transportním médiu.

Pokud se jedná o vzorek celé ryby o délce méně než 4 cm, nakrájí se po odstranění části těla, která se nachází za gastrointestinálním otvorem, s pomocí sterilních nůžek nebo sterilního skalpelu na malé kousky. Pokud se jedná o vzorek z celé ryby o délce 4 až 6 cm, odeberou se vnitřnosti včetně ledvin. Pokud se jedná o vzorek z celé ryby o délce více než 6 cm, odeberou se vzorky tkáně tak, jak je popsáno v bodě I.1. Vzorky tkáně se pomocí sterilních nůžek nebo sterilního skalpelu nadrobno nakrájí, homogenizují se způsobem popsaným v prvním odstavci a suspendují se v transportním médiu.

Konečný poměr mezi tkáňovým materiálem a transportním médiem se v laboratoři upraví na 1: 10.

I.4.3 Odstředění homogenátu

Homogenát se v odstředivce ochlazené na 2 až 5 °C při 2 000 až 4 000 × *g* odstřeďuje 15 minut, přičemž odebraný supernatant lze ošetřit antibiotiky buď čtyři hodiny při teplotě 15 °C nebo přes noc při teplotě 4 °C až 8 °C. Pokud přeprava vzorků proběhla v transportním médiu, lze ošetření supernatantu antibiotiky vynechat.

Pokud se vyskytnou praktické těžkosti, např. výpadek inkubátoru, problémy s buněčnými kulturami atd., které znemožní naočkovat buňky do 48 hodin po odběru vzorků tkáně ryb, lze supernatant zmrazit na – 80 °C a virologické vyšetření provést do 14 dnů.

Pokud byl odebraný supernatant během 48 hodin po odběru vzorku uskladněn při – 80 °C, lze jej znovu použít k virologickému vyšetření, ale pouze jednou.

Před naočkováním buněk se supernatant smísí v poměru jedna ku jedné s přiměřeně zředěnou směsí antisér proti domácím sérotypům infekční nekrózy pankreatu (IPN) a inkubuje se minimálně jednu hodinu při 15 °C nebo maximálně 18 hodin při 4 °C. Při 50 % plakovém neutralizačním testu musí titr antiséra činit minimálně 1/2 000.

Cílem ošetření všech inokul antisérem proti IPNV je zabránit cytopatickému efektu (CPE) vyvolanému IPNV v naočkovaných buněčných kulturách. Takto lze snížit dobu trvání virologických vyšetření a také počet případů, u kterých by se výskyt CPE musel zvážit jako možný důkaz přítomnosti VHSV nebo IHNV.

Pokud vzorky pocházejí z výrobních jednotek, které se považují za prosté IPN, lze ošetření inokula antisérem IPNV vynechat.

I.4.4 Příprava vzorků pro programy dozoru založené na RT-PCR a RT-qPCR

Jestliže byly vzorky odebrány do transportního média, postupuje se podle bodů I.4.2 a I.4.3. Po odstředění se odebere supernatant a extrahuje RNA. Nemá-li se ihned po odstředění provést další vyšetření, vzorky se okamžitě zmrazí na teplotu – 20 °C nebo teplotu nižší.

K analýze tkání ryb konzervovaných v činidle pro stabilizaci RNA je třeba provést další práce, přičemž doba na jejich provedení je dána teplotou, při níž se vzorky skladují, takto:

vzorky skladované při 37 °C: jeden den,

vzorky skladované při 25 °C: jeden týden,

vzorky skladované při 4 °C: jeden měsíc,

vzorky skladované při – 20 °C: neomezeně.

Se vzorky smísenými v činidle pro stabilizaci RNA se zachází jako s jedním vzorkem v tomto činidle. U vzorků smísených v činidle pro stabilizaci RNA nesmí velikost vzorku překročit velikost doporučenou výrobcem pro extrakci RNA sadami, jako je RNeasy Mini kit (společnosti Qiagen) apod. Smísí-li se větší vzorky, je třeba to zohlednit a použít vhodné extrakční sady nebo metody.

Vzorky odebrané do činidel pro stabilizaci RNA se nepoužijí k buněčné kultivaci.

I.4.5 Smísení vzorků pro RT-qPCR

Jelikož mají relevantní protokoly RT-qPCR podobnou nebo vyšší citlivost než kultivační metody, lze za přijatelné řešení považovat, pokud se v kultivačním médiu pro PCR použije supernatant z homogenizovaného tkáňového materiálu ze směsi orgánů z až 10 ryb. Vzhledem k tomu, že je inokulum používané při PCR v porovnání s inokulem pro buněčnou kultivaci mnohem menší, je však třeba všechny tkáně ryb před smísením materiálu k extrakci pečlivě homogenizovat.

Tato zásada se použije také tehdy, pokud se vzorky odebírají do činidel pro stabilizaci RNA. V tomto případě je však často obtížné odebrat do jedné zkumavky reprezentativní materiál z až 10 ryb, a proto se počet ryb na směsný vzorek sníží na 2 až 5.

I.5 Virologické vyšetření na buněčné kultuře

I.5.1 Buněčné kultury a média

Ve vhodném médiu, konkrétně v Eaglově minimálním esenciálním médiu (MEM) nebo v jeho modifikacích, doplněném 10 % fetálním bovinním sérem a antibiotiky ve standardních koncentracích se při teplotě 20 až 30 °C kultivuje buněčná linie potěru slunečnice modroskřelé (BF-2) či buněčná linie gonád pstruha duhového (RTG-2), a buď buňky *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC), nebo jelečka velkohlavého (FHM).

Pokud se buňky kultivují v uzavřených zkumavkách, pufruje se médium hydrogenuhličitanem. Médium používané pro kultivaci buněk v otevřených jednotkách lze pufrovat Tris-HCl (23 mM) a hydrogenuhličitanem sodným (6 mM). Hodnota pH přitom musí činit 7,6 ± 0,2.

Buněčné kultury, do kterých se naočkovává tkáňový materiál ryb, musí být mladé, obvykle se pokud možno použijí jeden den staré buněčné linie; za přijatelné řešení lze však považovat i použití buněčných linií starých 4 až 48 hodin. Při naočkování musí buňky aktivně růst.

I.5.2 Naočkování buněčných kultur

Orgánová suspenze ošetřená antibiotiky se naočkuje do buněčných kultur ve dvou stupních ředění: primární ředění a dále tímto roztokem ředěným v poměru 1: 10, čímž se dosáhne konečného ředění tkáňového materiálu v médiu buněčných kultur v poměru 1: 100, respektive 1: 1 000, a zabrání se tak homologické interferenci. Naočkovat je třeba alespoň dvě buněčné linie uvedené v bodě I.5.1. Poměr mezi velikostí inokula a objemem kultivačního média činí asi 1: 10.

U každého zředění a každé buněčné linie se použije plocha buněčných kultur o velikosti minimálně 2 cm^2, což odpovídá jedné jamce na 24jamkové kultivační destičce. Použijí se pokud možno kultivační desky.

I.5.3 Inkubace buněčných kultur

Naočkované buněčné kultury se inkubují sedm až deset dnů při teplotě 15 °C. Pokud se barva kultivačního média změní z červené na žlutou, což naznačuje překyselení, je třeba upravit hodnotu pH sterilním roztokem hydrogenuhličitanu nebo jinými látkami s obdobným účinkem tak, aby byla zajištěna vnímavost buněk na virovou infekci.

K přezkoušení vnímavosti buněčných kultur se minimálně každých šest měsíců nebo při podezření na sníženou citlivost provádí titrace hluboce zmrazeným zásobním roztokem VHSV nebo IHNV. Použije se pokud možno postup popsaný v oddíle III.

I.5.4 Mikroskopické vyšetření

U naočkovaných buněčných kultur je třeba pravidelně (minimálně třikrát týdně) při 40–150násobném mikroskopickém zvětšení kontrolovat výskyt cytopatického efektu (CPE). V případě, že je pozorován CPE, je třeba okamžitě zahájit postup identifikace viru v souladu s bodem I.6.

I.5.5 Subkultivace

Pokud se cytopatický efekt po primární sedmi až desetidenní inkubaci nevyskytne, provede se subkultivace na čerstvé buněčné kultury, přičemž je třeba použít podobnou buněčnou plochu jako u primární kultury.

Alikvotní množství média (supernatantu) ze všech kultur či jamek, jež tvoří primární kulturu, se v závislosti na buněčné linii sedm až deset dní po naočkování smísí do jednoho směsného vzorku. Směsné vzorky se následně podle bodu 1.5.2 naočkují do homologických buněčných kultur v ředěném a nezředěném stavu, a to 1: 10 (čímž se dosáhne konečného ředění supernatantu 1: 10, respektive 1: 100). Alternativně lze alikvotní množství 10 % média, jež tvoří primární kulturu, naočkovat přímo do jamky s čerstvou buněčnou kulturou (subkultivace z jamky do jamky). Před naočkováním lze provést preinkubaci roztoků s antisérem IPNV v příslušném roztoku, a to podle popisu v bodě I.4.3.

Naočkované kultury se následně inkubují sedm až deset dní při teplotě 15 °C a kontrolují podle bodu I.5.4.

Pokud se během prvních tří dnů inkubace vyskytne toxický CPE, musí být v této fázi provedena subkultivace; buňky se však poté musí sedm dní inkubovat a opět subkultivovat a znovu sedm dní inkubovat. Pokud se toxický CPE vyskytne po třech dnech, buňky se jednou pasážují a inkubují se, tak aby od prvního naočkování uplynulo celkem 14 dní. V posledních sedmi dnech inkubace se nesmí vyskytnout žádná známka toxicity.

Pokud se přes ošetření antibiotiky vyskytne bakteriální kontaminace, je třeba před subkultivací provést po dobu 15 až 30 minut za teploty 2 až 5 °C odstředění při 2 000 až 4 000 × g nebo filtraci supernatantu přes filtr s velikostí pórů 0,45 µm (s membránou s nízkým vázáním proteinů), nebo oba tyto kroky. Jinak je při subkultivaci postup totožný jako postup u toxického cytopatického efektu popsaný ve čtvrtém odstavci tohoto bodu.

Nedojde-li k CPE, lze vyšetření prohlásit za negativní.

I.6 Identifikace viru

Jsou-li v buněčné kultuře pozorovány známky CPE, médium (supernatant) se odebere a vyšetří jedním či několika z těchto postupů: enzymovou imunoanalýzou s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA), imunofluorescencí (IF), neutralizací, polymerázovou řetězovou reakcí s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-PCR) nebo kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-qPCR). Pokud tato vyšetření do týdne neumožní definitivní identifikaci viru, je třeba supernatant předat národní referenční laboratoři nebo referenční laboratoři EU pro nákazy ryb k okamžité identifikaci, a to v souladu s přílohou VI směrnice 2006/88/ES.

I.6.1 ELISA

Za účelem identifikace izolátu viru se provede nekompetitivní enzymová imunoanalýza ELISA. Na mikrotitrační destičky se nanese vrstva čištěných imunoglobulinů A (Ig, a to v množství 50 µl na jamku (0,9 pg)), jejichž kvalita byla prokázána, z králičího antiséra proti IHNV nebo VSHV ředěných karbonátovým pufrem (pH 9,6) s 15 mM azidu sodného a vše se nechá 18 hodin až 2 týdny při teplotě 4 °C inkubovat.

Na zřeďovací destičce se každý vzorek obsahující 1 % Triton X-100, jakož i pozitivní kontrolní vzorky 4krát zředí pufrovým roztokem (slaným fosfátovým pufrem (PBS)-T-BSA, 1 % BSA), a to v těchto poměrech: neředěn, 1:4, 1:16 a 1:64. Destičky ELISA se opláchnou v pufru PBS obsahujícím 0,05 % Tween-20-(PBS-T), přičemž na opláchnutou destičku ELISA s nanesenou vrstvou se ze zřeďovací destičky přenese 50 µl z každého roztoku.

Destičky ELISA se poté 30 minut při teplotě 37 °C inkubují. Následně se opláchnou a inkubují 30 minut při 37 °C se specifickými monoklonálními protilátkami (k identifikaci VHSV se použije MAb IP5B11 a k identifikaci IHNV Hyb 136-3). Na destičku ELISA se přenese 50 µl králičích protilátek proti myšímu antigenu konjugovaných s křenovou peroxidázou (HRP), ředěných 1:1 000 v PBS-T-BSA.

Po opětovném opláchnutí se konečně nechají proběhnout reakce, přičemž se do každé jamky přidá 50 µl ortho-fenylendiaminu. Destičky ELISA se inkubují 20 minut v temnu při pokojové teplotě a reakce se zastaví přidáním 100 µl H_2SO_4v koncentraci 0,5 M do každé jamky.

Absorbance vzorků se kontroluje ve čtečce ELISA při vlnové délce 492 a 620 nm. Zda jsou vzorky pozitivní, nebo negativní se rozhodne po porovnání výsledků vyšetření s hodnotami absorbance pro pozitivní a negativní kontrolní vzorky. Obecně se vzorky s celkovou absorbancí (A) menší než 0,5 u neředěného materiálu považují za negativní, vzorky s hodnotami absorbance mezi 0,5 a 1,0 za podezřelé a vzorky s hodnotami absorbance vyššími než 1,0 za pozitivní.

Místo varianty analýzy ELISA popsané v tomto bodě lze použít i jiné varianty, pokud byla prokázána jejich obdobná účinnost.

I.6.2 Imunofluorescence – IF

Identifikace patogenů VHSV a IHNV uvedených na seznamu se provede infikováním buněk na černých 96jamkových destičkách, běžných 24jamkových destičkách nebo na krycích sklíčkách do 24jamkových destiček. Jsou-li IHNV, VHSV nebo oba viry identifikovány infikováním buněk na krycích sklíčkách, použije se tento protokol:

a) krycí sklíčka se osází buňkami v hustotě zaručující po 24 hodinách kultivace konfluenci mezi 60 % a 90 %. Pro tento účel se pokud možno použijí endoteliální progenitorové buňky (EPC), a to z důvodu jejich silné přilnavosti ke skleněným povrchům, lze však použít i jiné buněčné linie, např. BF-2, RTG-2 nebo FHM. Vrstva jednodenní buněčné linie se duplicitně naočkuje 150 µl supernatantu buněčné kultury ve dvou různých ředěních (1: 10 a 1: 1 000) a při 15 °C se inkubuje 24 hodin;

b) následně se kultivační médium odstraní a infikovaná vrstva buněčné linie se fixuje 0,5 ml ledovým vodným roztokem acetonu (80 % obj./obj.). Fixace probíhá 15 minut v digestoři při pokojové teplotě, poté se acetonový roztok odstraní a krycí sklíčka se alespoň 30 minut suší na vzduchu. V této fázi se destičky buď okamžitě zpracují, nebo uskladní při – 20 °C k dalšímu použití;

c) specifické monoklonální protilátky (k identifikaci VHSV se použije MAb IP5B11 a k identifikaci IHNV Hyb 136-3) se ředí PBST s koncentrací 0,01 M a pH 7,2 v poměru doporučeném dodavatelem těchto protilátek; k fixované buněčné linii se přidá 50 až 100 µl této směsi na jamku a destičky se následně inkubují jednu hodinu při 37 °C ve vlhké komoře;

d) krycí sklíčka se třikrát jemně opláchnou pufrem PBS obsahujícím 0,05 % Tween-20 (PBS-T) a po posledním propláchnutí se pufr zcela odstraní. Buňky se následně jednu hodinu při 37 °C inkubují s konjugátem fluorescein-izothiokyanátu (FITC) nebo tetrametyl-rhodamin-5-(a-6-)isothiokyanátu (TRITC) a protilátkek proti myšímu imunoglobulinu použitému jako primární protilátka, ředí se podle pokynů dodavatele, opět se oplachují v PBS-T a suší. Obarvené kultury se pomocí roztoku glycerinu a soli montují na podložná sklíčka a vyšetřují pod dopadajícím ultrafialovým (UV) světlem. Použije se přitom okulár s 10- respektive 12násobným zvětšením a objektivní čočka s 25- respektive 40násobným zvětšením a numerickou aperturou větší než 0,7 respektive 1,3.

Alternativně mohou být použity i jiné techniky IF s prokázanou obdobnou účinností, pokud jde o buněčné kultury, fixaci a protilátky referenční kvality.

I.6.3 Neutralizace

Z odebraného supernatantu se odstřeďováním (při 2 000 až 4 000 × *g*) nebo membránovou filtrací (s velikostí pórů 0,45 μm) za použití membrány s nízkým vázáním proteinu odstraní buňky a supernatant se zředí v kultivačním médiu v poměru 1:100 a 1:10 000.

Alikvotní množství minimálně dvou roztoků supernatantu se každé zvlášť smíchá se stejným dílem níže uvedených činidel a inkubuje se po 60 minut při 15 °C:

a) se sérem obsahujícím skupinově specifickou protilátku proti viru virové hemoragické septikémie (VHSV) v ředění 1:50 (obj.: obj.);

b) se sérem obsahujícím skupinově specifickou protilátku proti viru infekční nekrózy krvetvorné tkáně (IHNV) v ředění 1:50 (obj.: obj.);

c) se smísenými antiséry proti domácím sérotypům viru infekční nekrózy pankreatu (IPNV) v ředění 1:50 (obj.: obj.);

d) se samotným médium (pozitivní kontrola).

Každou směsí viru a séra supernatantu se naočkují alespoň dvě buněčné kultury (každá 50 μl), které se poté inkubují při 15 °C. Vývoj CPE se kontroluje postupem podle bodu I.5.4.

Kmeny a izoláty VHSV, které při neutralizačních testech nereagují, se identifikují pomocí IF nebo analýzy ELISA.

Alternativně lze provést i jiné neutralizační testy, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

I.6.4 RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1 Příprava virové RNA

Veškerá práce s RNA se provádí v rukavicích na ledu.

RNA se extrahuje fenol-chloroformovou metodou nebo afinitními spin kolonami pro RNA podle pokynů výrobce. Lze použít komerčně dostupné sady pro extrakci RNA, kterými se získá vysoce kvalitní RNA vhodná k použití s protokoly RT-PCR, jež jsou podrobně popsány v bodech níže.

RNA se resuspenduje v destilované vodě zbavené RNázy (tedy ve vodě ošetřené 0,1 % dietylpyrokarbonátem) nebo ve vhodném elučním pufru.

I.6.4.2 RT-PCR

Ke zjištění IHNV se použijí tyto primery:

přímý primer 5′-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3′;

reverzní primer 5′-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3′.

Použijí se tyto cykly (jednostupňová reakce RT-PCR): 1 cyklus: 30 minut při 50 °C; 1 cyklus: 2 minut při 95 °C; 30 cyklů: 30 sekund při 95 °C, 30 sekund při 50 °C, 60 sekund při 72 °C; 1 cyklus: 7 minut při 72 °C a s namočením při 4 °C.

Ke zjištění VHSV se použijí tyto primery:

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

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

Použijí se tyto cykly (jednostupňová reakce RT-PCR): 30 minut při 50 °C, 15 minut při 95 °C; 35 cyklů: 30 sekund při 94 °C, 30 sekund při 55 °C a 60 sekund při 68 °C. Následně probíhá 7 minut při 68 °C reakce.

Množství a specifičnost reakcí RT-PCR se vyhodnotí gelovou elektroforézou v 1,5 % agarózovém gelu s ethidium-bromidem a pozorováním pomocí UV transiluminace. U IHNV lze pozorovat amplikon PCR o velikosti 693 bp. U VHSV činí velikost 505 bp.

Výsledky polymerázové řetězové reakce (PCR) se mohou lišit v závislosti na podmínkách, za kterých se provádí, konkrétně může být v závislosti na používaném termocykleru zapotřebí optimalizovat teplotní protokol. Kromě toho může nesprávné žíhání primerů nebo kontaminace laboratoře vést k falešně pozitivním výsledkům. Aby se zabránilo jakýmkoliv pochybnostem, použijí se tedy adekvátní pozitivní a negativní kontrolní vzorky a sekvenované amplikony. U primerů VHSV je při používání buněk BF-2 namístě zvláštní opatrnost, jelikož primery mohou reagovat s DNA/RNA buněčné linie a vytvořit falešně pozitivní produkty podobné velikosti. Při vyšetření supernatantu z buněk BF-2 se sekvenují veškeré fragmenty amplifikované pomocí PCR.

I.6.4.3 RT-qPCR u VHSV

U VHSV se provede amplifikace pomocí těchto primerů a sondy:

Přímý primer: 5′-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3′;

Reverzní primer: 5′-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3′;

a sonda: 5′-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Jednostupňová RT-qPCR:

Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Podmínky cyklování: 30 minut při 50 °C, 15 minut při 95 °C; 40 cyklů: 15 sekund při 94 °C, 40 sekund při 60 °C a 20 sekund při 72 °C; v případě potřeby se tyto podmínky upraví. Místo tohoto postupu lze také použít i jiné varianty RT-PCR či RT-qPCR, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

I.6.4.4 RT-qPCR u IHNV

U IHNV se provede amplifikace pomocí těchto primerů a sondy:

Přímý primer: 5′- AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3′;

Reverzní primer: 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3′

a sonda: 5′ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Dvoustupňová RT-qPCR:

Jelikož tento test závisí na dvoustupňové amplifikaci, je třeba při manipulaci se zkumavkami mezi jednotlivými reakcemi dávat zvláštní pozor na to, aby nedošlo ke kontaminaci.

Podmínky cyklování (po stupni RT): 2 minuty při 50 °C, 10 minut při 95 °C; následuje 40 cyklů: 15 sekund při 95 °C a 1 minuta při 60 °C; v případě potřeby se tyto podmínky upraví.

Místo tohoto postupu lze také použít i jiné varianty RT-PCR či RT-qPCR, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

II. **Podrobné diagnostické metody a postupy k potvrzení VHS nebo IHN či obou těchto nákaz při podezření na nákazy nebo k jejich vyloučení v případě podezření na jejich ohniska**

Je-li v souladu s čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES vyžadováno laboratorní vyšetření za účelem potvrzení nebo vyloučení přítomnosti IHN, VHS či obou infekcí pomocí diagnostických metod stanovených v příloze I části 1 bodě II.3, použijí se tyto podrobné diagnostické metody a postupy:

a) obvyklá izolace viru s jeho následnou séroneutralizační, imunochemickou nebo molekulární identifikací;

b) zjišťování viru pomocí RT-PCR nebo RT-qPCR;

c) jiné diagnostické techniky, například IFAT, ELISA, RT-PCR či imunohistochemická analýza.

II.1 Obvyklá izolace viru s jeho následnou identifikací

II.1.1 Odběr vzorků

K vyšetření je třeba vybrat minimálně deset ryb s typickými symptomy IHN respektive VHS.

II.1.2 Příprava a zaslání vzorků ryb

Příprava a zaslání pro účely obvyklé izolace viru se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.2.

II.1.3 Odběr doplňkového diagnostického materiálu

Odběr doplňkového materiálu pro účely obvyklé izolace viru se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.3.

II.1.4 Příprava vzorků ke kultivačnímu vyšetření

Příprava vzorků ke kultivačnímu vyšetření pro účely obvyklé izolace viru se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.4.

II.1.5 Virologické vyšetření na buněčné kultuře

Virologické vyšetření pro účely obvyklé izolace viru se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.5.

II.1.6 Identifikace viru

Identifikace viru pro účely obvyklé izolace viru se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.6.

II.2 Zjišťování viru pomocí RT-qPCR

II.2.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků pro účely zjišťování viru pomocí RT-qPCR se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.1.2.

II.2.2 Příprava a zaslání vzorků ryb

Příprava a zaslání pro účely zjišťování viru pomocí RT-qPCR se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.2.

II.2.3 Odběr doplňkového diagnostického materiálu

Odběr doplňkového diagnostického materiálu pro účely zjišťování viru pomocí RT-qPCR se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.3.

II.2.4 Příprava vzorků na RT-qPCR

Příprava vzorků pro účely zjišťování viru pomocí RT-qPCR se řídí metodami a postupy stanovenými v bodě I.6.4.1.

II.2.5 RT-qPCR

Zjišťování viru pomocí RT-qPCR se řídí metodami a postupy stanovenými v bodech I.6.4.1, I.6.4.3 a I.6.4.4.

II.3 Jiné diagnostické postupy

K analýze ELISA, k nepřímému imunofluorescenčnímu testu (IFAT) nebo k RT-PCR lze v souladu s bodem I.6.1 respektive bodem I.6.2 respektive bodem I.6.4 předložit supernatant připravený podle bodu I.4.3. Tkáňový materiál lze zkoumat jinými diagnostickými postupy (např. technikou IFAT na řezech zmrzlého materiálu či imunohistochemickou analýzou tkáňového materiálu fixovaného formalinem). Tyto rychlé postupy se do 48 hodin po odběru vzorku doplní virologickým vyšetřením v souladu s bodem II písm. a), nebo bodem II písm. b), pokud:

a) je výsledek negativní; nebo

b) je výsledek pozitivní u materiálu, jenž představuje první případ IHN nebo VHS.

III. **Postup titrace k ověření vnímavosti buněčných kultur k infekcím**

Při provádění titrace k ověření vnímavosti buněčných kultur k infekcím podle bodu I.5.3 se dodrží postupy stanovené v následujících odstavcích tohoto bodu.

Použijí se nejméně dva izoláty VHSV a jeden izolát IHNV. V izolátech musí být zastoupena nejdůležitější skupina virů v Evropské unii: konkrétně je třeba v případě VHSV použít jeden patogenní izolát pstruha duhového ve sladké vodě a jeden patogenní izolát pakambaly velké ve slané vodě a v případě IHNV jeden patogenní kmen pstruha duhového z Evropské unie. Použijí se dobře definované izoláty z členských států. Dávky virů s nízkými subkultivačními čísly se v kultivačních baňkách množí na buňkách BF-2 nebo RTG-2 v případě VHSV a na buňkách EPC nebo FHM v případě IHNV. Použije se kultivační médium s minimálně 10 % séra. Při naočkování se použije nízká multiplicita infekce (MOI menší než 1).

V případě celkového CPE se virus odebírá 15minutovým odstřeďováním supernatantu buněčné kultury při 2 000 × *g*, podrobí se sterilizační filtraci s pomocí membránového filtru (s velikostí pórů 0,45 μm) a rozdělí se do označených kryozkumavek. Virus se uchovává při – 80 °C.

Týden po zmrazení se tři zkumavky (postup probíhá ve více replikacích) s každým virem nechají roztát ve studené vodě a titrují se na své příslušné buněčné linie. Každý z izolátů viru se nechává roztát a titruje se minimálně každých šest měsíců či při podezření na sníženou vnímavost některé z buněčných linií.

Postupy titrace je nutno podrobně popsat a pokaždé provést stejným způsobem.

Titrace se ředěním do koncového bodu musí v každém kroku ředění zahrnovat minimálně šest replikací. Titry se srovnají s předchozími získanými titry. Pokud poklesne titr jednoho ze tří izolátů viru ve srovnání s původním titrem o 2 řády (logy) nebo více, nesmí se již dotčená buněčná linie pro účely dozoru používat.

Pokud se v laboratoři nacházejí různé buněčné linie, měla by být každá buněčná linie vyšetřena zvlášť.

Záznamy je třeba uchovávat minimálně deset let.

ČÁST 2

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY ZA ÚČELEM DOZORU NAD KOI HERPESVIRÓZOU (KHV) A JEJÍHO POTVRZENÍ

I. **Podrobné diagnostické metody a postupy za účelem potvrzení přítomnosti nebo vyloučení podezření na KHV**

Je-li v souladu s čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES vyžadováno laboratorní vyšetření za účelem potvrzení přítomnosti nebo vyloučení podezření na KHV pomocí diagnostických metod stanovených v příloze I části 2 oddíle III, použijí se podrobné diagnostické metody a postupy stanovené v bodech I.1–I.2 v této části.

I.1 Příprava vzorků ryb

Pro diagnostické účely lze k vyšetření běžnými metodami založenými na PCR či qPCR použít ryby (zaslané živé či usmrcené a samostatně zabalené v utěsněných aseptických nádobách) nebo zmrazené orgány nebo části orgánů konzervované v 80 % až absolutním ethanolu či virovém transportním médiu (je pak nutno je zpracovat do 48 hodin od odběru).

Za účelem zjištění KHV se odeberou žábry a ledviny; kromě toho lze jako další samostatný vzorek odebrat slezinu, mozek a střevo. V akutních případech lze v jednom vzorku smísit tkáňový materiál z až pěti ryb.

Dále lze v některých případech použít neletální vzorky, například krev, výtěry z žaber, bioptické vzorky žaber či stěr slizu (v případě podezření na přítomnost KHV tedy lze využít i velmi cenné ryby).

I.1.1 Extrakce DNA

DNA se extrahuje standardními postupy.

Lze použít komerčně dostupné sady pro extrakci DNA, kterými se získá vysoce kvalitní DNA vhodná k použití s protokoly PCR popsanými v bodě I.2.

I.2 Zjišťování a identifikace původce metodami založenými na polymerázové řetězové reakci (PCR)

I.2.1 qPCR ke zjištění KHVV

Za účelem zjištění KHV pomocí qPCR se použije tento test qPCR:

přímý primer (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

reverzní primer (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′

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

Podmínky cyklování: 15 minut při 95 °C; následovaný 40 cykly: 15 sekund při 94 °C a 60 sekund při 60 °C. Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Místo tohoto postupu lze použít i jiné varianty qPCR, u nichž byla prokázána podobná účinnost.

I.2.2 Běžná reakce PCR ke zjištění KHV

Použije se test popsaný v tomto bodě, který se zaměřuje na gen thymidinkinázy přenášený KHV. Místo tohoto postupu lze však použít i jiné testy PCR, u nichž byla prokázána podobná citlivost a specifičnost jako v popisovaném testu.

Přímý primer (KHV-TKf): 5′-GGGTTACCTGTAC GAG-3′;

reverzní primer (KHV-TKr): 5′-CACCCAGTAGATTA TGC-3′.

Podmínky cyklování: 5 minut při 95 °C; následovaný 35 cykly: 30 sekund při 95 °C, 30 sekund při 52 °C a 1 minuta při 72 °C; a jedním cyklem: 10 minut při 72 °C. Velikost produktu by měla činit 409 bp.

Výsledky polymerázové řetězové reakce (PCR) se mohou lišit v závislosti na podmínkách, za kterých se provádí, konkrétně může být v závislosti na používaném termocykleru zapotřebí optimalizovat teplotní protokol. Kromě toho může nesprávné žíhání primerů nebo kontaminace laboratoře vést k falešně pozitivním výsledkům. Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Místo tohoto postupu lze použít i jiné varianty PCR, u nichž byla prokázána podobná účinnost.

První zjištění v oblasti se potvrdí sekvenováním nebo se k okamžité identifikaci zašle do národní referenční laboratoře či do referenční laboratoře EU pro nákazy ryb uvedené v příloze VI směrnice 2006/88/ES.

II. **Podrobné diagnostické metody a postupy za účelem dozoru nad KHV**

Při odběru vzorků a laboratorním vyšetření za účelem získání nebo zachování určitého nákazového statusu, pokud jde o KHV, podle přílohy I části 2 oddílu I pomocí diagnostických metod stanovených v části 2 oddílu II nebo III uvedené přílohy se použijí podrobné diagnostické metody a postupy stanovené v následujících bodech II.1 a II.2 této části.

II.1 Příprava vzorků ryb

Je-li to možné, odeberou se vzorky z ryb, které byly delší dobu chovány v teplotním rozmezí příznivém pro virus, a to dva až tři týdny při teplotě 15 °C až 26 °C. Je-li to možné, odeberou se vzorky do 24 hodin, nejpozději však do 72 hodin, od provedení řídicích postupů, které mohou opět aktivovat virus u ryby se statusem přenašeče, jako je odlov do sítí nebo přeprava, tak aby se zvýšila pravděpodobnost zjištění KHV.

Pro účely dozoru nad KHV lze ryby zaslat živé či usmrcené a samostatně zabalené v utěsněných aseptických nádobách nebo lze k vyšetření metodami založenými na PCR použít zmrazené orgány nebo části orgánů konzervované v 80 % až 100 % ethanolu či virovém transportním médiu (je pak nutno je zpracovat do 48 hodin od odběru). Pro účely dozoru nad KHV se odebere tkáň ze žaber a ledvin.

Pro účely dozoru nad KHV je nezbytné pokud možno zabránit smísení vzorků. Je-li to nezbytné, lze smísit tkáňový materiál maximálně ze dvou ryb. Větší vzorky se homogenizují pomocí třecí misky a paličky nebo stomacheru a dílčí vzorky odebrané pro účely extrakce DNA před klarifikací. Dílčí vzorky lze alternativně odebrat z každé tkáně zařazené do vzorku do lyzačních zkumavek.

II.1.1 Extrakce DNA

DNA se extrahuje standardními postupy. Lze použít komerčně dostupné sady k extrakci DNA, kterými se získá vysoce kvalitní DNA vhodná k použití s protokoly PCR popsanými v bodě II.2.

Přijatelný poměr mezi tkání a médiem činí 1 hmotnostní díl v 9 objemových dílech. Předmětem vyšetření je 20 až 25 mg tkáňového materiálu.

II.2 Dozor nad KHV pomocí metod založených na PCR

Pro účely dozoru nad KHV se použije qPCR. Vyskytnou-li se pozitivní vzorky v oblasti, jež dříve jako pozitivní potvrzena nebyla, musí být výsledky vyšetření potvrzeny buď:

a) sekvenováním produktu PCR nebo „zahnízděné“ (nested) PCR ze vzorků.

Získaná čistá konsenzuální sekvence musí (v rozsahu nejméně 98 %) odpovídat těmto referenčním sekvencím.

b) nebo alternativně lze vzorky zaslat k potvrzení do národní referenční laboratoře.

II.2.1 qPCR ke zjištění KHVV

Použije se qPCR odpovídající tomuto popisu:

přímý primer (KHV-86f): 5′- GACGCCGGAGACCTTGTG -3′;

reverzní primer (KHV-163r): 5′- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3′

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

Podmínky cyklování: 15 minut při 95 °C; následovaný 50 cykly: 15 sekund při 94 °C a 60 sekund při 60 °C.

Výsledky qPCR se mohou lišit v závislosti na podmínkách, za kterých se provádí, konkrétně může být v závislosti na používaném termocykleru zapotřebí optimalizovat teplotní protokol. Kromě toho může nesprávné žíhání primerů nebo kontaminace laboratoře vést k falešně pozitivním výsledkům. Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Místo tohoto postupu lze použít i jiné varianty qPCR, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

II.2.2 Běžná reakce PCR za účelem potvrzení zjištěné přítomnosti KHV

Pro účely potvrzení přítomnosti infekce KHV se použije standardní „zahnízděná“ (nested) PCR popsaná v tabulce 2.1 níže, přičemž poté následuje sekvenování amplifikovaného produktu.

Tabulka 2.1

Primery a podmínky testu „zahnízděné“ (nested) PCR zaměřeného na všechny typy herpesviru kaprovitých ryb (CyHV-1, CyHV-2 a CyHV-3).

Název primeru	Sekvenování	Podmínky cyklování	Velikost produktu
CyHVpol – přímý	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	První kolo PCR *1 cyklus:* 2 minuty při 95 °C *40 cyklů:* 30 sekund při 95 °C 30 sekund při 55 °C 45 sekund při 72 °C *1 cyklus:* 10 minut při 72 °C	362 bp
CyHVpol – reverzní	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Název primeru	Sekvenování	Podmínky cyklování	Velikost produktu
CyHVpol – vnitřní přímý	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	Druhé kolo PCR *1 cyklus:* 2 minuty při 95 °C *40 cyklů:* 30 sekund při 95 °C 30 sekund při 55 °C 45 sekund při 72 °C *1 cyklus:* 10 minut při 72 °C	339 bp
CyHVpol – vnitřní reverzní	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

Výsledky polymerázové řetězové reakce (PCR) se mohou lišit v závislosti na podmínkách, za kterých se provádí, konkrétně může být v závislosti na používaném termocykleru zapotřebí optimalizovat teplotní protokol. Kromě toho může nesprávné žíhání primerů nebo kontaminace laboratoře vést k falešně pozitivním výsledkům. Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Místo tohoto postupu lze použít i jiné varianty PCR, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

Sekvenování může provést sama laboratoř nebo externí společnost specializovaná na sekvenování. Analýza výsledků sekvenování se provede srovnáním sekvencí se známými referenčními sekvencemi KHV (jejichž přístupová čísla v databázi Gen Bank jsou: AP008984, DQ657948 a DQ177346). Získaná čistá konsenzuální sekvence musí referenčním sekvencím odpovídat v rozsahu nejméně 98 %.

ČÁST 3

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY ZA ÚČELEM DOZORU NAD NAKAŽLIVOU CHUDOKREVNOSTÍ LOSOSŮ (ISA) A JEJÍHO POTVRZENÍ

I. **Postupy odběru vzorků pro účely dozoru nad ISA a její kontroly**

Při odběru vzorků a laboratorním vyšetření pro účely programů pro dozor nebo eradikaci podle přílohy I části 3 nebo za účelem potvrzení či vyloučení výskytu ISA v souladu s čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES se použijí podrobné metody a postupy stanovené v bodech I.1, I.2 a I.3 této části.

I.1 Příprava vzorků ryb

Pro účely laboratorního vyšetření na přítomnost ISA nesmí být vzorky ryb pokud možno smíseny. Pro účely dozoru nad ISA se však smísení vzorků 2 až 5 ryb považuje za přijatelné řešení.

Vzorky pro analýzu polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-PCR) se odeberou ze všech ryb zařazených do vzorku. Kousek z prvoledviny se rybám odebere pomocí sterilního nástroje a přenese se do mikroodstředivkové zkumavky s 1 ml roztoku pro konzervaci RNK, jehož účinnost byla prokázána. Do jedné zkumavky s transportním médiem lze umístit tkáně odebrané z maximálně pěti ryb, které pak představují jeden smísený vzorek. V jednom vzorku se použije tkáň o hmotnosti 0,5 g. Pokud jsou ryby k získání vzorku požadované hmotnosti příliš malé, lze odebrat kousky ledviny, srdce, sleziny, jater nebo vrátníkových slepých střev (caeca pylori), v tomto pořadí, tak aby se dosáhlo hmotnosti 0,5 g.

Pro účely histologického vyšetření se tkáň odebere pouze z čerstvě usmrcených ryb normální konstituce, které vykazují klinické nebo postmortální příznaky odpovídající přítomnosti ISA. Ze všech vnějších a vnitřních lézí se odeberou vzorky; v každém případě je třeba u každé jednotlivé ryby odebrat prvoledvinu, srdce, játra, slinivku břišní, střeva, žábry a slezinu pomocí skalpelu a přenést je do 8–10 % (obj./obj.) roztoku slaného a pufrovaného formolu. K zajištěné spolehlivé konzervace musí být poměr mezi fixativem a tkání přinejmenším 20: 1. Pro účely imunohistochemické analýzy se odeberou vzorky z prvoledviny a srdce.

Tkáně pro virologické vyšetření na buněčné kultuře se odebírají ze všech ryb zařazených do vzorku. Kousky jater, předledviny nebo prvoledviny, srdce a sleziny se rybám odeberou pomocí sterilního nástroje a přenesou se do plastových zkumavek s 9 ml transportního média. Do jedné zkumavky obsahující transportní médium lze odebrat tkáň z maximálně pěti ryb, která pak představuje jeden směsný vzorek. V jednom vzorku se použije tkáň o hmotnosti 1,0 ± 0,5 g.

I.2 Odeslání vzorků ryb

Do laboratoře lze přepravovat celé ryby, pokud mohou být během přepravy splněny teplotní požadavky popsané v odstavci 3 tohoto bodu. Celá ryba musí být zabalena do savého papíru a zaslána v plastovém sáčku, přičemž musí být podle uvedeného odstavce chlazena.

Ryby mohou být zasílány i živé, avšak pouze pod dohledem národní referenční laboratoře pro nákazy ryb a při zohlednění dalších aspektů spojených s dezinfekcí a biologickou bezpečností při přepravě živých ryb.

Vzorky krve a zkumavky s tkání ryb určenou k virologickému vyšetření nebo analýze RT-PCR se umístí do izolovaných nádob, například polystyrénových přepravek se silnými stěnami, spolu s dostatečným množstvím ledu nebo chladicích bloků, tak aby se při přepravě do laboratoře zajistilo chlazení vzorků. Nesmí přitom dojít k jejich zmrazení a přepravní nádoba musí ještě při převzetí zásilky obsahovat led nebo musí být jeden či více chladicích bloků stále částečně nebo úplně zmrazený. Za mimořádných okolností mohou být vzorky RT-PCR a vzorky pro virologické vyšetření zmrazeny a do laboratoře přepravovány při teplotě od – 20 °C níže.

V případě analýzy RT-PCR u tkání konzervovaných přípravkem RNAlater se extrakce RNA v závislosti na teplotě, při které jsou vzorky skladovány, provede v těchto lhůtách:

vzorky skladované při 37 °C: jeden den,

vzorky skladované při 25 °C: jeden týden,

vzorky skladované při 4 °C: jeden měsíc,

vzorky skladované při – 20 °C: neomezeně.

Přepravují-li se tkáně ryb k histologickému vyšetření ve fixativu, musí se převážet v nepropustných zkumavkách umístěných v nádobách odolných vůči nárazu. Je přitom třeba zajistit, aby nedošlo ke zmrazení těchto vzorků.

Virologické vyšetření na buněčné kultuře je třeba zahájit co nejdříve, nejpozději 48 hodin po odběru vzorků. Ve výjimečných případech jej však lze zahájit do 72 hodin po odběru materiálu, a to pokud je materiál chráněn transportním médiem a během přepravy mohou být splněny teplotní požadavky.

I.3 Odběr doplňkového diagnostického materiálu

Na základě souhlasu diagnostické laboratoře mohou být z ryb odebrány a k doplňkovému vyšetření připraveny i jiné tkáně než ty, jež se uvádějí v bodě I.1.

II. **Podrobné diagnostické metody a postupy za účelem dozoru nad ISA a jejího potvrzení nebo vyloučení podezření na ni**

Při laboratorním vyšetření za účelem získání nebo zachování určitého nákazového statusu, pokud jde o ISA, podle přílohy I části 3 oddílu I, nebo za účelem potvrzení výskytu ISA nebo vyloučení podezření na ni v souladu s čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES pomocí diagnostických metod stanovených v příloze I části 3 oddíle II se použijí podrobné metody a postupy stanovené v následujících bodech II.1 až II.5.

II.1 Vyšetření vzorků pomocí RT-PCR

Diagnostickou metodou, jež má být použita ke screeningu ISAV, je RT-qPCR. Vzhledem k tomu, že výsledky RT-qPCR se mohou v závislosti na podmínkách, za nichž je prováděna, lišit, jsou součástí vyšetření odpovídající pozitivní a negativní kontrolní vzorky a amplikony, tak aby se zabránilo jakýmkoli pochybnostem.

II.1.1 Extrakce celé RNA

Veškerá práce s RNA se provádí v rukavicích na ledu.

Celá RNA se extrahuje fenol-chloroformovou metodou nebo afinitními spin kolonami pro RNA podle pokynů výrobce.

Purifikovaná RNA se resuspenduje v destilované vodě zbavené RNázy (tedy ve vodě ošetřené 0,1 % dietylpyrokarbonátem).

Odhad koncentrace a čistoty extrahované RNA se provede měřením optické hustoty při 260 nm a při 280 nm. Alternativním přístupem může být zařazení vnitřních kontrol zaměřených na hostitelský genom podle bodu II.1.3.

II.1.2 RT-PCR za účelem zjištění ISAV

K amplifikaci genomu ISAV lze použít několik metod RT-PCR. Může být provedena dvoustupňová polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-PCR), přičemž stupně reakce RT a PCR probíhají každý v jiné zkumavce. Lze však provést také jednostupňovou reakci: obě reakce pak probíhají v jedné zkumavce. Použije se pokud možno jednostupňová metoda, a to z toho důvodu, že test v jedné zkumavce minimalizuje riziko křížové kontaminace, protože obsah nemusí být přenášen, přičemž tato metoda se považuje za stejně citlivou jako metoda dvoustupňová.

Použijí se primery a test, jež jsou popsány v tomto bodě, tedy pár primerů ILA1 či ILA2, které se zaměřují na segment 8 a které byly shledány za vhodné ke zjišťování ISAV v ohniscích a u ryb, které jsou přenašeči. Reverzní primer ILA2 neodpovídá izolátům ze Severní Ameriky, a proto se v těchto případech použije alternativní sada primerů.

Přímý primer (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3′;

Reverzní primer (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Podmínky cyklování: 30 minut při 50 °C; 1 cyklus: 15 minut při 94 °C, 40 cyklů: 30 sekund při 94 °C, 30 sekund při 55 °C, 60 sekund při 72 °C; 1 cyklus: 5 minut při 72 °C. Velikost produktu je 155 bp.

Výsledky polymerázové řetězové reakce (PCR) se mohou lišit v závislosti na podmínkách, za kterých se provádí, konkrétně může být v závislosti na používaném termocykleru zapotřebí optimalizovat teplotní protokol. Kromě toho může nesprávné žíhání primerů nebo kontaminace laboratoře vést k falešně pozitivním výsledkům. Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Místo tohoto postupu lze použít i jiné varianty RT-PCR, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

II.1.3 RT-qPCR za účelem zjištění ISAV

Použitím kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-qPCR) lze zvýšit specifičnost a pravděpodobně i citlivost testu. Tato metoda je rychlejší, protože nevyžaduje gelovou elektroforézu, a navíc snižuje riziko křížové kontaminace, protože množství RNA s genomem viru ve zkumavce se vzorkem lze odhadnout. Nevýhodou testu RT-qPCR je, že často není možné provést sekvenování amplifikovaných produktů. Panují-li však pochybnosti o specifičnosti amplifikovaného produktu, musí být k ověření výsledku proveden další specifický test na ISAV.

Použije se test popsaný v tomto bodě, což je test, který se zaměřuje na segment 8. Tento test se použije u izolátů z Evropské unie, Evropského sdružení volného obchodu a Severní Ameriky. Použije se pokud možno jednostupňová metoda, protože test v jedné zkumavce minimalizuje riziko křížové kontaminace.

Přímý primer: 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;

Reverzní primer: 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;

a sonda: 5′-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – *MGBNFQ*-3′.

Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Podmínky cyklování: 30 minut při 50 °C; 1 cyklus: 15 minut při 95 °C; 40 cyklů: 15 sekund při 94 °C, 60 sekund při 60 °C; v případě potřeby se tyto podmínky upraví. Místo tohoto postupu lze také použít i jiné varianty RT-PCR či RT-qPCR, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

II.1.4 Sekvenování amplifikovaných produktů PCR

Přímý primer (ILAs6-3F): 5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;

Reverzní primer (ILAs6-2R): 5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.

Každá zpracovávaná destička musí obsahovat negativní vzorové kontrolní vzorky a pozitivní kontrolní vzorky. Podmínky cyklování (jednostupňová RT-PCR): 1 cyklus: 30 minut při 50 °C; 1 cyklus: 15 minut při 94 °C; 40 cyklů: 30 sekund při 94 °C, 30 sekund při 55 °C a 60 sekund při 72 °C; 1 cyklus: 5 minut při 72 °C; v případě potřeby se tyto podmínky upraví. Místo tohoto postupu lze také použít i jiné varianty RT-PCR či RT-qPCR, u nichž byla prokázána obdobná účinnost.

Alternativně lze k sekvenování HPR v segmentu 6 použít tuto metodu:

Přímý primer: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′,

Reverzní primer: 5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′;.

Velikost produktu: 304 nt v případě HPR0.

Lze použít i testy RT-PCR s podobnou citlivostí a specifičností, jakou mají testy popsané v tomto bodě.

Před sekvenováním se pomocí gelové elektroforézy provede kontrola čistoty amplifikovaných produktů RT-PCR. Je-li zjištěn pouze jeden čistý fragment, provede se jeho purifikace přímo z reakce PCR. Je-li přítomno více amplifikovaných fragmentů, provede se pomocí gelové elektroforézy purifikace fragmentu, který je předmětem zájmu. Purifikace fragmentů PCR z roztoků nebo agarózových gelů se provede afinitními spin kolonami pro fragment PCR podle pokynů výrobce.

Sekvenování provede pomocí amplifikačních primerů specializovaná externí společnost. Výsledky se analyzují pomocí algoritmu BLAST a sekvence se porovnají s jinými známými sekvencemi v databázi nukleotidů Národního centra USA pro biotechnologické informace (National Centre for Biotechnical Information – NCBI).

Sekvenování musí odstranit jakékoli pochybnosti o specifičnosti amplifikovaného produktu RT-PCR.

II.2 Izolace ISAV na buněčné kultuře

II.2.1 Příprava vzorků

Tkáň se uchovává při teplotě – 80 °C. Tkáň lze před vyšetřením zmrazit a rozmrazit pouze jednou. Pro účely dozoru a kontroly se vyšetření provede co nejrychleji.

Každý vzorek (směs tkání v transportním médiu) se zcela homogenizuje za pomoci schváleného homogenizátoru, odstřeďuje se při 2 000 až 4 000 × *g* po dobu 15 minut za teploty 0 až 6 °C a supernatant se filtruje (filtrem s póry o velikosti 0,45 μm) a inkubuje se stejným objemem přiměřeně zředěné směsi antisér proti domácím sérotypům viru infekční nekrózy pankreatu (IPNV). Při 50 % neutralizačním plakovém testu musí titr antiséra činit minimálně 1: 2 000. Směs se inkubuje po dobu jedné hodiny při teplotě 15 °C. Použije se jako očkovací látka (inokulum).

Ošetření všech inokulí antisérem viru infekční nekrózy pankreatu (v některých částech Evropy je tímto virem kontaminováno 50 % rybích vzorků) slouží k prevenci výskytu cytopatického efektu (CPE) vyvolaného IPNV u naočkovaných buněčných kultur. Toto ošetření lze provést ke zkrácení doby virologických vyšetření, jakož i ke snížení počtu případů, v nichž by se zjištění CPE mohlo považovat za možnou známku ISAV. Pokud vzorky pocházejí z výrobních jednotek, které se považují za prosté IPNV, lze ošetření očkovací látkou s antisérem na IPNV vynechat.

II.2.2 Naočkování buněčných kultur

Pro prvotní izolaci ISAV se použijí buňky z ledvin lososa obecného (Atlantic salmon kidney – ASK). Mohou být použity i jiné buněčné linie, jejichž účinnost a citlivost v souvislosti s izolováním ISAV byly prokázány, přičemž je třeba zohlednit variabilitu kmene a schopnost různých kmenů rozmnožovat se v různých buněčných liniích. Pokud se použije nízký počet pasáží, podporují buňky ASK podle všeho izolaci a růst dosud známých izolátů viru. U buněk ASK může být cytopatický efekt (CPE) výraznější než u jiných vnímavých buněčných linií, např. SHK-1 (*Salmon head kidney*-1).

Buňky ASK (subkultivační číslo 65 nebo nižší) se kultivují v médiu L-15 s 10 % fetálním bovinním sérem, 2 % (obj./obj.) 200mM L-glutaminu a 0,08 % (obj./obj.) 50mM 2-merkaptoetanolu na destičkách s více jamkami. Antisérem ošetřená suspenze orgánů se naočkuje do mladých, aktivně rostoucích buněčných kultur tak, aby se dosáhlo konečného zředění tkáňového materiálu v médiu buněčných kultur v poměru 1: 1 000. Na každý orgán se do jedné jamky s 2 ml kultivačního média přidá suspenze s 40 µl inokula. V zájmu minimalizace rizika křížové kontaminace se pro vzorky z různých míst s chovem ryb použijí samostatné destičky s 12 nebo 24 jamkami.

Jedna destička se nenaočkuje a poslouží jako negativní kontrolní vzorek. Jiná destička se naočkuje referenčním izolátem ISAV a poslouží jako pozitivní kontrolní vzorek, přičemž se použije tento postup. První jamka se naočkuje 100 µl zásobního preparátu ISAV (s minimálním titrem infekční dávky tkáňové kultury v 50 % koncovém bodu ($TCID50\ ml^{-1}$) v hodnotě 10^7) a promíchá se. Objem této látky v první jamce se přenese do druhé, naředí se v poměru 1: 10 a promíchá se. Tento postup se opakuje u každé jamky na destičce, přičemž se vytvoří šest desetiprocentních roztoků. Zásobu ISAV lze skladovat při teplotě – 80 °C po dobu minimálně dvou let, avšak po rozmrazení musí být použita do tří dní. Je třeba dávat pozor na to, aby se zabránilo křížové kontaminaci mezi testovacími destičkami a materiálem pozitivního kontrolního vzorku. Aby se toto nebezpečí vyloučilo, je třeba pozitivní kontrolní vzorky zpracovávat a ošetřovat odděleně od testovacích destiček. Použití pozitivního kontrolního vzorku při každém očkování lze nahradit tím, že se každých šest měsíců provede test citlivost buněk ASK vůči izolátům ISAV.

Vzorky se inkubují při teplotě 15 ± 2 °C po dobu až 15 dní. Ke zjištění CPE se buněčné kultury dvakrát vyšetří pod mikroskopem: nejprve mezi pátým a sedmým a poté mezi dvanáctým a čtrnáctým dnem po naočkování. Pokud se u kterékoli směsi zjistí CPE, musí být okamžitě zahájeny postupy identifikace viru v souladu s bodem II.2.4. Pokud není CPE do čtrnáctého dne pozorován, provede se nepřímý imunofluorescenční test (IFAT), hemadsorpční test nebo RT-PCR.

II.2.3 Subkultivace

Subkultivace se provádí od třináctého do patnáctého dne. Do jamek obsahujících mladé, aktivně rostoucí buněčné kultury se přidá supernatant kultury ve vhodném (10 %) roztoku na destičkách s více jamkami a inkubuje se při teplotě 14 ± 2 °C po dobu 18 dní. Ke zjištění CPE se buněčné kultury dvakrát vyšetří pod mikroskopem: nejprve mezi pátým a sedmým a poté mezi čtrnáctým dnem a osmnáctým dnem po naočkování. Pokud se u kterékoli směsi zjistí CPE, musí být okamžitě zahájeny postupy identifikace viru v souladu s bodem II.2.4. Pokud není CPE do čtrnáctého až osmnáctého dne pozorován, provede se hemadsorpční test nebo test RT-PCR.

Pokud je během prvních sedmi dní po inkubaci zjištěna cytotoxicita, provede se subkultivace tak, že se buňky nechají inkubovat po dobu 14 až 18 dní a pak se provede nová subkultivace, která trvá dalších 14 až 18 dní. Pokud se objeví cytotoxicita po sedmi dnech, nechají se buňky inkubovat tak, aby se dospělo k celkové době 28 až 36 dní inkubace od prvotního naočkování.

Pokud se v prvotní kultuře objeví bakteriální kontaminace, musí se vyšetření opakovat, a to za použití homogenátu tkáně skladovaného při teplotě – 80 °C. Před naočkováním se homogenát tkáně odstřeďuje při 4 000 × *g* po dobu 15 až 30 minut za teploty 0 až 6 °C a supernatant se filtruje filtrem s póry o velikosti 0,22 µm. Pokud se bakteriální kontaminace objeví během subkultivačního stupně, na povrchu plovoucí vrstva se filtruje na 0,22 µm, naočkuje se do čerstvých buněk a nechá se inkubovat po dalších 14 až 18 dní.

II.2.4 Vyšetření k identifikaci viru

Pokud jsou v kterémkoliv stádiu pozorovány důkazy CPE nebo pokud je výsledek hemadsorpčního testu pozitivní, provede se identifikace viru. Obvyklými metodami k identifikaci ISAV je RT-PCR v souladu s bodem II.1 a imunofluorescence (IF) v souladu s bodem II.2.6. Pokud se předpokládá přítomnost dalších virů, musí být k identifikaci viru provedena doplňková vyšetření. Nevedou-li tato vyšetření do jednoho týdne ke konečné identifikaci viru, předá se supernatant k okamžité identifikaci:

a) referenční laboratoři pro ISA Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE); nebo

b) národní referenční laboratoři či referenční laboratoři EU pro nákazy ryb v souladu s přílohou VI směrnice 2006/88/ES.

II.2.5 Hemadsorpce

Replikace ISAV v buněčných kulturách nevede vždy k CPE, a proto musí být u každé jamky proveden test RT-PCR nebo hemadsorpční test v souladu s tímto bodem nebo imunofluorescenční test v souladu s bodem II.2.6.

Z každé jamky, včetně jamek s pozitivními a negativními kontrolními vzorky, se odebere kultivační médium a umístí se do označených sterilních zkumavek. Do každé jamky se přidá 500 µl 0,2 % roztoku (obj./obj.) omytých červených krvinek králíka nebo koně nebo 0,05 % roztok (obj./obj.) omytých červených krvinek pstruha duhového nebo lososa obecného a nechá se inkubovat za pokojové teploty po dobu 45 minut. Červené krvinky se odstraní a každá jamka se dvakrát opláchne médiem L-15. Každá jamka se vyšetří pod mikroskopem.

Přítomnost shluků červených krvinek přichycených na povrchu buněk ASK je třeba považovat za známku podezření na infekci orthomyxovirem. Pokud je hemadsorpční test pozitivní, musí být okamžitě provedeno vyšetření k identifikaci viru v souladu s bodem II.2.4.

II.2.6 Imunofluorescence (IF)

Buňky ASK (subkultivační číslo 65 nebo nižší) se kultivují v médiu L-15 s 10 % fetálním bovinním sérem, 2 % (obj./obj.) 200mM L-glutaminem a 0,08 % (obj./obj.) 50mM 2-merkaptoetanolem na destičkách s více jamkami, přičemž se použijí při konfluenci přesahující 50 %. Lze použít i jiné buněčné linie nebo jiná kultivační média, jejichž účinnost byla prokázána. Do dvou jamek se vždy přidá 225 µl supernatantu kultury, u níž se předpokládá infikace virem, jamky se promíchají a 225 µl se přenese do dvou dalších jamek, přičemž se ředí 1: 5. Dvě další nenaočkované jamky poslouží jako kontrolní vzorky. Se vzorky z každého hospodářství s chovem ryb se pracuje na samostatných destičkách, podobně jako s kontrolními vzorky viru. Kontrolní vzorek viru se vytvoří za použití referenčního izolátu ISAV.

Destičky se inkubují při teplotě 14 ± 2 °C a vyšetřují pod mikroskopem po dobu až sedmi dní. Pokud se zjistí předčasný CPE nebo pokud není CPE do sedmi dnů pozorován, následuje fixace. Jamky se opláchnou fosfátovým pufrem s chloridem sodným (PBS) a fixují se inkubací s 80 % acetonem po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Destičky se usuší na vzduchu a neprodleně obarví nebo se před obarvením maximálně po 24 hodin při teplotě 0 až 6 °C skladují.

Jamky (postup probíhá ve více replikacích) se obarví směsí monoklonálních protilátek ISAV (MAb) 3H6F8 a 1OC9F5 nebo jinou monoklonální protilátkou, jejíž účinnost a specifičnost byla prokázána, naředí se PBS a inkubují při teplotě 37 ± 4 °C po dobu 30 minut. MAb se odstraní a destičky se třikrát opláchnou 0,05 % roztokem Tween 20 v PBS. Do každé jamky se přidá konjugát anti-myšího IgG a fluorescein-isothiokyanátu (FITC) ředěný v PBS a inkubuje se při teplotě 37 ± 4 °C po dobu 30 minut. Roztoky různých dávek MAb a konjugátu FITC se v každé laboratoři optimalizují. Protilátka se odstraní a destičky se třikrát opláchnou 0,05 % roztokem Tween 20 v PBS.

Replikační jamky se neprodleně vyšetří za použití inverzního mikroskopu zařízeného k fluorescenční mikroskopii s vhodným filtrem upraveným k excitaci FITC. Test se považuje za pozitivní, pokud jsou pozorovány fluorescenční buňky. Aby test byl platný, musí být pozitivního výsledku dosaženo také u kontrolních pozitivních vzorků a u negativních vzorků musí být dosaženo výsledku negativního.

II.3 Vyšetření jiných tkání

Technika uvedená v bodě II.2.6 se může použít i na jiné tkáně ryb, například na játra, slezinu a srdce, a to za podmínky, že na sklíčko se podaří uložit dostatečné množství endotelových buněk, leukocytů nebo lymfocytů. Obarvení probíhá u každé tkáně totožně, avšak u některých tkání může být vhodnější nepoužívat značení propidiumiodidem a upřednostnit k identifikaci typů buněk přítomných v otisku fázové osvětlení.

II.4 Histologie

Řezy zalité do parafínu se nakrájí na kousky o velikosti 5 µm a obarví hematoxylinen a eosinem.

Histologické změny u klinicky nemocného lososa obecného jsou různé, jejich součástí však mohou být:

a) četné erytrocyty v centrálním žilním splavu a lamelózních kapilárách žaber, přičemž se mohou tvořit také shluky erytrocytů;

b) multifokální nebo splývající petechie nebo nekróza hepatocytů případně obojí dohromady v určité vzdálenosti od velkých cév v játrech; multifokální nahromadění erytrocytů v dilatovaných jaterních sinusoidách;

c) nahromadění erytrocytů v krevních cévách v *lamina propria* ve střevech a případně i krvácení do *lamina propria*;

d) stroma sleziny rozšířené v důsledku nahromadění erytrocytů;

e) lehce multifokální až značně rozšířené intersticiální krvácení s tubulární nekrózou v oblastech krvácení, nahromaděním erytrocytů v glomerulech v ledvinách;

f) erytrofagocytóza ve slezině a sekundární krvácení jater a ledvin.

II.5 Imunohistochemie (IHC)

Použije se polyklonální protilátka proti nukleoproteinu ISAV na řezech z tkáně fixované formalinem zalitých do parafínu. Orgány, které mají být vyšetřeny, jsou prvoledvina a srdce (přechodová oblast zahrnující všechny tři komory a chlopně). Případy, u kterých existuje vzhledem k patologickým příznakům podezření, se ověří pozitivní IHC. Histologické řezy se připraví podle standardních metod.

1) Příprava tkáňových řezů

Tkáně se fixují v neutrálním, fosfátem pufrovaném 10 % roztoku formalinu po dobu nejméně jednoho dne, dehydratují se ve stupňované etanolové řadě, vyčistí se v xylenu a zalijí se do parafínu v souladu se standardními protokoly. Přibližně 5 µm silné řezy (v případě IHC umístěných na sklíčku pokrytém poly-L-lysinem) se na dobu 20 minut zahřejí na teplotu 56 °C až 58 °C (maximálně 60 °C), odparafínují se v xylenu, rehydratují se ve stupňované etanolové řadě a obarví se hematoxylinem a eosinem pro účely patomorfologie a IHC v souladu s bodem 2.

2) Obarvování pro účely IHC

Není-li v tomto rozhodnutí stanoveno jinak, provedou se veškeré inkubace při pokojové teplotě na třepačce:

a) antigen se získá tak, že se řezy vaří v 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 po dobu 2 × 6 minut, následuje blokování za pomoci 5 % netučného sušeného mléka a 2 % kozího séra v 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) po dobu 20 minut;

b) řezy se poté přes noc inkubují pomocí primární protilátky (monospecifická králičí protilátka proti nukleoproteinu ISAV) ředěné v TBS za pomoci 1 % netučného sušeného mléka, poté se třikrát opláchnou v TBS s 0,1 % Tween 20;

c) za účelem zjištění vázaných protilátek se řezy inkubují za pomoci protilátek konjugovaných alkalickou fosfatázou proti králičímu IgG po dobu 60 minut. Po posledním opláchnutí se přidá Fast Red (1 mg ml^{-1}) a naftol AS-MX fosfát (0,2 mg ml^{-1}) s 1 mM Levamisolu v 0,1 M TBS (pH 8,2) a nechá se po 20 minut reagovat. Řezy se následně opláchnou kohoutkovou vodou, kontrastně se obarví Harrisovým hematoxylinem a montují se do montovacího média rozpustného ve vodě. Součástí každé testové sestavy musí být kontrolní vzorky tkáňových řezů pozitivních a negativních na ISAV.

3) Interpretace výsledků imunohistochemické analýzy (IHC)

Interpretace výsledků testu IHC je stanovena v písmenech a) a b):

a) kontrolní řezy se považují za pozitivní, pokud je pozorováno, že mají zřetelně viditelné červené (načervenalé) cytoplazmatické a intranukleární zabarvení endoteliálních buněk v krevních cévách endokardu. Řez testovaného vzorku se považuje za pozitivní pouze tehdy, pokud se zjistí takovéto zřetelné intranukleární červené zabarvení endoteliálních buněk;

b) kontrolní řezy se považují za negativní, pokud nevykazují žádné významné barevné reakce.

Intranukleární lokalizace je specifická v případě nukleoproteinu orthomyxoviru ve fázi replikace viru, ale souběžné cytoplazmatické zabarvení je často dominantní. Cytoplazmatické zabarvení a další barevné struktury při absenci intranukleární lokalizace je třeba považovat za nespecifické či neprůkazné.

K nejsilnějším pozitivním barevným reakcím dochází zpravidla u endoteliálních buněk srdce a ledvin. Barevné reakce u endoteliálních buněk v rámci velmi rozsáhlých hemoragických lézí mohou být slabé nebo k nim nemusí dojít vůbec, zřejmě z důvodu lýzy infikovaných endoteliálních buněk.

ČÁST 4

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY ZA ÚČELEM DOZORU NAD INFEKCÍ MARTEILIÓZOU (*MARTEILIA REFRINGENS*) A JEJÍHO POTVRZENÍ

I. **Podrobné diagnostické metody a postupy za účelem diagnostiky infekce marteiliózou (*Marteilia refringens*)**

Při odběru vzorků a laboratorním vyšetření za účelem získání nebo zachování nákazového statusu, pokud jde o infekci *Marteilia refringens*, podle přílohy I části 4 oddílu I, nebo za účelem potvrzení či vyloučení výskytu této nákazy uvedené na seznamu v souladu s čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES pomocí diagnostických metod stanovených v příloze I části 4 oddíle II se použijí podrobné diagnostické metody a postupy stanovené v bodech I.1, I.2 a I.3 této části.

I.1 Postupy odběru vzorků

K odběru vzorků se přednostně použijí jednotliví rozevření nebo čerstvě uhynulí měkkýši, aby se zvýšila pravděpodobnost nalezení infikovaných živočichů.

Po odebrání se vzorky ústřic a slávek uchovávají při teplotě 4 °C nebo na chlazeném ledu v plastovém sáčku se štítkem, na němž jsou uvedeny údaje o vlastnostech a původu ústřic nebo slávek, a to po dobu maximálně 24 hodin v případě, že obsahují rozevřené měkkýše, a po dobu maximálně 72 hodin v případě, že je neobsahují. Rozevření nebo čerstvě uhynulí měkkýši se uchovávají odděleně od ostatních měkkýšů.

Pro účely histologického diagnostikování *Marteilia refringens* se použije 3 až 5 mm silný řez zahrnující tkáň ze žaber a srdce. K některým testům, například otiskům či polymerázové řetězové reakci (PCR), se použije část slinivkojaterní žlázy.

I.2 Mikroskopické techniky

I.2.1 Cytologie (cytologické otisky)

Po osušení tkání slinivkojaterní žlázy na savém papíře se pořídí několik otisků na podložná sklíčka. Sklíčka se usuší na vzduchu, fixují se v metanolu nebo v absolutním etanolu a obarví se pomocí komerčně dostupné sady pro barvení krve (například Diff-Quik®/Hemacolor®), a to podle pokynů výrobce. Po opláchnutí v kohoutkové vodě a usušení se za použití syntetické pryskyřice překryjí krycími sklíčky. Sklíčka se pozorují nejprve při 200násobném zvětšení a poté pod imerzní tekutinou při 1 000násobném zvětšení.

Za pozitivní výsledek se považuje, pokud jsou pozorovány buňky o velikosti 30 až 40 μm. Zabarvení cytoplazmy je bazofilní, zatímco jádra eosinofilní. Kolem velkých, výrazně obarvených (světlolomných) granul lze pozorovat světlé kruhy a ve větších buňkách také buňky uvnitř buněk.

Tato technika není specifická pro parazitní druhy.

I.2.2 Histologie

Řezy tkání, které zahrnují žábry, slinivkojaterní žlázu, plášť a gonády, se po dobu minimálně 24 hodin fixují v Davidsonově fixačním roztoku a poté následuje běžné zpracování na parafínový histologický preparát a barvení, například hematoxylinem a eosinem. Při pozorování se zvětšení postupně zvyšuje až na 1 000násobek.

Za pozitivní výsledek se považuje, pokud jsou pozorovány buňky o velikosti 4 až 40 μm. V počátečních fázích lze pozorovat vícejaderné, sférické až protáhlé buňky. Nacházejí se především v epitelové tkáni jícnu a žaludku a někdy i labiálních palp. Při sporulaci, která probíhá v tubulech a kanálcích slinivkojaterní žlázy, dochází k dělení buněk uvnitř buněk. V jejím průběhu se objevují světlolomná granula, která v počátečních fázích pozorována nejsou. V závěrečných fázích infekce jsou pozorována sporangia nacházející se volně v *lumen* trávícího traktu. Zabarvení cytoplazmy je bazofilní, zatímco jádra eosinofilní. Granula mohou mít sytě oranžovou až sytě rudou barvu.

Tato technika není specifická pro parazitní druhy.

I.3 Molekulární techniky

I.3.1 Extrakce DNA

DNA se extrahuje standardními postupy.

Lze použít komerčně dostupné sady pro extrakci DNA, kterými se získá vysoce kvalitní DNA vhodná k použití s protokoly PCR popsanými v bodě I.3.2.

I.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Bylo vypracováno a zveřejněno několik protokolů PCR.

Použijí se primery PCR, které se zaměřují na vnitřní přepisovaný mezerník (oblast ITS (ITS1)), protože jsou schopny amplifikovat pouze *M. refringens*.

PCR se provede v objemu 50 µl směsi. Směsi na PCR musí obsahovat pufr (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 při teplotě 25 °C] a 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM směsi dNTP, 1 µM přímých a reverzních primerů, 0,02 jednotky μl^{-1} Taq DNA polymerázy a 10 až 100 ng extrahované DNA. Po denaturaci DNA po dobu 5 minut při teplotě 94 °C se 30 cyklů provede takto: denaturace při teplotě 94 °C po dobu 1 minuty, žíhání po dobu 1 minuty při teplotě 55 °C a elongace při teplotě 72 °C po dobu 1 minuty na 1 kbp. Následně se provede závěrečná elongace po dobu 10 minut při teplotě 72 °C. Za účelem zjištění *M. refringens* se provede PCR s primery, které se zaměřují na oblast ITS1 (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ a 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Pozitivní kontrolní vzorky tvoří genomická DNA z vysoce infikované hostitelské či plazmatické DNA obsahující cílovou oblast.

Negativní kontrolní vzorky tvoří genomická DNA z neinfikované hostitelské DNA a reakční činidla PCR bez cílové DNA.

Za pozitivní výsledek se považuje pozitivní amplifikace PCR s očekávanou velikostí (412 bp), přičemž všechny negativní kontrolní vzorky musí být negativní a všechny pozitivní kontrolní vzorky pozitivní.

I.3.3 Hybridizace in situ (ISH)

Bylo vypracováno a zveřejněno několik protokolů (ISH).

Použije se sonda, která se zaměřuje na malou podjednotku (SSU) genového komplexu rRNA, protože byla histologicky ověřena.

Řezy tkání, které zahrnují žábry a slinivkojaterní žlázu, se po dobu minimálně 24 hodin fixují v Davidsonově fixačním roztoku a poté následuje běžné zpracování na parafínový histologický preparát. Připraví se řezy o síle 5 µm a položí na sklíčka potažená aminoalkylsilanem, jež se přes noc zapečou v troubě při 40 °C. Řezy se poté odparafínují ponořením do xylenu na dobu 10 minut. Tento krok se jednou opakuje, poté se rozpouštědlo odstraní dvěma po sobě následujícími lázněmi v absolutním etanolu, z nichž každá trvá 10 minut. Řezy se poté dehydratují ponořením do stupňované etanolové řady. Následně se po dobu 30 minut při teplotě 37 °C ošetřují proteinázou K (100 µg/ml) v TE pufru (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]). Sklíčka se dehydrují ponořením do stupňované etanolové řady a pak se usuší na vzduchu. Řezy se inkubují s 100 µl hybridizačního pufru (4 × SSC [solný roztok citrátu sodného], 50 % formamid, 1 × Denhardtův roztok, 250 µg/ml kvasinkové tRNA, 10 % dextran sulfát) obsahujícího 10 ng (1 µl reaktantů PCR připravených podle postupu popsaného v bodě I.3.2 za použití primerů CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG a TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) sondy značené digoxigeninem. Řezy se přikryjí plastickými krycími sklíčky *in situ* a umístí se do ohřívacího bloku s teplotou 95 °C na dobu 5 minut. Sklíčka se pak chladí na ledu po dobu 1 minuty, poté se přes noc provede hybridizace při teplotě 42 °C ve vlhké komoře. Řezy se dvakrát opláchnou v solném roztoku citrátu sodného (2 × SSC) po dobu 5 minut při pokojové teplotě a jednou v solném roztoku citrátu sodného (0,4 × SSC) po dobu 10 minut při teplotě 42 °C. Zjišťování probíhá podle pokynů výrobce. Sklíčka se poté opláchnou sterilní destilovanou vodou (dH2O). Řezy se kontrastně obarví Bismarckovou hnědou žlutí, opláchnou se sterilní destilovanou vodou a za použití montovacího média rozpustného ve vodě se přikryjí krycími sklíčky.

Pozitivní a negativní kontrolní vzorky tvoří řezy ze známých infikovaných respektive neinfikovaných hostitelů.

Při pozitivním výsledku jsou buňky *M. refringens* v rámci známých cílových tkání označeny fialově-černou barvou, přičemž všechny negativní kontrolní vzorky musí být negativní a všechny pozitivní kontrolní vzorky pozitivní.

I.3.4 Sekvenování

Sekvenování se provádí jakožto jeden ze závěrečných kroků k potvrzení diagnózy. Cílenými oblastmi jsou malá podjednotka rRNA a ITS1.

II. **Podrobné diagnostické metody a postupy za účelem dozoru nad infekcí marteiliózou (*Marteilia refringens*) a jejího potvrzení**

Pro účely programů pro dozor a za účelem potvrzení infekce marteiliózou (*Marteilia refringens*) nebo vyloučení podezření na tuto nákazu uvedenou na seznamu v souladu s požadavky stanovenými v příloze I části 4 oddíle II musí diagnostické metody a příslušné postupy, které se použijí, odpovídat následujícím pokynům stanoveným v tabulce 4.1 níže:

Tabulka 4.1

Pokyny k použití diagnostických metod pro účely programů pro dozor a potvrzení nebo vyloučení výskytu infekce *Marteilia refringens*

Metoda	Cílený dozor	Předběžná diagnóza	Potvrzení diagnózy
Otisky slinivkojaterní žlázy	X	X	X (jako možnost)
Histopatologie	X		X (jako možnost)
Hybridizace *in situ*			X (vždy)
Polymerázová řetězová reakce	X	X	X (vždy)
Sekvenování			X

ČÁST 5

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY ZA ÚČELEM DOZORU NAD INFEKCEMI BONAMIÓZOU (*BONAMIA OSTREAE*) A JEJICH POTVRZENÍ

I. **Diagnostické postupy u infekce bonamiózou (*Bonamia ostreae*)**

Při odběru vzorků a laboratorním vyšetření za účelem získání nebo zachování určitého nákazového statusu, pokud jde o *Bonamia ostreae*, podle přílohy I části 5 oddílu I nebo za účelem potvrzení výskytu nebo vyloučení této nákazy uvedené na seznamu v souladu s čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES pomocí diagnostických metod stanovených v příloze I části 5 oddíle II se použijí podrobné diagnostické metody a postupy stanovené v bodech I.1, I.2 a I.3 níže.

I.1 Postup odběru vzorků

K odběru vzorků se přednostně použijí jednotliví rozevření nebo čerstvě uhynulí měkkýši, aby se zvýšila pravděpodobnost nalezení infikovaných živočichů.

Po odebrání se vzorky ústřic uchovávají při teplotě 4 °C nebo na chlazeném ledu v plastovém sáčku se štítkem, na němž jsou uvedeny údaje o vlastnostech a původu, a to po dobu maximálně 24 hodin v případě, že obsahují rozevřené měkkýše, a po dobu maximálně 72 hodin v případě, že je neobsahují. Rozevření nebo čerstvě uhynulí měkkýši se uchovávají odděleně od ostatních měkkýšů.

Pro účely histologického diagnostikování *Bonamia ostreae* se použije 3 až 5 mm silný řez zahrnující tkáň ze žaber a srdce. K některým testům, například otiskům či polymerázové řetězové reakci (PCR), se použije část slinivkojaterní žlázy.

I.2 Mikroskopické techniky

I.2.1 Cytologie (cytologické otisky)

Po usušení žaber nebo srdečních tkání na savém papíře se pořídí několik otisků na podložná sklíčka. Sklíčka se usuší na vzduchu, fixují se v metanolu nebo v absolutním etanolu a obarví se pomocí komerčně dostupné sady pro barvení krve (například Diff- Quik®/Hemacolor®.), a to podle pokynů výrobce. Po opláchnutí v kohoutkové vodě a usušení se za použití syntetické pryskyřice překryjí krycími sklíčky. Sklíčka se pozorují nejprve při 200násobném zvětšení a poté pod imerzní tekutinou při 1 000násobném zvětšení.

Za pozitivní výsledek se považuje přítomnost malých kulovitých nebo vejčitých organismů (širokých 2 až 5 μm) v hemocytech. Extracelulárně by se však mohli objevit také paraziti. Tyto organismy mají bazofilní cytoplazmu a eosinofilní jádro (barvy se mohou lišit podle použitého barvení), a vzhledem k tomu, že jsou rozetřeny po sklíčku, mohou se na otiscích zdát širší než při histologickém zkoumání. Lze pozorovat i vícejaderné buňky. Tato technika není specifická pro parazitní druhy.

I.2.2 Histologie

Řezy tkání, které zahrnují žábry a slinivkojaterní žlázu, se po dobu minimálně 24 hodin fixují v Davidsonově fixačním roztoku a poté následuje běžné zpracování na parafínový histologický preparát a barvení, například hematoxylinem a eosinem. Při pozorování se zvětšení postupně zvyšuje až na 1 000násobek.

Za pozitivní výsledek se považuje přítomnost parazitů v podobě velice malých buněk o šířce 2 až 5 μm v hemocytech nebo volně v pojivové tkáni nebo sinusech epitelu žaber, střeva a pláště, často ve spojení s intenzivní zánětlivou reakcí. Aby se zamezilo jakýmkoliv pochybnostem, je k pozitivní diagnóze třeba v hemocytech parazita pozorovat. Tato technika není specifická pro parazitní druhy.

I.3 Molekulární techniky

I.3.1 Extrakce DNA

DNA se extrahuje standardními postupy.

Lze použít komerčně dostupné sady pro extrakci DNA, kterými se obvykle získá vysoce kvalitní DNA vhodná k použití s protokoly PCR popsanými níže.

I.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Bylo vypracováno a zveřejněno několik protokolů PCR.

Lze použít dva protokoly PCR, které se zaměřují na malou podjednotku (SSU) rDNA:

a) prvním je běžná reakce PCR, která amplifikuje několik členů skupiny *Haplosporidia*, mj. i *Bonamia* spp. Primery označené Bo a Boas (5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ respektive 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′) amplifikují produkt o velikosti 300 bp. Směsi PCR obsahují pufr (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 při 25 °C] a 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM směsi dNTP, 1 μM přímých a reverzních primerů, 0,02 jednotky/μl Taq DNA polymerázy a 0,2 ng/μl šablony DNA při celkovém objemu 50 μl. Vzorky se denaturují v termocykleru po dobu pěti minut při 94 °C a následně se podrobí 30 cyklům (1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C, 1 minuta při 72 °C) a na závěr se po dobu 10 minut při 72 °C provede konečná extenze.

   Pozitivní kontrolní vzorky tvoří genomická DNA z vysoce infikované hostitelské či plazmatické DNA obsahující cílovou oblast.

   Negativní kontrolní vzorky tvoří genomická DNA z neinfikované hostitelské DNA a reakční činidla PCR bez cílové DNA.

   Za pozitivní výsledek se považuje pozitivní amplifikace PCR s očekávanou velikostí (300 bp), přičemž všechny negativní kontrolní vzorky musí být negativní a všechny pozitivní kontrolní vzorky pozitivní;

b) druhým protokolem PCR je test PCR v reálném čase s pomocí barviva SYBR® Green. Umožňuje specificky zjistit *B. ostreae* (jak je popsáno níže) a lze jej kombinovat s testem PCR v reálném čase pomocí barviva SYBR® Green ke specifickému zjištění *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Primery BOSTRE-F (5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) a BOSTRE-R (5′- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) amplifikují produkt o velikosti 208 bp. Směsi PCR obsahují směs SYBR® Green Master (1×), 0,3 μM přímých a reverzních primerů a 200 ng extrahované DNA. Vzorky se po dobu 10 minut při 95 °C denaturují v systému umožňujícím detekci v reálném čase, následně se podrobí 35 cyklům (30 sekund při 95 °C, 45 sekund při 55 °C a 1 minuta při 72 °C). Provede se analýza křivky teploty tání, a to s přírůstky teploty ve výši 0,5 °C/s a počátkem na 55 °C a koncem na 95 °C, přičemž se zaznamená fluorescence při každé změně teploty.

Pozitivní kontrolní vzorky tvoří genomická DNA z vysoce infikované hostitelské či plazmatické DNA obsahující cílovou oblast.

Negativní kontrolní vzorky tvoří genomická DNA z neinfikované hostitelské DNA a reakční činidla PCR bez cílové DNA.

Za pozitivní výsledek se považuje pozitivní amplifikace PCR s jedinečným horním bodem tání (78,25 ± 0,25 °C za podmínek zveřejněných ve studii Ramilo et al. 2013), přičemž všechny negativní kontrolní vzorky musí být negativní a všechny pozitivní kontrolní vzorky pozitivní.

I.3.3 Hybridizace *in situ* (ISH)

Bylo vypracováno a zveřejněno několik protokolů (ISH).

Použije se sonda, která se zaměřuje na malou podjednotku (SSU) genového komplexu rDNA, přestože bylo prokázáno, že křížově reaguje s některými dalšími členy skupiny *Haplosporidia*.

Řezy tkání, které zahrnují žábry a slinivkojaterní žlázu, se po dobu minimálně 24 hodin fixují v Davidsonově fixačním roztoku a poté následuje běžné zpracování na parafínový histologický preparát. Připraví se řezy o síle 5 μm a položí na sklíčka potažená aminoalkylsilanem, jež se přes noc zapečou v troubě při 40 °C. Řezy se poté odparafínují ponořením do xylenu na dobu 10 minut. Tento krok se jednou opakuje, poté se rozpouštědlo odstraní dvěma po sobě následujícími lázněmi v absolutním etanolu, z nichž každá trvá 10 minut. Řezy se poté dehydratují ponořením do stupňované etanolové řady. Následně se po dobu 30 minut při teplotě 37 °C ošetřují proteinázou K (100 μg/ml) v TE pufru (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]). Sklíčka se dehydrují ponořením do stupňované etanolové řady a pak se usuší na vzduchu. Řezy se inkubují s 100 μl hybridizačního pufru (4 × SSC [solný roztok citrátu sodného], 50 % formamid, 1 × Denhardtův roztok, 250 μg/ml kvasinkové tRNA, 10 % dextran sulfát) obsahujícího 20 ng (2 μl reakce PCR připravené podle postupu popsaného v bodě I.3.2 za použití primerů Bo a Boas) sondy značené digoxigeninem. Řezy se přikryjí plastickými krycími sklíčky *in situ* a umístí se do ohřívacího bloku s teplotou 95 °C na dobu 5 minut. Sklíčka se pak chladí na ledu po dobu 1 minuty, poté se přes noc provede hybridizace při teplotě 42 °C ve vlhké komoře. Řezy se dvakrát opláchnou v solném roztoku citrátu sodného (2 × SSC) po dobu 5 minut při pokojové teplotě a jednou v solném roztoku citrátu sodného (0,4 × SSC) po dobu 10 minut při teplotě 42 °C. Zjišťování probíhá podle pokynů výrobce. Sklíčka se poté opláchnou sterilní destilovanou vodou (dH2O). Řezy se kontrastně obarví Bismarckovou hnědou žlutí, opláchnou se sterilní destilovanou vodou a za použití montovacího média rozpustného ve vodě se přikryjí krycími sklíčky.

Pozitivní a negativní kontrolní vzorky tvoří řezy ze známých infikovaných respektive neinfikovaných hostitelů.

Při pozitivním výsledku jsou v hemocytech označeni paraziti, přičemž všechny negativní kontrolní vzorky musí být negativní a všechny pozitivní kontrolní vzorky musí být pozitivní.

I.3.4 Sekvenování

Sekvenování se provádí jakožto jeden ze závěrečných kroků k potvrzení diagnózy. Cílovými oblastmi jsou malá podjednotka (SSU) rDNA a ITS1.

II. **Postupy za účelem dozoru nad infekcí *Bonamia ostreae* a jejího potvrzení**

Pro účely programů pro dozor a za účelem potvrzení přítomnosti infekce *Bonamia ostreae* nebo vyloučení podezření na ni v souladu s požadavky stanovenými v příloze I části 5 oddíle II musí diagnostické metody a příslušné postupy, které se použijí, odpovídat pokynům stanoveným v tabulce 5.1 níže.

Tabulka 5.1

Pokyny k použití diagnostických metod pro účely programů pro dozor a potvrzení nebo vyloučení přítomnosti infekce *Bonamia ostreae*

Metoda	Cílený dozor	Předběžná diagnóza	Potvrzení diagnózy
Otisky srdce nebo žaber	X	X	X (jako možnost)
Histopatologie	X		X (jako možnost)
Hybridizace *in situ*			X (vždy)
Polymerázová řetězová reakce	X	X	X (vždy)
Sekvenování			X

ČÁST 6

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY ZA ÚČELEM DOZORU NAD BĚLOSKVRNITOSTÍ (WSD) A JEJÍHO POTVRZENÍ

1. **Diagnostické postupy za účelem zjištění WSSV**

Při odběru vzorků a laboratorním vyšetření pro účely programů pro dozor a eradikaci podle přílohy I části 6 oddílu I a za účelem potvrzení přítomnost infekce WSSV nebo vyloučení podezření na tuto infekci v souladu s čl. 57 písm. b) směrnice 2006/88/ES pomocí diagnostických metod stanovených v příloze I části 6 oddílu II se použijí podrobné diagnostické metody a postupy stanovené v bodech 2–7 této části.

Metody a postupy popsané v této části přílohy II jsou přejaty z akreditovaného testu ISO 17025, jenž se používá v referenční laboratoři Evropské unie pro nákazy korýšů. Lze uplatnit alternativní přístupy a obdobné podmínky nebo použít sady jiných výrobců, které vzhledem k těm, jež se v této části popisují, nabízejí obdobnou citlivost a specifičnost. Ve všech případech je třeba k potvrzení identity WSSV amplifikovaný produkt PCR sekvenovat.

2. **Postup odběru vzorků**

Tkáň (pleopody a žábry) obsahující WSSV infikovaných korýšů lze skladovat v etanolu, v přípravku RNAlater nebo zmrazenou při teplotě – 80 °C. Identifikace WSSV ze vzorků tkáně by měla probíhat v těchto fázích: homogenizace tkáně, extrakce DNA, specifická amplifikace DNA WSSV za použití PCR, vizualizace amplifikovaného produktu na gelu, purifikace DNA a sekvenování k potvrzení identity patogenu.

3. **Homogenizace tkáně**

Rozrušení tkání a příprava homogenátu ve vhodném pufru probíhá za použití přístroje k rozrušení tkání Fast Prep a zkumavek s lyzační maticí A (společnosti MP Biomedicals). Tkáň se zváží, umístí do zkumavek s lyzační maticí A, zředí se v poměru 1: 10 hm./obj. nebo podle pokynů výrobce ve vhodném pufru (G2 a 10 µl proteinázy K, jež se používá se sadou pro extrakci DNA z tkáně (společnosti Qiagen)) a homogenizuje homogenizátorem Fast Prep 24 po dobu dvou minut. Homogenizované vzorky se inkubují při 56 °C po dobu minimálně čtyř hodin nebo přes noc. Vzorky se vortexují, odstřeďují se dvě minuty při rychlosti 9 000 otáček za minutu, poté se do zkumavky pro extrakci DNA přidá supernatant v objemu 50 µl nebo v objemu odpovídajícím 5 mg tkáně (což je optimální váha tkáně pro sadu pro extrakci DNA) a až do objemu 200 µl se doplní pufr G2.

4. **Extrakce DNA**

Celková DNA se extrahuje za použití sady pro extrakci DNA a přístroje EZ1 Advanced XL Biorobot (společnosti Qiagen) podle pokynů výrobce. S každou dávkou vzorků se zároveň zpracovává vzorek ke kontrole extrakce (telecí thymová DNA) a negativní vzorek (pufr G2). DNA by měla být eluována do objemu 50 µl. K ověření toho, že extrakce byla úspěšně dokončena, se určí koncentrace DNA u všech vzorků a kontrolních vzorků za použití přístroje Nano Drop. Extrahovanou DNA je třeba, pokud není bezprostředně zapotřebí, zmrazit na – 20 °C.

5. **Polymerázová řetězová reakce (PCR) u WSSV**

Jako metoda ke zjištění WSSV se použije protokol ke zjištění tohoto viru technikou „zahnízděné" (nested) PCR, jež se popisuje v následujících odstavcích a která v prvním a druhém kole PCR amplifikuje amplikon o velikosti 1 447 bp, respektive amplikon o velikosti 848 bp genu 18S rRNA.

Pro reakci PCR v prvním kole se připraví 50 µl směsi, která obsahuje konečné koncentrace pufru GoTaq (1×, společnost Promega), 5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/µl primeru WSSV 146 F1, 1 pmol/µl primeru WSSV 146 R1 (viz tabulka 1), 0,25 mM dNTP, 1,25 jednotek Taq polymerázy a 2,5 µl DNA. Každý vzorek by měl být zpracován duplicitně spolu s negativním vzorkem ke kontrole extrakce, negativním vzorkem ke kontrole PCR (místo DNA se přidá 2,5 µl H_2O) a pozitivními kontrolními vzorky. Pozitivní kontrolní vzorek tvoří zředěný plazmid WSSV vyrobený a potvrzený k internímu použití (k dispozici z referenční laboratoře EU).

Pro druhé kolo reakce PCR u WSSV se připraví totéž, co v kole prvním, použije se však primerová sada WSSV 146 F2/R2 a druhý pozitivní kontrolní vzorek, kterým se ověří, že tato fáze PCR fungovala.

Primer	Sekvenování
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 R2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

První i druhé kolo PCR probíhá na termocykleru DNA Engine Tetrad 2 s Peltierovými články (nebo obdobném zařízení) za těchto podmínek cyklování: nejprve 2 minuty denaturace při 94 °C, následuje 30 sekund při 94 °C, 30 sekund při 62 °C, 30 sekund při 72 °C opakovaných ve 30 cyklech a 2 minuty elongace při 72 °C a následně se teplota udržuje na 4 °C.

6. **Gelová elektroforéza**

Amplifikované produkty PCR z prvního i druhého kola PCR je třeba vizualizovat na 2 % agarózovém gelu za použití pufru TAE. 15 µl každého vzorku se vystaví 120 voltům po dobu přibližně 20 minut a sleduje se pod ultrafialovým (UV) světlem. Pozitivní vzorky vytvoří pás o velikosti 1 447 bp v prvním kole PCR a 848 bp ve druhém kole PCR. Vzorky této velikosti se vyříznou a umístí do mikroodstředivkové zkumavky o objemu 1,5 ml. DNA obsažená v proužcích gelu se purifikuje pomocí systému „Promega Wizard® SV Gel and PCR clean-Up System", a to podle pokynů výrobce. Provede se odhad koncentrace DNA pomocí přístroje Nano Drop. Pokud se purifikovaná DNA nepoužije okamžitě, zmrazí se na – 20 °C.

7. **Sekvenování produktů PCR**

DNA se sekvenuje za použití sady Big Dye Terminator v. 3.1 (společnosti Applied Biosystems). Celkový objem při každé reakci činí 20 µl, konečné koncentrace přitom tvoří Big Dye terminator (1 ×), pufr na sekvenování (1 ×), 10 pmol/µl přímého nebo reverzního primeru a 10 µl purifikované DNA (zředěné na přibližně 10 ng/µl), přičemž reakce probíhá na termocykleru DNA Engine Tetrad 2 s Peltierovými články (nebo obdobném zařízení) za těchto podmínek cyklování: 30 sekund při 94 °C, 10 sekund při 96 °C, 10 sekund při 50 °C a čtyři minuty při 60 °C, přičemž u posledních tří kroků probíhá cyklování 30krát.

Produkty PCR se vysráží sodno-acetátovou metodou: 20 µl DNA se přidá do 10 µl NaAc, 70 µl H_20 a 250 µl etanolu, následně se vortexuje a odstřeďuje při 13 000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut, supernatant se odstraní a peleta se opláchne 200 µl absolutního etanolu, přičemž se odstřeďuje při 13 000 otáčkách za minutu po dobu pěti minut. Peleta se následně suší pět minut při 37 °C. K peletám se přidá dvacet 25 µl Hi-Di formamidu, vše se na dvě minuty zahřeje na 95 °C a důkladně vortexuje. Vzorky se sekvenují pomocí analyzéru ABI3130xl Avant Genetic podle pokynů výrobce. Výsledky sekvenování se analyzují softwarem Sequencher, přičemž sekvence se porovnají se sekvencemi v databázi NCBI pomocí algoritmu BLAST.