II

(Nelegislatívne akty)

ROZHODNUTIA

VYKONÁVACIE ROZHODNUTIE KOMISIE (EÚ) 2015/1554

z 11. septembra 2015,

ktorým sa stanovujú pravidlá na uplatňovanie smernice 2006/88/ES, pokiaľ ide o požiadavky týkajúce sa metód dohľadu a diagnostických metód

[oznámené pod číslom C(2015) 6188]

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na smernicu Rady 2006/88/ES z 24. októbra 2006 o zdravotných požiadavkách na živočíchy a produkty akvakultúry a o prevencii a kontrole niektorých chorôb vodných živočíchov ([1]), a najmä na jej články 49 ods. 3, 50 ods. 4, 57 písm. b) a 61 ods. 3,

keďže:

(1) Smernicou 2006/88/ES sa stanovujú minimálne preventívne opatrenia týkajúce sa dohľadu a včasného zistenia chorôb vodných živočíchov, ktoré sú vymenované v prílohe IV k uvedenej smernici (ďalej len „choroby uvedené v zozname“), a kontrolné opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v prípade podozrenia na choroby uvedené v zozname alebo výskytu ich ohniska. Stanovujú sa ňou aj požiadavky na dosiahnutie štatútu oblasti bez výskytu chorôb v prípade členských štátov, ich zón alebo priestorov.

(2) Eradikácia chorôb uvedených v zozname a dosiahnutie štatútu oblasti bez výskytu chorôb v členskom štáte, zóne alebo priestore by mali byť v celej Únii založené na rovnakých zásadách a riadiť sa rovnakým vedeckým prístupom. Z toho dôvodu je potrebné stanoviť na úrovni Únie osobitné požiadavky týkajúce sa systémov eradikácie a dohľadu a metód odberu vzoriek a diagnostických metód, ktoré členské štáty použijú na získanie štatútu oblasti bez výskytu chorôb pre celé územie členského štátu alebo jeho zónu alebo priestor.

(3) Laboratórne vyšetrenia, ktoré sa majú vykonať v prípade podozrenia na prítomnosť chorôb uvedených v zozname alebo v prípade ich potvrdenia, by mali byť na úrovni Únie rovnaké a mali by vychádzať z rovnakých vedeckých noriem a protokolov. V súlade so smernicou 2006/88/ES je potrebné stanoviť osobitné diagnostické metódy a postupy na použitie v laboratóriách, ktoré na daný účel určí príslušný orgán členských štátov.

(4) V Kódexe zdravia vodných živočíchov Svetovej organizácie pre zdravie zvierat (OIE) (ďalej len „kódex zdravia vodných živočíchov“) sa stanovujú normy na zlepšenie zdravia vodných živočíchov a dobrých životných podmienok rýb z farmového chovu na celom svete vrátane noriem pre bezpečný medzinárodný obchod s chovnými vodnými živočíchmi a výrobkami z nich. V niekoľkých kapitolách v kódexe zdravia vodných živočíchov sú uvedené odporúčania týkajúce sa používania určitých diagnostických testov. Takéto testy, stanovené OIE, sú uvedené v príručke OIE o diagnostických testoch pre vodné živočíchy (ďalej len „príručka testov pre vodné živočíchy“). S cieľom zabezpečiť, aby požiadavky Únie v súvislosti s diagnostikou chorôb vodných živočíchov boli v súlade s medzinárodnými normami, by mali pravidlá stanovené v tomto rozhodnutí zohľadňovať normy a odporúčania kódexu zdravia vodných živočíchov.

([1]) Ú. v. EÚ L 328, 24.11.2006, s. 14.

(5) V tejto súvislosti, v prípade mnohých chorôb uvedených v zozname, príručka testov pre vodné živočíchy uvádza niekoľko testov a postupov, ktoré sa majú použiť na účely laboratórnych vyšetrení. Na zjednotenie jednotného vedeckého základu diagnostickej práce v súvislosti s chorobami uvedenými v zozname na úrovni Únie je potrebné uskutočniť výber spomedzi diagnostických testov a postupov odporúčaných výborom OIE a špecifikovať, ktoré testy by mali byť povinné na účely laboratórneho vyšetrenia pri vykonávaní programov dohľadu a na vylúčenie podozrenia na výskyt chorôb uvedených v zozname alebo na potvrdenie ich prítomnosti. Zatiaľ čo v určitých prípadoch bude potrebné, aby boli dostupné aj alternatívne metódy a postupy, mali by sa poskytnúť opisy a niektoré vedecké vysvetlenia toho, kedy a ako by sa mohli uplatňovať alternatívne metódy. To je predovšetkým potrebné v prípade podrobných diagnostických postupov.

(6) S cieľom získať presné a reprodukovateľné diagnostické výsledky je dôležité, aby podrobné postupy a protokoly, ktoré sa majú používať, boli validované v súlade s príslušnými normami kvality uvedenými v časti I prílohy VI k smernici 2006/88/ES. Pri mnohých diagnostických metódach stanovených v tomto rozhodnutí je používanie komerčných testovacích súprav nevyhnutnou súčasťou diagnostických protokolov a uvedené testovacie súpravy boli validované v akreditovaných testoch európskymi referenčnými laboratóriami (EURL), pokiaľ ide o príslušné choroby. V záujme právnej istoty by sa obchodné názvy uvedených validovaných komerčných testovacích súprav mali uviesť v tomto rozhodnutí.

(7) Pre niektoré členské štáty môže byť ťažké dosiahnuť štatút oblasti bez výskytu chorôb pre celé územie členského štátu alebo pre jeho zónu alebo priestor, pokiaľ ide o jednu alebo viaceré z chorôb uvedených v zozname. V takýchto situáciách si členský štát nemusí želať, aby získal alebo opätovne získal štatút oblasti bez výskytu daných chorôb uvedených v zozname. Minimálne kontrolné opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v prípadoch, keď si dotknutý členský štát neželá získať alebo opätovne získať štatút oblasti bez výskytu chorôb, by mali byť na úrovni Únie rovnaké a mali by vychádzať z rovnakých kritérií. Preto je nevyhnutné v súlade so smernicou 2006/88/ES stanoviť podrobné pravidlá na zabránenie šíreniu daných chorôb uvedených v zozname a minimálne požiadavky na zrušenie uvedených opatrení na zabránenie šíreniu daných chorôb.

(8) V rozhodnutí Komisie 2001/183/ES ([1]) sa stanovujú požiadavky týkajúce sa plánov odberu vzoriek a diagnostických metód na zisťovanie a potvrdzovanie infekčnej hematopoietickej nekrózy a vírusovej hemoragickej septikémie, chorôb uvedených v zozname. Rozhodnutím Komisie 2003/466/ES ([2]) sa stanovujú požiadavky týkajúce sa plánov odberu vzoriek a diagnostických metód na zisťovanie nákazlivej chudokrvnosti lososov, ako aj kritériá na vymedzenie pásiem a úradný dozor pri podozrení na výskyt uvedenej choroby alebo pri jej potvrdení. Rozhodnutím Komisie 2002/878/ES ([3]) sa stanovujú požiadavky týkajúce sa plánov na zber vzoriek a diagnostických metód na zistenie a potvrdenie prítomnosti chorôb mušlí bonamióza a marteilióza. S cieľom aktualizovať požiadavky by sa uvedené tri rozhodnutia mali nahradiť týmto rozhodnutím. Rozhodnutie 2001/183/ES, rozhodnutie 2002/878/ES a rozhodnutie 2003/466/ES by sa preto mali zrušiť.

(9) Keďže niektoré členské štáty požadujú čas na aktualizáciu svojich národných referenčných laboratórií na dosiahnutie súladu s požiadavkami stanovenými v tomto rozhodnutí, toto rozhodnutie by sa malo uplatňovať od 1. apríla 2016.

(10) Opatrenia stanovené v tomto rozhodnutí sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre rastliny, zvieratá, potraviny a krmivá,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

Článok 1

Predmet úpravy

Týmto rozhodnutím sa stanovujú pravidlá, pokiaľ ide o:

a) dohľad, nárazníkové zóny, odber vzoriek a diagnostické metódy, ktoré členské štáty majú používať v súvislosti so štatútom chorôb členských štátov alebo zón alebo priestorov v prípade neexotických chorôb vodných živočíchov uvedených v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES („choroby uvedené v zozname“);

([1]) Rozhodnutie Komisie 2001/183/ES z 22. februára 2001, ktoré ustanovuje plány odberu vzoriek a diagnostické metódy na zisťovanie a potvrdzovanie určitých nákaz rýb a ktorým sa ruší rozhodnutie 92/532/EHS (Ú. v. ES L 67, 9.3.2001, s. 65).

([2]) Rozhodnutie Komisie 2003/466/ES z 13. júna 2003, ktorým sa stanovujú kritériá na vymedzenie pásiem a úradný dozor pri podozrení na výskyt nákazlivej chudokrvnosti lososov (ISA) alebo pri jeho potvrdení (Ú. v. EÚ L 156, 25.6.2003, s. 61).

([3]) Rozhodnutie Komisie 2002/878/ES zo 6. novembra 2002, ktorým sa ustanovujú plány na zber vzoriek a diagnostické metódy na zistenie a potvrdenie prítomnosti chorôb mušlí bonamióza (*Bonamia ostreae*) a marteilióza (*Marteilia refringens*) (Ú. v. ES L 305, 7.11.2002, s. 57).

b) diagnostické metódy, ktoré sa majú použiť na laboratórne vyšetrenia v prípade podozrenia alebo potvrdenia prítomnosti choroby uvedenej v zozname; a

c) minimálne kontrolné opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v prípade podozrenia na chorobu uvedenú v zozname alebo jej potvrdenia v členskom štáte, zóne alebo priestore, ktoré nie sú vyhlásené za oblasť bez výskytu danej choroby uvedenej v zozname.

Článok 2

Vymedzenie pojmov

Na účely tohto rozhodnutia sa uplatňuje toto vymedzenie pojmov:

a) „vírusová hemoragická septikémia“ („VHS“) je nákaza spôsobená vírusom vírusovej hemoragickej septikémie (VHSV), známym aj ako Egtved vírus, ktorý patrí do rodu *Novirhabdovirus* v čeľadi *Rhabdoviridae*;

b) „infekčná hematopoetická nekróza“ („IHN“) je nákaza spôsobená vírusom infekčnej hematopoetickej nekrózy, ktorý patrí do rodu *Novirhabdovirus v čeľadi Rhabdoviridae*;

c) „herpesviróza kaprov koi“ („KHVD“) je nákaza spôsobená koi herpesvírusom (KHV), ktorý patrí do čeľade *Alloherpesviridae*. Vedecký názov je herpesvírus kaprovitých rýb 3 (CyHV-3);

d) „infekčná anémia lososov“ („ISA“) je nákaza spôsobená infekciou vírusom infekčnej anémie lososov (ISAV) s deléciou vo vysoko polymorfnej oblasti, ktorý patrí do rodu *Isavirus* v čeľadi *Orthomyxoviridae*;

e) „marteilióza (*Marteilia refringens*)“ je nákaza spôsobená infekciou prvokom *Marteilia refringens* patriacim do radu Paramyxida;

f) „bonamióza (*Bonamia ostreae*)“ je nákaza spôsobená infekciou prvokom *Bonamia ostreae* patriacim do skupiny Haplosporidia;

g) „choroba bielych škvŕn“ („WSD“) je nákaza spôsobená vírusom choroby bielych škvŕn, ktorý je dvojvláknovým DNA vírusom patriacim do rodu *Whispovirus* a čeľade *Nimaviridae*.

Článok 3

Minimálne požiadavky, pokiaľ ide o programy eradikácie a dohľadu

Členské štáty zabezpečia, aby boli splnené pravidlá týkajúce sa programov dohľadu a eradikačných programov, nárazníkových zón, odberu vzoriek a diagnostických metód stanovených v prílohe I a špecifických metód a podrobných postupov stanovených v prílohe II, ak sa má v prípade členského štátu, jeho zóny alebo priestoru udeliť, odobrať alebo obnoviť štatút oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o jednu alebo viaceré z chorôb uvedených v zozname.

Článok 4

Minimálne požiadavky, pokiaľ ide o diagnostické metódy a špecifické postupy

Členské štáty zabezpečia, aby boli splnené kontrolné metódy stanovené v prílohe I, ako aj špecifické diagnostické metódy a podrobné postupy stanovené v prílohe II, ak sa laboratórne vyšetrenia vykonávajú s cieľom potvrdiť alebo vylúčiť prítomnosť choroby uvedenej v zozname.

Článok 5

Minimálne kontrolné opatrenia na zabránenie šíreniu chorôb uvedených v zozname a minimálne požiadavky na zrušenie opatrení na zabránenie šíreniu chorôb v členských štátoch, zónach alebo priestoroch, ktoré nie sú vyhlásené za oblasti bez výskytu chorôb uvedených v zozname

Členské štáty zabezpečia, aby pri vykonávaní kontrolných opatrení a pri rušení opatrení na zabránenie šíreniu chorôb v prípade jednej alebo viacerých chorôb uvedených v zozname v členskom štáte alebo jeho zóne alebo priestore, ktoré nie sú vyhlásené za oblasti bez výskytu daných chorôb uvedených v zozname, boli splnené minimálne kontrolné opatrenia a minimálne požiadavky na zrušenie opatrení na zabránenie šíreniu chorôb stanovené v prílohe I.

Článok 6

Zrušenia

Rozhodnutia 2001/183/ES, 2002/878/ES a 2003/466/ES sa zrušujú.

Článok 7

Dátum uplatňovania

Toto rozhodnutie sa uplatňuje od 1. apríla 2016.

Článok 8

Adresáti

Toto rozhodnutie je adresované členským štátom.

V Bruseli 11. septembra 2015

Za Komisiu
Vytenis ANDRIUKAITIS
člen Komisie

PRÍLOHA I

METÓDY DOHĽADU A KONTROLY

I. **Úvod**

Táto príloha stanovuje:

a) požiadavky týkajúce sa eradikačných programov a programov dohľadu podľa článku 44 smernice 2006/88/ES a metód odberu vzoriek a diagnostických metód, ktoré sa majú použiť na účely vyhlásenia štatútu oblasti bez výskytu chorôb v prípade členských štátov alebo ich zón alebo priestorov podľa kapitoly VII uvedenej smernice;

b) metódy odberu vzoriek a diagnostické metódy, ktoré sa majú použiť na laboratórne vyšetrenia v prípade podozrenia na výskyt neexotických chorôb a v prípade potvrdenia prítomnosti neexotických chorôb, ktoré sú uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES (ďalej len „choroby uvedené v zozname"), podľa článku 28 písm. a) a článku 57 písm. b) uvedenej smernice;

c) opatrenia na zabránenie šíreniu chorôb, ktoré sa majú prijať v prípade potvrdenia výskytu choroby uvedenej v zozname, uvedené v článku 39 smernice 2006/88/ES, a opatrenia, ktoré sa majú prijať s cieľom získať zdravotný štatút kategórie III pre členský štát, zónu alebo priestor so zdravotným štatútom kategórie V.

Požiadavky stanovené v tejto prílohe sa vzťahujú na tieto choroby uvedené v zozname:

1.	Vírusová hemoragická septikémia (VHS)	Časť 1
2.	Infekčná hematopoetická nekróza (IHN)	Časť 1
3.	Herpesviróza kaprov koi (KHV)	Časť 2
4.	Infekčná anémia lososov (ISA)	Časť 3
5.	Marteilióza (*Marteilia refringens*)	Časť 4
6.	Bonamióza (*Bonamia ostreae*)	Časť 5
7.	Choroba bielych škvŕn (WSD)	Časť 6

II. **Vymedzenie pojmov**

Na účely príloh I a II sa uplatňuje toto vymedzenie pojmov:

a) „suchozemský priestor" je jedna farma alebo viacero fariem nachádzajúcich sa v suchozemskej časti jedného alebo viacerých členských štátov v rámci spoločného systému biologickej bezpečnosti, ktorá obsahuje populáciu vodných živočíchov s jasne odlíšeným zdravotným štatútom v súvislosti so špecifickou chorobou;

b) „suchozemská farma" je farma, v ktorej sa držia živočíchy akvakultúry a ktorá sa nachádza v suchozemskej časti územia jedného členského štátu;

c) „suchozemská oblasť" je presná geografická oblasť nachádzajúca sa v suchozemskej časti jedného alebo viacerých členských štátov s homogénnym hydrologickým systémom obsahujúcim časti povodia od prameňa (prameňov) po prirodzenú alebo umelú bariéru, ktorá zabraňuje migrácii vodných živočíchov z nižších úsekov povodia proti prúdu, celé povodie od jeho prameňa (prameňov) po jeho ústie alebo viac ako jedno povodie vrátane ich ústí z dôvodu epidemiologického prepojenia povodí cez ústie;

d) „úradne vyhlásená infikovaná farma“ je farma, v ktorej sa držia vodné živočíchy a v ktorej príslušný orgán v súlade s článkom 28 písm. a), článkom 29 a článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES potvrdil jednu alebo viaceré z chorôb uvedených v zozname;

e) „kontaktná farma“ je farma držiaca vodné živočíchy, v prípade ktorej sa akýmkoľvek spôsobom preukáže kontaminácia infekčným materiálom z farmy úradne vyhlásenej za infikovanú alebo v prípade ktorej existuje silné podozrenie na takúto kontamináciu.

ČASŤ 1

METÓDY DOHĽADU A KONTROLY, POKIAĽ IDE O VÍRUSOVÚ HEMORAGICKÚ SEPTIKÉMIU (VHS) A INFEKČNÚ HEMATOPOETICKÚ NEKRÓZU (IHN)

I. **Požiadavky týkajúce sa programov dohľadu a eradikačných programov na účely získania a udržania zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o VHS a IHN, a opatrení na zabránenie šíreniu daných chorôb uvedených v zozname**

I.1. Všeobecné požiadavky, pokiaľ ide o veterinárne kontroly a odber vzoriek v prípade VHS a IHN:

a) veterinárne kontroly, a ak je to vhodné, odber vzoriek, sa vykonávajú v období roka, keď je teplota vody nižšia ako 14 °C, alebo vtedy, keď je pravdepodobné, že teplota vody dosiahne svoje najnižšie ročné hodnoty;

b) ak sa v súlade s druhým odsekom bodu 2 časti I prílohy V k smernici 2006/88/ES vyžaduje cielený dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, stanoví sa počet a zemepisné rozmiestnenie miest odberu vzoriek s cieľom získať primerané pokrytie členského štátu, zóny alebo priestoru. Miesta odberu vzoriek sú reprezentatívne pre rôzne ekosystémy, kde sa nachádzajú voľne žijúce populácie vnímavých druhov;

c) ak farmy alebo voľne žijúce populácie majú byť predmetom veterinárnych kontrol alebo sa podrobovať odberu vzoriek viac ako raz ročne, intervaly medzi veterinárnymi kontrolami a medzi odbermi vzoriek musia byť dlhé aspoň štyri mesiace a podľa možnosti čo najdlhšie, pričom sa zohľadňujú požiadavky týkajúce sa teploty stanovené v písm. a);

d) všetky výrobné jednotky, ako sú rybníky, nádrže a sieťové klietky, sú predmetom veterinárnych kontrol zameraných na prítomnosť uhynutých, slabých alebo abnormálne sa správajúcich rýb. Osobitná pozornosť sa venuje oblasti odtoku vody, kde sa väčšinou zhromažďujú slabé ryby pre prúdenie vody;

e) výber rýb vnímavých druhov, ktoré sa majú odobrať ako vzorky, sa uskutočňuje takto:

i) ak sú prítomné pstruhy dúhové, na odber vzoriek sa vyberú len ryby tohto druhu, s výnimkou prípadu, ak sú prítomné iné vnímavé druhy, ktoré preukazujú typické príznaky VHS alebo IHN; ak pstruhy dúhové nie sú prítomné, vzorka musí reprezentovať všetky ostatné vnímavé druhy, ktoré sú prítomné;

ii) ak sú prítomné slabé, abnormálne sa správajúce alebo čerstvo uhynuté, ale nerozložené ryby, takéto ryby sa vyberú; ak sa na produkciu rýb využíva viac ako jeden vodný zdroj, do vzorky sa zahrnú ryby reprezentujúce všetky vodné zdroje;

iii) vybrané ryby zahŕňajú ryby odobraté tak, aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti farmy ako aj všetky ročníky.

I.2. Osobitné požiadavky na získanie zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb (kategória I), pokiaľ ide o VHS a IHN

I.2.1. Programy dohľadu:

a) členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie III podľa časti B prílohy III k smernici 2006/88/ES v súvislosti s VHS alebo IHN alebo obomi chorobami, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danými chorobami uvedenými v zozname, pod podmienkou, že všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k uvedenej smernici v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru sú v súlade s požiadavkami stanovenými v prílohe V k uvedenej smernici a všetky uvedené farmy, a ak sa to vyžaduje v druhom odseku bodu 2 časti I prílohy V k uvedenej smernici, aj miesta odberu vzoriek v prípade voľne žijúcich populácií vybraných v súlade s uvedenou časťou, boli podrobené jednému z týchto programov dohľadu:

i) model A – dvojročný program dohľadu:

Farmy alebo miesta odberu vzoriek museli byť podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas dvoch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 1.A v oddiele II.

Počas uvedeného dvojročného obdobia muselo testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2. priniesť negatívne výsledky buď v prípade VHS alebo IHN alebo oboch chorôb a muselo byť vylúčené akékoľvek podozrenie buď na VHS alebo IHN alebo obe choroby v súlade s metódami odberu vzoriek a diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3;

ii) model B – štvorročný program dohľadu so zníženou veľkosťou vzorky:

Farmy alebo miesta odberu vzoriek museli byť podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas štyroch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 1.B uvedenej v oddiele II.

Počas uvedeného štvorročného obdobia muselo testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2. priniesť negatívne výsledky buď v prípade VHS alebo IHN alebo oboch chorôb a muselo byť vylúčené akékoľvek podozrenie buď na VHS alebo IHN alebo obe choroby v súlade s metódami odberu vzoriek a diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3;

b) ak sa počas realizácie programu dohľadu uvedeného v písm. a) na farme zaradenej do uvedeného programu dohľadu potvrdila infekcia VHS alebo IHN alebo obomi chorobami, a na základe toho sa danej farme zrušil zdravotný štatút kategórie II, uvedená farma môže okamžite znovu získať svoj zdravotný štatút kategórie II a pokračovať v realizácii programu dohľadu s cieľom získať štatút oblasti bez výskytu chorôb bez toho, aby uplatňovala eradikačný program, ako sa uvádza v bode I.2.2, za predpokladu, že daná farma spĺňa tieto podmienky:

i) je suchozemskou farmou, ktorej zdravotný štatút buď v súvislosti s VHS alebo IHN alebo obomi chorobami je nezávislý od zdravotného štatútu populácie vodných živočíchov v okolitých prírodných vodách, pokiaľ ide o dané choroby uvedené v zozname v súlade s bodom 3 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES;

ii) je vyprázdnená, vyčistená, vydezinfikovaná a úhorovaná; dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov;

iii) bola opätovne zarybnená rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I buď v súvislosti s VHS alebo IHN alebo obomi chorobami.

I.2.2. Eradikačné programy

I.2.2.1. Všeobecné požiadavky

Členský štát, zóna alebo priestor so zdravotným štatútom kategórie V, pokiaľ ide buď o VHS alebo IHN alebo obe choroby, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danými chorobami uvedenými v zozname, pod podmienkou, že všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci daného členského štátu, zóny alebo priestoru boli predmetom eradikačného programu, ktorý je v súlade s písm. a) až e):

a) museli sa účinne uplatňovať minimálne kontrolné opatrenia stanovené v oddiele 4 kapitoly V smernice 2006/88/ES a v blízkosti farmy(-iem) úradne vyhlásenej(-ých) za infikovanú(-é) buď VHS alebo IHN alebo obomi uvedenými chorobami zo zoznamu sa musela zriadiť uzavretá oblasť uvedená v článku 32 písm. b) uvedenej smernice, ktorá obsahuje ochrannú zónu a zónu pozorovania.

Uzavretá oblasť sa musela vymedziť na základe jednotlivých prípadov, so zohľadnením faktorov, ktoré majú vplyv na riziká rozširovania daných chorôb uvedených v zozname na chované a voľne žijúce ryby, ako sú: počet, miera a rozdelenie úhynu rýb na farme infikovanej buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami; vzdialenosť k susedným farmám a hustota týchto susedných fariem; blízkosť bitúnkov; farmy, ktoré sú v styku; druhy prítomné na farmách; chovné postupy uplatňované na postihnutých farmách a na farmách susediacich s postihnutými farmami; zistené hydrodynamické podmienky a ostatné faktory epidemiologického významu.

Na účely zriadenia ochranných zón a zón pozorovania platia tieto minimálne požiadavky, pokiaľ ide o geografické vymedzenie uvedených zón:

i) ochranná zóna sa zriadi v bezprostrednej blízkosti farmy úradne vyhlásenej za infikovanú buď VHS alebo IHN alebo obomi danými chorobami uvedenými v zozname a zodpovedá:

(1) v pobrežných oblastiach: oblasti zahŕňajúcej kruh s priemerom aspoň jedného posunu prílivu alebo aspoň 5 km, podľa toho, ktorý je väčší, ktorého stredom je farma, ktorá je úradne vyhlásená za infikovanú buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami, alebo rovnocennej oblasti určenej na základe príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov;

(2) vo vnútrozemských oblastiach: celému povodiu farmy úradne vyhlásenej za infikovanú VHS alebo IHN alebo obomi chorobami; príslušný orgán môže obmedziť rozsah zóny na časti povodia, alebo oblasť farmy, za predpokladu, že sa neohrozí prevencia šírenia buď VHS alebo IHN alebo oboch chorôb;

ii) zónu pozorovania vymedzí príslušný orgán mimo ochrannej zóny, pričom zóna pozorovania zodpovedá:

(1) v pobrežných oblastiach: oblasti, ktorá okolo ochrannej zóny presahuje pásma posunu prílivu; alebo oblasti okolo ochrannej zóny, ktorá patrí do okruhu s priemerom 10 km od stredu ochrannej zóny; alebo rovnocennej oblasti určenej na základe príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov;

(2) vo vnútrozemských oblastiach: rozsiahlej oblasti mimo stanovenej ochrannej zóny;

b) všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci ochrannej zóny, ktoré nie sú úradne vyhlásené za infikované buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami, musia byť predmetom úradného vyšetrovania, ktoré bude obsahovať minimálne tieto prvky:

i) odber vzoriek 10 rýb na testovanie, ak sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zodpovedajúce infekcii buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami, alebo najmenej 30 rýb, ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem*;

ii) veterinárna kontrola: v tých farmách, kde testy uvedené v podbode i) priniesli negatívne výsledky; veterinárne kontroly pokračujú raz mesačne počas obdobia, keď je teplota vody nižšia ako 14 °C, okrem prípadov, keď sú rybníky alebo sieťové klietky pokryté ľadom, až kým sa ochranná zóna nezruší v súlade s bodom I.2.2.1. písm. c);

c) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami musia byť vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované. Dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov. Ak sú vyprázdnené všetky farmy úradne vyhlásené za infikované v rámci tej istej ochrannej zóny, musí sa vykonať najmenej trojtýždňové súbežné úhorovanie. Tento odsek sa vzťahuje aj na nové farmy úradne vyhlásené za infikované počas realizácie eradikačného programu.

Ak sa vykonáva úhorovanie úradne vyhlásených infikovaných fariem, ochranné zóny sa premenia na zóny pozorovania.

Príslušný orgán sa môže rozhodnúť požadovať vyprázdnenie, vyčistenie, dezinfekciu a úhorovanie ďalších fariem v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania. Dĺžku obdobia úhorovania v uvedených farmách určí príslušný orgán na základe posúdenia rizika v jednotlivých konkrétnych prípadoch.

d) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované buď VHS alebo IHN alebo obomi danými chorobami uvedenými v zozname a všetky ostatné farmy úhorované v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania podľa písm. c) musia byť opätovne zarybnené rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom oblasti bez výskytu chorôb (kategória I), pokiaľ ide buď o VHS alebo IHN alebo obe choroby.

Opätovné zarybňovanie sa uskutoční len vtedy, keď všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované v súlade s bodom I.2.2.1 písm. c);

e) všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru, na ktoré sa vzťahuje eradikačný program, a ak je potrebný dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, miesta odberu vzoriek vybraté v súlade s bodom I.1, následne podliehajú systému dohľadu stanovenému v bode I.2.1.

I.2.2.2. Požiadavky na opätovné získanie štatútu oblasti bez výskytu chorôb v prípade suchozemských priestorov zahŕňajúcich jednu jedinú farmu, ktorá bola predtým vyhlásená za farmu buď bez výskytu IHN alebo VHS alebo oboch chorôb

Suchozemský priestor zahŕňajúci jednu jedinú farmu predtým vyhlásenú za farmu buď bez výskytu VHS alebo IHN alebo oboch daných chorôb uvedených v zozname, ktorej zdravotný štatút v súvislosti s danými chorobami uvedenými v zozname je nezávislý od okolitých prírodných vôd v súlade s bodom 3 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES a ktorých zdravotný štatút kategórie I bol zrušený v súlade s článkom 53 ods. 3 uvedenej smernice, môže opätovne získať zdravotný štatút kategórie I okamžite potom, ako príslušný orgán potvrdil, že boli splnené tieto podmienky:

a) farma úradne vyhlásená za infikovanú buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami musí byť vyprázdnená, vyčistená, vydezinfikovaná a úhorovaná; dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov;

b) farma úradne vyhlásená za infikovanú buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami bola opätovne zarybnená rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I buď v súvislosti VHS alebo IHN alebo obomi chorobami.

I.3. Osobitné požiadavky na udržanie zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb (kategória I), pokiaľ ide buď o VHS alebo IHN alebo obe choroby

Ak sa na udržanie zdravotného štatútu kategórie I vyžaduje cielený dohľad podľa článku 52 smernice 2006/88/ES, všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k uvedenej smernici v rámci príslušného členského štátu, zóny alebo priestoru podliehajú veterinárnej kontrole a vzorky rýb sa odoberajú v súlade s tabuľkou 1.C stanovenou v oddiele II tejto časti, so zohľadnením úrovne rizika farmy v súvislosti s nakazením buď VHS alebo IHN alebo obomi danými chorobami uvedenými v zozname.

Pri určovaní frekvencie veterinárnych kontrol v prípade priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, pokiaľ ide buď o VHS alebo IHN alebo obe choroby, ktoré sú umiestnené v suchozemských oblastiach a ktorých zdravotný štatút, pokiaľ ide o VHS alebo IHN, závisí od zdravotného štatútu populácií vodných živočíchov v okolitých prírodných vodách v súlade s bodom 2 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES, sa riziko nakazenia buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami považuje za vysoké.

Štatút oblasti bez výskytu chorôb sa udrží iba pokiaľ všetky vzorky testované s použitím diagnostických metód stanovených v bode II. 2. majú negatívne výsledky buď v prípade VHS alebo IHN alebo oboch daných chorôb uvedených v zozname a pokiaľ je vylúčené akékoľvek podozrenie buď na VHS alebo IHN alebo obe choroby v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II. 3.

I.4. Požiadavky na zrušenie opatrení na zabránenie šíreniu podľa článku 39 smernice 2006/88/ES, konkrétne zmena zdravotného štatútu z kategórie V na kategóriu II

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V buď v súvislosti s VHS alebo IHN alebo obomi chorobami, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie III, pokiaľ ide o dané choroby uvedené v zozname, za predpokladu, že:

a) sú splnené požiadavky stanovené v bode I.2.2.1 písm. a), b) a c). V prípade, ak úhorovanie nie je technicky možné, dotknuté farmy podliehajú alternatívnemu opatreniu, na základe ktorého sa poskytuje takmer podobná záruka, pokiaľ ide o vyhubenie buď IHNV alebo VHSV alebo oboch chorôb v prostredí farmy;

b) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy, ktoré boli úhorované alebo podliehali alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a) v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania boli opätovne zarybnené rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, II alebo III, pokiaľ ide buď o VHS alebo IHN alebo obe choroby;

c) opätovné zarybňovanie sa uskutočnilo len potom, ako všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované alebo sa podrobili alternatívnym opatreniam v súlade s písmenom a).

II. **Diagnostické metódy a metódy odberu vzoriek**

II.1. Orgány, z ktorých sa majú odobrať vzorky:

Má sa vyšetriť zkanivový materiál sleziny, prednej obličky, a buď srdca, alebo mozgu. Pri odbere vzoriek sa môže vyšetriť aj ovariálna tekutina alebo semenná tekutina chovu generačných rýb.

V prípade malého plôdika sa môžu celé ryby kratšie ako 4 cm na drobné kúsky rozstrihať sterilnými nožnicami alebo pokrájať skalpelom po odstránení tela za črevným otvorom. Ak vzorka pozostáva z celých rýb s dĺžkou tela 4 až 6 cm, odoberajú sa vnútornosti vrátane obličiek.

Časti orgánov najviac z 10 rýb sa môžu spojiť.

II.2. Diagnostické metódy na získanie a udržanie štatútu oblasti bez výskytu buď VHS alebo IHN alebo oboch chorôb

Diagnostickou metódou v súlade so schválenými diagnostickými metódami a postupmi stanovenými v bode I. časti 1 prílohy II na dosiahnutie alebo na udržanie štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti buď s VHS alebo IHN alebo obomi chorobami je buď:

a) izolácia vírusu v bunkových kultúrach, po ktorej nasleduje identifikácia pomocou enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA), nepriameho imunofluorescenčného testu (IFAT), vírusneutralizačného testu alebo pomocou polymerázovej reťazovej reakcie spojenej s reverznou transkripciou v reálnom čase (RT-qPCR); alebo

b) RT-qPCR.

II.3. Metódy odberu vzoriek a diagnostické metódy na vylúčenie alebo potvrdenie výskytu VHS alebo IHN

Ak sa vyžaduje potvrdenie alebo vylúčenie podozrenia na výskyt buď VHS alebo IHN alebo oboch chorôb v súlade s článkom 28 smernice 2006/88/ES, musia sa dodržať tieto postupy kontroly, odberu vzoriek a testovania:

a) farma, ktoré je predmetom podozrenia, sa podrobí najmenej jednej veterinárnej kontrole a jednému odberu vzoriek 10 rýb, ak sú pozorované klinické príznaky ani príznaky *post-mortem* zodpovedajúce infekcii buď VHS alebo IHN alebo obomi chorobami, alebo najmenej 30 rýb, ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem*. Vzorky sa testujú s použitím jednej alebo viacerých diagnostických metód stanovených v písm. i) a ii) v súlade s podrobnými diagnostickými metódami a postupmi uvedenými v oddiele II časti 1 prílohy II:

   i) konvenčná izolácia vírusu v bunkovej kultúre s následnou imunochemickou alebo molekulárnou identifikáciou vírusu;

   ii) detekcia vírusov prostredníctvom RT-qPCR;

   iii) iné diagnostické techniky s preukázanou podobnou účinnosťou, ako je nepriamy imunofluorescenčný test (IFAT), imunoenzymatická reakcia (ELISA), RT-PCR a imunohistochémia (IHC).

b) výskyt VHS sa považuje za potvrdený, ak sú výsledky jednej alebo viacerých z uvedených diagnostických metód pozitívne na VHSV. Výskyt IHN sa považuje za potvrdený, ak sú jedna alebo viaceré z uvedených diagnostických metód pozitívne na IHNV. Potvrdenie prvého prípadu VHS alebo IHN v členských štátoch, zónach alebo priestoroch, ktoré predtým neboli infikované, vychádza z konvenčnej izolácie vírusu v bunkovej kultúre alebo RT-qPCR;

c) podozrenie buď na VHSV alebo IHNV alebo oba vírusy sa môže vylúčiť, ak testy na pomnoženie vírusu v bunkových kultúrach alebo testy RT-qPCR neodhalia ďalší dôkaz prítomnosti buď VHSV alebo IHNV alebo oboch vírusov.

Tabuľka 1.A

Systém dohľadu v prípade zón a priestorov na dvojročné kontrolné obdobie uvedené v bode I.2.1. písm. a) podbode i), ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu VHS alebo IHN

Typ farmy	Počet veterinárnych kontrol za rok (dva roky)	Počet odberov vzoriek za rok (dva roky)	Počet rýb vo vzorke (1)	
			Počet mladých rýb	Počet generačných rýb (2)
a) Farmy s chovom generačných rýb	2	2	50 (prvá kontrola) 75 (druhá kontrola)	30 (prvá alebo druhá kontrola) 0 (prvá alebo druhá kontrola)
b) Farmy výlučne s chovom generačných rýb	2	1	0	75 (prvá alebo druhá kontrola)
c) Farmy bez chovu generačných rýb	2	2	75 (3) (prvá a druhá kontrola)	0

Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 10

(1) Vzorky sa nesmú odoberať skôr ako tri týždne po presune rýb zo sladkej vody do slanej.
(2) Ovariálna tekutina alebo semenná tekutina generačných rýb sa odoberá počas dozrievania v súvislosti s vytieraním.
(3) Vzorky sa musia odoberať z takého počtu rýb, ktorým sa zabezpečí detekcia VHSV alebo IHNV s 95 % spoľahlivosťou, ak je predpokladaná prevalencia 5 %.

Tabuľka 1.B

Systém dohľadu so zníženou veľkosťou vzorky na štvorročné kontrolné obdobie uvedené v bode I.2.1. písm. a) podbode ii), ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu VHS alebo IHN

Typ farmy	Počet veterinárnych kontrol za rok	Počet odberov vzoriek za rok	Počet rýb vo vzorke (1)	
			Počet mladých rýb	Počet generačných rýb (2)
Prvé dva roky obdobia dohľadu				
a) Farmy s chovom generačných rýb	2	1	0 (prvá kontrola) 30 (druhá kontrola)	0 (prvá kontrola) 0 (druhá kontrola)
b) Farmy výlučne s chovom generačných rýb	2	1	0	30 (prvá alebo druhá kontrola)
c) Farmy bez chovu generačných rýb	2	1	30 (3) (prvá alebo druhá kontrola)	0
Posledné dva roky obdobia dohľadu				
a) Farmy s chovom generačných rýb	2	2	30 (prvá kontrola) 0 (druhá kontrola)	0 (prvá kontrola) 30 (druhá kontrola)

Typ farmy	Počet veterinárnych kontrol za rok	Počet odberov vzoriek za rok	Počet rýb vo vzorke (1)	
			Počet mladých rýb	Počet generačných rýb (2)
b) Farmy výlučne s chovom generačných rýb	2	2		30 (prvá a druhá kontrola)
c) Farmy bez chovu generačných rýb	2	2	30 (3) (prvá a druhá kontrola)	

Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 10

(1) Vzorky sa nesmú odoberať skôr ako tri týždne po presune rýb zo sladkej vody do morskej.
(2) Ovariálna tekutina alebo semenná tekutina generačných rýb sa odoberá počas dozrievania v súvislosti s vytieraním.
(3) Vzorky sa musia odoberať z takého počtu rýb, ktorým sa zabezpečí zistenie VHSV alebo IHNV s 95 % spoľahlivosťou, ak je predpokladaná prevalencia 5 %.

Tabuľka 1.C

Systémy dohľadu v prípade zón alebo priestorov na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o VHS alebo IHN, ako sa uvádza v bode I.3

Úroveň rizika	Počet veterinárnych kontrol	Počet rýb vo vzorke (3)
vysoká	2 každý rok	30 (1) (2)
stredná	1 každý rok	30 (1)
nízka	1 každé 2 roky	30 (1)

Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 10

(1) Vzorky sa nesmú odoberať skôr ako tri týždne po presune rýb zo sladkej vody do morskej.
(2) Vzorky sa musia odoberať z takého počtu rýb, ktorým sa zabezpečí detekcia VHSV alebo IHNV s 95 % spoľahlivosťou, ak je predpokladaná prevalencia 10 %.
(3) Pri každej veterinárnej kontrole sa musí dobrať minimálne jedna vzorka.

ČASŤ 2

METÓDY DOHĽADU A KONTROLY, POKIAĽ IDE O HERPESVIRÓZU KAPROV KOI (KHVD)

I. **Požiadavky týkajúce sa programov dohľadu a eradikačných programov na účely získania a udržania zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o KHVD, a na zabránenie šíreniu infekcie koi herpesvírusom (KHV)**

I.1. Všeobecné požiadavky

Ak sa v súlade s druhým odsekom bodu 2 časti I prílohy V k smernici 2006/88/ES vyžaduje cielený dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, stanoví sa počet a zemepisné rozmiestnenie miest odberu vzoriek s cieľom získať primerané pokrytie členského štátu, zóny alebo priestoru. Miesta odberu vzoriek musia takisto reprezentovať rozličné ekosystémy, v ktorých sa nachádzajú voľne žijúce vnímavé populácie, konkrétne riečne systémy a jazerá.

Cielený dohľad sa musí zakladať na pravidelnom monitorovaní lokalít držiacich vnímavé druhy. Lokality sa monitorujú, keď teploty vody dosiahnu úrovne, ktoré umožňujú rozvoj choroby (> 15 °C), a to nie skôr ako dva týždne od dátumu, keď sa tieto teploty dosiahli. Odoberú a otestujú sa vzorky zo všetkých chorých rýb alebo rýb vykazujúcich neobvyklé správanie, ktoré sa v lokalite nájdu.

Vždy, keď je to možné, sa odoberú vzorky z rýb, ktoré boli dlhší čas držané v teplotnom rozsahu priaznivom pre vírus, konkrétne dva až tri týždne pri teplote 15 °C až 26 °C. Za prijateľný sa však môže považovať aj tento prístup:

a) odobrať subpopuláciu pri prenose zo zimných do letných rybníkov a držať ryby v rovnakej vode ako v letnom rybníku dovtedy, kým sa nedosiahnu minimálne požiadavky týkajúce sa teploty, alebo

b) odobrať vzorky pri výlove alebo počas inej manipulácie s rybami ako súčasť bežných postupov riadenia. Ak je to možné, vzorky sa odoberajú 24 až 72 hodín po takýchto postupoch riadenia na zvýšenie pravdepodobnosti detekcie KHV.

Ak majú byť farmy alebo voľne žijúce populácie predmetom veterinárnych kontrol alebo odberu vzoriek viac ako raz ročne, intervaly medzi veterinárnymi kontrolami alebo odbermi vzoriek sú v období, keď je pravdepodobné, že teplota vody dosiahne svoje najvyššie ročné hodnoty bez prekročenia hranice 28 °C, čo najdlhšie.

Všetky výrobné jednotky, ako sú rybníky a nádrže, musia byť predmetom veterinárnych kontrol zameraných na prítomnosť uhynutých, slabých alebo abnormálne sa správajúcich rýb.

Odoberajú sa vzorky z *Cyprinus carpio* a jeho hybridov, ako je *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, ak sa na farme vyskytujú.

Výber rýb, ktoré sa majú odobrať ako vzorky, sa uskutočňuje takto:

i) ak sú prítomné slabé, abnormálne sa správajúce alebo čerstvo uhynuté, ale nerozložené ryby, takéto ryby sa musia vybrať;

ii) ak sa na chov rýb využíva viac ako jeden vodný zdroj, do odberu vzoriek musia byť zahrnuté ryby zo všetkých vodných zdrojov;

iii) vybrané ryby musia zahŕňať ryby odobraté tak, aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti farmy ako aj všetky ročníky.

I.2. Osobitné požiadavky na dosiahnutie zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb (kategória I), pokiaľ ide o KHVD

I.2.1. Programy dohľadu

a) členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie III v súvislosti s KHVD, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I, ak sú všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru v súlade s požiadavkami týkajúcimi sa štatútu oblasti bez výskytu chorôb, ktoré sú stanovené v prílohe V k uvedenej smernici, a všetky uvedené farmy, a ak sa to vyžaduje v druhom odseku bodu 2 časti I uvedenej prílohy, aj miesta odberu vzoriek v prípade voľne žijúcich populácií vybraných v súlade s uvedenou časťou, boli podrobené jednému z týchto programov dohľadu:

i) model A – dvojročný program dohľadu:

Farmy alebo miesta odberu vzoriek museli byť podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas obdobia dvoch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 2.A v oddiele III.

Počas uvedeného dvojročného obdobia muselo testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2. priniesť negatívne výsledky v prípade KHV a muselo byť vylúčené akékoľvek podozrenie na KHVD v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode III.2;

ii) model B – štvorročný program dohľadu so zníženým množstvom vzoriek

Farmy alebo miesta odberu vzoriek museli byť podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas obdobia štyroch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 2.B v oddiele III.

Počas uvedeného štvorročného obdobia muselo testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2. priniesť negatívne výsledky v prípade KHV a muselo byť vylúčené akékoľvek podozrenie na KHVD v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode III.2.

b) ak sa počas realizácie štvorročného programu dohľadu uvedeného v písm. a) na farme zaradenej do uvedeného programu dohľadu potvrdí infekcia KHV, a na základe toho sa jej zrušil zdravotný štatút kategórie II, uvedená farma môže okamžite znovu získať zdravotný štatút kategórie II a pokračovať v realizácii programu dohľadu s cieľom dosiahnuť štatút oblasti bez výskytu chorôb bez toho, aby uplatňovala eradikačný program, ako sa opisuje v bode I.2.2, za predpokladu, že daná farma spĺňa tieto podmienky:

i) je suchozemskou farmou, ktorej zdravotný štatút v súvislosti s KHVD je nezávislý od zdravotného štatútu populácií vodných živočíchov v okolitej prírodnej vode, pokiaľ ide o danú chorobu uvedenú v zozname v súlade s bodom 3 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES;

ii) bola vyprázdnená, vyčistená, vydezinfikovaná a úhorovaná; dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov;

iii) bola opätovne zarybnená rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s KHVD.

I.2.2. Eradikačné programy

I.2.2.1. Všeobecné požiadavky

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V, pokiaľ ide o KHVD, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru boli prinajmenšom predmetom tohto eradikačného programu:

a) účinne sa uplatňovali minimálne kontrolné opatrenia stanovené v oddiele 4 kapitoly V smernice 2006/88/ES a v blízkosti farmy(-iem) úradne vyhlásenej(-ých) za infikovanú(-é) KHV sa zriadila uzavretá oblasť uvedená v článku 32 písm. b) uvedenej smernice, ktorá obsahuje ochrannú zónu a zónu pozorovania.

Uzavretá oblasť sa musela vymedziť na základe jednotlivých prípadov, so zohľadnením faktorov, ktoré majú vplyv na riziká rozširovania KHVD na chované a voľne žijúce ryby, ako sú: počet, miera a rozloženie úhynov rýb na farme infikovanej KHV; vzdialenosť k susedným farmám a hustota susedných fariem; blízkosť bitúnkov; farmy, ktoré sú v styku; druhy prítomné na farmách; chovné postupy uplatňované na postihnutých farmách a na susedných farmách; zistené hydrodynamické podmienky a ostatné faktory epidemiologického významu.

Na účely zriadenia ochranných zón a zón pozorovania platia tieto minimálne požiadavky, pokiaľ ide o geografické vymedzenie uvedených zón:

i) v bezprostrednej blízkosti farmy úradne vyhlásenej za infikovanú KHV sa zriadi ochranná zóna, ktoré zodpovedá celému povodiu farmy úradne vyhlásenej za infikovanú KHV; príslušný orgán môže obmedziť rozsah zóny na časti povodia pod podmienkou, že nie je ohrozená prevencia rozširovania KHVD;

ii) zóna pozorovania sa zriadi mimo ochrannej zóny a zodpovedá rozšírenej oblasti okolo zriadenej ochrannej zóny;

b) všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci ochrannej zóny, ktoré nie sú úradne vyhlásené za infikované KHV, musia byť predmetom úradného vyšetrovania, ktoré bude obsahovať minimálne tieto prvky:

i) odber vzoriek na testovanie10 rýb, ak sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zodpovedajúce KHVD, alebo 30 rýb, ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem*;

ii) jedna veterinárna kontrola; v tých farmách, kde testy uvedené v bode III.2 priniesli negatívne výsledky; veterinárne kontroly pokračujú raz mesačne počas obdobia, keď je pravdepodobné, že teplota vody dosiahne > 15 °C, až kým sa ochranná zóna nezruší v súlade s bodom I.2.2.1 písm. c);

c) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované KHV musia byť vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované. Dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov. Ak sú vyprázdnené všetky farmy úradne vyhlásené za infikované v rámci tej istej ochrannej zóny, musí sa vykonať najmenej trojtýždňové súbežné úhorovanie. Tento odsek sa vzťahuje aj na nové farmy úradne vyhlásené za infikované počas realizácie eradikačného programu.

Ak sa vykonáva úhorovanie úradne vyhlásených infikovaných fariem, ochranné zóny sa premenia na zóny pozorovania.

Príslušný orgán sa môže rozhodnúť požadovať vyprázdnenie, vyčistenie, dezinfekciu a úhorovanie iných fariem v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania. Dĺžku obdobia úhorovania určí príslušný orgán na základe posúdenia rizika v jednotlivých konkrétnych prípadoch.

d) Všetky farmy úradne vyhlásené za infikované KHV a všetky ostatné farmy úhorované v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania sa musia opätovne zarybniť:

i) rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s KHVD; alebo

ii) počas prechodného obdobia do 31. decembra 2020, rybami z členských štátov, zón alebo priestorov so schváleným programom dohľadu v súvislosti s KHVD.

Opätovné zarybňovanie sa uskutoční len vtedy, keď všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované v súlade s bodom I.2.2.1 písm. c);

e) Všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru, na ktoré sa vzťahuje eradikačný program, a ak je potrebný dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, miesta odberu vzoriek vybraté v súlade s bodom I.1, následne podliehajú prinajmenšom systému dohľadu stanovenému v bode I.2.1.

I.2.2.2. Požiadavky na opätovné získanie štatútu oblasti bez výskytu chorôb v prípade suchozemských priestorov zahŕňajúcich jednu jedinú farmu, ktorá bola predtým vyhlásená za farmu bez výskytu KHVD

Suchozemský priestor zahŕňajúci jednu jedinú farmu so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s KHVD, ktorej zdravotný štatút v súvislosti s KHVD je nezávislý od okolitých prírodných vôd v súlade s bodom 3 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES a ktorej štatút kategórie I bol zrušený v súlade s článkom 53 ods. 3 uvedenej smernice, môže opätovne získať zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s KHVD okamžite potom, ako príslušný orgán potvrdil, že boli splnené tieto podmienky:

a) bola vyprázdnená, vyčistená, vydezinfikovaná a úhorovaná; dĺžka obdobia úhorovania musela byť najmenej šesť týždňov;

b) bola opätovne zarybnená rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I alebo priestorov so schváleným programom dohľadu, pokiaľ ide o KHVD (zdravotný štatút kategórie II).

I.3. Osobitné požiadavky na udržanie štatútu kategórie I, pokiaľ ide o KHVD

Ak sa na udržanie zdravotného štatútu kategórie I vyžaduje cielený dohľad podľa článku 52 smernice 2006/88/ES, všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k uvedenej smernici v rámci príslušného členského štátu, zóny alebo priestoru podliehajú veterinárnej kontrole a odberu vzoriek v súlade s tabuľkou 2.B stanovenou v oddiele III tejto časti, so zohľadnením úrovne rizika farmy v súvislosti s nakazením KHV.

Frekvencia kontrol v prípade veterinárnych kontrol priestorov kategórie I v súvislosti s KHVD, umiestnených v kontinentálnych oblastiach a zahŕňajúcich jednu alebo viaceré farmy, ktorých zdravotný štatút v súvislosti s KHVD je závislý od zdravotného štatútu okolitých prírodných vôd v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname v súlade s bodom 2 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES, musí byť v súlade s počtom stanoveným pre vysokú úroveň rizika v uvedenej tabuľke 2.C.

V členských štátoch, zónach alebo priestoroch, v ktorých je obmedzený počet fariem a cielený dohľad v prípade takýchto fariem neposkytuje dostatočné epidemiologické údaje, systémy dohľadu na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb musia obsahovať miesta na odber vzoriek vybrané v súlade s požiadavkami stanovenými v bode I. 1.

Uvedené miesta odberu vzoriek sa musia kontrolovať a musia sa z nich odoberať vzorky na základe rotácie 50 % miest odberu vzoriek každý rok. Odber vzoriek sa uskutočňuje v súlade s tabuľkou 2.C. stanovenou v oddiele III. Vzorky sa musia vybrať, pripraviť a vyšetriť v súlade s opisom v oddiele II a laboratórne vyšetrenia musia byť negatívne, pokiaľ ide o prítomnosť pôvodcu KHVD.

Štatút oblasti bez výskytu chorôb sa udrží iba dovtedy, kým všetky vzorky testované s použitím diagnostických metód stanovených v bode II. 2. prinášajú negatívne výsledky v prípade KHVD, a musí byť vylúčené akékoľvek podozrenie na KHVD v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode III.2.

I.4. Osobitné požiadavky na zrušenie opatrení na zabránenie šíreniu podľa článku 39 smernice 2006/88/ES s cieľom získať zdravotný štatút kategórie III v súvislosti s KHVD v členských štátoch, priestoroch alebo zónach so zdravotným štatútom kategórie V

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré mali predtým zdravotný štatút kategórie V v súvislosti s KHVD, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie III, pokiaľ ide o danú chorobu uvedenú v zozname, za predpokladu, že:

a) sú splnené požiadavky stanovené v bode I.2.2.1 písm. a), b) a c). V prípade, ak úhorovanie nie je technicky možné, dotknuté farmy podliehajú alternatívnemu opatreniu, na základe ktorého sa poskytuje takmer rovnaká záruka, pokiaľ ide o vyhubenie KHV v prostredí farmy;

b) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy, ktoré boli úhorované alebo podrobené alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a) v rámci zriadenej ochrannej zóny a zóny pozorovania boli opätovne zarybnené rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, II alebo III, pokiaľ ide o KHVD;

c) opätovné nasadzovanie sa uskutočnilo len vtedy, keď všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované alebo sa podrobili alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a).

II. **Diagnostické metódy a metódy odberu vzoriek v prípade dohľadu na účely získania a udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o KHVD**

II.1. Vzorky

Má sa vyšetriť tkanivový materiál častí žiabier a obličiek. Časti orgánov najviac z dvoch rýb sa môžu spojiť.

II.2. Diagnostické metódy v prípade dohľadu na účely získania a udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o KHVD

Diagnostickou metódou na dosiahnutie alebo na udržanie štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o KHVD, je PCR v reálnom čase (qPCR) v súlade s podrobnými diagnostickými metódami a postupmi uvedenými v bode II časti 2 prílohy II.

III. **Diagnostické metódy a metódy odberu vzoriek v prípade úradných vyšetrovaní na účely potvrdenia alebo vylúčenia podozrenia na KHVD**

III.1. Vzorky

Má sa vyšetriť tkanivový materiál častí žiabier a obličiek. Časti orgánov najviac z dvoch rýb sa môžu spojiť.

III.2. Metódy úradného vyšetrovania a diagnostické metódy na vylúčenie alebo potvrdenie prítomnosti infekcie KHV

Ak sa vyžaduje potvrdenie alebo vylúčenie podozrenia na KHVD v súlade s článkom 28 smernice 2006/88/ES, musí sa dodržať tento postup kontroly, odberu vzoriek a testovania:

a) úradné vyšetrovanie musí zahŕňať najmenej jednu veterinárnu kontrolu a jeden odber vzoriek 10 rýb, ak sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zodpovedajúce infekcii KHV, alebo 30 rýb, ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem*. Vzorky sa testujú s použitím diagnostickej metódy stanovenej v písm. b) v súlade s podrobnými diagnostickými metódami a postupmi uvedenými v bode II časti 2 prílohy II;

b) prítomnosť infekcie KHV sa považuje za potvrdenú, ak sa KHV zistí pomocou PCR;

podozrenie na KHVD možno vylúčiť v prípade, ak tento test neodhalí žiadny ďalší dôkaz o prítomnosti KHV.

Tabuľka 2.A

Systém dohľadu v prípade zón a priestorov na dvojročné kontrolné obdobie, ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu KHVD, podľa bodu I.2.1

		Počet klinických kontrol za rok (dva roky)	Počet laboratórnych vyšetrení za rok (dva roky)	Počet rýb vo vzorke
Farmy/miesta odberu vzoriek	Prvé dva roky obdobia dohľadu	2	2	75 [1]
	Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 2			

[1] Vzorky sa musia odoberať z takého počtu rýb, ktorým sa zabezpečí detekcia KHV s 95 % spoľahlivosťou, ak je predpokladaná prevalencia 5 %.

Tabuľka 2.B

Systém dohľadu v prípade zón a priestorov na štvorročné kontrolné obdobie, ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu KHVD, podľa bodu I.2.1

		Počet klinických kontrol za rok	Počet laboratórnych vyšetrení za rok	Počet rýb vo vzorke
Farmy/miesta odberu vzoriek	Prvé dva roky obdobia dohľadu	1	1	30
Farmy/miesta odberu vzoriek	Posledné dva roky obdobia dohľadu	2	2	30
	Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 2			

Tabuľka 2.C

Systémy dohľadu v prípade zón alebo priestorov na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti s KHVD, ako sa uvádza v bode I.3

Úroveň rizika	Počet veterinárnych kontrol	Počet rýb vo vzorke
vysoká	2 každý rok	30
stredná	1 každý rok	30
nízka	1 každé 2 roky	30

Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 2

Tabuľka 2.D

Systém dohľadu na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti s KHVD v členských štátoch, zónach alebo priestoroch, v ktorých je obmedzený počet fariem a cielený dohľad v takýchto farmách neposkytuje dostatočné epidemiologické údaje, ako sa uvádza v bode I. 3

	Počet klinických kontrol za rok	Počet laboratórnych vyšetrení za rok	Počet rýb vo vzorke
Miesta odberu vzoriek	1 každé 2 roky	1 každé 2 roky	30

Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 2

ČASŤ 3

METÓDY DOHĽADU A KONTROLY, POKIAĽ IDE O INFEKČNÚ ANÉMIU LOSOSOV (ISA)

I. **Požiadavky týkajúce sa programov dohľadu a eradikačných programov na účely získania a udržania zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o ISA, a na zabránenie šíreniu infekcie ISAV s deléciou v HPR**

I.1. Všeobecné požiadavky

Ak sa vyžaduje, aby sa veterinárne kontroly a odber vzoriek na farmách v súlade s druhým odsekom bodu 2 časti I prílohy V k smernici 2006/88/ES vykonávali viac ako raz ročne, intervaly medzi veterinárnymi kontrolami alebo odberom vzoriek musia byť čo najdlhšie.

Ak sa v súlade s druhým odsekom bodu 2 časti I prílohy V k smernici 2006/88/ES vyžaduje cielený dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, stanoví sa počet a zemepisné rozmiestnenie miest odberu vzoriek s cieľom dosiahnuť primerané pokrytie členského štátu, zóny alebo priestoru. Miesta odberu vzoriek musia takisto reprezentovať rozličné ekosystémy, v ktorých sa nachádzajú voľne žijúce vnímavé populácie.

Veterinárne kontroly sa vykonávajú vo všetkých výrobných jednotkách, ako sú rybníky, nádrže a sieťové klietky, a sú zamerané na prítomnosť uhynutých, slabých alebo abnormálne sa správajúcich rýb. Osobitná pozornosť sa musí venovať oblasti odtoku vody, kde sa väčšinou zhromažďujú slabé ryby pre prúdenie vody.

Výber rýb, ktoré sa majú odobrať ako vzorky, sa uskutočňuje takto:

a) vyberú sa len moribundné alebo čerstvo uhynuté ryby, ale nie rozložené ryby; pri výbere majú prednosť najmä ryby preukazujúce anémiu, krvácanie alebo iné klinické príznaky naznačujúce poruchy krvného obehu;

b) ak medzi vnímavé druhy na danom mieste patrí losos atlantický, vzorky z lososa atlantického majú prednosť. Ak vo farme s chovom rýb nie je losos atlantický, musia sa odobrať vzorky z iných vnímavých druhov;

c) ak sa na produkciu rýb využíva viac ako jeden vodný zdroj, do vzorky sa musia zahrnúť ryby reprezentujúce všetky vodné zdroje;

d) vybrané ryby musia zahŕňať ryby odobraté tak, aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky výrobné jednotky, ako sú sieťové klietky, nádrže a rybníky, ako aj všetky ročníky vo farme.

I.2. Osobitné požiadavky na dosiahnutie zdravotného štatútu kategórie I, pokiaľ ide o ISA

I.2.1. Programy dohľadu

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie III v súlade s časťou B prílohy III k smernici 2006/88/ES v súvislosti s ISA, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru spĺňajú príslušné požiadavky stanovené v prílohe V k uvedenej smernici a všetky uvedené farmy, a ak sa to vyžaduje v druhom odseku bodu 2 časti I prílohy V k uvedenej smernici, aj miesta odberu vzoriek v prípade voľne žijúcich populácií vybraných v súlade s uvedeným bodom, boli podrobené tomuto programu dohľadu:

a) farmy alebo miesta odberu vzoriek boli podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas dvoch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 3.A v oddiele II;

b) počas uvedeného dvojročného obdobia muselo testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2. priniesť negatívne výsledky v prípade ISAV s deléciou v HPR a muselo byť vylúčené akékoľvek podozrenie na ISA v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3;

c) ak sa počas realizácie programu dohľadu na farme zahrnutej do uvedeného programu dohľadu potvrdila ISA, a na základe toho sa zrušil jej zdravotný štatút kategórie II, musel sa realizovať eradikačný program v súlade s bodom I.2.2.

I.2.2. Eradikačné programy

I.2.2.1. Všeobecné požiadavky

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V, pokiaľ ide o ISA, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru boli predmetom eradikačného programu, ktorý spĺňa tieto písmená a) až e).

a) účinne sa uplatňovali minimálne kontrolné opatrenia stanovené v oddiele 3 kapitoly V smernice 2006/88/ES, a predovšetkým, v blízkosti farmy(-iem) úradne vyhlásenej(-ých) za infikovanú(-é) ISAV s deléciou v HPR alebo potvrdenou ISA sa zriadila uzavretá oblasť uvedená v článku 32 písm. b) uvedenej smernice, ktorá zahŕňa ochrannú zónu a zónu pozorovania.

Uzavretá oblasť sa musela vymedziť na základe jednotlivých prípadov, so zohľadnením faktorov, ktoré majú vplyv na riziká rozširovania ISA na chované alebo voľne žijúce ryby, ako sú: počet, miera a rozloženie úhynu rýb na farme infikovanej ISAV s deléciou v HPR alebo potvrdenou ISA; vzdialenosť k susedným farmám a hustota susedných fariem; blízkosť bitúnkov; farmy, ktoré sú v styku; druhy prítomné na farmách; chovné postupy uplatňované na postihnutých farmách a na susedných farmách; zistené hydrodynamické podmienky a ostatné faktory epidemiologického významu.

Na účely zriadenia ochranných zón a zón pozorovania platia tieto minimálne požiadavky, pokiaľ ide o geografické vymedzenie uvedených zón:

i) ochranná zóna sa zriadi v bezprostrednej blízkosti farmy úradne vyhlásenej za infikovanú ISA a zodpovedá:

(1) v pobrežných oblastiach: oblasti zahŕňajúcej kruh s priemerom aspoň jedného posunu prílivu alebo aspoň 5 km, podľa toho, ktorý je väčší, ktorého stredom je farma úradne vyhlásená za infikovanú ISA, alebo rovnocennej oblasti určenej na základe príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov;

(2) vo vnútrozemských oblastiach: celému povodiu farmy úradne vyhlásenej za infikovanú ISA; príslušný orgán môže obmedziť rozsah zóny na časti povodia pod podmienkou, že nie je ohrozená prevencia rozširovania ISA;

ii) zóna pozorovania sa vymedzí mimo ochrannej zóny a zodpovedá:

(1) v pobrežných oblastiach: oblasti, ktorá okolo ochrannej zóny presahuje pásma posunu prílivu; alebo oblasti okolo ochrannej zóny, ktorá patrí do okruhu s priemerom 10 km od stredu ochrannej zóny; alebo rovnocennej oblasti určenej na základe príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov; alebo

(2) vo vnútrozemských oblastiach: rozsiahlej oblasti mimo stanovenej ochrannej zóny;

b) všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci ochrannej zóny, ktoré nie sú úradne vyhlásené za infikované ISA, musia byť predmetom úradného vyšetrovania, ktoré bude obsahovať minimálne tieto prvky:

i) odber vzoriek na testovanie minimálne 10 moribundných rýb, ak sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zodpovedajúce ISA, alebo minimálne 30 rýb, ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem*;

ii) jedna veterinárna kontrola; v tých farmách, kde testy uvedené v podbode i) priniesli negatívne výsledky, veterinárne kontroly pokračujú raz mesačne až do zrušenia ochrannej zóny v súlade s bodom I.2.2.1 písm. c);

c) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované ISAV s deléciou v HPR alebo potvrdenou ISA musia byť vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované počas obdobia najmenej troch mesiacov. Ochranné zóny a zóny pozorovania sa môžu zrušiť, keď sú všetky farmy v ochrannej zóne vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a potom súbežne úhorované aspoň počas šiestich týždňov.

Ak sa vykonáva úhorovanie úradne vyhlásených infikovaných fariem, ochranné zóny sa premenia na zóny pozorovania.

Príslušný orgán sa môže rozhodnúť požadovať vyprázdnenie, vyčistenie, dezinfekciu a úhorovanie iných fariem v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania. Dĺžku trvania obdobia úhorovania v uvedených farmách určí príslušný orgán na základe posúdenia rizika v jednotlivých konkrétnych prípadoch.

d) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované ISAV s deléciou v HPR alebo potvrdenou ISA a všetky ostatné farmy úhorované v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania musia byť opätovne zarybnené rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov kategórie I, pokiaľ ide o ISA.

Opätovné zarybňovanie sa uskutoční len vtedy, keď všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované v súlade s bodom I.2.2.1 písm. c);

e) všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru, na ktoré sa vzťahuje eradikačný program, a ak je potrebný dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, miesta odberu vzoriek vybraté v súlade s bodom I.1, následne podliehajú systému dohľadu stanovenému v bode I.2.1.

I.2.2.2. Požiadavky týkajúce sa opätovného získania štatútu oblasti bez výskytu chorôb v prípade suchozemských priestorov zahŕňajúcich jednu jedinú farmu, ktorá bola predtým vyhlásená za oblasť so zdravotným štatútom kategórie I

Suchozemský priestor zahŕňajúci jednu jedinú farmu so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s ISA, ktorej zdravotný štatút je nezávislý od okolitých prírodných vôd v súlade s bodom 3 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES a ktorej zdravotný štatút kategórie I sa zrušil v súlade s článkom 53 ods. 3 uvedenej smernice, ho môže opätovne získať okamžite potom, ako príslušný orgán potvrdil, že spĺňa tieto podmienky:

a) bola vyprázdnená, vyčistená, vydezinfikovaná a úhorovaná; dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov;

b) bola opätovne zarybnená rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s ISA.

I.3. Minimálne kontrolné opatrenia na udržanie štatútu kategórie I, pokiaľ ide o ISA

Ak sa na udržanie zdravotného štatútu kategórie I vyžaduje cielený dohľad podľa článku 52 smernice 2006/88/ES, všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k uvedenej smernici v rámci príslušného členského štátu, zóny alebo priestoru podliehajú veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek v súlade s tabuľkou 3.B ([1]) stanovenou v oddiele II tejto časti, so zohľadnením úrovne rizika farmy v súvislosti s nakazením ISA.

Pri určovaní frekvencie veterinárnych kontrol v prípade priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, pokiaľ ide o ISA, ktoré sú umiestnené v suchozemských oblastiach a ktorých zdravotný štatút, pokiaľ ide o ISA, je závislý od zdravotného štatútu okolitých prírodných vôd, v ktorých sa nachádza losos atlantický (*Salmo salar*), sa riziko nakazenia ISA považuje za vysoké.

Štatút oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o ISA, sa môže udržať iba vtedy, ak všetky vzorky testované s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2. vykázali negatívne výsledky v prípade ISAV s deléciou v HPR, a ak bolo vylúčené akékoľvek podozrenie na ISA v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3.

I.4. Osobitné požiadavky na dosiahnutie zdravotného štatútu kategórie III v súvislosti s ISAV s deléciou v HPR v členských štátoch, zónach alebo priestoroch, ktoré mali predtým zdravotný štatút kategórie V

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V v súvislosti s ISA, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie III za predpokladu, že:

a) sú splnené požiadavky stanovené v bode I.2.2.1 písm. a), b) a c). V prípade, ak úhorovanie nie je technicky možné, dané farmy podliehajú alternatívnemu opatreniu, na základe ktorého sa poskytuje takmer rovnaká záruka, pokiaľ ide o vyhubenie ISAV v prostredí farmy;

b) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy, ktoré boli úhorované alebo podliehali alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a) v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania, boli opätovne zarybnené rybami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, II alebo III, pokiaľ ide o ISA;

c) takéto opätovné zarybňovanie sa uskutočnilo len potom, ako všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované alebo sa podrobili alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a).

d) počas obdobia dvoch rokov, ktoré nasleduje po ukončení opatrení uvedených v písm. a), b) a c) nedošlo k potvrdeniu ISAV s deléciou v HPR a podozrenia počas tohto obdobia boli vylúčené v súlade s postupmi stanovenými v bode II.3.

([1]) Nevzťahuje sa na farmy, v ktorých sa chová výlučne pstruh dúhový (*Oncorhynchus mykiss*) alebo pstruh jazerný a potočný (*Salmo trutta*) alebo oba druhy, kde zdroj vody pochádza výlučne zo sladkovodných zdrojov, v ktorých sa nenachádza losos atlantický (*Salmo salar*).

II. **Diagnostické metódy a úradné vyšetrovania**

II.1. Vzorky

Má sa vyšetriť tkanivový materiál:

a) histológia: predná oblička, pečeň, srdce, pankreas, črevo, slezina a žiabre;

b) imunohistochémia: zadná oblička a srdce vrátane chlopní a tepnovej hľuzy (*bulbus arteriosus*);

c) analýza RT-qPCR: zadná oblička a srdce;

d) kultivácia vírusu: zadná oblička, srdce, pečeň a slezina.

Spojiť sa môžu časti orgánov najviac z piatich rýb.

II.2. Diagnostické metódy na účely získania alebo udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o ISA

Diagnostickou metódou, ktorá sa má použiť na získanie alebo na udržanie štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o ISA, v súlade s bodmi I.2 a I.3, je RT-qPCR, po ktorej nasleduje sekvenovanie pozitívnych vzoriek v súlade s podrobnými metódami a postumi stanovenými v časti 3 prílohy II.

V prípade pozitívneho výsledku RT-qPCR sa testujú ďalšie vzorky pred vykonaním počiatočných kontrolných opatrení stanovených v článku 28 smernice 2006/88/ES.

Uvedené vzorky sa musia testovať takto v súlade s podrobnými metódami a postupmi stanovenými v časti 3 prílohy II:

a) skríning vzoriek prostredníctvom RT-qPCR vrátane sekvenovania HE génu na účely overenia delécie v HPR;

a

b) vyšetrenie tkanivových preparátov prostredníctvom špecifických protilátok proti ISAV (konkrétne IHC na fixovaných rezoch alebo IFAT na odtlačkoch tkaniva); alebo

c) izolácia a identifikácia ISAV v bunkovej kultúre aspoň z jednej odobratej vzorky z akejkoľvek ryby na farme.

II.3. Metódy úradného vyšetrovania a diagnostické metódy na vylúčenie alebo na potvrdenie prítomnosti ISA

Ak sa potvrdí alebo vylúči podozrenie na ISA v súlade s článkom 28 smernice 2006/88/ES, musí sa dodržať tento postup kontroly, odberu vzoriek a testovania:

a) úradné vyšetrovanie, ktoré zahŕňa aspoň jednu veterinárnu kontrolu a jeden odber vzoriek 10 moribundných rýb, ak sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zlučiteľné s ISA. Ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zlučiteľné s ISA, po veterinárnej kontrole nasleduje cielený odber vzoriek minimálne 30 moribundných rýb alebo čerstvých rýb *post-mortem* s normálnou konštitúciou v súlade s bodom I.1. Vzorky sa testujú v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v písm. b);

b) v prípade pozitívneho výsledku RT-qPCR na ISAV s deléciou v HPR sa testujú ďalšie vzorky pred vykonaním počiatočných kontrolných opatrení stanovených v článku 28 smernice 2006/88/ES. Prípad podozrenia na infekciu ISA sa potvrdí v súlade s týmito kritériami s použitím podrobných metód a postupov stanovených v časti 3 prílohy II:

i) detekcia ISAV prostredníctvom RT-qPCR vrátane sekvenovania HE génu na overenie delécie v HPR a detekcia ISAV v tkanivových preparátoch prostredníctvom špecifických protilátok proti ISAV (konkrétne IHC na fixovaných rezoch alebo IFAT na odtlačkoch tkaniva);

alebo

ii) detekcia ISAV prostredníctvom RT-qPCR vrátane sekvenovania HE génu na účely overenia delécie v HPR a

izolácia a identifikácia ISAV v bunkovej kultúre aspoň z jednej odobratej vzorky z akejkoľvek ryby na farme;

c) v prípade pozorovania prítomnosti klinických zmien, vážnych patologických zmien alebo histopatologických nálezov zlučiteľných s ISA sa dané zistenia musia potvrdiť detekciou vírusu prostredníctvom dvoch diagnostických metód vychádzajúcich z nezávislých princípov detekcie, ako je RT-qPCR a IHC, a to v súlade s časťou 3 prílohy II.

Podozrenie na ISA sa môže vylúčiť, ak sa zistí, že testy a kontroly počas obdobia 12 mesiacov od dátumu podozrenia neodhalili žiadne ďalšie dôkazy o prítomnosti ISA.

Tabuľka 3.A

Systém dohľadu v prípade zón a priestorov na dvojročné kontrolné obdobie, ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu ISA, podľa bodu I.2.1

Rok dohľadu	Počet veterinárnych kontrol za rok (dva roky)	Počet laboratórnych vyšetrení za rok (dva roky)	Počet rýb, z ktorých sa majú za rok odobrať vzorky
Rok 1	6	2 (1)	2 * 75 (2)
Rok 2	6	2 (1)	2 * 75 (2)

(1) Vzorky sa musia každoročne odoberať, uchovávať a vyšetrovať počas dvoch jednomesačných skúšobných období (konkrétne jar a jeseň) alebo alebo vtedy, keď je to vhodné z praktických dôvodov.
(2) Maximálny počet rýb v zmesnej vzorke: 5.

Tabuľka 3.B

Systémy dohľadu v prípade zón alebo priestorov na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti s ISA, ako sa uvádza v bode I.3 (2)

Úroveň rizika	Počet veterinárnych kontrol za rok	Počet laboratórnych vyšetrení za rok	Počet rýb, z ktorých sa majú za rok odobrať vzorky
vysoká	2	2 (1)	2 * 30
stredná	1	1 (1)	30
nízka	1 každé 2 roky	1 každé 2 roky	30 každé 2 roky

(1) Vzorky sa musia každoročne odoberať a vyšetrovať počas dvoch jednomesačných skúšobných období (konkrétne jar a jeseň) alebo vtedy, keď je to vhodné z praktických dôvodov.
(2) Nevzťahuje sa na farmy, v ktorých sa chová výlučne pstruh dúhový (*Oncorhynchus mykiss*) alebo pstruh jazerný a potočný (*Salmo trutta*) alebo oba druhy, kde zdroj vody pochádza výlučne zo sladkovodných zdrojov, v ktorých sa nenachádza losos atlantický (*Salmo salar*).

ČASŤ 4

METÓDY DOHĽADU A KONTROLY, POKIAĽ IDE O MARTEILIÓZU (*MARTEILIA REFRINGENS*)

I. **Požiadavky týkajúce sa programov dohľadu a eradikačných programov na účely získania a udržania zdravotných štatútov oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*)**

I.1. Všeobecné požiadavky

Veterinárne kontroly, a ak je to vhodné, odber vzoriek na laboratórne vyšetrenie, sa vykonáva v tom období roka, keď je známe, že prevalencia parazitu v členskom štáte, zóne alebo priestore je najvyššia. Ak takéto údaje nie sú k dispozícii, odber vzoriek sa vykonáva bezprostredne po tom, ako teplota vody presiahne 17 °C.

Ak sa majú mäkkýše podrobiť odberu vzoriek v súlade s požiadavkami stanovenými v časti 4, uplatňujú sa tieto kritériá:

a) ak sú vo výrobných jednotkách alebo v oblasti produkcie prítomné *Ostrea* spp. a *Mytilus* spp., z oboch rodov sa odoberie rovnaká veľkosť vzorky. Ak je prítomný len jeden z uvedených rodov, odoberú sa vzorky daného rodu. Ak nie sú prítomné rody *Ostrea* a *Mytilus*, vzorka musí reprezentovať všetky ostatné prítomné vnímavé druhy;

b) ak sú vo výrobných jednotkách prítomné slabé, otvorené alebo čerstvo uhynuté, ale nerozložené mäkkýše, v prvom rade sa vyberú takéto mäkkýše. Ak takéto mäkkýše nie sú prítomné, medzi vybrané mäkkýše sa zaradia najstaršie zdravé mäkkýše;

c) pri odbere vzoriek vo farmách s chovom mäkkýšov, v ktorých sa na produkciu mäkkýšov využíva viac ako jeden vodný zdroj, sa do odberu vzoriek zahrnú mäkkýše reprezentujúce všetky vodné zdroje tak, aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti farmy;

d) pri odbere vzoriek v chovných oblastiach pre mäkkýše sa do odberu vzoriek zahrnú mäkkýše z dostatočného počtu miest odberu vzoriek tak, aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti chovnej oblasti pre mäkkýše. Hlavnými faktormi, ktoré je potrebné zvážiť pri výbere týchto miest odberu vzoriek, sú predchádzajúce miesta odberu vzoriek, kde sa zistil výskyt *Marteilia refringens*, hustota chovu, vodné toky, prítomnosť vnímavých druhov, prítomnosť prenášačov, batymetria a postupy riadenia. Do odberu vzoriek sú zahrnuté prírodné dná.

I.2. Osobitné požiadavky na dosiahnutie zdravotného štatútu kategórie I, pokiaľ ide o *Marteilia refringens*

I.2.1. Programy dohľadu

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie III, pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*), môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru boli predmetom prinajmenšom tohto programu dohľadu, ktorý zahŕňa veterinárne kontroly a odber vzoriek na testovanie.

Dvojročný program dohľadu:

a) farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše museli byť podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas obdobia dvoch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 4.A v oddiele II;

b) počas uvedeného dvojročného obdobia testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2. prinieslo negatívne výsledky v prípade *Marteilia refringens* a vylúčilo sa akékoľvek podozrenie na *Marteilia refringens* v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3;

c) ak vo vzorke majú byť zahrnuté *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* alebo *Mytilus galloprovincialis* pochádzajúce z členského štátu, zóny alebo priestoru so zdravotným štatútom kategórie I, museli byť umiestnené vo farme alebo v chovnej oblasti pre mäkkýše prinajmenšom na jar, ktorá bezprostredne predchádza obdobiu, keď sa vykonáva program dohľadu.

I.2.2. Eradikačné programy

Eradikácia *Marteilia refringens* sa vo väčšine prípadov považuje za nemožnú, ale ak ju členský štát považuje za zrealizovateľnú, uplatňuje sa nasledujúci model eradikačného programu.

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V, pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*), môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru boli prinajmenšom predmetom tohto eradikačného programu:

a) účinne sa uplatňovali opatrenia stanovené v oddiele 3 kapitoly V smernice 2006/88/ES, a predovšetkým, v blízkosti farmy(-iem) alebo chovnej(-ých) oblasti(-ach) pre mäkkýše úradne vyhlásenej(-ých) za infikovanú(-é) *Marteilia refringens* sa zriadila uzavretá oblasť uvedená v článku 32 písm. b) smernice 2006/88/ES, ktorá obsahuje ochrannú zónu a zónu pozorovania.

Uzavretá oblasť sa vymedzí na základe jednotlivých prípadov, so zohľadnením faktorov, ktoré majú vplyv na riziká rozširovania *Marteilia refringens*, ako sú: počet, vek, miera a rozdelenie úhynov mäkkýšov na farme alebo v chovnej oblasti pre mäkkýše, ktoré sú infikované *Marteilia refringens*, vrátane voľne žijúcich mäkkýšov; vzdialenosť a hustota susediacich fariem alebo chovných oblastí pre mäkkýše vrátane voľne žijúcich mäkkýšov; blízkosť k spracovateľským prevádzkárňam, k farmám, ktoré sú v styku, alebo k chovným oblastiam pre mäkkýše; druhy, najmä vnímavé druhy, a prenášače prítomné na farmách alebo v chovných oblastiach pre mäkkýše; chovné postupy uplatňované v postihnutých a susediacich farmách a chovných oblastiach pre mäkkýše; zistené hydrodynamické podmienky a ostatné faktory epidemiologického významu.

Na účely zriadenia ochranných zón a zón pozorovania platia tieto minimálne požiadavky:

i) ochranná zóna sa zriadi v bezprostrednej blízkosti farmy alebo chovnej oblasti pre mäkkýše, ktorá bola úradne vyhlásená za infikovanú *Marteilia refringens* a zodpovedá oblasti určenej podľa príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov;

ii) zóna pozorovania sa zriadi mimo ochrannej zóny a zodpovedá oblasti okolo ochrannej zóny, určenej podľa príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov;

b) všetky farmy a chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci ochrannej zóny, ktoré nie sú úradne vyhlásené za infikované *Marteilia refringens*, podliehajú úradnému vyšetrovaniu zahŕňajúcemu prinajmenšom odber vzoriek na testovanie 150 mäkkýšov po začiatku obdobia prenosu*Marteilia refringens*. Ak obdobie prenosu nie je známe, odber vzoriek sa začne v období po tom, ako teplota vody presiahne 17 °C;

c) všetky farmy a chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované *Marteilia refringens* musia byť vyprázdnené, úhorované, a podľa možnosti vyčistené a vydezinfikované.

Dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej:

i) dva mesiace v prípade fariem a chovných oblastí pre mäkkýše s obmedzenými spojeniami s okolitými vodami, ako sú liahne a odchovne;

ii) dva mesiace v prípade fariem a chovných oblastí pre mäkkýše s neobmedzenými spojeniami s okolitými vodami za predpokladu, že infikované mäkkýše vnímavých druhov a tie mäkkýše vnímavých druhov, ktoré majú majú epidemiologickú súvislosť s infikovanou farmou alebo chovnou oblasťou pre mäkkýše, boli zberané alebo odstránené pred obdobím roka, v ktorom je známe, že prevalencia *Marteilia refringens* je najvyššia, alebo ak uvedené obdobie nie je známe, pred obdobím, keď teplota vody presiahne 17 °C;

iii) štrnásť mesiacov v prípade fariem a chovných oblastí pre mäkkýše s neobmedzenými spojeniami s okolitými vodami za predpokladu, že infikované mäkkýše vnímavých druhov a tie mäkkýše vnímavých druhov, ktoré majú epidemiologickú súvislosť s infikovanou farmou alebo chovnou oblasťou pre mäkkýše, neboli zberané alebo odstránené pred obdobím roka, v ktorom je známe, že prevalencia Marteilia refringens je najvyššia, alebo ak takéto údaje nie sú známe, keď mäkkýše vnímavých druhov neboli zberané alebo odstránené pred obdobím, keď teplota vody presiahne 17 °C;

Ak sú vyprázdnené všetky farmy a chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované, musí sa vykonať najmenej štvortýždňové súbežné úhorovanie.

Príslušný orgán sa môže rozhodnúť požadovať vyprázdnenie, vyčistenie, dezinfekciu a úhorovanie iných fariem alebo chovných oblastí pre mäkkýše v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania. Dĺžku trvania úhorovania určí príslušný orgán na základe posúdenia rizika v jednotlivých konkrétnych prípadoch.

d) všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úhorované v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania musia sú opätovne nasádzané mäkkýšmi pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*).

Opätovné nasádzanie sa uskutoční len vtedy, keď všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované v súlade s bodom I.2.2 písm. c);

e) všetky farmy a chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru, na ktoré sa vzťahuje eradikačný program, následne podliehajú systému dohľadu stanovenému v bode I.2.1 tejto časti.

I.3. Osobitné požiadavky na udržanie zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb (kategória I), pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*).

Ak sa na udržanie zdravotného štatútu kategórie I vyžaduje cielený dohľad podľa článku 52 smernice 2006/88/ES, všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci príslušného členského štátu, zóny alebo priestoru podliehajú veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek v súlade s tabuľkou 4.B stanovenou v oddiele II tejto časti, so zohľadnením úrovne rizika farmy alebo chovnej oblasti pre mäkkýše v súvislosti s nakazením *Marteilia refringens*.

Štatút oblasti bez výskytu chorôb sa môže udržať iba dovtedy, kým všetky vzorky testované s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2 prinášajú negatívne výsledky v prípade *Marteilia refringens*, a musí byť vylúčené akékoľvek podozrenie na *Marteilia refringens* v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3.

I.4. Požiadavky na zrušenie opatrení na zabránenie šíreniu stanovených v článku 39 smernice 2006/88/ES (zmena zdravotného štatútu z kategórie V na kategóriu III), pokiaľ ide marteiliózu (*Marteilia refringens*)

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V v súvislosti s marteiliózou (*Marteilia refringens*), môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie III, pokiaľ ide o danú chorobu uvedenú v zozname, za predpokladu, že:

a) sú splnené požiadavky stanovené v bode I.2.2 písm. a), b) a c). V prípade, že úhorovanie nie je technicky možné, dané farmy podliehajú alternatívnemu opatreniu, na základe ktorého sa poskytuje takmer podobná záruka, pokiaľ ide o vyhubenie *Marteilia refringens* v prostredí farmy;

b) všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úhorované alebo podrobené alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a) v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania boli opätovne nasádzané mäkkýšmi pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, II alebo III, pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*);

c) opätovné nasadzovanie sa uskutočnilo len v prípade, keď všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované alebo sa podrobili alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a);

d) počas obdobia dvoch rokov, ktoré nasleduje po ukončení opatrení uvedených v písm. a), b) a c), nedošlo k potvrdeniu marteiliózy (*Marteilia refringens*) a podozrenia počas tohto obdobia boli vylúčené podľa postupov stanovených v bode II.3.

II. **Diagnostické metódy a úradné vyšetrovania**

II.1. Vzorky

Na vykonávanie diagnostických testov uvedených v bodoch II.2 a II.3 sa do laboratória musí dodať celý živočích.

II.2. Diagnostické metódy na účely získania alebo udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*)

Diagnostickými metódami, ktoré sa majú použiť na získanie alebo udržanie štatútu oblasti bez výskytu marteiliózy (*Marteilia refringens*), sú histopatológia, odtlačky tkaniva alebo PCR. Pri uplatňovaní týchto diagnostických metód sa musia dodržiavať príslušné podrobné metódy a postupy stanovené v časti 4 prílohy II.

II. 3. Metódy úradného vyšetrovania a diagnostické metódy na potvrdenie alebo vylúčenie podozrenia na marteiliózu (*Marteilia refringens*)

Ak sa vyžaduje potvrdenie alebo vylúčenie podozrenia na marteiliózu (*Marteilia refringens*) v súlade s článkom 28 smernice 2006/88/ES, musí sa dodržať tento postup kontroly, odberu vzoriek a testovania:

a) úradné vyšetrovanie musí zahŕňať aspoň jeden odber vzoriek 30 mäkkýšov vnímavých druhov, ak sa podozrenie zakladá na správe o úhyne, alebo ak nie, 150 mäkkýšov vnímavých druhov po začiatku obdobia prenosu *Marteilia refringens*. Ak obdobie prenosu nie je známe, odber vzoriek sa začne v období po tom, ako teplota vody presiahne 17 °C;

b) vzorky sa testujú s použitím diagnostických metód stanovených v bode i) podľa podrobných diagnostických metód a postupov uvedených v oddiele I časti 4 prílohy II:

i) prítomnosť *Marteilia refringens* sa považuje za potvrdenú, ak je pozitívny výsledok prostredníctvom histopatológie, odtlačkov tkaniva alebo hybridizácie pre dôkaz *in situ* kombinovaný s pozitívnym výsledkom PCR doplnenej sekvenovaním;

ii) podozrenie na marteiliózu (*Marteilia refringens*) sa môže vylúčiť, ak sa testami uvedenými v podbode i) neodhalí žiadny ďalší dôkaz prítomnosti *Marteilia refringens*.

Tabuľka 4.A

Systém dohľadu v prípade členských štátov, zón alebo priestorov na kontrolné obdobie, ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu *Marteilia refringens*, podľa bodu I.2.1

	Počet veterinárnych kontrol za rok	Počet laboratórnych vyšetrení za rok	Počet mäkkýšov vo vzorke
Farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše	1	1	150

Tabuľka 4.B

Systémy dohľadu v prípade členských štátov, zón alebo priestorov na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti s *Marteilia refringens*, ako sa uvádza v bode I.3

Úroveň rizika	Počet veterinárnych kontrol	Počet laboratórnych vyšetrení	Počet mäkkýšov vo vzorke
vysoká	1 každý rok	1 každé 2 roky	150
stredná	1 každé 2 roky	1 každé 2 roky	150
nízka	1 každé 2 roky	1 každé 4 roky	150

ČASŤ 5

METÓDY DOHĽADU A KONTROLY, POKIAĽ IDE O BONAMIÓZU (*BONAMIA OSTREAE*)

I. **Požiadavky týkajúce sa programov dohľadu alebo eradikačných programov na účely získania a udržania zdravotných štatútov oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o bonamiózu (*Bonamia ostreae*)**

I.1. Všeobecné požiadavky

Veterinárne kontroly, a ak je to vhodné, odber vzoriek v prípade výrobných jednotiek, sa vykonáva v období roka, keď je známe, že prevalencia *Bonamia ostreae* v členskom štáte, zóne alebo priestore je najvyššia. Ak takéto údaje nie sú k dispozícii, odber vzoriek sa vykonáva v zime alebo na začiatku jari.

Ak sa majú mäkkýšom odoberať vzorky v súlade s požiadavkami stanovenými v časti 5, uplatňujú sa tieto kritériá:

a) ak sú prítomné ustrice jedlé (*Ostrea edulis*), na odber vzoriek môžu byť vybraté len ustrice tohto druhu. Ak nie sú prítomné ustrice jedlé (*Ostrea edulis*), vzorka musí reprezentovať všetky ostatné prítomné vnímavé druhy;

b) ak sú prítomné slabé, otvorené alebo čerstvo uhynuté, ale nerozložené mäkkýše, v prvom rade sa musia vybrať takéto mäkkýše. Ak takéto mäkkýše nie sú prítomné, medzi vybrané mäkkýše sa zaradia najstaršie zdravé mäkkýše;

c) pri odbere vzoriek vo farmách, v ktorých sa na produkciu mäkkýšov využíva viac ako jeden vodný zdroj, musia byť do odberu vzoriek zahrnuté mäkkýše reprezentujúce všetky vodné zdroje tak, aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti farmy;

d) pri odbere vzoriek v chovných oblastiach pre mäkkýše sa do vzorky musia zahrnúť mäkkýše z dostatočného počtu miest odberu vzoriek. Hlavnými faktormi, ktoré je potrebné zvážiť pri výbere týchto miest odberu vzoriek, sú predchádzajúce miesta, kde sa zistil výskyt *Bonamia ostreae*, hustota chovu, vodné toky, prítomnosť vnímavých druhov, prítomnosť prenášačov, batymetria a postupy riadenia. Do odberu vzoriek sa zahrnú prírodné dná v rámci chovných oblastí alebo oblastí, ktoré s nimi susedia.

I.2. Osobitné požiadavky na dosiahnutie zdravotného štatútu kategórie I, pokiaľ ide o *Bonamia ostreae*

I.2.1. Programy dohľadu

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie III, pokiaľ ide o Bonamia ostreae, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru boli predmetom prinajmenšom tohto programu dohľadu, ktorý zahŕňa veterinárne kontroly a odber vzoriek na testovanie.

Dvojročný program dohľadu:

a) farmy a chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES boli podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas dvoch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 5.A uvedenej v tejto časti;

b) počas uvedeného dvojročného obdobia testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód uvedených v bode II.2. vykazovalo negatívne výsledky v prípade *Bonamia ostreae* a vylúčilo sa akékoľvek podozrenie na *Bonamia ostreae* v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3;

c) ak vo vzorke majú byť zahrnuté *Ostrea edulis* pochádzajúce z členského štátu, zóny alebo priestoru so zdravotným štatútom kategórie I, museli byť umiestnené vo farme alebo v chovnej oblasti pre mäkkýše prinajmenšom na jeseň, ktorá predchádza obdobiu, keď sa vykonáva program dohľadu.

I.2.2. Eradikačné programy

Eradikácia *Bonamia ostreae* sa vo väčšine prípadov považuje za nemožnú, ale ak ju členský štát považuje za zrealizovateľnú, uplatňuje sa tento model eradikačného programu.

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V, pokiaľ ide o *Bonamia ostreae*, môžu znovu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru boli prinajmenšom predmetom tohto eradikačného programu:

a) účinne sa uplatňovali minimálne kontrolné opatrenia stanovené v oddiele 3 kapitoly V smernice 2006/88/ES, a predovšetkým, v blízkosti farmy(-iem) alebo chovnej(-ých) oblasti(-í) pre mäkkýše úradne vyhlásenej(-ých) za infikovanú(-é) *Bonamia ostreae* sa zriadila uzavretá oblasť uvedená v článku 32 písm. b) uvedenej smernice, ktorá obsahuje ochrannú zónu a zónu pozorovania.

Uzavretá oblasť sa vymedzí na základe jednotlivých prípadov, so zohľadnením faktorov, ktoré majú vplyv na riziká rozširovania danej choroby uvedenej v zozname, ako sú: počet, miera, vek a rozdelenie úhynov mäkkýšov na farme alebo v chovnej oblasti pre mäkkýše, ktoré sú infikované *Bonamia ostreae*, vrátane voľne žijúcich mäkkýšov; vzdialenosť a hustota susediacich fariem alebo chovných oblastí pre mäkkýše vrátane voľne žijúcich mäkkýšov; blízkosť k spracovateľským prevádzkárňam, k farmám, ktoré sú v styku, alebo k chovným oblastiam pre mäkkýše; druhy prítomné na farmách alebo v chovných oblastiach pre mäkkýše, najmä vnímavé druhy a prenášače; chovné postupy uplatňované v postihnutých a susediacich farmách alebo chovných oblastiach pre mäkkýše; zistené hydrodynamické podmienky a ostatné faktory epidemiologického významu.

Na účely zriadenia ochranných zón a zón pozorovania platia tieto minimálne požiadavky:

i) ochranná zóna sa zriadi v bezprostrednej blízkosti farmy alebo chovnej oblasti pre mäkkýše, ktorá bola úradne vyhlásená za infikovanú *Bonamia ostreae*, a zodpovedá oblasti určenej podľa príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov;

ii) zóna pozorovania sa zriadi mimo ochrannej zóny a zodpovedá oblasti okolo ochrannej zóny, určenej podľa príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov;

b) všetky farmy a chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci ochrannej zóny, ktoré nie sú úradne vyhlásené za infikované *Bonamia ostreae*, podliehajú úradnému vyšetrovaniu zahŕňajúcemu prinajmenšom odber vzoriek na testovanie 150 mäkkýšov vnímavých druhov po začiatku obdobia prenosu *Bonamia ostreae*. Ak obdobie prenosu nie je známe, odber vzoriek sa začne v zime alebo na začiatku jari;

c) všetky farmy a chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované *Bonamia ostreae* musia byť vyprázdnené, úhorované, a podľa možnosti vyčistené a vydezinfikované. Dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť mesiacov.

Ak sú vyprázdnené všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované, musí sa vykonať najmenej štvortýždňové súbežné úhorovanie.

Príslušný orgán sa môže rozhodnúť požadovať vyprázdnenie, vyčistenie, dezinfekciu a úhorovanie iných fariem alebo chovných oblastí pre mäkkýše v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania. Dĺžku trvania úhorovania určí príslušný orgán na základe posúdenia rizika v jednotlivých konkrétnych prípadoch;

d) všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úhorované v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania musia byť opätovne nasádzané mäkkýšmi pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, pokiaľ ide o bonamiózu (*Bonamia ostreae*). Opätovné nasádzanie sa uskutoční len vtedy, ak všetky farmy úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované v súlade s bodom I.2.2 písm. c);

e) všetky farmy a chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru, na ktoré sa vzťahuje eradikačný program, musia následne podliehať systému dohľadu stanovenému v bode I.2.

I.3. Osobitné požiadavky na udržanie zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb (kategória I), pokiaľ ide o bonamiózu (*Bonamia ostreae*).

Ak sa na udržanie zdravotného štatútu kategórie I vyžaduje cielený dohľad podľa článku 52 smernice 2006/88/ES, všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k uvedenej smernici v rámci príslušného členského štátu, zóny alebo priestoru podliehajú veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek v súlade s tabuľkou 5.B stanovenou v oddiele II tejto časti, so zohľadnením úrovne rizika farmy alebo chovnej oblasti pre mäkkýše v súvislosti s nakazením bonamiózou (*Bonamia ostreae*).

Štatút oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o bonamiózu (Bonamia ostreae), sa môže udržať iba vtedy, ak všetky vzorky testované s použitím diagnostických metód stanovených v bode II. 2. priniesli negatívne výsledky v prípade Bonamia ostreae, a ak bolo vylúčené akékoľvek podozrenie na Bonamia ostreae v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3.

I.4. Požiadavky, pokiaľ ide o zrušenie opatrení na zabránenie šíreniu stanovených v článku 39 smernice 2006/88/ES (zmena zdravotného štatútu z kategórie V na kategóriu III), pokiaľ ide o bonamiózu (*Bonamia ostreae*).

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V v súvislosti s bonamiózou (*Bonamia ostreae*), môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie III, pokiaľ ide o uvedenú chorobu, za predpokladu, že:

a) sú splnené požiadavky stanovené v bode I.2.2 písm. a), b) a c). V prípade, že úhorovanie nie je technicky možné, dané farmy podliehajú alternatívnemu opatreniu, na základe ktorého sa poskytuje takmer podobná záruka, pokiaľ ide o vyhubenie *Bonamia ostreae* v prostredí farmy;

b) všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úhorované alebo podrobené alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a) v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania boli opätovne nasádzané mäkkýšmi pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, II alebo III, pokiaľ ide o bonamiózu (*Bonamia ostreae*).

c) opätovné nasadzovanie sa uskutočnilo len v tom prípade, ak všetky farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše úradne vyhlásené za infikované boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované alebo sa podrobili alternatívnym opatreniam v súlade s písmenom a).

d) počas obdobia dvoch rokov, ktoré nasleduje po ukončení opatrení uvedených v písm. a), b) a c) nedošlo k potvrdeniu bonamiózy (*Bonamia ostreae*) a podozrenia počas tohto obdobia boli vylúčené podľa postupov stanovených v bode II. 3.

II. **Diagnostické metódy a diagnostické kritériá**

II.1. Vzorky

Na vykonávanie diagnostických testov uvedených v bodoch II.2 a II.3 sa do laboratória musí dodať celý živočích.

II.2. Diagnostické metódy na účely získania alebo udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o bonamiózu (*Bonamia ostreae*)

Diagnostickými metódami, ktoré sa majú použiť na získanie alebo udržanie štatútu oblasti bez výskytu bonamiózy (*Bonamia ostreae*), sú histopatológia, odtlačky tkaniva alebo PCR. Pri uplatňovaní týchto diagnostických metód sa musia dodržiavať príslušné podrobné metódy a postupy stanovené v časti 5 prílohy II.

II.3. Diagnostické kritériá na potvrdenie prítomnosti bonamiózy (*Bonamia ostreae*) alebo na vylúčenie podozrenia na túto chorobu

Ak sa vyžaduje potvrdenie alebo vylúčenie podozrenia na bonamiózu (*Bonamia ostreae*) v súlade s článkom 28 smernice 2006/88/ES, musí sa dodržať tento postup kontroly, odberu vzoriek a testovania:

úradné vyšetrovanie musí zahŕňať aspoň jeden odber vzoriek 30 mäkkýšov vnímavých druhov, ak sa podozrenie zakladá na správe o úhyne, alebo ak nie, 150 mäkkýšov vnímavých druhov po začiatku obdobia prenosu *Bonamia ostreae*. Ak obdobie prenosu nie je známe, odber vzoriek sa začne v zime alebo na začiatku jari. Vzorky sa testujú s použitím diagnostických metód uvedených v bode i) podľa podrobných diagnostických metód a postupov uvedených v oddiele I časti 5 prílohy II:

i) prítomnosť *Bonamia ostreae* sa považuje za potvrdenú, ak je pozitívny výsledok prostredníctvom histopatológie, odtlačkov tkaniva alebo hybridizácie pre dôkaz *in situ* kombinovaný s pozitívnym výsledkom PCR doplnenej sekvenovaním v súlade so schválenými metódami a postumi uvedenými v časti 5 prílohy II;

ii) podozrenie na prítomnosť bonamiózy (*Bonamia ostreae*) sa vylúči, ak sa uvedenými testami neodhalí žiadny ďalší dôkaz prítomnosti *Bonamia ostreae*.

Tabuľka 5.A

Systém dohľadu v prípade členských štátov, zón alebo priestorov na kontrolné obdobie, ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu *Bonamia ostreae*, podľa bodu I.2.1

	Počet veterinárnych kontrol za rok	Počet laboratórnych vyšetrení za rok	Počet mäkkýšov vo vzorke
Farmy alebo chovné oblasti pre mäkkýše	1	1	150

Tabuľka 5.B

Systémy dohľadu v prípade členských štátov, zón alebo priestorov na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti s *Bonamia ostreae*, ako sa uvádza v bode I.3

Úroveň rizika	Počet veterinárnych kontrol	Počet laboratórnych vyšetrení	Počet mäkkýšov vo vzorke
vysoká	1 každý rok	1 každé 2 roky	150
stredná	1 každé 2 roky	1 každé 2 roky	150
nízka	1 každé 2 roky	1 každé 4 roky	150

ČASŤ 6

METÓDY DOHĽADU A KONTROLY, POKIAĽ IDE O CHOROBU BIELYCH ŠKVŔN (WSD)

I. **Požiadavky týkajúce sa programov dohľadu a eradikačných programov na účely získania a udržania zdravotných štatútov oblastí bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o WSD a na zabránenie šíreniu infekcie WSSV**

I.1. Všeobecné požiadavky, pokiaľ ide o kontroly a odber vzoriek

Odber vzoriek kôrovcov na laboratórne vyšetrenie sa vykonáva kedykoľvek, keď je pravdepodobné, že teplota vody dosiahne svoje najvyššie ročné hodnoty. Táto požiadavka týkajúca sa teploty vody sa vzťahuje aj na veterinárne kontroly, ak sú uskutočniteľné a vhodné.

Ak majú sa majú odobrať vzorky chovaných kôrovcov v súlade s požiadavkami stanovenými v tejto časti, uplatňujú sa tieto kritériá:

a) ak sú vo výrobných jednotkách prítomné slabé alebo moribundné kôrovce, v prvom rade sa musia vybrať takéto kôrovce. Ak takéto kôrovce nie sú prítomné, vyberú sa kôrovce z kategórie mladých a dospelých jedincov rôznej veľkosti patriace k vybranému vnímavému druhu, pomerne reprezentované vo vzorke;

b) ak sa na chov kôrovcov využíva viac ako jeden vodný zdroj, do odberu vzoriek musia byť zahrnuté vnímavé kôrovce reprezentujúce všetky vodné zdroje.

Ak sa v súlade s druhým odsekom bodu 2 časti I prílohy V k smernici 2006/88/ES vyžaduje cielený dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, stanoví sa počet a zemepisné rozloženie miest odberu vzoriek s cieľom získať primerané pokrytie členského štátu, zóny alebo priestoru. Miesta odberu vzoriek musia takisto reprezentovať rozličné ekosystémy, v ktorých sa nachádzajú voľne žijúce populácie vnímavých druhov, konkrétne morské systémy, systémy ústia, riečne a jazerné systémy.

Ak sa vyžaduje cielený dohľad v prípade voľne žijúcich populácií v súlade s druhým odsekom bodu 2 časti I prílohy V k smernici 2006/88/ES, kôrovce, z ktorých sa majú odobrať vzorky, musia byť vybrané takto:

i) v oblastiach morských systémov a systémov ústia sa vyberie jeden alebo viacero z týchto druhov: *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Eriocheir sinensis, Liocarcinus depurator, Liocarcinus puber, Crangon crangon, Homarus gammarus, Palaemon adspersus* alebo druh kreviet *penaeid, konkrétne Penaeus. japonicus, Penaeus kerathurus, Penaeus semisulcatus*. Ak uvedené druhy nie sú prítomné, vzorka musí reprezentovať ostatné vnímavé druhy desaťnožcov, ktoré sú prítomné. Vzhľadom na široký rozsah vnímavých hostiteľov možno hostiteľov vybrať z rodov alebo čeľadí *Decapoda*, pri ktorých bola experimentálne alebo prirodzene preukázaná vnímavosť;

ii) v oblastiach riečnych a jazerných systémov sa vyberie jeden alebo viacero z týchto druhov: *Pacifastacus leniusculus, Astacus leptodactylus, Austropotamobius pallipes* alebo *Orconectes limosus*. Ak uvedené druhy nie sú prítomné, vzorka musí reprezentovať ostatné vnímavé druhy desaťnožcov, ktoré sú prítomné. Vzhľadom na široký rozsah vnímavých hostiteľov možno hostiteľov vybrať z rodov alebo čeľadí *Decapoda*, pri ktorých bola experimentálne alebo prirodzene preukázaná vnímavosť;

iii) ak sú prítomné slabé alebo moribundné kôrovce, v prvom rade sa musia vybrať takéto kôrovce. Ak takéto kôrovce nie sú prítomné, vyberú sa kôrovce z kategórie mladých a dospelých jedincov rôznej veľkosti patriace k vybranému vnímavému druhu, pomerne reprezentované vo vzorke.

I.2. Osobitné požiadavky na získanie zdravotného štatútu kategórie I, pokiaľ ide o WSD

I.2.1. Programy dohľadu

a) členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie III v súvislosti s WSD v súlade s časťou B prílohy III k smernici 2006/88/ES, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k uvedenej smernici v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru spĺňajú príslušné požiadavky stanovené v prílohe V k uvedenej smernici a všetky uvedené farmy, a ak sa to vyžaduje v druhom odseku bodu 2 časti I prílohy V k smernici 2006/88/ES, aj miesta odberu vzoriek v prípade voľne žijúcich populácií vybraných v súlade s uvedeným bodom, boli predmetom tohto dvojročného programu dohľadu, ktorý zahŕňa veterinárne kontroly a odber vzoriek na testovanie.

Farmy alebo miesta odberu vzoriek boli podrobené veterinárnym kontrolám a odberu vzoriek minimálne počas dvoch po sebe nasledujúcich rokov, ako je to stanovené v tabuľke 6.A v oddiele II.

Počas uvedeného dvojročného obdobia testovanie všetkých vzoriek s použitím diagnostických metód stanovených v bode II.2 prinieslo negatívne výsledky v prípade infekcie WSD a vylúčilo sa akékoľvek podozrenie na WSD v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3.

b) ak sa počas realizácie programu dohľadu uvedeného v písm. a) na farme zaradenej do uvedeného programu dohľadu potvrdí infekcia WSSV, a na základe toho sa zruší jej zdravotný štatút kategórie II, uvedená farma môže okamžite znovu získať zdravotný štatút kategórie II a pokračovať v realizácii programu dohľadu s cieľom dosiahnuť štatút oblasti bez výskytu chorôb bez toho, aby uplatňovala eradikačný program, ako sa uvádza v bode I.2.2, za predpokladu, že:

i) je suchozemskou farmou, ktorej zdravotný štatút v súvislosti s WSD je nezávislý od zdravotného štatútu okolitých prírodných vôd v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname v súlade s bodom 3 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES;

ii) bola vyprázdnená, vyčistená, vydezinfikovaná a úhorovaná; dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov;

iii) bola opätovne nasádzaná kôrovcami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s WSD.

I.2.2. Eradikačné programy

I.2.2.1. Všeobecné požiadavky

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V, pokiaľ ide o WSD, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie I v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname, ak všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci uvedeného členského štátu, zóny alebo priestoru boli prinajmenšom predmetom tohto eradikačného programu:

a) účinne sa uplatňovali minimálne kontrolné opatrenia stanovené v oddiele 4 kapitoly V smernice 2006/88/ES a v blízkosti farmy(-iem) úradne vyhlásenej(-ých) za infikovanú(-é) WSD sa zriadila uzavretá oblasť uvedená v článku 32 písm. b) uvedenej smernice, ktorá obsahuje ochrannú zónu a zónu pozorovania.

Uzavretá oblasť sa musela vymedziť na základe jednotlivých prípadov, so zohľadnením faktorov, ktoré majú vplyv na riziká rozširovania WSD na chované i voľne žijúce kôrovce, ako sú: počet, miera a rozdelenie úhynu kôrovcov na farme infikovanej WSD; vzdialenosť k susedným farmám a hustota susedných fariem; farmy, ktoré sú v styku; druhy prítomné na farmách; chovné postupy použité na postihnutých farmách a na susedných farmách; zistené hydrodynamické podmienky a ostatné faktory epidemiologického významu.

Na účely zriadenia ochranných zón a zón pozorovania platia tieto minimálne požiadavky:

i) ochranná zóna sa zriadi v bezprostrednej blízkosti farmy úradne vyhlásenej za infikovanú WSD a zodpovedá:

(1) v morských oblastiach a oblastiach ústia: oblasti zahŕňajúcej kruh s priemerom aspoň jedného posunu prílivu alebo aspoň 5 km, podľa toho, ktorý je väčší, ktorého stredom je farma úradne vyhlásená za infikovanú WSD, alebo rovnocennej oblasti určenej na základe príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov; alebo

(2) v sladkých vodách: celému povodiu farmy úradne vyhlásenej za infikovanú WSD; príslušný orgán môže obmedziť rozsah ochrannej zóny na časti povodia pod podmienkou, že nie je ohrozená prevencia rozširovania WSD;

ii) zóna pozorovania sa vymedzí mimo ochrannej zóny a zodpovedá:

(1) v morských oblastiach: oblasti, ktorá okolo ochrannej zóny presahuje pásma posunu prílivu; alebo oblasti okolo ochrannej zóny, ktorá patrí do okruhu s priemerom 10 km od stredu ochrannej zóny; alebo rovnocennej oblasti určenej na základe príslušných hydrodynamických alebo epidemiologických údajov; alebo

(2) v sladkých vodách: rozsiahla oblasť mimo stanovenej ochrannej zóny;

b) všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci ochrannej zóny, ktoré nie sú úradne vyhlásené za infikované WSD, musia byť predmetom úradného vyšetrovania, ktoré bude obsahovať minimálne:

i) odber vzoriek na testovanie 10 kôrovcov, ak sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zodpovedajúce infekcii WSD, alebo 150 kôrovcov, ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem*; a

ii) jednu veterinárnu kontrolu; v tých farmách, kde testy uvedené v podbode i) priniesli negatívne výsledky, veterinárne kontroly pokračujú raz mesačne počas obdobia, keď je pravdepodobné, že teplota vody dosiahne svoje najvyššie ročné hodnoty až do zrušenia ochrannej zóny v súlade s bodom I.2.2.1 písm. c);

c) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované WSD musia byť vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované. Dĺžka obdobia úhorovania musí byť najmenej šesť týždňov. Ak sú vyprázdnené všetky farmy úradne vyhlásené za infikované, musí sa vykonať najmenej trojtýždňové súbežné úhorovanie. Tento odsek sa vzťahuje aj na nové farmy úradne vyhlásené za infikované počas realizácie eradikačného programu.

Ak sa vykonáva úhorovanie úradne vyhlásených infikovaných fariem, ochranné zóny sa premenia na zóny pozorovania.

Príslušný orgán sa môže rozhodnúť požadovať vyprázdnenie, vyčistenie, dezinfekciu a úhorovanie iných fariem v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania. Dĺžku trvania uvedeného obdobia úhorovania určí príslušný orgán na základe posúdenia rizika v jednotlivých konkrétnych prípadoch.

d) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované a všetky ostatné farmy úhorované v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania sa musia opätovne nasádzať:

i) kôrovcami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s WSD; alebo

ii) počas prechodného obdobia do 31. decembra 2020, kôrovcami z členských štátov, zón alebo priestorov so schváleným programom dohľadu v súvislosti s WSD.

Opätovné nasádzanie sa uskutoční len vtedy, keď všetky farmy úradne vyhlásené za infikované WSD boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované v súlade s bodom I.2.2.1 písm. c);

e) všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES v rámci členského štátu, zóny alebo priestoru, na ktoré sa vzťahuje eradikačný program, a ak je potrebný dohľad nad voľne žijúcimi populáciami, miesta odberu vzoriek vybraté v súlade s druhým odsekom bodu 2 časti I prílohy V k uvedenej smernici, musia následne podliehať prinajmenšom programu stanovenému v bode I.2.1.

I.2.2.2. Požiadavky na opätovné získanie štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti s WSD v prípade suchozemských priestorov zahŕňajúcich jednu jedinú farmu, ktorá bola predtým vyhlásená za farmu bez výskytu WSD

Suchozemský priestor zahŕňajúci jednu jedinú farmu so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s WSD, ktorej zdravotný štatút v súvislosti s danou chorobou uvedenou v zozname je nezávislý od okolitých prírodných vôd v súlade s bodom 3 časti II prílohy V k smernici 2006/88/ES a ktorej zdravotný štatút kategórie I bol zrušený v súlade s článkom 53 ods. 3 uvedenej smernice, môže opätovne získať zdravotný štatút kategórie I okamžite potom, ako príslušný orgán potvrdil, že boli splnené tieto podmienky:

a) farma s WSD bola vyprázdnená, vyčistená, vydezinfikovaná a úhorovaná; dĺžka obdobia úhorovania musela byť najmenej šesť týždňov;

b) farma s WSD bola opätovne nasádzaná kôrovcami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I v súvislosti s WSD.

I.3. Osobitné požiadavky na udržanie zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb (kategória I), pokiaľ ide o WSD

Ak sa na udržanie zdravotného štatútu kategórie I vyžaduje cielený dohľad podľa článku 52 smernice 2006/88/ES, všetky farmy držiace vnímavé druhy uvedené v časti II prílohy IV k uvedenej smernici v rámci príslušného členského štátu, zóny alebo priestoru sa podrobia veterinárnej kontrole a odberu vzoriek v súlade s tabuľkou 6 B stanovenou v oddiele II, so zohľadnením úrovne rizika farmy v súvislosti s nákazou WSD.

V členských štátoch, zónach alebo priestoroch, v ktorých je obmedzený počet fariem a cielený dohľad v prípade uvedených fariem neposkytuje dostatočné epidemiologické údaje, programy dohľadu na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb musia zahŕňať miesta na odber vzoriek vybrané v súlade s požiadavkami stanovenými v bode I.1.

Uvedené miesta odberu vzoriek sa musia kontrolovať a musia sa z nich odoberať vzorky na základe 50 % rotácie miest odberu vzoriek každý rok. Odber vzoriek sa uskutočňuje v súlade s tabuľkou 6 B stanovenou v oddiele II. Vzorky sa musia vybrať, pripraviť a vyšetriť v súlade s diagnostickými metódami a metódami odberu vzoriek uvedenými v oddiele II a laboratórne vyšetrenia musia priniesť negatívne výsledky, pokiaľ ide o prítomnosť pôvodcu WSD.

Štatút oblasti bez výskytu chorôb sa udrží iba dovtedy, kým všetky vzorky testované s použitím diagnostických metód a metód odberu vzoriek stanovených v bode II.2. prinášajú negatívne výsledky v prípade WSD, a je vylúčené akékoľvek podozrenie na WSD v súlade s metódami úradného vyšetrovania a diagnostickými metódami uvedenými v bode II.3.

I.4. Požiadavky na zrušenie opatrení na zabránenie šíreniu stanovených v článku 39 smernice 2006/88/ES (zmena zdravotného štatútu z kategórie V na kategóriu III), pokiaľ ide o WSD

Členský štát, zóna alebo priestor, ktoré majú zdravotný štatút kategórie V v súvislosti s WSD, môžu dosiahnuť zdravotný štatút kategórie III, pokiaľ ide o danú chorobu uvedenú v zozname, za predpokladu, že:

a) sú splnené požiadavky stanovené v bode I.2.2.1 písm. a), b) a c). V prípade, že úhorovanie nie je technicky možné, dané farmy podliehajú alternatívnemu opatreniu, na základe ktorého sa poskytuje takmer rovnaká záruka, pokiaľ ide o vyhubenie WSSV v prostredí farmy;

b) všetky farmy úradne vyhlásené za infikované WSD a všetky ostatné farmy, ktoré boli úhorované alebo podliehali alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a) v rámci zriadených ochranných zón a zón pozorovania, boli opätovne nasádzané kôrovcami pochádzajúcimi z členských štátov, zón alebo priestorov so zdravotným štatútom kategórie I, II alebo III, pokiaľ ide o WSD;

c) opätovné nasadzovanie sa uskutočnilo len vtedy, keď všetky farmy úradne vyhlásené za infikované WSD boli vyprázdnené, vyčistené, vydezinfikované a úhorované alebo sa podrobili alternatívnym opatreniam v súlade s písm. a).

d) počas obdobia dvoch rokov, ktoré nasleduje po ukončení opatrení uvedených v písm. a) a b) nedošlo k zisteniu WSD a počas tohto obdobia boli vylúčené podozrenia podľa postupov stanovených v bode II.3.

II. **Diagnostické metódy a metódy odberu vzoriek**

II.1. Vzorky

Pred prípravou vzoriek na dvojkrokovú PCR sa odoberú vzorky integumentu, buď samostatné alebo ako súčasť kráčavých končatín, plávacích končatín, ústneho ústrojenstva alebo žiabier vyšetrovaného živočícha, ktoré by mali byť fixované v 95 % etanole.

Na účely podloženia diagnostických údajov vyplývajúcich z PCR je možné odobrať ďalšie vzorky, ktoré sú fixované na účely histológie a transmisnej elektrónovej mikroskopie.

II.2. Diagnostické metódy na účely získania alebo udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o WSD

Diagnostickou metódou, ktorá sa má použiť na získanie alebo udržanie štatútu oblasti bez výskytu WSD, na základe podrobných diagnostických metód a postupov uvedených v časti 6 prílohy II, je dvojkroková PCR.

V prípade pozitívneho výsledku dvojkrokovej PCR musí byť pred tým, ako sa uplatnia počiatočné kontrolné opatrenia stanovené v článku 28 smernice 2006/88/ES, výsledok potvrdený sekvenovaním amplikónu, a ak je to v rámci praktických podmienok možné, preukázaním patognomonických príznakov WSD pri uvedených vybraných vnímavých hostiteľoch, prostredníctvom histológie a transmisnej elektrónovej mikroskopie.

II.3. Metódy úradného vyšetrovania a diagnostické metódy na vylúčenie podozrenia na infekciu WSD alebo na potvrdenie jej prítomnosti

Ak sa vyžaduje potvrdenie prítomnosti infekcie WSD alebo vylúčenie podozrenia na takúto infekciu v súlade s článkom 28 smernice 2006/88/ES, musí sa dodržať tento postup kontroly, odberu vzoriek a testovania:

a) úradné vyšetrovanie musí zahŕňať najmenej jednu veterinárnu kontrolu a jeden odber vzoriek 10 kôrovcov, ak sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem* zodpovedajúce infekcii WSD, alebo 150 kôrovcov, ak nie sú pozorované klinické príznaky alebo príznaky *post-mortem*. Pri testovaní vzoriek sa použijú diagnostické metódy uvedené v bode II.2 (dvojkroková PCR);

b) prítomnosť WSD sa považuje za potvrdenú, ak je dvojkroková PCR doplnená sekvenovaním podľa podrobných metód a postupov stanovených v tejto časti 6 prílohy II, pozitívna na WSSV, a ak sú vo vybraných hostiteľoch prítomné patognomonické príznaky WSD.

Podozrenie na WSD možno vylúčiť, ak sa uvedenými testami neodhalí ďalší dôkaz prítomnosti WSD.

Tabuľka 6 A

Systém dohľadu v prípade členských štátov, zón a priestorov na dvojročné kontrolné obdobie, ktoré predchádza dosiahnutiu štatútu oblasti bez výskytu WSD, podľa bodu I.2.1

	Počet klinických kontrol za rok	Počet laboratórnych vyšetrení za rok	Počet kôrovcov vo vzorke
Farmy/miesta odberu vzoriek	1	1	150

Tabuľka 6 B

Systémy dohľadu v prípade členských štátov, zón alebo priestorov na účely udržania štatútu oblasti bez výskytu chorôb v súvislosti s WSD, ako sa uvádza v bode I. 3

Úroveň rizika	Počet veterinárnych kontrol	Počet laboratórnych vyšetrení	Počet kôrovcov vo vzorke
vysoká	1 ročne	1 každé 2 roky	150
stredná	1 každé 2 roky	1 každé 2 roky	150
nízka	1 každé 2 roky	1 každé 4 roky	150

PRÍLOHA II

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METÓDY A POSTUPY

I. **Úvod**

V tejto prílohe sa stanovujú podrobné postupy týkajúce sa diagnostických metód, ktoré sa majú použiť na laboratórne vyšetrenie v eradikačných programoch a programoch dohľadu uvedených v prílohe I k tomuto rozhodnutiu, a s cieľom potvrdiť alebo vylúčiť podozrenie na výskyt týchto neexotických chorôb uvedených v časti II prílohy IV k smernici 2006/88/ES (ďalej len „choroby uvedené v zozname“) v súlade s článkom 57 písm. b) uvedenej smernice:

1.	Vírusová hemoragická septikémia (VHS)	Časť 1
2.	Infekčná hematopoetická nekróza (IHN)	Časť 1
3.	Herpesviróza kaprov koi (KHV)	Časť 2
4.	Infekčná anémia lososov (ISA)	Časť 3
5.	Marteilióza (*Marteilia refringens*)	Časť 4
6.	Bonamióza (*Bonamia ostreae*)	Časť 5
7.	Choroba bielych škvŕn (WSD)	Časť 6

II. **Vymedzenie pojmov**

Na účely tejto prílohy je „transportné médium“ médium na kultiváciu buniek s 10 % teľacím sérom a s 200 iu penicilínu, 200 µg streptomycínu a 200 µg kanamycínu na mililiter alebo s inými antibiotikami s preukázanou účinnosťou.

ČASŤ 1

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METÓDY A POSTUPY NA DOHĽAD NAD IHN A VHS A POTVRDENIE IHN A VHS

I. **Diagnostické metódy a postupy na dohľad nad VHS a IHN**

Pri výkone odberu vzoriek a laboratórneho vyšetrenia na účely získania alebo udržania zdravotného štatútu oblasti bez výskytu chorôb, pokiaľ ide o IHN alebo VHS, ako sa stanovuje v oddiele I časti 1 prílohy I, s použitím diagnostických metód stanovených v bodoch II.1 a II.2 časti 1 uvedenej prílohy, sa uplatňujú podrobné diagnostické metódy a postupy stanovené v bodoch I.1 až I. 6.

I.1. Príprava a zasielanie vzoriek rýb

I.1.1. Tkanivá na virologické vyšetrenie na bunkovej kultúre

Pred zasielaním alebo prepravou do laboratória sa z rýb sterilnými pitevnými nástrojmi vyberú časti orgánov, ktoré majú byť vyšetrené, vložia sa do sterilných plastových skúmaviek, ktoré obsahujú transportné médium.

Množstvo materiálu z rýb, ktoré je vhodné na virologické vyšetrenie na bunkovej kultúre a prostredníctvom RT-qPCR, závisí od veľkosti rýb. Preto sú vzorkovanými tkanivami celý vreckový plôdik (dĺžka tela < 4 cm), vnútornosti vrátane obličiek (4 cm < dĺžka tela < 6 cm), alebo, v prípade rýb väčšej veľkosti, sú to obličky, slezina, srdce a/alebo mozog a vaječníková tekutina z chovu generačných rýb v čase neresenia.

Vaječníková tekutina alebo semenná tekutina alebo časti orgánov najviac z 10 rýb môžu byť vložené do jednej sterilnej skúmavky, ktorá obsahuje aspoň 4 ml transportného média a predstavuje jednu zmesnú vzorku. Tkanivo v každej vzorke musí vážiť aspoň 0,5 gramu g).

Virologické vyšetrenie na bunkovej kultúre sa začne čo najskôr, a najneskôr do 48 hodín po odobratí vzoriek. Vo výnimočných prípadoch môže virologické vyšetrenie začať najneskôr do 72 hodín po odobratí materiálu, a to za predpokladu, že materiál, ktorý má byť vyšetrovaný, je chránený transportným médiom, a že je počas prepravy možné dodržať požiadavky na teplotu.

I.1.2. Vzorky na analýzu pomocou polymerázovej reťazovej reakcie spojenej s reverznou transkripciou (RT-PCR alebo RT-qPCR)

Vzorky sa odoberú z rýb v súlade s postupom opísaným v bode I.1.1 s použitím sterilného nástroja a vložia sa do sterilnej plastovej skúmavky, ktorá obsahuje transportné médium. Tkanivo z 10 rýb sa môže odobrať do jednej skúmavky, pričom predstavuje jednu zmesnú vzorku. Ak je však množstvo inokula malé, môže sa použiť tkanivo maximálne z piatich rýb. Alternatívnym spôsobom môže byť odobratie zmesnej vzorky do činidla na stabilizáciu RNA, napríklad 0,2 g tkaniva/ml činidla podľa odporúčania výrobcov, hoci každá ryba sa spracúva jednotlivo a nesmie sa vo vzorkách spojiť vzhľadom na malé množstvo materiálu, ktoré sa má použiť na extrakciu.

Do laboratória sa môžu odoslať aj celé ryby.

I.2. Zasielanie vzoriek v prípade rýb

Skúmavky, ktoré obsahujú tkanivá rýb v transportnom médiu na kultiváciu buniek alebo analýzu RT-PCR/RT-qPCR sa umiestnia do izolovaných nádob, ako sú polystyrénové krabice s hrubými stenami, spolu s dostatočným množstvom ľadu alebo alternatívnym chladiacim médiom s podobným chladiacim účinkom na zabezpečenie chladenia vzoriek počas prepravy do laboratória. Je potrebné vyvarovať sa zmrazenia vzoriek. Teplota vzorky počas prepravy nesmie nikdy prekročiť 10 °C, pričom v transportnej prepravke musí byť aj pri prevzatí ešte stále prítomný ľad alebo jeden alebo viaceré chladiace vložky musia byť stále čiastočne alebo úplne zamrznuté.

Do laboratória môžu byť odoslané celé ryby, ak je počas prepravy možné splniť požiadavky na teplotu uvedené v prvom odseku. Celé ryby sa zabalia do papiera s absorpčnými vlastnosťami a nakoniec sú zasielané v plastovom vrecku. Môžu sa zasielať aj živé ryby.

I.3. Odber doplnkového diagnostického materiálu

V prípade schválenia diagnostickým laboratóriom môžu byť na doplňujúce vyšetrenia odobraté a pripravené aj iné tkanivá rýb.

I.4. Príprava vzoriek na vyšetrenie na bunkovej kultúre a RT-qPCR

I.4.1. Zmrazovanie vo výnimočných prípadoch

Ak vzniknú praktické problémy, ktoré znemožňujú spracovanie vzoriek do 48 hodín od odberu tkaniva rýb, môže byť prípustné zmraziť vzorky tkanív v transportnom médiu pri teplote – 20 °C alebo nižšej a vykonať virologické vyšetrenie do 14 dní. Tkanivá rýb sa však pred vyšetrením zmrazia a rozmrazia iba raz. Musia byť vedené záznamy s informáciami o dôvode každého zmrazenia vzoriek tkaniva rýb.

I.4.2. Homogenizácia orgánov

Rybie tkanivo, ktoré je v skúmavkách, sa v laboratóriu úplne homogenizuje (homogenizátorom stomacher, mixérom alebo trecou miskou a roztieradlom so sterilným pieskom) a následne suspenduje v pôvodnom transportnom médiu.

Ak vzorka pozostáva z celých rýb kratších ako 4 cm, na drobné kúsky sa nastrihá sterilnými nožnicami alebo poseká skalpelom po odstránení tela za črevným otvorom. Ak vzorka pozostáva z celých rýb s dĺžkou tela 4 až 6 cm, uskutoční sa odber vnútorností vrátane obličiek. Ak vzorka pozostáva z celých rýb dlhších ako 6 cm, vzorky tkaniva sa odoberajú tak, ako je to opísané v bode I.1. Vzorky tkaniva sa na drobné kúsky nastrihajú sterilnými nožnicami alebo skalpelom, homogenizujú sa podľa opisu v prvom odseku tohto bodu a suspendujú v transportnom médiu.

Konečný pomer medzi tkanivovým materiálom a transportným médiom je v laboratóriu upravený na 1:10.

I.4.3. Centrifugácia homogenátu

Homogenát sa centrifuguje v odstredivke chladenej na teplotu 2 °C až 5 °C a pri 2 000 až 4 000 × *g* počas 15 minút a supernatant sa odoberá a môže sa ošetriť antibiotikami buď počas štyroch hodín pri teplote 15 °C, alebo cez noc pri teplote 4 °C až 8 °C. Ak bola vzorka zaslaná v transportnom médiu, ošetrenie supernatantu antibiotikami možno vynechať.

Ak vzniknú praktické problémy, ako je porucha inkubátora alebo problémy s bunkovými kultúrami, ktoré znemožňujú naočkovanie buniek do 48 hodín od odberu vzoriek tkaniva rýb, supernatant sa môže zmraziť pri teplote – 80 °C a virologické vyšetrenie sa môže vykonať do 14 dní.

Ak je odobratý supernatant skladovaný pri teplote – 80 °C počas 48 hodín po odbere vzorky, na virologické vyšetrenie môže byť znovu použitý len raz.

Pred naočkovaním buniek sa supernatant zmieša s rovnakým množstvom vhodne zriedeného antiséra proti indigénnemu sérotypu vírusu infekčnej pankreatickej nekrózy (IPN) a inkubuje sa s ním aspoň jednu hodinu pri teplote 15 °C alebo maximálne 18 hodín pri teplote 4 °C. Titer antiséra je aspoň 1:2 000 v 50 % plakovom neutralizačnom teste.

Cieľom ošetrenia všetkých inokul antisérom proti vírusu IPN je zabránenie vzniku cytopatického efektu (CPE) v dôsledku vírusu IPN v naočkovaných bunkových kultúrach. Tým sa skráti trvanie virologických vyšetrení, ako aj počet prípadov, pri ktorých by výskyt CPE musel byť považovaný za možný indikátor VHSV alebo IHNV.

Ak vzorky pochádzajú z výrobných jednotiek, ktoré sú považované za oblasti bez výskytu vírusu IPN, ošetrenie inokulom s antisérom proti vírusu IPN sa smie vynechať.

I.4.4. Príprava vzoriek na programy dohľadu založené na RT-PCR a RT-qPCR

Ak boli vzorky odobrané do transportného média, vykoná sa postup uvedený v bodoch I.4.2 a I.4.3. Po centrifugácii sa odoberie supernatant a extrahuje RNA. Ak sa po centrifugácii nemá hneď vykonať ďalšie vyšetrenie, vzorky sa okamžite zmrazia pri teplote – 20 °C alebo nižšej.

Na analýzu tkanív rýb konzervovaných v činidle na stabilizáciu RNA sa vykoná ďalšia práca v týchto časových rámcoch v prípade vzoriek skladovaných pri rôznych teplotách:

vzorky skladované pri 37 °C: jeden deň;

vzorky skladované pri 25 °C: jeden týždeň;

vzorky skladované pri 4 °C: jeden mesiac;

vzorky skladované pri – 20 °C: na neurčito.

Zmesné vzorky v činidle na stabilizáciu RNA sa spracúvajú ako samostatné vzorky v činidle na stabilizáciu RNA. V prípade zmesných vzoriek v činidle na stabilizáciu RNA množstvo vzorky nesmie prekročiť hodnotu odporúčanú výrobcom na extrakciu so súpravami RNA, ako sú *RNeasy Mini kits* (Qiagen) alebo podobné súpravy. Ak sa spájajú väčšie vzorky, je potrebné to zohľadniť a použiť vhodné extrakčné súpravy alebo metódy.

Vzorky odobraté do činidiel na stabilizáciu RNA sa nepoužívajú na kultiváciu buniek.

I.4.5. Spájanie vzoriek na RT-qPCR

Keďže dané protokoly RT-qPCR majú podobnú alebo vyššiu citlivosť ako metódy kultivácie buniek, za prijateľné riešenie sa môže považovať, ak sa na PCR použije supernatant z homogenizovaného materiálu tkanív zmesných vzoriek orgánov najviac 10 rýb v médiu na kultiváciu buniek. Vzhľadom na to, že inokulum použité na PCR je v porovnaní s kultiváciou buniek oveľa menšie, sa však všetky tkanivá rýb pred spojením materiálu na extrakciu dôkladne homogenizujú.

Rovnaká zásada sa uplatňuje aj vtedy, ak sa vzorky odoberajú v činidlách na stabilizáciu RNA. V takom prípade je však často obtiažne vykonať odber reprezentatívneho materiálu až 10 rýb do jednej skúmavky, a preto sa počet rýb v zmesnej vzorke musí znížiť na 2 až 5.

I.5. Virologické vyšetrenie na bunkovej kultúre

I.5.1. Bunkové kultúry a médiá

Bunkové línie BF-2 poteru zo slnečnice modrožiabrovej (Bluegill fry) alebo RTG-2 gonád pstruha dúhového (Rainbow trout gonad) a buď bunky EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) alebo FHM (čerebľa potočná, Fathead minnow) sa kultivujú pri teplote 20 až 30 °C vo vhodnom médiu, konkrétne v minimálnom základnom médiu podľa Eagla (MEM) alebo v jeho modifikáciách, s prídavkom 10 % séra získaného z plodov hovädzieho dobytka a antibiotík v štandardných koncentráciách.

Ak sú bunky kultivované v uzatvorených nádobách, médium sa pufruje hydrogénuhličitanom. Médium použité na kultiváciu buniek v otvorených jednotkách sa môže tlmiť pomocou tris(hydroxymetyl)aminometánu-HCl (Tris-HCl) (23 mM) a hydrogénuhličitanu sodného (6 mM). pH musí byť 7,6 ± 0,2.

Bunkové kultúry, ktoré sa majú použiť na naočkovanie tkanivového materiálu rýb, musia byť mladé, zvyčajne sa pokiaľ možno použijú jeden deň staré jednovrstvové bunkové kultúry; prijateľné však môžu byť aj bunkové kultúry staré od 4 do 48 hodín. Bunky musia pri naočkovaní aktívne rásť.

I.5.2. Naočkovanie bunkových kultúr

Suspenzia orgánov spracovaná pomocou antibiotík sa naočkuje do bunkových kultúr v dvoch riedeniach, konkrétne primárny roztok a okrem toho jeho riedenie v pomere 1:10, výsledkom čoho sú konečné riedenia tkanivového materiálu v médiu na kultiváciu bufniek v pomere 1:100 a 1:1 000 (v danom poradí), s cieľom zabrániť homologickej interferencii. Naočkujú sa aspoň dve bunkové línie, ako sa uvádza v bode I.5.1. Pomer medzi veľkosťou inokula a objemom média na kultiváciu buniek je približne 1:10.

Pri každom roztoku a každej bunkovej línii sa použije bunková plocha s veľkosťou približne aspoň 2 cm^2, čo zodpovedá jednej jamke v 24-jamkovej platničke pre bunkové kultúry. Podľa možnosti sa používajú platničky pre bunkové kultúry.

I.5.3. Inkubácia bunkových kultúr

Inkubácia naočkovaných bunkových kultúr sa uskutočňuje pri teplote 15 °C počas siedmich až desiatich dní. Ak sa farba média na kultiváciu buniek mení z červenej na žltú, čo naznačuje okysľovanie média, musí sa vykonať úprava pH sterilným roztokom hydrogénuhličitanu alebo ekvivalentnými látkami na zabezpečenie bunkovej vnímavosti na vírusovú infekciu.

Aspoň každých šesť mesiacov alebo pri podozrení na zníženú vnímavosť buniek sa vykoná titrácia zmrazených zásob VHSV a IHNV na overenie vnímavosti bunkových kultúr na infekciu. Podľa možnosti sa použije postup uvedený v oddiele III.

I.5.4. Mikroskopia

Naočkované bunkové kultúry sa pravidelne kontrolujú, a to aspoň trikrát týždenne, v súvislosti s výskytom CPE pri 40 až 150-násobnom zväčšení. V prípade, ak je pozorovaný CPE, je potrebné okamžite začať postupy na identifikáciu vírusu v súlade s bodom I.6.

I.5.5. Subkultivácia

Ak sa po primárnej inkubácii 7 až 10 dní nevyvinul CPE, na čerstvých bunkových kultúrach sa vykonáva subkultivácia, pričom veľkosť bunkovej plochy je podobná ploche použitej pri primárnej kultúre.

Pomerné časti média (supernatantu) zo všetkých kultúr alebo jamiek, ktoré predstavujú primárnu kultúru, sa spoja podľa bunkovej línie 7 až 10 dní po naočkovaní. Zmesné vzorky sa potom naočkujú do homologických bunkových kultúr v nezriedenom a zriedenom stave, a to 1:10 [čím sa dosiahnu konečné zriedenia supernatantu 1:10 a 1:100 (v danom poradí)], podľa opisu v bode I.5.2. Alternatívnym spôsobom je, že sa pomerné časti 10 % média, ktoré predstavujú primárnu kultúru, naočkujú priamo do jamky s čerstvou bunkovou kultúrou (konkrétne subkultivácia z jamky do jamky). Naočkovaniu môže predchádzať inkubácia príslušných riedení s antisérom proti vírusu IPN podľa opisu v bode I.4.3.

Potom sa vykoná inkubácia naočkovaných kultúr počas 7 až 10 dní pri teplote 15 °C a kontrola v súlade s bodom I.5.4.

Ak sa toxický CPE vyskytne počas prvých troch dní inkubácie, v tejto fáze sa vykoná subkultivácia, ale bunky sa potom inkubujú sedem dní a opäť subkultivujú a inkubujú ďalších sedem dní. Ak sa toxický CPE vyvinie po troch dňoch, bunky sa prenášajú len jeden raz a inkubujú tak, aby bolo dosiahnutých celkovo 14 dní od primárneho naočkovania. Počas posledných siedmich dní inkubácie nesmie byť zistený žiadny dôkaz toxicity.

Ak napriek ošetreniu antibiotikami dôjde k bakteriálnej kontaminácii, subkultivácii predchádza centrifugácia pri 2 000 to 4 000 × g počas 15 až 30 minút pri teplote 2 až 5 °C alebo filtrácia supernatantu cez 0,45 µm filter (membrána s nízkou väzbou bielkovín) alebo oba tieto kroky. Okrem toho subkultivácia uplatňuje rovnaké postupy ako postupy opísané pri toxickom CPE vo štvrtom odseku tohto bodu.

Ak sa nevyskytne CPE, test sa môže vyhlásiť za negatívny.

I.6. Identifikácia vírusu

Ak bol zistený dôkaz prítomnosti CPE v bunkovej kultúre, médium (supernatant) sa odoberie a vyšetrí jednou alebo viacerými z týchto techník: imunoenzymatická reakcia (ELISA), imunofluorescencia (IF), neutralizácia, RT-PCR alebo RT-qPCR. Ak tieto testy neumožnia definitívnu identifikáciu vírusu do jedného týždňa, supernatant sa odošle do národného referenčného laboratória alebo referenčného laboratória EÚ pre choroby rýb uvedeného v prílohe VI k smernici 2006/88/ES na okamžitú identifikáciu.

I.6.1. ELISA

Sendvičová ELISA s dvojitou protilátkou sa vykoná s cieľom identifikovať izolát vírusu. Mikrotitračné platničky sú potiahnuté 50 µl/jamku (0,9 pg) imunoglobulínmi (Ig) prečistenými vysokokvalitným proteínom A z králičieho antiséra proti IHNV alebo VSHV, ktoré sú rozpustené v uhličitanovom tlmivom roztoku (pH 9,6) s obsahom 15 mM azidu sodného, a inkubujú sa od 18 hodín do 2 týždňov pri teplote 4 °C.

Na riediacej platničke sa každá vzorka s obsahom 1 % Triton X-100 a pozitívne kontrolné vzorky zriedia tlmivým roztokom (konkrétne fosfátovým tlmivým fyziologickým roztokom (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) v týchto štyroch pomeroch riedenia: neriedený, 1:4, 1:16, 1:64. Platničky ELISA sa premyjú PBS s obsahom 0,05 % Tween-20 (PBS-T) a z riediacej platničky sa na premytú a potiahnutú platničku ELISA prenesie 50 µl každého riedenia.

Platničky ELISA sa potom inkubujú počas 30 minút pri teplote 37 °C. Platničky sa následne premyjú a inkubujú počas 30 minút pri teplote 37 °C so špecifickými monoklonálnymi protilátkami (na identifikáciu VHSV sa použije MAb IP5B11 a na identifikáciu IHNV sa použije Hyb 136-3, v danom poradí). Na platničku ELISA sa prenesie 50µl králičích protimyšacích protilátok konjugovaných s chrenovou peroxidázou, zriedených v pomere 1:1 000 v PBS-T-BSA.

Nakoniec, po opätovnom premytí, sa vyvolajú reakcie pridaním ortofenyléndiamínu (OPD) v množstve 50 µl/jamku. Platničky ELISA sa inkubujú počas 20 minút pri izbovej teplote v tme a reakcia sa zastaví pridaním 100 µl 0,5 M H_2SO_4/jamku.

Absorbancia sa monitoruje pri vlnovej dĺžke 492 a 620 nm v zariadení na čítanie platničiek ELISA. Vzorky sa označia ako pozitívne alebo negatívne porovnaním hodnôt testovaných vzoriek s hodnotami absorbancie pozitívnach a negatívnych kontrol. Vo všeobecnosti sa vzorky s kombinovanou absorbanciou (A) < 0,5 pri nezriedenom materiáli považujú za negatívne, vzorky s hodnotami A medzi 0,5 a 1,0 sa považujú za podozrivé a vzorky s hodnotami A > 1,0 sa považujú za pozitívne.

Namiesto verzií ELISA, ktoré sú uvedené v tomto bode, sa môžu použiť iné verzie ELISA s preukázanou podobnou účinnosťou.

I.6.2. Imunofluorescencia – IF

Identifikácia patogénov VHSV a IHNV uvedených v zozname sa vykoná infikovaním buniek v čiernych „Black" 96-jamkových platničkách, bežných 24-jamkových platničkách alebo na krycích sklíčkach do 24-jamkových platničiek. Ak sa VHSV alebo IHNV alebo oba zistia infikovaním buniek na krycích sklíčkach, uplatňuje sa tento protokol:

a) krycie sklíčka sa vysejú bunkami s hustotou, ktorá povedenie k zhlukovaniu medzi 60 % a 90 % po 24 hodinách od kultivácie. Na tento účel sa podľa možnosti použijú bunky EPC z dôvodu ich silnej priľnavosti k skleným povrchom, pričom však môžu byť použité aj iné bunkové línie, ako je BF-2, RTG-2 alebo FHM. 150 µl supernatantu bunkovej kultúry v dvoch rozdielnych riedeniach (1:10 and 1:1 000) sa naočkuje duplicitne na jednodňové jednovrstvové bunkové kultúry a inkubuje pri teplote 15 °C počas 24 hodín;

b) médium na kultiváciu buniek sa následne odstráni a infikované jednovrstvové bunkové kultúry sa fixujú 0,5 ml ľadového vodného acetónového roztoku (80 % vol:vol). Fixácia sa uskutoční v digestóriu počas 15 minút pri izbovej teplote, potom sa acetónový roztok odstráni a krycie sklíčka sa aspoň 30 minút sušia na vzduchu. V tejto fáze sa platničky buď ihneď spracujú alebo skladujú pri teplote – 20 °C na ďalšie použitie;

c) špecifické monoklonálne protilátky (na identifikáciu VHSV sa použije monoklonálna protilátka MAb IP5B11 a na identifikáciu IHNV sa použije Hyb 136-3, v danom poradí) sa zriedia v 0,01 M PBST, pH 7,2, v pomere odporučenom dodávateľom týchto monoklonálnych protilátok; 50 až 100 µl/jamku sa pridá k fixovanej jednovrstve a platničky sa inkubujú počas jednej hodiny pri teplote 37 °C vo vlhkej komore;

d) krycie sklíčka sa trikrát jemne premyjú PBS s obsahom 0,05 % Tween-20 (PBS-T) a tlmivý roztok sa po poslednom premytí úplne odstráni. Bunky sa potom inkubujú počas jednej hodiny pri teplote 37 °C s protilátkami proti myšiemu imunoglobulínu konjugovanými s fluorescenčným izotiokyanátom (FITC) alebo tetrametylrodamín-5-(and-6-) izotiokyanátom (TRITC), použitých ako primárna protilátka, zriedených podľa pokynov dodávateľa, potom sa opäť premyjú PBS-T a sušia. Farbené kultúry sa montujú na podložných sklíčkach s použitím roztoku glycerínu a vyšetrujú pod dopadajúcim ultrafialovým (UV) svetlom. Používajú sa okuláre 10 × alebo 12 × a šošovky objektívu × 25 alebo × 40 s numerickou apertúrou > 0,7 a > 1,3 (v danom poradí).

Pokiaľ ide o bunkové kultúry, fixáciu a protilátky referenčnej kvality, môžu byť alternatívne použité iné metódy IF s podobnou preukázanou účinnosťou.

I.6.3. Neutralizácia

Bunky sa z odobratého supernatantu odstránia centrifugáciou (2 000 až 4 000 × *g*) alebo membránovou filtráciou (0,45 μm) s membránou s nízkou väzbou bielkovín a supernatant sa zriedi v pomere 1:100 and 1:10 000 v médiu na kultiváciu buniek.

Pomerné časti minimálne dvoch riedení supernatantu sa zmiešajú a inkubujú počas 60 minút pri teplote 15 °C s rovnakými časťami nasledovných činidiel osobitne:

a) sérum obsahujúce skupinovo špecifickú protilátku proti VHSV pri riedení 1:50 (obj:obj);

b) sérum obsahujúce skupinovo špecifickú protilátku proti IHNV pri riedení 1:50 (obj:obj);

c) zmesné antiséra proti indigénnym sérotypom IPNV pri zriedení 1:50 (obj:obj);

d) samotné médium (pozitívna kontrola).

Z každej zmesi vírusového supernatantu a séra sa naočkujú aspoň dve bunkové kultúry (každá 50 μl) a potom sa inkubujú pri teplote 15 °C. Vývoj CPE sa kontroluje podľa opisu v bode I.5.4.

Kmene a izoláty VHSV, ktoré pri neutralizačných testoch nereagujú, sa identifikujú prostredníctvom IF alebo ELISA.

Alternatívne môžu byť použité iné neutralizačné testy s podobnou preukázanou účinnosťou.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Príprava vírusovej RNA

Celá práca s RNA sa vykonáva na ľade a s použitím rukavíc.

RNA sa extrahuje fenol-chloroformovou metódou alebo pomocou centrifugačných kolón s afinitou k RNA, podľa pokynov výrobcu. Môžu sa použiť komerčne dostupné súpravy na extrakciu RNA, ktorými sa získa kvalitná RNA vhodná na použitie s protokolmi RT-PCR, ktoré sú podrobne opísané v nasledujúcich bodoch.

RNA sa resuspenduje v destilovanej vode bez RNázy (konkrétne vode ošetrenej 0,1 % dietyl pyrokarbonátom), alebo vo vhodnom elučnom tlmivom roztoku.

I.6.4.2. RT-PCR

Na zistenie IHNV sa použijú tieto primery:

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

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

Použijú sa tieto cykly (jednokroková RT-PCR): 1 cyklus: 50 °C počas 30 minút; 1 cyklus: 95 °C počas 2 minút; 30 cyklov: 95 °C počas 30 sekúnd, 50 °C počas 30 sekúnd, 72 °C počas 60 sekúnd; 1 cyklus: 72 °C počas 7 minút s namočením pri 4 °C.

Na zistenie VHSV sa použijú tieto primery:

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

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

Použijú sa tieto cykly (jednokroková RT-PCR): 50 °C počas 30 minút, 95 °C počas 15 minút, 35 cyklov pri 94 °C počas 30 sekúnd, 55 °C počas 30 sekúnd a 68 °C počas 60 sekúnd. Následne prebieha reakcia pri teplote 68 °C počas 7 minút.

Množstvo a špecificita RT-PCR reakcií sa hodnotí pomocou gélovej elektroforézy v 1,5 % agarózovom géli s etídium-bromidom a s pozorovaním pomocou UV transiluminácie. Pri IHNV možno pozorovať PCR amplikón s veľkosťou 693 bp. V prípade VHSV ide o veľkosť 505 bp.

Výsledky PCR sa môžu líšiť v závislosti od podmienok, v ktorých sa vykonáva, konkrétne môže byť v závislosti od používaného termocykléra potrebné optimalizovať termálne protokoly. Okrem toho môže dôjsť k falošne pozitívnym výsledkom z dôvodu nesprávnej anelácie primeru alebo kontaminácie laboratória. S cieľom vyhnúť sa akejkoľvek pochybnosti sa preto použijú adekvátne pozitívne a negatívne kontrolné vzorky a sekvenované amplikóny. V prípade primerov VHSV treba venovať osobitnú pozornosť používaniu buniek BF-2, keďže primery môžu reagovať s DNA/RNA tejto bunkovej línie a spôsobiť falošne pozitívne výsledky podobnej veľkosti. Pri testovaní supernatantu z buniek BF-2 sa sekvenujú všetky fragmenty amplifikované pomocou PCR.

I.6.4.3. RT-qPCR v prípade VHSV

V prípade VHSV sa amplifikácia vykonáva s použitím týchto primerov a tejto sondy:

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

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

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

Jednokroková RT-qPCR:

Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky. Podmienky cyklovania: 50 °C počas 30 minút, 95 °C počas 15 minút, 40 cyklov pri 94 °C počas 15 sekúnd, 60 °C počas 40 sekúnd a 72 °C počas 20 sekúnd; v prípade potreby sa tieto podmienky upravia. Alternatívne môžu byť použité iné verzie RT-PCR alebo RT-qPCR s podobnou preukázanou účinnosťou.

I.6.4.4. RT-qPCR v prípade IHNV

V prípade IHNV sa amplifikácia vykonáva s použitím týchto primerov a sondy:

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

Reverzný primer: 5′- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3′;

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

Dvojkroková RT-qPCR:

Keďže táto skúška závisí od dvojkrokovej amplifikácie, je potrebné venovať osobitnú pozornosť zaobchádzaniu so skúmavkami medzi jednotlivými reakciami, aby sa predišlo kontaminácii.

Podmienky cyklovania (po kroku RT): 50 °C počas 2 minút, 95 °C počas 10 minút, potom nasleduje 40 cyklov pri 95 °C počas 15 sekúnd a 60 °C počas 1 minúty; v prípade potreby sa tieto podmienky upravia.

Alternatívne môžu byť použité iné verzie RT-PCR alebo RT-qPCR s podobnou preukázanou účinnosťou.

II. **Podrobné diagnostické metódy a postupy na potvrdenie alebo vylúčenie podozrenia na VHS alebo IHN alebo oboch chorôb pri podozrení na ohniská**

Ak sa na potvrdenie alebo vylúčenie prítomnosti IHN alebo VHS alebo oboch chorôb vyžaduje laboratórne vyšetrenie v súlade s článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES s použitím diagnostických metód uvedených v bode II.3 časti 1 prílohy I, uplatňujú sa tieto podrobné diagnostické metódy a postupy:

a) konvenčná izolácia vírusu s následnou sérumneutralizačnou, imunochemickou alebo molekulárnou identifikáciou vírusu;

b) detekcia vírusu prostredníctvom RT-PCR alebo RT-qPCR;

c) iné diagnostické techniky, ako sú IFAT, ELISA, RT-PCR, IHC.

II.1. Konvenčná izolácia vírusu s následnou identifikáciou vírusu

II.1.1. Výber vzoriek

Na vyšetrenie sa vyberie aspoň 10 rýb, ktoré majú typické príznaky IHN alebo VHS.

II.1.2. Príprava a zasielanie vzoriek rýb

Pri príprave a zasielaní na účely konvenčnej izolácie vírusu sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.2.

II.1.3. Odber doplnkového diagnostického materiálu

Pri odbere doplnkového materiálu na účely konvenčnej izolácie vírusu sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.3.

II.1.4. Príprava vzoriek na vyšetrenie bunkovej kultúry

Pri príprave vzoriek na vyšetrenie bunkovej kultúry na účely konvenčnej izolácie vírusu sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.4.

II.1.5. Virologické vyšetrenie na bunkovej kultúre

Pri virologickom vyšetrení na účely konvenčnej izolácie vírusu sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.5.

II.1.6. Identifikácia vírusu

Pri identifikácii vírusu na účely konvenčnej izolácie vírusu sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.6.

II.2. Detekcia vírusu prostredníctvom RT-qPCR

II.2.1. Výber vzoriek

Pri výbere vzoriek na účely detekcie vírusu prostredníctvom RT-qPCR sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.1.2.

II.2.2. Príprava a zasielanie vzoriek rýb

Pri príprave a zasielaní na účely detekcie vírusu prostredníctvom RT-qPCR sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.2.

II.2.3. Odber doplnkového diagnostického materiálu

Pri odbere doplnkového diagnostického materiálu na účely detekcie vírusu prostredníctvom RT-qPCR sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.3.

II.2.4. Príprava vzoriek na RT-qPCR

Pri príprave vzoriek na účely detekcie vírusu prostredníctvom RT-qPCR sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bode I.6.4.1.

II.2.5. RT-qPCR

Pri detekcii vírusu prostredníctvom RT-qPCR sa dodržiavajú metódy a postupy uvedené v bodoch I.6.4.1, I.6.4.3 a I.6.4.4.

II.3. Iné diagnostické techniky

Supernatant pripravený podľa opisu v bode I.4.3. sa môže predložiť na test ELISA, nepriamy imunofluorescenčný test (IFAT) alebo na RT-PCR v súlade s bodom I.6.1, bodom I.6.2 alebo bodom I.6.4 (v uvedenom poradí). Tkanivový materiál môže byť podrobený iným diagnostickým technikám, ako je IFAT na rezoch zmrazeného materiálu, imunohistochémia tkaninového materiálu fixovaného formalínom. Uvedené rýchle techniky sa doplnia virologickým vyšetrením v súlade buď s bodom II písm. a), alebo bodom II písm. b), do 48 hodín po odbere vzoriek, ak:

a) je zistený negatívny výsledok; alebo

b) je zistený pozitívny výsledok pri materiáli, ktorý predstavuje prvý prípad IHN alebo VHS.

III. **Postup titrácie na overenie vnímavosti bunkových kultúr na infekciu**

Ak sa vykoná titrácia na overenie vnímavosti bunkových kultúr na infekciu, ako je uvedené v bode I.5.3, dodržiavajú sa postupy uvedené v nasledujúcich odsekoch tohto bodu.

Použijú sa aspoň dva izoláty VHSV a jeden izolát IHNV. V izolátoch musí byť zastúpená hlavná skupina vírusov v Európskej únii, konkrétne v prípade VHSV jeden patogénny izolát pstruha dúhového v sladkej vode a jeden patogénny izolát kambaly veľkej v slanej vode a v prípade IHNV jeden patogénny kmeň pstruha dúhového z Európskej únie. Použijú sa dobre definované izoláty z členských štátov. Dávky vírusov s nízkymi číslami pasáže sa množia v bankách s bunkovými kultúrami na bunkách BF-2 alebo RTG-2 v prípade VHSV a na bunkách EPC alebo FHM v prípade IHNV. Použije sa médium na kultiváciu buniek s aspoň 10 % sérom. Na naočkovanie sa použije nízke MOI (< 1).

V prípade celkového CPE sa vírus získava 15-minútovou centrifugáciou supernatantu bunkovej kultúry pri 2 000 × *g* počas 15 minút, podrobí sa sterilizačnej filtrácii pomocou membránového filtra (0,45 μm) a distribuuje v označených kryoskúmavkách. Vírus sa uchováva pri teplote – 80 °C.

Týždeň po zmrazení sa tri vialky s každým vírusom nechajú rozmraziť v studenej vode a titrujú sa na svojich príslušných bunkových líniách. Aspoň každých šesť mesiacov alebo ak existuje podozrenie na zníženie vnímavosti bunkovej línie, sa každý izolát vírusu rozmrazí a titruje.

Postupy titrácie musia byť podrobne opísané a vždy musí byť použitý rovnaký postup.

Titrácia s riedením až do konečného bodu zahŕňa najmenej šesť opakovaní každého kroku riedenia. Titre sa porovnajú s predtým získanými titrami. Ak sa titer ktoréhokoľvek z troch izolátov vírusu zníži o 2 logs alebo viac v porovnaní so začiatočným titrom, bunková línia sa ďalej nepoužíva na účely dohľadu.

Ak sa v laboratóriu nachádzajú rôzne bunkové línie, každá línia sa skúma osobitne.

Záznamy sa uchovávajú aspoň počas obdobia 10 rokov.

ČASŤ 2

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METÓDY A POSTUPY V PRÍPADE DOHĽADU NAD HERPESVIRÓZOU KAPROV KOI (KHVD) A V PRÍPADE JEJ POTVRDENIA

I. **Podrobné diagnostické metódy a postupy na potvrdenie prítomnosti KHVD alebo na vylúčenie podozrenia na KHVD**

Ak sa na na potvrdenie prítomnosti KHVD alebo na vylúčenie podozrenia na KHVD vyžaduje laboratórne vyšetrenie v súlade s článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES s použitím diagnostických metód uvedených v oddiele III časti 2 prílohy I, uplatňujú sa tieto podrobné diagnostické metódy a postupy uvedené v bodoch I.1 – I.2 tejto časti:

I.1. Príprava vzoriek rýb

Na diagnostické účely sa na testovanie štandardnými metódami založenými na PCR alebo qPCR môžu používať ryby (zasielané živé alebo zabité a balené oddelene v zapečatených aseptických nádobách) alebo mrazené orgány alebo časti orgánov konzervované v 80 % až absolútnom etanole alebo vo vírusovom transportnom médiu (je potrebné ich spracovať do 48 hodín po odbere).

Na detekciu KHV sa odoberú žiabre a obličky; okrem toho sa do dodatočnej oddelenej vzorky môže zahrnúť slezina, mozog a črevo. V naliehavých prípadoch sa môže spojiť tkanivový materiál až piatich rýb.

Okrem toho sa v určitých prípadoch môžu použiť neletálne vzorky, ako je krv, výtery zo žiaber, biopsia zo žiaber či ster hlienu (konkrétne v prípade podozrenia na výskyt KHV sa môžu použiť veľmi cenné ryby).

I.1.1. Extrakcia DNA

DNA sa extrahuje v súlade so štandardnými postupmi.

Môžu sa použiť komerčne dostupné súpravy na extrakciu DNA, ktorými sa získava kvalitná DNA vhodná na použitie s protokolmi PCR uvedenými v bode I.2.

I.2. Detekcia pôvodcu a identifikácia prostredníctvom metód založených na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR)

I.2.1. qPCR na detekciu KHV

Na detekciu KHV prostredníctvom qPCR sa použije táto skúška qPCR:

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

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

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

Podmienky cyklovania: jeden cyklus pri 95 °C počas 15 minút, po ktorom nasleduje 40 cyklov pri 94 °C počas 15 sekúnd a 60 °C počas 60 sekúnd. Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky. Alternatívne však môžu byť použité iné verzie qPCR s podobnou preukázanou účinnosťou.

I.2.2. Konvenčné PCR na detekciu KHV

Použije sa skúška opísaná v tomto bode zameraná na gén pre tymidínkinázu (TK) KHV. Namiesto nej sa môžu použiť iné skúšky PCR s preukázanou podobnou citlivosťou a osobitosťami, aké má opísaná skúška.

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

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

Podmienky cyklovania: jeden cyklus pri 95 °C počas 5 minút, po ktorom nasleduje 35 cyklov pri 95 °C počas 30 sekúnd, 52 °C počas 30 sekúnd, 72 °C počas jednej minúty a jeden cyklus pri 72 °C počas 10 minút. Veľkosť produktu by mala byť 409 bp.

Výsledky PCR sa môžu líšiť v závislosti od podmienok, v ktorých sa vykonáva, konkrétne môže byť v závislosti od používaného termocykléra potrebné optimalizovať termálne protokoly. Okrem toho môžu nastať falošne pozitívne výsledky z dôvodu nesprávnej teplotnej hybridizácie primeru alebo kontaminácie. Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky. Namiesto nej však môžu byť použité iné verzie PCR s preukázanou podobnou účinnosťou.

Prvé zistenie v oblasti sa potvrdí sekvenovaním alebo sa pošle na okamžitú identifikáciu do národného referenčného laboratória alebo referenčného laboratória EÚ pre choroby rýb uvedeného v prílohe VI k smernici 2006/88/ES.

II. **Podrobné diagnostické metódy a postupy dohľadu v prípade KHVD**

Pri výkone odberu vzoriek a laboratórneho vyšetrenia na účely získania alebo udržania určitých zdravotných štatútov v súvislosti s KHVD podľa oddielu I časti 2 prílohy I s použitím diagnostických metód stanovených v oddieloch II alebo III časti 2 uvedenej prílohy sa uplatňujú podrobné diagnostické metódy a postupy uvedené v nasledujúcich bodoch II.1 a II.2 tejto časti.

II.1. Príprava vzoriek rýb

Ak je to možné, odoberú sa vzorky rýb, ktoré boli dlhší čas držané v teplotnom rozsahu priaznivom pre vírus (konkrétne dva až tri týždne pri teplote 15 °C až 26 °C). Ak je to možné, vzorky sa odoberú 24 hodín, ale nie neskôr ako 72 hodín, po postupoch riadenia, ktoré môžu vírus reaktivovať pri rybách so štatútom prenášača, ako je odchyt rýb do sietí alebo doprava, s cieľom zvýšiť šancu detekcie KHV.

Na účely dohľadu nad KHVD sa môžu na testovanie metódami založenými na PCR zasielať ryby živé alebo zabité a balené oddelene v zapečatených aseptických nádobách alebo mrazené orgány, alebo časti orgánov konzervované v 80 % až 100 % alkohole alebo vo vírusovom transportnom médiu (je potrebné ich spracovať do 48 hodín po odbere). Pri dohľade nad KHVD sa odoberú žiabre a obličky.

Na účely dohľadu nad KHVD je podľa možností potrebné čo najviac sa vyhýbať spájaniu vzoriek. Ak je spájanie nevyhnutné, môže sa spojiť tkanivový materiál najviac z dvoch rýb. Väčšie vzorky sa homogenizujú v trecej miske a roztieradle alebo v homogenizátori stomacher a čiastkové vzorky sa získajú na extrakciu DNA pred objasnením. Alternatívnym spôsobom môže byť odobranie čiastkových vzoriek z každého tkaniva zaradeného do vzorky a ich umiestnenie v skúmavkach na lýzu.

II.1.1. Extrakcia DNA

DNA sa extrahuje v súlade so štandardnými postupmi. Môžu sa použiť komerčne dostupné súpravy na extrakciu DNA, ktorými sa získava kvalitná DNA vhodná na použitie s protokolmi PCR, ktoré sú uvedené v bode II.2.

Prijateľný pomer medzi tkanivom a médiom je 1:9 w/v. Do testov sa zahrnie 20 až 25 mg tkanivového materiálu.

II.2. Dohľad nad KHVD prostredníctvom metód založených na PCR

Na účely dohľadu nad KHV sa použije qPCR. Ak sa v oblasti, ktorá predtým nebola potvrdená ako pozitívna, objavia pozitívne vzorky, výsledky testu sa potvrdia buď:

a) sekvenovaním produktu PCR alebo vnorenej PCR zo vzoriek.

Získaná čistá konsenzus sekvencia zodpovedá (najmenej 98 %) týmto referenčným sekvenciám;

b) alebo alternatívne sa vzorky môžu poslať do národného referenčného laboratória na potvrdenie.

II.2.1. qPCR na detekciu KHV

Použije sa qPCR zodpovedajúca tomuto opisu:

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

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

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

Podmienky cyklovania: jeden cyklus pri 95 °C počas 15 minút, po ktorom nasleduje 50 cyklov pri 94 °C počas 15 sekúnd a 60 °C počas 60 sekúnd.

Výsledky qPCR sa môžu líšiť v závislosti od podmienok, v ktorých sa vykonáva, konkrétne môže byť v závislosti od používaného termocykléra potrebné optimalizovať termálne protokoly. Okrem toho môže dôjsť k falošne pozitívnym výsledkom z dôvodu nesprávnej anelácie primeru alebo kontaminácie laboratória. Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky.. Namiesto tohto postupu však môžu byť použité iné verzie qPCR s preukázanou podobnou účinnosťou.

II.2.2. Štandardná PCR na potvrdenie detekcie KHV

Na potvrdenie prítomnosti infekcie KHV sa použije štandardná vnorená PCR opísaná v nasledujúcej tabuľke 2.1, po ktorej nasleduje sekvenovanie amplifikovaného produktu.

Tabuľka 2.1

Primery a podmienky na vnorenú PCR zameranú na všetky koi herpesvírusy (CyHV-1, CyHV-2 a CyHV-3)

Názov primeru	Sekvencia	Podmienky cyklovania	Veľkosť produktu
CyHVpol-priamy	5′-CCAGCAACATGTGCGACGG-3′	Prvé kolo PCR *1 cyklus:* 95 °C počas 2 minút *40 cyklov:* 95 °C počas 30 sekúnd 55 °C počas 30 sekúnd 72 °C počas 45 sekúnd *1 cyklus:* 72 °C počas 10 minút	362 bp
CyHVpol-reverzný	5′-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3′		

Názov primeru	Sekvencia	Podmienky cyklovania	Veľkosť produktu
CyHVpol-vnútorný priamy	5′-CGACGGVGGYATCAGCCC-3′	Druhé kolo PCR *1 cyklus:* 95 °C počas 2 minút, *40 cyklov:* 95 °C počas 30 sekúnd 55 °C počas 30 sekúnd 72 °C počas 45 sekúnd *1 cyklus:* 72 °C počas 10 minút	339 bp
CyHVpol-vnútorný reverzný	5′-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3′		

Výsledky PCR sa môžu líšiť v závislosti od podmienok, v ktorých sa vykonáva, konkrétne môže byť v závislosti od používaného termocykléra potrebné optimalizovať termálne protokoly. Okrem toho môže dôjsť k falošne pozitívnym výsledkom z dôvodu nesprávnej anelácie primeru alebo kontaminácie laboratória. Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky. Namiesto nej môžu byť použité verzie PCR s preukázanou podobnou účinnosťou.

Sekvenovanie môže vykonávať laboratórium alebo sa môže vykonávať v externých spoločnostiach špecializovaných na sekvenovanie. Výsledky sekvenovania sa analyzujú zosúladením sekvencií na známe referenčné sekvencie KHV (prístupové čísla v Gen Bank sú AP008984, DQ657948 a DQ177346). Získaná čistá konsenzus sekvencia musí zodpovedať uvedeným referenčným sekvenciám aspoň na 98 %.

ČASŤ 3

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METÓDY A POSTUPY NA DOHĽAD NAD INFEKČNOU ANÉMIOU LOSOSOV (ISA) A NA POTVRDENIE INFEKČNEJ ANÉMIE LOSOSOV (ISA)

I. **Postupy odberu vzoriek na účely dohľadu nad ISA a jej kontroly**

Pri vykonávaní odberu vzoriek a laboratórneho vyšetrenia na účely programov dohľadu alebo eradikačných programov podľa časti 3 prílohy I alebo na potvrdenie alebo vylúčenie prítomnosti ISA v súlade s článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES sa uplatňujú podrobné metódy a postupy uvedené v bodoch I.1, I.2 a I.3 tejto časti.

I.1. Príprava vzoriek rýb

Na účely laboratórneho vyšetrenia na zistenie prítomnosti ISA sa vzorky rýb podľa možnosti nespájajú. Na účely dohľadu nad ISA je však prijateľné spájanie vzoriek 2 až 5 rýb.

Vzorky na analýzu polymerázovou reťazovou reakciou spojenou s reverznou transkripciou (RT-PCR) sa odoberajú zo všetkých rýb, ktoré sú predmetom odberu vzoriek. Časť zadnej obličky sa z ryby odstráni použitím sterilného nástroja a prenesie sa do mikroskúmavky, ktorá obsahuje 1 ml roztoku konzervujúceho RNA preukázanej účinnosti. Tkanivá maximálne z piatich rýb sa môžu odobrať do jednej skúmavky, ktorá obsahuje prepravný roztok, a predstavujú jednu zmesnú vzorku. Hmotnosť tkaniva v jednej vzorke je 0,5 g. Ak sú ryby príliš malé na to, aby sa získala vzorka požadovanej hmotnosti, môžu byť odobraté časti obličky, srdca, sleziny, pečene alebo pylorického slepého čreva v tomto poradí tak, aby ich hmotnosť bola 0,5 g.

Tkanivo na histologické vyšetrenie sa odoberá iba z čerstvo zabitých rýb s normálnou konštitúciou, ktoré vykazujú klinické príznaky alebo nálezy *post-mortem* svedčiace o prítomnosti ISA. Vzorky sa odoberú z akýchkoľvek vonkajších alebo vnútorných lézií, v každom prípade sa však z jednotlivých rýb odoberú vzorky zo zadnej obličky, srdca, pečene, pankreasu, čreva, žiaber a sleziny s použitím skalpela a prenesú sa do slaného tlmiaceho roztoku 8 až 10 % (vol:vol) formalínu. Pomer medzi fixatívom a tkanivom je aspoň 20:1, aby sa zabezpečila spoľahlivá konzervácia tkanív. Na imunohistochémiu (IHC) sa odoberú vzorky zo zadnej obličky a srdca.

Tkanivá na virologické vyšetrenie na bunkovej kultúre sa odoberajú zo všetkých rýb, ktoré sú predmetom odberu vzoriek. Časti pečene, prednej alebo zadnej obličky, srdca a sleziny sa z rýb odoberajú pomocou sterilného nástroja a prenesú sa do plastových skúmaviek obsahujúcich 9 ml transportného média. Tkanivá maximálne z piatich rýb sa môžu zbierať do jednej skúmavky, ktorá obsahuje prepravný roztok, a to predstavuje jednu zmesnú vzorku. Hmotnosť tkaniva v jednej vzorke je 1,0 ± 0,5 g.

I.2. Odosielanie vzoriek rýb

Do laboratória sa môžu prepravovať tiež celé ryby, ak môžu byť počas dopravy splnené teplotné požiadavky, ako je opísané v ods. 3 Celá ryba sa zabalí do sacieho papiera a odošle sa v plastovom vreci, chladená, ako je opísané v uvedenom odseku.

Takisto sa môžu odosielať aj živé ryby, ale iba pod dohľadom národného referenčného laboratória pre choroby rýb a so zohľadnením dodatočných aspektov dezinfekcie a biologickej bezpečnosti pri preprave živých rýb.

Vzorky krvi a skúmavky, ktoré obsahujú tkanivá rýb určené na virologické vyšetrenie alebo analýzu RT-PCR sa umiestnia do izolovaných nádob, ako sú polystyrénové krabice s hrubými stenami, spolu s dostatočným množstvom ľadu alebo mraziacimi blokmi na účely zaistenia chladenia vzoriek počas prepravy do laboratória. Nesmie dôjsť k zmrazeniu a v prepravnej nádobe musí byť v čase prijatia stále ľad alebo musí byť čiastočne alebo úplne zmrazený jeden alebo viaceré z mraziacich blokov. Za mimoriadnych okolností môžu byť vzorky RT-PCR a vzorky na virologické vyšetrenie rýchlo zmrazené a prepravované do laboratória pri teplote – 20 °C alebo nižšej.

Na analýzu RT-PCR tkanív konzervovaných v roztoku Ribonucleic acid (RNA) later sa extrakcia RNA vykonáva v rámci týchto časových rámcov v závislosti od teploty, pri ktorej sa vzorky skladujú:

vzorky skladované pri 37 °C: jeden deň;

vzorky skladované pri 25 °C: jeden týždeň;

vzorky skladované pri 4 °C: jeden mesiac;

vzorky skladované pri – 20 °C: na neurčito.

Ak sú tkanivá rýb prepravované vo fixatíve na histologické vyšetrenie, odosielajú sa v utesnených skúmavkách umiestnených do nádob odolných voči nárazom. Je potrebné vyvarovať sa zmrazeniu vzoriek.

Virologické vyšetrenie na bunkovej kultúre sa začne čo najskôr, a najneskôr do 48 hodín po odobratí vzoriek. Vo výnimočných prípadoch môže virologické vyšetrenie začať najneskôr do 72 hodín po odobratí materiálu, a to za predpokladu, že materiál, ktorý má byť vyšetrovaný, je chránený transportným médiom a počas prepravy je možné dodržať požiadavky na teplotu.

I.3. Odber doplnkového diagnostického materiálu

Na základe schválenia diagnostického laboratória sa môžu odoberať a na doplnkové vyšetrenie pripravovať tkanivá rýb iné ako tie, ktoré sú uvedené v bode I.1.

II. **Podrobné diagnostické metódy a postupy na účely dohľadu nad ISA a na potvrdenie prítomnosti ISA alebo na vylúčenie podozrenia na ISA**

Ak sa vykonávajú laboratórne vyšetrenia na účely získania alebo udržania určitého zdravotného štatútu, pokiaľ ide o ISA, ako sa uvádza v oddiele I časti 3 prílohy I, alebo na účely potvrdenia prítomnosti ISA alebo vylúčenia podozrenia na ISA v súlade s článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES s použitím diagnostických metód uvedených v oddiele II časti 3 prílohy I, uplatňujú sa podrobné metódy a postupy stanovené v týchto bodoch II.1 až II.5.

II.1. Vyšetrenie vzoriek pomocou RT-PCR

Diagnostickou metódou, ktorá sa má používať na skríning ISAV, je RT-qPCR. Keďže výsledky RT-qPCR sa môžu líšiť v závislosti od podmienok, za ktorých sa vykonáva, zahrnú sa adekvátne pozitívne a negatívne kontrolné vzorky a amplikóny s cieľom predísť akýmkoľvek pochybnostiam.

II.1.1. Extrakcia celej RNA

Celá práca s RNA sa vykonáva na ľade a s použitím rukavíc.

Celá RNA sa extrahuje použitím fenol-chloroformovej metódy alebo centrifugačných kolón s afinitou k RNA, podľa pokynov výrobcu.

Purifikovaná RNA sa resuspenduje v destilovanej vode bez RNázy (konkrétne vode ošetrenej 0,1 % dietyl pyrokarbonátom).

Koncentrácia a čistota extrahovanej RNA sa odhaduje meraním optickej hustoty pri 260 nm a pri 280 nm. Alternatívnym spôsobom môže byť zahrnúť vnútorné kontroly zamerané proti genómu vírusu podľa bodu II.1.3.

II.1.2. RT-PCR na detekciu ISAV

Na amplifikáciu genómu ISAV možno použiť niekoľko metód RT-PCR. Dvojkroková RT-PCR, pričom kroky reakcií RT a PCR prebiehajú v dvoch oddelených skúmavkách. Môže sa však takisto vykonať jednokroková reakcia, kde dané dve reakcie prebiehajú v jednej skúmavke. Vždy, keď je to možné, sa použije jednokroková metóda, keďže pri skúške s jednou skúmavkou sa minimalizuje riziko krížovej kontaminácie, keďže sa nemusí uskutočniť prenos obsahu, a táto metóda sa považuje za rovnako citlivú ako dvojkroková metóda.

Použijú sa primery a skúška, ktoré sú opísané v tomto bode, konkrétne pár primerov ILA1 alebo ILA2, ktoré sú zamerané na segment 8 a ktoré sa považujú za vhodné na detekciu ohnísk ISAV a pri rybách, ktoré sú prenášačmi. Reverzný primer ILA2 nezodpovedá izolátom zo Severnej Ameriky a v uvedených prípadoch sa použije alternatívny súbor primerov.

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

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

Podmienky cyklovania: jeden cyklus pri 50 °C počas 30 minút, 1 cyklus pri 94 °C počas 15 minút, 40 cyklov pri 94 °C počas 30 sekúnd, 55 °C počas 30 sekúnd a 72 °C počas 60 sekúnd; jeden cyklus pri 72 °C počas 5 min. Veľkosť produktu 155 bp.

Výsledky PCR sa môžu líšiť v závislosti od podmienok, v ktorých sa vykonáva, konkrétne môže byť v závislosti od používaného termocykléra potrebné optimalizovať termálne protokoly. Okrem toho môže dôjsť k falošne pozitívnym výsledkom z dôvodu nesprávnej anelácie primeru alebo kontaminácie laboratória. Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky. Namiesto nej však môžu byť použité iné verzie RT-PCR s preukázanou podobnou účinnosťou.

II.1.3. RT-qPCR na detekciu ISAV

Používanie RT-qPCR môže zvýšiť špecificitu a pravdepodobne aj citlivosť. Metódu možno vykonať rýchlejšie, keďže sa nevyžaduje gélová elektroforéza, a znižuje sa ňou riziko krížovej kontaminácie, keďže je možné odhadnúť množstvo vírusovej genómovej RNA v skúmavke so vzorkou. Nevýhodou skúšky RT-qPCR je, že často nie je možné sekvenovanie amplifikovaných produktov. Ak však existujú pochybnosti o špecifickosti amplifikovaného produktu, musí sa vykonať ďalšia ISAV-špecifická skúška na overenie výsledku.

Použije sa skúška opísaná v tomto bode, ktorá je skúškou zameranou na segment 8. Táto skúška zahŕňa izoláty z Európskej únie, Európskeho združenia voľného obchodu a Severnej Ameriky. Jednokroková metóda sa použije vždy, keď je to možné, pretože pri skúške s jednou skúmavkou sa minimalizuje riziko krížovej kontaminácie.

Priamy primer: 5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;

Reverzný primer: 5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;

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

Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky. Podmienky cyklovania: jeden cyklus pri 50 °C počas 30 minút, jeden cyklus pri 95 °C počas 15 minút, 40 cyklov pri 94 °C počas 15 sekúnd, 60 °C počas 60 sekúnd; v prípade potreby sa tieto podmienky upravia. Alternatívne môžu byť použité iné verzie RT-PCR alebo RT-qPCR s podobnou preukázanou účinnosťou.

II.1.4. Sekvenovanie amplifikovaných produktov PCR

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

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

Každý beh musí obsahovať negatívne vzorové kontrolné vzorky a pozitívne kontrolné vzorky. Podmienky cyklovania (jednokroková RT-PCR): jeden cyklus pri 50 °C počas 30 minút, jeden cyklus pri 94 °C počas 15 minút, 40 cyklov pri 94 °C počas 30 sekúnd, 55 °C počas 30 sekúnd, 72 °C počas 60 sekúnd a jeden cyklus pri 72 °C počas 5 minút; v prípade potreby sa tieto podmienky upravia. Namiesto toho môžu byť použité iné verzie RT-PCR alebo RT-qPCR s podobnou preukázanou účinnosťou.

Alternatívne sa môže použiť táto metóda na sekvenovanie HPR v segmente 6:

Priamy primer: 5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′;

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

Veľkosť produktu: 304 nt v prípade HPR0.

Môžu sa použiť aj skúšky RT-PCR s podobnou citlivosťou a osobitosťami, ako má skúška opísaná v tomto bode.

Pred sekvenovaním sa skontroluje čistota amplifikovaného produktu RT-PCR pomocou gélovej elektroforézy. Ak sa objaví len jeden čistý fragment, purifikuje sa priamo z reakcie PCR. Ak je prítomných viacero amplifikovaných fragmentov, fragment, ktorý je predmetom záujmu, sa purifikuje gélovou elektroforézou. Purifikácia fragmentov PCR od roztokov alebo agarózových gélov sa uskutoční s použitím centrifugačných kolón s afinitou k PCR fragmentu, podľa pokynov výrobcu.

Sekvenovanie sa vykonáva použitím amplifikovaných primerov v externých spoločnostiach špecializovaných na sekvenovanie. Výsledky sekvenovania sa analyzujú nástrojom vyhľadávania BLAST a sekvencie sa porovnávajú s ostatnými známymi sekvenciami v databáze nukleotidov národného centra USA pre biotechnologické informácie (US National Centre for Biotechnical Information – NCBI).

Sekvenovaním sa musí odstrániť akákoľvek pochybnosť o špecifickosti amplifikovaného produktu RT-PCR.

II.2. Izolácia ISAV na bunkových kultúrach

II.2.1. Príprava vzoriek

Tkanivo sa môže uchovávať pri teplote – 80 °C. Tkanivo sa pred vyšetrením zmrazí a rozmrazí iba raz. Na účely dohľadu a kontroly sa vyšetrenie uskutoční čo najskôr.

Každá vzorka (zmes tkaniva v prepravnom roztoku) sa úplne homogenizuje použitím validovaného homogenizátora, centrifuguje sa pri 2 000 až 4 000 × *g* počas 15 minút pri teplote 0 až 6 °C a supernatant sa filtruje (0,45 µm) a inkubuje rovnakým objemom zmesi vhodne zriedeného antiséra proti indigénnym sérotypom IPNV. Titer antiséra musí byť aspoň 1:2 000 v 50 % plakovom neutralizačnom teste. Zmes sa inkubuje počas jednej hodiny pri teplote 15 °C. To prestavuje inokulum.

Cieľom spracovania všetkých inokul s antisérom proti vírusu infekčnej pankreatickej nekrózy (vírus, ktorý sa v niektorých častiach Európy vyskytuje pri 50 % vzoriek rýb) je zabrániť výskytu cytopatického efektu CPE v naočkovaných bunkových kultúrach v dôsledku vírusu IPN. Takéto ošetrenie sa môže vykonať, aby sa skrátilo trvanie virologických vyšetrení, ako aj počet prípadov, pri ktorých by výskyt CPE musel byť považovaný za potenciálny indikátor ISAV. Ak vzorky pochádzajú z výrobných jednotiek, ktoré sú považované za jednotky bez výskytu vírusu IPN, ošetrenie inokulom s antisérom proti vírusu IPN sa smie vynechať.

II.2.2. Naočkovanie na bunkových kultúrach

Na primárnu izoláciu ISAV sa použijú bunky z obličky lososa atlantického (ASK). Môžu byť použité aj iné bunkové línie s preukázanou účinnosťou a citlivosťou na izolovanie vírusu ISA, pričom sa zohľadňuje variabilita kmeňa a schopnosť rôznych kmeňov rozmnožovať sa v rôznych bunkových líniách. Zdá sa, že bunky ASK podporujú izoláciu a rast doteraz známych izolátov vírusu, pokiaľ sa používa úroveň s nízkou pasážou. V bunkách ASK sa môže objaviť výraznejší cytopatický efekt (CPE) ako v iných vnímavých bunkových líniách ako SHK-1 (Salmon head kidney-1).

Bunky ASK (pasáž 65 alebo nižšia) sa kultivujú v prostredí L-15 obsahujúcom 10 % fetálne bovinné sérum, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamín a 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanol na viacjamkových platničkách. Suspenzia orgánov ošetrená antisérom sa naočkuje do mladých aktívne rastúcich bunkových kultúr, aby sa dosiahlo konečné riedenie tkanivového materiálu v kultivačnom médiu v pomere 1:1 000. V prípade každého orgánu sa pridá suspenzia 40 µl inokula do jednej jamky obsahujúcej 2 ml kultivačného média. Na účely minimalizácie rizika krížovej kontaminácie sa použijú samostatné platničky s 12 alebo 24 jamkami v prípade vzoriek pochádzajúcich z rôznych fariem s chovom rýb.

Jedna platnička zostane nenaočkovaná, aby slúžila ako negatívna kontrolná vzorka. Osobitná platnička sa naočkuje referenčným izolátom ISAV ako pozitívna kontrola podľa nasledujúceho postupu. 100 µl zásobného roztoku ISAV (minimálny titer 10^7 infekčnej dávky pre tkanivovú kultúru v 50 % koncovom bode (TCID50 ml^{-1})) sa naočkuje do prvej jamky a premieša. Objem tohto materiálu sa prenesie z prvej jamky do druhej, aby sa získalo riedenie v pomere 1:10 a premieša sa. Tento postup sa opakuje v celej platničke, aby sa získalo šesť riedení v pomere 1:10. Zásobný roztok ISAV sa môže uchovávať pri teplote – 80 °C počas obdobia minimálne dvoch rokov, ale ak sa raz rozmrazí musí sa použiť do troch dní. Pozornosť sa venuje tomu, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii testovacích platničiek s pozitívnym kontrolným materiálom. Aby sa zabránilo tomuto riziku, pripravia sa pozitívne kontrolné vzorky a pracuje sa s nimi oddelene od testovacích platničiek. Uplatňovanie zaradenia pozitívnej kontroly pri každom naočkovaní môže nahradiť test citlivosti buniek ASK voči izolátom ISAV.

Vzorky sa inkubujú pri teplote 15 ± 2 °C počas obdobia maximálne 15 dní. Použitím mikroskopu sa dvakrát vyšetrujú bunkové kultúry na zistenie CPE, najskôr v období medzi piatym a siedmym dňom, a potom medzi dvanástym a štrnástym dňom po naočkovaní. Ak niektorá zmesná vzorka vykazuje CPE, okamžite sa začnú postupy identifikácie vírusu v súlade s bodom II.2.4. Ak sa do 14 dní nespozoruje žiaden CPE, vykoná sa nepriamy imunofluorescenčný test (IFAT), hemadsorpcia alebo RT-PCR.

II.2.3. Subkultivácia

Subkultivácia sa vykonáva v období medzi 13. až 15. dňom. Supernatant bunkovej kultúry sa pridá do jamiek, ktoré obsahujú čerstvé bunky v etape aktívneho rastu vo vhodnom zriedení (1/10) na viacjamkových platničkách a inkubuje sa pri teplote 14 ± 2 °C maximálne počas 18 dní. Bunkové kultúry sa dvakrát preskúmajú použitím mikroskopu na zistenie CPE, a to medzi piatym a siedmym dňom a medzi štrnástym a osemnástym dňom po naočkovaní. Ak niektorá zmesná vzorka vykazuje CPE, okamžite sa začne postup identifikácie vírusu v súlade s bodom II.2.4. Ak sa nespozoruje žiaden CPE medzi 14. až 18. dňom, vykoná sa test hemadsorpcie alebo RT-PCR.

Ak sa cytotoxicita zistí počas prvých siedmich dní po inkubácii, vykoná sa subkultivácia v tejto etape a bunky sa inkubujú počas 14 až 18 dní, a potom sú znova subkultivované s ďalším obdobím inkubácie 14 až 18 dní. Ak sa cytotoxicita vyskytne po siedmich dňoch, vykoná sa subkultivácia a bunky sú inkubované tak, aby sa dosiahol celkový počet 28 až 36 dní inkubácie od prvého naočkovania.

Ak sa v prvotnej kultúre vyskytne bakteriálna kontaminácia, test sa musí zopakovať použitím homogenátu tkaniva uskladneného pri teplote – 80 °C. Pred naočkovaním sa homogenát tkaniva centrifuguje pri 4 000 × *g* počas 15 až 30 minút pri 0 až 6 °C a supernatant sa filtruje cez 0,22 µm filter. Ak sa počas subkultivácie vyskytne bakteriálna kontaminácia, supernatant sa filtruje cez 0,22 µm filter, naočkuje do čerstvých buniek a inkubuje počas ďalších 14 až 18 dní.

II.2.4. Testy na identifikáciu vírusu

Ak sa preukáže výskyt CPE v akomkoľvek štádiu alebo ak je pozitívny hemadsorpčný test, vykoná sa identifikácia vírusu. Metódy, ktoré sa môžu zvoliť na identifikáciu ISAV, sú RT-PCR v súlade s bodom II.1 a imunofluorescencia (IF) v súlade s bodom II.2.6. Ak sa predpokladá možná prítomnosť aj iných vírusov, vykonajú sa doplňujúce testy na identifikáciu vírusov. V prípade, že sa uvedenými testami nepodarilo definitívne identifikovať vírus do jedného týždňa, supernatant sa zašle na okamžitú identifikáciu do:

a) referenčného laboratória pre ISASvetovej organizácie pre zdravie zvierat (OIE) alebo

b) národného referenčného laboratória alebo referenčného laboratória EÚ pre choroby rýb uvedeného v prílohe VI k smernici 2006/88/ES.

II.2.5. Hemadsorpcia

Keďže množenie ISAV v bunkových kultúrach vždy nevedie k výskytu CPE, každá jamka sa podrobuje testu RT-PCR alebo hemadsorpčnému testu v súlade s týmto bodom alebo testu IF v súlade s bodom II.2.6.

Z každej jamky sa odoberie médium na kultiváciu buniek, vrátane tých, ktoré sú s pozitívnymi a negatívnymi kontrolnými vzorkami a umiestnia sa do označených sterilných skúmaviek. Do každej jamky sa pridá 500 µl 0,2 % (vol:vol) suspenzie premytých červených krviniek zajaca alebo koňa alebo 0,05 % (vol:vol) suspenzie premytých červených krviniek pstruha dúhového alebo lososa atlantického a inkubuje sa pri izbovej teplote počas 45 minút. Červené krvinky sa odstránia a každá jamka sa dvakrát opláchne pomocou roztoku L-15. Každá jamka sa vyšetrí použitím mikroskopu.

Prítomnosť zhlukov červených krviniek pripojených k povrchu buniek ASK indikuje podozrenie na infekciu orthomyxovírusom. Ak je test hemadsorpcie pozitívny, okamžite sa vykoná test na identifikáciu vírusu v súlade s bodom II.2.4.

II.2.6. Imunofluorescencia (IF)

Bunky ASK (pasáž 65 alebo nižšia) sa kultivujú v prostredí L-15 obsahujúcom 10 % fetálne bovinné sérum, 2 % (vol:vol) 200 mM L-glutamín a 0,08 % (vol:vol) 50 mM 2-merkaptoetanol na viacjamkových platničkách a používajú pri zhlukovaní presahujúcom 50 %. Môžu sa použiť tiež iné bunkové línie alebo rastové médiá s preukázanou účinnosťou. 225 µl supernatantu kultúry, pri ktorej sa predpokladá infekcia vírusom, sa pridá do každej z dvoch jamiek, premieša sa a 225 µl sa prenesie do dvoch ďalších jamiek pri zriedení 1:5. Dve ďalšie jamky zostanú nenaočkované, aby poslúžili ako kontrolné vzorky. Vzorky z každého rybného hospodárstva sa umiestnia na samostatné platničky, ako aj kontrolné vzorky vírusu. Kontrola vírusu sa vykoná použitím referenčného izolátu vírusu ISAV.

Platničky sa inkubujú pri teplote 14 ± 2 °C a vyšetrujú sa pod mikroskopom počas maximálne siedmich dní. Ak sa zistí predčasný CPE alebo ak sa nezistil žiaden CPE do siedmich dní, potom je ďalším krokom fixácia. Jamky sa premyjú fosfátovým tlmivým fyziologickým roztokom (PBS) a fixujú sa inkubáciou s 80 % acetónom počas f20 minút pri izbovej teplote. Platničky sa usušia na vzduchu a okamžite sa zafarbia alebo sa skladujú pri teplote 0 – 6 °C maximálne 24 hodín pred zafarbením.

Duplicitné jamky sa zafarbia zmesou monoklonálnych protilátok (MAb) 3H6F8 a 1OC9F5 proti ISAV alebo inou monoklonálnou protilátkou s preukázanou účinnosťou a špecificitou, rozriedia sa v PBS a inkubujú pri teplote 37 ± 4 °C počas 30 minút. MAb sa odstráni a platničky sa trikrát premyjú s 0,05 % Tween 20 v PBS. Konjugát protimyšacieho IgG s fluoresceín-izotio-kyanátom (FITC) zriedený v PBS sa pridá do každej jamky a inkubuje sa pri teplote 37 ± 4 °C počas 30 minút. Riedenia rôznych šarží MAb a konjugátu FITC sa v každom laboratóriu optimalizujú. Protilátka sa odstráni a platničky sa trikrát premyjú 0,05 % Tween 20 v PBS.

Jamky sa okamžite vyšetria použitím inverzného mikroskopu, ktorý je vybavený fluorescenčným mikroskopom s filtrom upraveným pre excitáciu FITC. Test sa považuje za pozitívny, ak sú pozorované fluoreskujúce bunky. Aby bol test platný, musí sa dosiahnuť pozitívny výsledok pri pozitívnych kontrolných vzorkách a negatívny výsledok pri negatívnych kontrolných vzorkách.

II.3. Vyšetrenie iných tkanív

Technika uvedená v bode II.2.6 sa môže použiť na iné rybie tkanivá, ako je pečeň, slezina a srdce pod podmienkou, že sa na platničku môže uložiť dostatočné množstvo endotelových buniek, leukocytov a lymfocytov. Farbenie je rovnaké pre všetky tkanivá, ale u niektorých tkanív sa odporúča nepoužívať značenie propidiumjodidom a uprednostniť fázové osvetlenie, aby sa identifikovali druhy buniek prítomné vo vzorke.

II.4. Histológia

Rezy zaliate parafínom sa nakrájajú na kúsky veľkosti 5 µm a zafarbia sa použitím hematoxylínu a eozínu.

Histologické zmeny pri klinicky chorých lososoch atlantických sú variabilné, ale môžu zahŕňať:

a) mnohé erytrocyty v centrálnom žilovom splave a lamelárnych kapilárach žiaber, kde sa takisto môžu tvoriť zrazeniny erytrocitov;

b) multifokálne až splývajúce petechie alebo nekrózu hepatocytov alebo oboje v určitej vzdialenosti od väčších ciev v pečeni; multifokálna akumulácia erytrocytov v dilatovaných pečeňových sínusoidách;

c) akumulácia erytrocytov v krvných cievach intestinálneho *lamina propria* a napokon krvácanie do *lamina propria*;

d) stróma sleziny distendovaná akumuláciou erytrocytov;

e) mierne multifokálne až extenzívne difúzne intersticiálne krvácanie s tubulárnou nekrózou v oblastiach krvácania, akumulácia erytrocytov v glomerule v obličke;

f) erytrofagocytóza v slezine a sekundárne krvácania v pečeni a obličke.

II.5. Imunohistochémia (IHC)

Polyklonálna protilátka proti nukleoproteínu ISAV sa použije na parafínových rezoch z tkaniva fixovaného formalínom. Orgány, ktoré majú byť vyšetrené, sú zadná oblička a srdce (prechodová oblasť vrátane všetkých troch komôr a chlopní). Prípady podozrenia z dôvodu patologických príznakov sa overia pozitívnou IHC. Histologické rezy sa pripravujú v súlade so štandardnými metódami.

1. Príprava rezov tkaniva

Tkanivá sú fixované v neutrálnom 10 % formalíne tlmenom fosfátom minimálne počas jedného dňa, dehydrované v sérii koncentrácií etanolu, vyčistené v xyléne a zaliate v parafíne, v súlade so štandardnými protokolmi. Približne 5 µm hrubé rezy (v prípade IHC umiestnené na sklenené sklíčka potiahnuté poly-L-lysinom, sa zahrejú na 56 °C až 58 °C (maximálne 60 °C) počas 20 minút, odparafínujú v xyléne, rehydratujú prostredníctvom série koncentrácií etanolu a farbia hematoxylínom a eozínom na účely patomorfológie a IHC v súlade s bodom 2.

2. Postup farbenia v prípade IHC

Všetky inkubácie sa vykonávajú pri izbovej teplote na trepačke, pokiaľ to nie je stanovené inak v tomto rozhodnutí:

a) antigén sa získava tak, že sa rezy varia v 0,1 M citrátovom tlmivom roztoku s pH 6,0 počas 2 × 6 minút, potom nasleduje blokovanie s 5 % odtučneným sušeným mliekom a 2 % kozím sérom v 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) počas 20 minút;

b) rezy sa potom v noci inkubujú s primárnou protilátkou (monošpecifická zajačia protilátka proti nukleoproteínu ISAV) zriedenou v TBS s 1 % odtučneným sušeným mliekom, po čom nasledujú tri premytia v TBS s 0,1 % Tween 20;

c) na účely detekcie viazaných protilátok sa rezy inkubujú s králičími protilátkami IgG konjugovanými s alkalickou fosfatázou počas 60 minút. Po poslednom premytí sa pridá Fast Red (1 mg ml^{-1}) a naftol AS-MX fosfát (0,2 mg ml^{-1}) s1 mM Levamisole v 0,1 M TBS (pH 8,2) a nechá sa 20 minút reagovať. Rezy sa potom opláchnu vodou z vodovodu predtým, ako sa kontrastne zafarbia s Harrisovým hematoxylínom a montujú sa vodným montovacím médiom. Rezy tkaniva pozitívne na ISAV a negatívne na ISAV sa zahrnú ako kontrolné vzorky pri každej testovacej súprave.

3. Výklad

Výsledky testu IHC sa vykladajú podľa písm. a) a b):

a) kontrolné rezy sa považujú za pozitívne, ak sa pozoruje, že kontrolné rezy majú jasne viditeľne červené (červenkasté) cytoplazmické a intranukleárne zafarbenie endotelových buniek v krvných cievach endokardu. Rez testovanej vzorky sa považuje za pozitívny len vtedy, ak sa zistí takéto jasné červené intranukleárne zafarbenie endotelových buniek;

b) kontrolné rezy sa považujú za negatívne, ak nemajú žiadnu významnú farebnú reakciu.

Keďže intranukleárna lokalizácia jefkonsn príznačná pre nukleoproteín orthomyxovíru počas fázy replikácie vírusu, ale často je dominantné súbežné cytoplazmatické zafarbenie, typy cytoplazmatického a iného sfarbenia bez intranukleárnej lokalizácie sa považujú za nešpecifické alebo nejednoznačné.

Farebne najsilnejšie pozitívne reakcie sa zvyčajne získavajú v endotelových bunkách srdca a obličky. Farebné endotelové reakcie v rámci veľmi rozsiahlych hemoragických lézií môžu byť mierne alebo neprítomné, pravdepodobne v dôsledku rozpadu infikovaných endotelových buniek.

ČASŤ 4

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METÓDY A POSTUPY NA ÚČELY DOHĽADU NAD MARTEILIÓZOU (*MARTEILIA REFRINGENS*) A JEJ POTVRDENIA

I. **Podrobné diagnostické metódy a postupy na účely diagnózy marteiliózy (*Marteilia refringens*)**

Ak sa vykonáva odber vzoriek a laboratórne vyšetrenie na účely získania alebo udržania zdravotného štatútu, pokiaľ ide o marteiliózu (*Marteilia refringens*), ako sa uvádza v oddiele I časti 4 prílohy I, alebo na účely potvrdenia alebo vylúčenia prítomnosti danej choroby uvedenej v zozname v súlade s článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES s použitím diagnostických metód uvedených v oddiele II časti 4 prílohy I, uplatňujú sa podrobné diagnostické metódy a postupy stanovené v bodoch I.1, I.2 a I.3 tejto časti.

I.1. Postup pri odbere vzoriek

Prednostne sa odoberú vzorky otvorených alebo čerstvo uhynutých mäkkýšov, aby sa zvýšila pravdepodobnosť nájdenia nakazených živočíchov.

Po odobraní vzoriek sa ustrice alebo mušle udržiavajú pri teplote 4 °C alebo na chladiarenskom ľade nie viac ako 24 hodín, ak vzorky zahŕňajú otvorené mäkkýše, a nie viac ako 72 hodín, ak nezahŕňajú otvorené mäkkýše, v plastovom vrecku s označením, na ktorom sú uvedené podrobné informácie týkajúce sa povahy a pôvodu ustríc alebo mušlí. Otvorené alebo čerstvo uhynuté mäkkýše sa udržiavajú oddelene od iných mäkkýšov.

Na diagnostikovanie *Marteilia refringens* prostredníctvom histológie sa použije 3 až 5 mm hrubý rez tkanív zahŕňajúci žiabre a srdcové tkanivo. Na niektoré testy, medzi ktoré patria odtlačky a polymerázová reťazová reakcia (PCR), sa použije časť tráviacej žľazy.

I.2. Mikroskopické techniky

I.2.1. Cytológia (odtlačková cytológia)

Po vysušení tkanív tráviacej žľazy na absorpčnom papieri sa na podložnom sklíčku pripraví niekoľko vzoriek. Sklíčka sa usušia na vzduchu, fixujú v metanole alebo v absolútnom etanole a zafarbia, pričom sa použije komerčne dostupná súprava na farbenie krvi ako Diff-Quik®/Hemacolor® v súlade s pokynmi výrobcu. Po opláchnutí vo vode z vodovodu a vysušení sa sklíčka prekryjú krycím sklíčkom, pričom sa použije vhodná syntetická živica. Sklíčka sa pozorujú najprv pri 200-násobnom zväčšení a potom pri ponorení do oleja pri 1 000-násobnom zväčšení.

Pozitívnym výsledkom je pozorovanie buniek v rozmedzí veľkosti od 30 do 40 µm. Cytoplazma sa farbí bazofilne, zatiaľ čo jadro sa farbí eozinofilne. Okolo veľkých, výrazne sfarbených (svetlolomných) granúl sa pozoruje bledé halo, a vo väčších bunkách sa pozoruje bunka v rámci bunkového usporiadania.

Táto technika nie je špecifická pre parazitné druhy.

I.2.2. Histológia

Časti tkaniva, ktoré zahŕňajú žiabre, tráviacu žľazu, mozgový plášť a gonádu, sa fixujú aspoň počas 24 hodín v Davidsonovom fixačnom prostriedku, a potom nasleduje normálne spracovanie na účely parafínovej histológie a farbenia, napríklad hematoxylínom a eozínom. Pozorovania sa vykonávajú pri zvyšujúcich sa zväčšeniach až do × 1 000.

Pozitívnym výsledkom je pozorovanie buniek v rozmedzí veľkosti od 4 do 40 µm. Počiatočné štádiá pozostávajú z viacjadrových, sférických až podlhovastých buniek. Tieto sa nachádzajú hlavne v epiteli pažeráka a žalúdka, niekedy v labiálnych hmatadlách. Sporulácia zahŕňa delenie buniek v rámci buniek a prebieha v kanálikoch a duktoch tráviacej žľazy. Svetlolomné granuly sa objavia v priebehu sporulácie, ale nie sú pozorované v počiatočných fázach. V konečných fázach infekcie sa v lúmene tráviaceho traktu voľne pozorujú výtrusnice. Cytoplazma sa farbí bazofilne, zatiaľ čo jadro sa farbí eozinofilne. Zafarbenie granúl môže byť v škále od oranžovej až po sýtočervenú farbu.

Táto technika nie je špecifická pre parazitné druhy.

I.3. Molekulárne techniky

I.3.1. Extrakcia DNA

DNA sa extrahuje v súlade so štandardnými postupmi.

Môžu sa použiť súpravy na extrakciu DNA, ktoré sú komerčne dostupné a ktorými sa zvyčajne získava kvalitná DNA vhodná na použitie s protokolmi PCR opísanými v bode I.3.2.

I.3.2. *Polymerázová reťazová reakcia* (*PCR*)

Vyvinulo a uverejnilo sa niekoľko protokolov PCR.

Použijú sa primery PCR, ktoré sú zamerané na oblasť vnútorného prepisovaného medzerníka (ITS1), keďže sú schopné amplifikovať len *M. refringens*.

PCR sa vykoná v objeme 50 µl. Zmesi PCR obsahujú tlmivý roztok (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 pri 25 °C] a 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP mix, 1 µM priame a reverzné primery, 0,02 jednotiek μl^{-1} Taq DNA polymerázy, a 10 až 100 ng extrahovanej DNA. Po denaturácii DNA pri teplote 94 °C počas piatich minút sa vykoná 30 cyklov takto: denaturácia pri 94 °C počas 1 minúty anelácia pri teplote 55 °C počas 1 minúty a elongácia pri 72 °C počas 1 minúty na kilobázový pár. Krok záverečnej elongácie sa vykoná počas 10 minút pri 72 °C. Na detekciu *M. refringens*, sa vykoná PCR s primermi cielenými na oblasť ITS1 (5′-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3′ a 5′-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3′).

Pozitívne kontrolné vzorky sa skladajú z genómovej DNA vysoko infikovanej hostiteľskej alebo plazmidovej DNA obsahujúcej cieľovú oblasť.

Negatívne kontrolné vzorky sa skladajú z genómovej DNA neinfikovaných hostiteľov a reakčných činidiel PCR bez cieľovej DNA.

Za pozitívny výsledok sa považuje pozitívna amplifikácia PCR s očakávanou veľkosťou (412 bp), pričom všetky negatívne kontrolné vzorky sú negatívne a všetky pozitívne kontrolné vzorky sú pozitívne.

I.3.3. Hybridizácia pre dôkaz in situ (ISH)

Vyvinulo a uverejnilo sa niekoľko protokolov ISH.

Použije sa sonda, ktorá je zameraná na génový komplex SSU rRNA, pretože bola validovaná oproti histológii.

Rezy tkaniva, ktoré zahŕňajú žiabre a tráviacu žľazu, sa fixujú aspoň počas 24 hodín v Davidsonovom fixačnom prostriedku, a potom nasleduje normálne spracovanie na účely parafínovej histológie. Pokrájajú sa rezy s veľkosťou 5 µm a umiestnia sa na sklíčka potiahnuté aminoalkylsilánom, ktoré sa potom cez noc pečú v peci pri 40 °C. Rezy sa odparafínujú ponorením v xyléne počas 10 minút. Tento krok sa jeden raz opakuje a potom sa rozpúšťadlo odstráni ponorením do dvoch po sebe nasledujúcich kúpeľoch v absolútnom etanole, pričom každý z nich trvá 10 minút. Rezy sa následne dehydrujú v sérii koncentrácií etanolu. Rezy sa ošetria proteinázou K (100 µg ml–1) v tlmivom roztoku TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), pri 37 °C počas 30 minút. Sklíčka sa dehydratujú postupným ponáraním do etanolu a potom vysušia na vzduchu. Rezy sa inkubujú so 100 µl hybridizačného tlmivého roztoku (4 × SSC [štandardný soľný roztok citrátu sodného], 50 % formamidu, 1 × Denhardtovho roztoku, 250 µg ml–1 kvasinkovej tRNA, 10 % dextran sulfát) s obsahom10 ng (1 µl PCR reagujúcich zložiek pripravených podľa opisu v bode I.3.2 s použitím primerov CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG a TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) sondy označenej digoxigeninom. Rezy sa pokryjú plastovými krycími sklíčkami *in-situ* a umiestnia sa do ohrievacieho bloku s teplotou 95 °C na päť minút. Sklíčka sa potom počas 1 minúty ochladia na ľade a následne sa cez noc vykoná hybridizácia pri teplote 42 °C vo vlhkej miestnosti. Rezy sa opláchnu dvakrát počas piatich minút v 2 × SSC pri izbovej teplote, a raz počas 10 minút v 0,4 × SSC pri 42 °C. Kroky detekcie sa vykonávajú podľa pokynov výrobcu. Sklíčka sa potom opláchnu v sterilnej destilovanej vode (dH2O). Rezy sa kontrastne zafarbia s Bismarck Brown Yellow, opláchnu v dH2O a prikryjú sa krycími sklíčkami s použitím vodného montovacieho média.

Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky predstavujú rezy zo známych infikovaných a neinfikovaných hostiteľov (v uvedenom poradí).

Pozitívny výsledok sa preukáže purpurovo-čiernym označením buniek *M. refringens* v známych cieľových tkanivách, pričom všetky negatívne kontrolné vzorky sú negatívne a všetky pozitívne kontrolné vzorky sú pozitívne.

I.3.4. Sekvenovanie

Sekvenovanie sa vykoná ako jeden zo záverečných krokov na potvrdenie diagnózy. Cieľovými oblasťami sú SSU rDNA a ITS1.

II. **Podrobné diagnostické metódy a postupy na účely dohľadu nad marteiliózou (*Marteilia refringens*) a jej potvrdenia**

Na účely programov dohľadu a na potvrdenie výskytu marteiliózy (*Marteilia refringens*) alebo na vylúčenie podozrenia na výskyt danej choroby uvedenej v zozname, v súlade s požiadavkami stanovenými v oddiele II časti 4 prílohy I, sú diagnostické metódy a zodpovedajúce postupy, ktoré sa majú použiť, v súlade s týmito usmerneniami stanovenými v tabuľke 4.1:

Tabuľka 4.1

Usmernenia na používanie diagnostických metód, pokiaľ ide o programy dohľadu a na potvrdenie alebo vylúčenie marteiliózy (*Marteilia refringens*)

Metóda	Cielený dohľad	Predpokladaná diagnóza	Potvrdzujúca diagnóza
Odtlačky tráviacej žľazy	X	X	X, alebo
Histopatológia	X		X, alebo
Hybridizácia pre dôkaz *in situ*			X, a
PCR	X	X	X, a
Sekvenovanie			X

ČASŤ 5

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METÓDY A POSTUPY NA ÚČELY DOHĽADU NAD BONAMIÓZOU (*BONAMIA OSTREAE*) A JEJ POTVRDENIA

I. **Diagnostické postupy pri bonamióze (*Bonamia ostreae*)**

Ak sa vykonáva odber vzoriek a laboratórne vyšetrenie na účely získania alebo udržania určitého zdravotného štatútu, pokiaľ ide o *Bonamia ostreae*, ako sa uvádza v oddiele I časti 5 prílohy I, alebo na účely potvrdenia alebo vylúčenia prítomnosti danej choroby uvedenej v zozname v súlade s článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES s použitím diagnostických metód uvedených v oddiele II časti 5 prílohy I, uplatňujú sa podrobné diagnostické metódy a postupy stanovené v týchto bodoch I.1, I.2 a I.3.

I.1. Postup odberu vzoriek

Prednostne sa odoberú vzorky otvorených alebo čerstvo uhynutých mäkkýšov, aby sa zvýšila pravdepodobnosť nájdenia nakazených živočíchov.

Po odobraní vzoriek sa ustrice udržiavajú pri teplote 4 °C alebo na chladiarenskom ľade nie viac ako 24 hodín, ak vzorky zahŕňajú otvorené mäkkýše, a 72 hodín, ak nezahŕňajú otvorené mäkkýše, v plastovom vrecku s označením, na ktorom sú uvedené podrobné informácie týkajúce sa povahy a pôvodu ustríc. Otvorené alebo čerstvo uhynuté mäkkýše sa udržiavajú oddelene od iných mäkkýšov.

Na diagnostikovanie *Bonamia ostreae* prostredníctvom histológie sa použije 3 až 5 mm hrubý rez tkanív zahŕňajúci žiabre a srdcové tkanivo. Na niektoré testy, medzi ktoré patria odtlačky a polymerázová reťazová reakcia (PCR), sa použije časť tráviacej žľazy.

I.2. Mikroskopické techniky

I.2.1. Cytológia (odtlačková cytológia)

Po vysušení žiabrových alebo srdcových tkanív na absorpčnom papieri sa na podložnom sklíčku pripraví niekoľko vzoriek. Sklíčka sa usušia na vzduchu, fixujú v metanole alebo v absolútnom etanole a zafarbia, pričom sa použije komerčne dostupná súprava na farbenie krvi (konkrétne Diff-Quik®/Hemacolor®.) v súlade s pokynmi výrobcu. Po opláchnutí vo vode z vodovodu a vysušení sa na sklíčka položí krycie sklíčko, pričom sa použije vhodná syntetická živica. Sklíčka sa pozorujú najprv pri 200-násobnom zväčšení a potom pri ponorení do oleja pri 1 000-násobnom zväčšení.

Pozitívnym výsledkom je prítomnosť malého sférického alebo ovoidného organizmu (širokého 2 až 5 μm) v hemocytoch. Paraziti sa však môžu vyskytnúť aj extracelulárne. Tieto organizmy majú bazofilnú cytoplazmu a eosinofilné jadro (farby sa môžu líšiť podľa použitého farbenia), a preto, že sa rozotierajú na sklíčku, môžu sa javiť na odtlačkoch širšie ako na histologickom vyšetrení. Možno pozorovať mnohojadrové bunky. Táto technika nie je špecifická pre parazitné druhy.

I.2.2. Histológia

Časti tkaniva, ktoré zahŕňajú žiabre tráviacu žľazu, sa fixujú aspoň počas 24 hodín v Davidsonovom fixačnom prostriedku, a potom nasleduje normálne spracovanie na účely parafínovej histológie a farbenia, napríklad hematoxylínom a eozínom. Pozorovania sa vykonávajú pri zvyšujúcich sa zväčšeniach až do × 1 000.

Za pozitívny výsledok sa považuje prítomnosť parazitov v podobe veľmi malých buniek širokých od 2 do 5 μm v hemocytoch alebo voľne v spojivovom tkanive alebo sínusoch epitela žiabrov, čreva a mozgového plášťa, často spojená s intenzívnou zápalovou reakciou. Aby sa predišlo akýmkoľvek pochybnostiam, parazit sa pozoruje vo vnútri hemocytu na účely pozitívnej diagnózy. Táto technika nie je špecifická pre parazitné druhy.

I.3. Molekulárne techniky

I.3.1. Extrakcia DNA

DNA sa extrahuje v súlade so štandardnými postupmi.

Môžu sa použiť súpravy na extrakciu DNA, ktoré sú komerčne dostupné a ktorými sa zvyčajne získava kvalitná DNA vhodná na použitie s protokolmi PCR podrobne opísanými ďalej.

I.3.2. Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Vyvinulo a uverejnilo sa niekoľko protokolov PCR.

Môžu sa používať dva protokoly PCR zamerané na malé podjednotky (SSU) rDNA:

a) prvou je konvenčná PCR, ktorou sa amplifikuje niekoľko členov *Haplosporidia* vrátane *Bonamia spp*. Primery označené Bo a Boas sú 5′-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3′ a 5′-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3′ (v danom poradí) amplifikujú produkt s veľkosťou 300 bp. Zmesi PCR obsahujú tlmivý roztok (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 pri 25 °C] a 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP mix, 1 μM priamych a reverzných primerov, 0,02 jednotiek μl–1 Taq DNA polymerázy, a 0,2 ng μl–1 templátovej DNA v celkovom objeme 50 μl. Vzorky sú denaturované v termocykleri počas piatich minút pri 94 °C, potom nasleduje 30 cyklov (94 °C počas 1 minúty, 55 °C počas 1 minúty, 72 °C počas jednej minúty), a potom nasleduje záverečná extenzia počas 10 minút pri teplote 72 °C.

Pozitívne kontrolné vzorky sa skladajú z genómovej DNA vysoko infikovanej hostiteľskej alebo plazmidovej DNA obsahujúcej cieľovú oblasť.

Negatívne kontrolné vzorky sa skladajú z genómovej DNA neinfikovaných hostiteľov a reakčných činidiel PCR bez cieľovej DNA.

Za pozitívny výsledok sa považuje pozitívna amplifikácia PCR s očakávanou veľkosťou (konkrétne 300 bp), pričom všetky negatívne kontrolné vzorky sú negatívne a všetky pozitívne kontrolné vzorky sú pozitívne;

b) druhým protokolom PCR je test PCR v reálnom čase pomocou farbiva SYBR® Green (SYBR® Green Real time PCR). Umožňuje špecifickú detekciu *B. ostreae* (opísanú ďalej) a môže sa kombinovať s testom PCR v reálnom čase pomocou farbiva SYBR® Green umožňujúcim špecifickú detekciu *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Primery BOSTRE-F (5′- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3′) a BOSTRE-R (5′- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3′) amplifikujú produkt s veľkosťou 208 bp. Zmesi PCR obsahujú SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM priamych a reverzných primerov a 200 ng extrahovanej DNA. Vzorky sú denaturované v systéme umožňujúcom detekciu v reálnom čase (Real Time Detection System) počas 10 minút pri 95 °C, potom nasleduje 35 cyklov (95 °C počas 30 sekúnd, 55 °C počas 45 sekúnd a 72 °C počas jednej minúty). Analýza krivky teploty topenia sa vykonáva so zvýšeniami teploty 0,5 °C/s, pričom sa začína na 55 °C a končí na 95 °C a fluorescencia sa zaznamenáva pri každej zmene teploty.

Pozitívne kontrolné vzorky sa skladajú z genómovej DNA vysoko infikovanej hostiteľskej alebo plazmidovej DNA obsahujúcej cieľovú oblasť.

Negatívne kontrolné vzorky sa skladajú z genómovej DNA neinfikovaných hostiteľov a reakčných činidiel PCR bez cieľovej DNA.

Za pozitívny výsledok sa považuje pozitívna amplifikácia PCR s jedinečnou hornou teplotou topenia (78,25 ± 0,25 °C v podmienkach, ktoré uverejnil Ramilo et al. 2013), pričom všetky negatívne kontrolné vzorky sú negatívne a všetky pozitívne kontrolné vzorky sú pozitívne.

I.3.3. Hybridizácia pre dôkaz *in situ* (ISH)

Vyvinulo a uverejnilo sa niekoľko protokolov ISH.

Použije sa sonda, ktorá je zameraná na génový komplex SSU rDNA, hoci bolo preukázané, že krížovo reaguje s niektorými inými členmi čeľade *Haplosporidia*.

Rezy tkaniva, ktoré zahŕňajú žiabre a tráviacu žľazu, sa fixujú aspoň počas 24 hodín v Davidsonovom fixačnom prostriedku, a potom nasleduje normálne spracovanie na účely parafínovej histológie. Narežú sa rezy s veľkosťou 5 µm a umiestnia sa na sklíčka potiahnuté aminoalkylsilánom, ktoré sa potom cez noc pečú v peci pri 40 °C. Rezy sa odparafínujú ponorením v xyléne počas 10 minút. Tento krok sa jeden raz opakuje a potom sa rozpúšťadlo odstráni ponorením do dvoch po sebe nasledujúcich kúpeľov v absolútnom etanole, pričom každý z nich trvá 10 minút. Rezy sa následne dehydrujú v sérii koncentrácií etanolu. Rezy sa ošetria proteinázou K (100 µg ml–1) v tlmivom roztoku TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), pri 37 °C počas 30 minút. Sklíčka sa dehydrujú v sérii koncentrácií etanolu a potom vysušia na vzduchu. Rezy sa inkubujú so 100 µl hybridizačného tlmivého roztoku (4 × SSC [štandarný soľný roztok citrátu sodného], 50 % formamid, 1 × Denhardtov roztok, 250 µg ml–1 kvasinkovej tRNA, 10 % dextran sulfát) s obsahom 20 ng (2 µl reakcie PCR pripravenej podľa opisu v bode I.3.2 s použitím primerov Bo a Boas) sondy označenej digoxigeninom. Rezy sa pokryjú plastovými krycími sklíčkami *in-situ* a umiestnia sa do ohrievacieho bloku s teplotou 95 °C na päť minút. Sklíčka sa potom počas 1 minúty ochladia na ľade a následne sa cez noc vykoná hybridizácia pri teplote 42 °C vo vlhkej miestnosti. Rezy sa premyjú dvakrát počas piatich minút v 2 × SSC pri izbovej teplote, a raz počas 10 minút v 0,4 × SSC pri 42 °C. Kroky detekcie sa vykonávajú podľa pokynov výrobcu. Sklíčka sa potom opláchnu v sterilnej destilovanej vode (dH2O). Rezy sa kontrastne zafarbia s Bismarck Brown Yellow, opláchnu v dH2O a prikryjú sa krycími sklíčkami s použitím vodného montovacieho média.

Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky predstavujú rezy zo známych infikovaných a neinfikovaných hostiteľov (v uvedenom poradí).

Pri pozitívnom výsledkom sú paraziti vo vnútri hemocytov označení, pričom všetky negatívne kontrolné vzorky sú negatívne a všetky pozitívne kontrolné vzorky sú pozitívne.

I.3.4. Sekvenovanie

Sekvenovanie sa vykoná ako jeden zo záverečných krokov na potvrdenie diagnózy. Cieľovými oblasťami sú SSU rDNA a ITS1.

II. **Postupy na účely dohľadu nad bonamiózou (*Bonamia ostreae*) a jej potvrdenia**

Na účely dohľadu nad bonamiózou (*Bonamia ostreae*) a na potvrdenie jej prítomnosti alebo na vylúčenie podozrenia na ňu v súlade s požiadavkami stanovenými v oddiele II časti 5 prílohy I musia byť diagnostické metódy a zodpovedajúce postupy, ktoré sa majú použiť, v súlade s týmito usmerneniami stanovenými v tejto tabuľke 5.1.

Tabuľka 5.1

Usmernenia na používanie diagnostických metód, pokiaľ ide o programy dohľadu, a na vylúčenie alebo potvrdenie bonamiózy (*Bonamia ostreae*)

Metóda	Cielený dohľad	Predpokladaná diagnóza	Potvrdzujúca diagnóza
Srdcové alebo žiabrové odtlačky	X	X	X, alebo
Histopatológia	X		X, alebo
Hybridizácia pre dôkaz *in situ*			X, a
PCR	X	X	X, a
Sekvenovanie			X

ČASŤ 6

PODROBNÉ DIAGNOSTICKÉ METÓDY A POSTUPY V PRÍPADE DOHĽADU NAD CHOROBOU BIELYCH ŠKVŔN A POTVRDENIA CHOROBY BIELYCH ŠKVŔN (WSD)

1. **Diagnostické postupy na detekciu WSSV**

Ak sa vykonáva odber vzoriek a laboratórne vyšetrenie na účely programov dohľadu a eradikačných programov uvedených v oddiele I časti 6 prílohy I a na účely potvrdenia prítomnosti infekcie vírusom WSSV alebo vylúčenia podozrenia na ňu v súlade s článkom 57 písm. b) smernice 2006/88/ES s použitím diagnostických metód uvedených v oddiele II časti 6 prílohy I, uplatňujú sa podrobné diagnostické metódy a postupy stanovené v bodoch 2 až 7 tejto časti.

Metódy a postupy opísané v tejto časti prílohy II sú prevzaté z akreditovaného testu ISO 17025, ktorý sa používa v Referenčnom laboratóriu Európskej únie pre choroby kôrovcov. Môžu sa použiť alternatívne prístupy, pri ktorých sa využívajú ekvivalentné podmienky alebo súpravy vyrábané rôznymi výrobcami, ale ktoré ponúkajú rovnocennú citlivosť a špecificitu ako tie, ktoré sú opísané v tejto časti. Vo všetkých prípadoch sa produkt amplifikovaný PCR sekvenuje na účely potvrdenia identity vírusu choroby bielych škvŕn (WSSV).

2. **Postup odberu vzoriek**

Tkanivo (pleopody a žiabre) obsahujúce WSSV z kôrovcov sa môže skladovať v etanole, RNAlater alebo zmrazené pri teplote – 80 °C. Na indentifikáciu WSSV zo vzoriek tkaniva sa vyžadujú tieto fázy: homogenizácia tkaniva, extrakcia DNA, špecifická amplifikácia DNA WSSV prostredníctvom PCR, vizualizácia amplifikovaného produktu v géle, purifikácia DNA a sekvenovanie na potvrdenie identitity patogénu.

3. **Homogenizácia tkaniva**

Narušenie tkanív a príprava homogenátu vo vhodnom tlmivom roztoku sa vykonáva s použitím zariadenia Fast Prep a skúmaviek Lysing matrix A (MP Biomedicals). Tkanivo sa odváži, vloží do skúmaviek Lysing Matrix A, zriedi v pomere 1:10 w/v alebo podľa pokynov výrobcov, vo vhodnom tlmivom roztoku [G2 a 10 µl proteinázy K na použitie s extrakčnou súpravou DNA Tissue (Qiagen)] a homogenizuje s použitím homogenizátora Fast Prep 24 počas dvoch minút. Homogenizované vzorky sa inkubujú pri teplote 56 °C minimálne počas štyroch hodín alebo cez noc. Vzorky sa vortexujú, centrifugujú pri 9 000 rpm počas dvoch minút, do skúmavky so vzorkou na extrakciu DNA sa pridá supernatant s objemom 50 µl alebo objem ekvivalentný 5 mg tkaniva (hmotnosť tkaniva optimálna pre súpravu na extrakciu) a až do objemu 200 µl sa doplní tlmivý roztok G2.

4. **Extrakcia DNA**

Celková DNA sa extrahuje použitím extrakčnej súpravy DNA Tissue a prístroja EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) podľa pokynov výrobcov. Pri každej dávke vzoriek sa zároveň vykonáva kontrola extrakcie (Calf Thymus DNA) a negatívna kontrola (tlmivý roztok G2). DNA sa eluuje do objemu 50 µl. Na overenie úspešnosti extrakcie sa zmeria koncentrácia DNA všetkých vzoriek a kontrolných vzoriek použitím prístroja Nano Drop. Extrahovaná DNA, pokiaľ nie je potrebná okamžite, sa zmrazí pri – 20 °C.

5. **Polymerázová reťazová reakcia (PCR) pri WSSV**

Metóda, ktorá sa má použiť na detekciu WSSV, je protokol na detekciu WSSV prostredníctvom vnorenej PCR, ktorý je uvedený v týchto odsekoch a ktorý amplifikuje 1 447bp a 848bp amplikón génu 18 s rRNA v prvom a druhom kole PCR (v uvednom poradí).

Prvé kolo PCR reakcie prebieha v objeme 50 µl a obsahuje konečné koncentrácie 1 × tlmivý roztok GoTaq (Promega), 5mM $MgCl_2$, 1pmol/µl primeru WSSV 146 F1, 1pmol/µl primeru WSSV 146 R1 (tabuľka 1), 0,25mM dNTPs, 1,25U Taq polymerázy a 2,5µl DNA. Každá vzorka je spracovaná duplicitne zároveň popri negatívnej kontrole extrakcie, negatívnej kontrole PCR (2,5µl H_2O pridané namiesto DNA) a pozitívnej kontrole. Pozitívnu kontrolu tvorí plazmid WSSV, vyrobený a validovaný na interné použitie (k dispozícii z referenčného laboratória EÚ).

Druhé kolo reakcie PCR sa uskutoční rovnakým spôsobom ako prvé kolo, ale použije sa primerová súprava WSSV 146 F2/R2 a druhá pozitívna kontrola na overenie, či táto fáza PCR fungovala.

Primer	Sekvencia
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Pri prvom aj druhom kole PCR sa použijú tieto podmienky cyklovania na termocykléri DNA Engine Tetrad 2 Peltier (alebo ekvivalentnom zariadení). Počiatočná denaturácia pri 94 °C počas dvoch minút, potom nasleduje 94 °C počas 30 sekúnd, 62 °C počas 30 sekúnd, 72 °C počas 30 sekúnd s opakovaním počas 30 cyklov, následne dve minúty elongácie pri 72 °C a potom sa teplota udržuje pri 4 °C.

6. **Gélová elektroforéza**

Amplifikované produkty PCR z 1. aj 2. kola PCR sa vizualizujú v 2 % agarózovom géli vyrobenom použitím tlmivého roztoku TAE. 15 µl každej vzorky sa vystaví 120 voltom na približne 20 minút a sleduje pod UV svetlom. Pozitívne vzorky vytvoria pás s veľkosťou 1 447bp v 1. kole PCR a 848bp v 2. kole PCR. Vzorky uvedenej veľkosti sa vyrežú a umiestnia do 1,5 ml mikroskúmavky. DNA obsiahnutá v plátkoch gélu sa purifikuje pomocou systému Promega Wizard® SV Gel a PCR clean-Up System podľa pokynov výrobcov. Koncentrácie DNA sa odhadujú prostredníctvom prístroja Nano Drop. Purifikovaná DNA, pokiaľ sa nepoužije okamžite, sa zmrazí pri – 20 °C.

7. **Sekvenovanie produktov PCR**

DNA sa sekvenuje pomocou súpravy Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Celkový objem v každej reakcii je 20 µl, s konečnými koncentráciami 1 × Big Dye terminator, 1 × tlmivý roztok na sekvenovanie, 10pmol/µl priamy alebo reverzný primer a 10µl purifikovanej DNA (riedenej na približne 10ng/µl), pričom reakcia prebieha pri týchto podmienkach cyklovania na termocykléri DNA Engine Tetrad 2 Peltier (alebo ekvivalentnom zariadení): 94 °C počas 30 sekúnd, potom nasleduje 96 °C počas 10 sekúnd, 50 °C počas 10 sekúnd a 60 °C štyroch minút, pričom pri posledných troch krokoch prebieha cyklovanie 30-krát.

Sekvenované produkty PCR sa vyzrážajú prostredníctvom metódy octanu sodného, pri ktorej sa pridá 20µl DNA do 10µl NaAc, 70µl H_2O a 250µl etanolu, vortexuje a centrifuguje pri 13 000 rpm počas 20 minút, supernatant sa odstráni a sediment sa premyje s 200 µl absolútneho etanolu, a centrifuguje pri 13 000 rpm počas piatich minút. Sediment sa suší počas piatich minút pri 37 °C. K sedimentom sa pridá 25 µl Hi-Di formamidu, zahreje sa na 95 °C počas dvoch minút a dôkladne vortexuje. Vzorky sa sekvenujú pomocou genetického analyzátora ABI3130xl Avant Genetic podľa pokynov výrobcov. Výsledky sekvenovania sa analyzujú prostredníctvom softvéru Sequencher a sekvencie sa priradia k sekvenciám v databáze NCBI použitím funkcie BLAST.