

32003D0466

25.6.2003

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÉ UNIE

L 156/61

ROZHODNUTÍ KOMISE**ze dne 13. června 2003,****kterým se stanoví kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor při podezření na výskyt nakažlivé chudokrevnosti lososů (ISA) nebo po jeho potvrzení***(oznámeno pod číslem K(2003) 1831)***(Text s významem pro EHP)**

(2003/466/ES)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 91/67/EHS ze dne 28. ledna 1991 o veterinárních předpisech pro uvádění živočichů pocházejících z akvakultury a produktů akvakultury na trh ⁽¹⁾, naposledy pozměněnou nařízením (ES) č. 806/2003 ⁽²⁾, a zejména na článek 15 uvedené směrnice,

s ohledem na směrnici Rady 93/53/ES ze dne 24. června 1993, kterou se zavádějí minimální opatření Společenství ke zdolávání některých nákaz ryb ⁽³⁾, naposledy pozměněnou rozhodnutím Komise 2001/288/ES ⁽⁴⁾, a zejména na čl. 5 odst. 2 a článek 6 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Směrnice 93/53/EHS uvádí, že odběr vzorků a laboratorní testování na výskyt chorob uvedených na seznamech I a II (které jsou uvedeny v příloze A směrnice 91/67/EHS) se provádí na základě metod stanovených v souladu s článkem 15 směrnice 91/67/EHS.

(2) Plány odběru vzorků a diagnostické metody pro zjišťování a potvrzování chorob ryb uvedených na seznamu II, totiž virové hemoragické septikémie (VHS) a infekční nekrózy krevtovorné tkáně (IHN), jsou stanoveny v rozhodnutí Komise 2001/183/ES ⁽⁵⁾.

(3) Podle čl. 5 odst. 2 a článku 6 směrnice 93/53/EHS se veškerá hospodářství, která se nacházejí ve stejném povodí nebo ve stejné pobřežní oblasti jako hospodářství podezřelá z infekce nakažlivou chudokrevností lososů nebo s potvrzenou infekcí ISA, dávají pod úřední dozor. Je třeba stanovit kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor.

(4) Aby se definovaly plány odběru vzorků a diagnostické metody pro zjišťování a potvrzování ISA a aby se stanovila kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor při podezření z ISA nebo po jejím potvrzení, byli konzultováni odborníci na zdraví ryb a laboratorní experti. Dále se musí brát v úvahu pokyny pro diagnostikování ISA, stanovené v současném vydání Diagnostické příručky pro choroby vodních živočichů Mezinárodního úřadu pro nákazy zvířat (OIE).

(5) Je třeba stanovit dostatečně dlouhou dobu pro provádění těchto nových požadavků.

(6) Opatření tohoto rozhodnutí jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

ROZHODLA TAKTO:

Článek 1

Plány odběru vzorků a diagnostické metody pro zjišťování a potvrzování nakažlivé chudokrevnosti lososů (ISA), jakož i kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor při podezření na ISA nebo jejím potvrzení, se stanoví v příloze tohoto rozhodnutí.

Článek 2⁽¹⁾ Úř. věst. L 46, 19.2.1991, s. 1.⁽²⁾ Úř. věst. L 122, s. 16. 5. 2003, s. 1.⁽³⁾ Úř. věst. L 175, 19.7.1993, s. 23.⁽⁴⁾ Úř. věst. L 99, 10.4.2001, s. 11.⁽⁵⁾ Úř. věst. L 67, 9.3.2001, s. 65.

Toto rozhodnutí se použije ode dne 23. října 2003.

Článek 3

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

V Bruselu dne 13. června 2003.

Za Komisi
David BYRNE
člen Komise

PŘÍLOHA

Plány odběru vzorků a diagnostické metody pro zjišťování a potvrzování nakažlivé chudokrevnosti lososů (ISA) a kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor při podezření na ISA nebo jejím potvrzení

ÚVOD A DEFINICE

Tato příloha:

- a) stanoví pokyny a minimální požadavky na plány odběru vzorků a diagnostické metody pro zjišťování a potvrzování výskytu ISA;
- b) integruje ustanovení a definice stanovené ve směrnici 91/67/EHS a směrnici 93/53/EHS;
- c) stanoví předpisy pro řádné diagnostikování a tlumení ISA a pro dozor nad touto chorobou v případě podezření na ISA nebo při jejím potvrzení;
- d) je určena stejně tak orgánům příslušným pro tlumení ISA, jako laboratornímu personálu, který provádí testy na tuto chorobu. Zdůrazňuje postupy odběru vzorků, zásady a použití laboratorních testů a zhodnocení jejich výsledků, jakož i podrobné laboratorní techniky. V případě potřeby však laboratoře mohou změnit testy popsané v této příloze, nebo mohou použít rozdílné testy, za podmínky, že mohou prokázat, že mají stejnou nebo vyšší citlivost a specifickou. Dále stanoví kritéria vymezení pásem a úřední dozor při podezření na ISA nebo po jejím potvrzení. Pro účely této přílohy se použijí následující doplňkové definice:

„Povodím“ se rozumí celé povodí vodního zdroje od pramene až k ústí, nebo část povodí od pramene vodního zdroje k přírodní nebo umělé překážce, která brání rybám v pohybu za tuto překážku.

„Pobřežní oblastí“ se rozumí část říčního nebo mořského břehu nebo ústí odpovídající přesnému zeměpisnému vymezení, které spočívá ve stejnorodém hydrodynamickém systému nebo v řadě takových systémů.

Část I stanoví hlavní zásady a kritéria pro diagnostikování a potvrzování ISA a kritéria pro vymezení pásem a úřední dozor, která se mají uplatnit při podezření z ISA nebo po jejím potvrzení.

Část II uvádí inspekce a odběry vzorků, které se mají provést za účelem zjištění výskytu ISA.

Část III stanoví metody, které se mají použít pro virologické vyšetření.

Část IV popisuje postup vyšetření vzorků pomocí RT-PCR na zjišťování ISA.

Část V popisuje protokol, který se má použít pro vyšetření vzorků ledvin pomocí IFAT (testu na nepřímou fluorescenční protilátku), pokud jde o ISA.

Část VI obsahuje metodologie pro histologii.

Část VII obsahuje seznam akronymů a použitých zkratk.

I. Kritéria pro diagnostikování ISA a pro stanovení pásem, některá opatření pro tlumení a úřední dozor**1.1 Hlavní zásady pro diagnostikování ISA**

Rozumné důvody pro podezření, že ryby jsou infikovány virem ISA, jsou uvedeny v části 1.2 této přílohy. Členské státy zajistí, aby při podezření, že ryby v hospodářství byly infikovány virem ISA, proběhlo co nejrychleji úřední vyšetření na potvrzení nebo vyloučení výskytu choroby, přičemž se použijí inspekce a klinická vyšetření, jakož i sběr a výběr vzorků a metody pro laboratorní vyšetření stanovené v části III-VI této přílohy. Výskyt ISA se považuje za úředně zjištěný, pokud je splněn jeden ze tří typů kritérií vyjmenovaných v části 1.3 této přílohy.

1.2 Podezření z infekce ISA

1.2.1 Podezření na výskyt ISA existuje, pokud je splněno přinejmenším jedno z těchto kritérií:

- a) přítomnost postmortálních nálezů slučitelných s ISA, též s klinickými příznaky choroby. Postmortální nálezy a klinické příznaky choroby jsou ve shodě s příznaky vyjmenovanými v novém vydání *Diagnostické příručky pro choroby vodních živočichů OIE*;
- b) izolování a zjištění viru ISA v buněčné kultuře jednotného vzorku odebraného jakékoliv rybě pocházející z hospodářství podle části III;

- c) rozumné prokázání přítomnosti viru ISA ve dvou nezávislých laboratorních testech, jako je test RT-PCR (část IV) a test IFAT (část V);
- d) předání živých ryb do hospodářství, kde jsou rozumné důvody se domnívat, že v době předání zde byla přítomna ISA;
- e) pokud vyšetření odhalí jiné závažné epizootologické vazby s hospodářstvími, v nichž existuje podezření z ISA nebo kde byla potvrzena.

I.2.2 Podezření na ISA se může vyloučit, pokud trvalá vyšetření zahrnující přinejmenším jednu klinickou inspekci měsíčně po dobu šesti měsíců neposkytnou žádný jiný významný důkaz o výskytu ISA.

I.3 Potvrzení ISA

Výskyt ISA se považuje za potvrzený, pokud jsou splněna kritéria popsaná v písmenech a) nebo b) či c):

- a) byly pozorovány klinické příznaky a postmortální nálezy ve shodě s ISA, v souladu s novým vydáním Příručky pro diagnostikování chorob vodních živočichů OIE, včetně uhynulých ryb, ryb slabých nebo vykazujících nenormální chování, s příznaky chudokrevnosti, jiných postmortálních nálezů a patologických změn a virus ISA byl zjištěn jednou nebo více níže uvedenými metodami:
 - i) izolace a identifikace viru ISA v buněčné kultuře přinejmenším jednoho vzorku odebraného jakékoliv rybě v hospodářství, jak je popsáno v části III;
 - ii) zjištění viru ISA pomocí testu RT-PCR podle metod popsanych v části IV;
 - iii) zjištění viru ISA v tkáních nebo přípravcích z tkání prostřednictvím specifických protilátek viru ISA (tj. test IFAT na vzorcích ledvin, jak je popsáno v části V);
- b) izolace a identifikace viru ISA ve dvou vzorcích odebraných z jedné nebo více ryb v hospodářství testovaných při různých příležitostech za použití metody popsané v části III;
- c) izolace a identifikace viru ISA v přinejmenším jednom vzorku odebraném z jakékoliv ryby v hospodářství za použití metody popsané v části III, s potvrzením zjištění viru ISA v přípravcích z tkání odebraných z jakékoliv ryby v hospodářství za použití testu RT – PCR (část IV) nebo testu IFAT (část V).

I.4 Kritéria pro stanovení a zrušení pásem kontroly a úředního dozoru při podezření na ISA a po jejím potvrzení

I.4.1 Pro účely stanovení programu úředního dozoru založeného na riziku zavedou členské státy v blízkosti hospodářství, kde je infekce virem ISA úředně zjištěna nebo potvrzena, vhodná pásma kontroly a dozoru.

I.4.2 Pásma, která se mají stanovit, jsou definována na základě analýzy nebezpečí dalšího rozšiřování choroby v konkrétních případech. V souladu s epizootickou situací dotyčné povodí nebo pobřežní pásmo:

- je definováno jako pásmo kontroly nebo
- může, pokud jde o povodí nebo rozsáhlou pobřežní oblast, být rozděleno na pásmo kontroly a na pásmo dozoru, pokud není ohrožena prevence rozšiřování viru ISA.

Kromě toho mohou být v případě potřeby stanovena další pásma dozoru mimo povodí nebo pobřežní oblast.

I.4.3 Hlavní faktory, které se berou v úvahu pro zavedení výše zmiňovaných pásem, jsou faktory, které mají dopad na nebezpečí rozšiřování choroby na chovné i volně žijící ryby, totiž počet, míra a rozdělení případů úhynu ryb v hospodářství, kde je infekce virem ISA úředně zjištěna nebo potvrzena; příčina úhynu v dotyčném hospodářství; vzdálenost k sousedním hospodářstvím a hustota těchto sousedních hospodářství; hospodářství ve styku; druhy přítomné v hospodářstvích; řízení použité v zasažených hospodářstvích a v hospodářstvích sousedních; hydrodynamické podmínky a jiné faktory epizootologického významu identifikované v rámci epizootického šetření provedeného v souladu s čl. 5 odst. 2 a s článkem 8 směrnice 93/53/EHS.

I.4.4 Pro stanovení pásem se použijí tato minimální kritéria:

I.4.4.1 „Pásmo kontroly“ zavádí členský stát v bezprostřední blízkosti hospodářství, v němž je infekce virem ISA potvrzena, takto:

- v pobřežních oblastech: oblast zahrnující kruh o průměru přinejmenším jednoho posunu přílivu nebo přinejmenším 5 kilometrů (km), jehož středem je hospodářství, v němž je infekce virem ISA potvrzena, nebo srovnatelnou oblast určenou na základě příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů nebo
- ve vnitrozemí: celé povodí hospodářství, v němž je infekce virem ISA potvrzena: členský stát může v rozsáhlých povodích omezit rozsah pásma na části povodí, za podmínky, že prevence rozšiřování ISA nebude ohrožena.

I.4.4.2 „Dočasné pásmo zóna kontroly“ se zavádí v případě podezření na přítomnost viru ISA, toto pásmo je založeno na stejných kritériích, jako „pásmo kontroly“.

I.4.4.3 „Pásmo dozoru“ zavádí členský stát v případě potřeby kolem pásma kontroly v oblastech, kde se považuje za dostatečný méně přísný dozor, přičemž toto pásmo odpovídá:

- v pobřežních oblastech: ploše, která kolem pásma kontroly přesahuje pásma posunu přílivu, ploše, která kolem pásma kontroly tvoří kruh o průměru 10 km od středu pásma kontroly nebo srovnatelné ploše určené podle příslušných hydrodynamických nebo epizootologických údajů nebo
- ve vnitrozemí: v případě potřeby rozsáhlé ploše ležící vně stanoveného pásma kontroly.

I.5 Zastavení provozu a zrušení stanovených pásem

I.5.1 Příslušný orgán členského státu zajistí, aby ve všech hospodářstvích ležících v pásmu kontroly byl po určité době pozastaven provoz poté, co z nich byly ryby odstraněny a po případné dezinfekci. Doba zastavení provozu v hospodářstvích s potvrzenou infekcí virem ISA je minimálně šest měsíců. Doba zastavení provozu v hospodářstvích v zónách kontroly určuje příslušný orgán na základě posouzení rizika v jednotlivých konkrétních případech. Po vyprázdnění všech hospodářství ležících v pásmu kontroly se zavede minimálně šestitýdenní synchronizované období zastavení provozu.

Kromě toho může příslušný orgán rozhodnout o zastavení provozu v hospodářstvích ležících v zavedených pásmech dozoru.

I.5.2 Zavedená pásma kontroly mohou být zrušena a znovu zarybněna teprve poté, kdy se hospodářství v těchto pásmech zbaví všech ryb, popřípadě se vydezinfikují, a projdou obdobím zastavení provozu podle bodu I.5.1. Při novém zarybnění se pásma kontroly přemění v pásma dozoru, jak je stanoveno v bodě I.4.4.3.

I.5.3 Zavedená dočasná pásma kontroly mohou být zrušena teprve poté, kdy se podezření na infekci virem ISA vyloučí podle části I.2.2. V případě potvrzení ISA podle části I.3 se dočasné pásmo kontroly přemění v pásmo kontroly.

I.5.4 Zavedená pásma dozoru je možné zrušit teprve dva roky po zrušení pásma kontroly.

I.6 Úřední dozor při podezření z ISA nebo po jejím potvrzení

I.6.1 S odkazem na čl. 5 odst. 2 a na článek 6 směrnice 93/53/EHS a za účelem stanovení rozdělení a vývoje choroby při podezření na ISA nebo po potvrzení choroby v hospodářství musí příslušný orgán nebo kvalifikovaný hygienický útvar v oblasti zdravotního stavu ryb po poradě s příslušným orgánem a za jeho dozoru provést program úředního dozoru založený na riziku ve všech hospodářstvích ležících v zavedených pásmech.

I.6.2 Pro účely použití programu úředního dozoru musí příslušný orgán, popřípadě pomocí kontrol na místě, identifikovat všechna hospodářství v zavedených pásmech a provést úřední soupis druhů, skupin a množství ryb chovaných v hospodářstvích, včetně míry úmrtnosti.

- I.6.3 Po prvotním úředním soupisu musí hospodářství v zavedených dočasných pásmech kontroly, která chovají lososa obecného (*Salmo salar*) nebo jakýkoliv jiný druh uvedený v nejnovějším vydání Veterinárního kodexu vodních živočichů OIE jako druh vnímavý na ISA nebo označený za potenciálního nositele ISA, hlásit všechny případy úhynu příslušnému orgánu každých čtrnáct dní. Zvýšená úmrtnost musí být hlášena po jednotlivých dnech a sádkách. Příslušný orgán vyšetří jakékoliv významné zvýšení úmrtnosti v hospodářství.

Je-li podezření potvrzeno, veškerá hospodářství v zavedeném pásmu kontroly hlásí příslušnému orgánu případy úhynu každý týden po jednotlivých sádkách a dnech.

Hospodářství v pásmech dozoru hlásí úmrtnost příslušnému orgánu každých 14 dní.

Kromě toho se v zavedených pásmech provádějí pravidelně po celý rok inspekce s četností uvedenou v tabulce 1. Pokud však klimatické podmínky znemožní provedení inspekce v určité části roku, mohou členské státy stanovit jinou četnost inspekcí v pohotovostním plánu.

Tabulka 1

Program úředního dozoru

Umístění hospodářství	Minimální počet inspekcí za rok	Minimální počet inspekcí za rok po zrušení pásma kontroly
Pásma kontroly	12	
Pásma dozoru	6	6
Dočasné pásma kontroly	6	

Program dozoru se provádí až do zrušení pásma.

- I.6.4 Inspekce, jakož i selekce, sběr, příprava a odeslání vzorků probíhá způsobem definovaným v částech II.1 až II.4. Vyšetření vzorků probíhá podle částí III až VI.

II. Inspekce a odběr vzorků

II.1 Inspekce, selekce a sběr vzorků v hospodářství s podezřením na přítomnost ISA

- II.1.1 Při pravidelných inspekcích prováděných v rámci programu úředního dozoru popsaného v části I.6 a v hospodářstvích podezřelých z infekce virem ISA se vyšetřuje veškeré vybavení hospodářství (sádky, nádrže a bazény), aby se odhalila přítomnost uhynulých a slabých ryb nebo ryb s neobvyklým chováním. Pokud to je možné, nedávno uhynulé ryby (nerozložené), slabé ryby nebo ryby s neobvyklým chováním se vyšetří, aby se zjistily klinické příznaky ISA nebo aby došlo k postmortálnímu zjištění choroby, jak je popsáno v novém vydání Diagnostické příručky pro choroby vodních živočichů OIE.
- II.1.2 Pokud jsou pozorovány čerstvé klinické příznaky typické pro ISA nebo pokud inspektor nebo veterinární lékař má jakýkoliv jiný důvod předpokládat, že ryby mohou být infikované, provede se odběr vzorků přinejmenším u 10 ryb. Pokud je to možné, vzorek tvoří ryby, které právě uhynuly, jsou slabé nebo vykazují neobvyklé chování. Pokud není dost ryb vykazujících klinické příznaky, pak se vzorek doplní o zdravé ryby odebrané ze sádek, nádrží nebo bazénů, v nichž jsou nejvyšší hladiny úmrtnosti nebo největší počet ryb vykazujících klinické příznaky choroby.
- II.1.3 Pokud se zpozorují čerstvě uhynulé ryby, ryby slabé nebo vykazující neobvyklé chování, avšak pokud klinické příznaky a postmortální zjištění nepotvrzují ISA, není odběr vzorků povinný, avšak inspektor nebo veterinární lékař může požadovat odběr vzorků pro zjištění jiné diagnózy.

- II.1.4 Pokud existuje podezření, že volně žijící ryby jsou infikovány ISA, členské státy zajistí, aby byly vyšetřeny příslušné vzorky vhodnými klinickými a laboratorními metodami, stanovenými v částech II až VI, aby se vyloučila nebo potvrdila přítomnost ISA a aby se posoudilo, zda představuje vážnou hrozbu pro chovné ryby.

II.2 Příprava vzorků ryb

- II.2.1 Vzorky pro histologické vyšetření se odebírají pouze z čerstvě zabitých ryb, které vykazují klinické příznaky choroby nebo jejichž postmortální ohledání odpovídá přítomnosti choroby. Z jakýchkoliv vnějších nebo vnitřních poruch se odeberou vzorky, v každém případě pak z jater, ze středu ledviny, ze srdce a ze sleziny se odeberou vzorky u každé ryby pomocí skalpelu a přenesou se do slaného tlumícího roztoku 8 – 10 % (vol/vol) formalínu. Poměr mezi fixativem a tkání musí být přinejmenším 20:1, aby se zaručila spolehlivá konzervace tkání.
- II.2.2 Tkáně pro virologické vyšetření se odebírají ze všech ryb vzorku. Duplicitní vzorky se odebírají pro potvrzení výsledku. Části jater, přední ledviny, srdce a sleziny se odebírají z ryb pomocí sterilního nástroje a přenesou se do plastických zkumavek obsahujících 9 ml přepravního roztoku, to znamená prostředí buněčné kultury s antibiotiky. Stačí kombinace 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fungizonu, 200 IU ml^{-1} polymixinu B a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycinu, avšak mohou se použít i jiné kombinace s prokázanou účinností. Do jedné zkumavky obsahující přepravní roztok je možné umístit maximálně tkáň odebrané z pěti ryb, které pak představují jeden souhrnný vzorek. Hmotnost tkáně v jednom vzorku je 1,0 \pm 0,5 g.
- II.2.3 Vzorky ledvin určené k vyšetření testem IFAT musí být odebrané z čerstvě zabitých ryb do dvou hodin po smrti. Pomocí sterilních nástrojů se odebere kousek ze středu ledviny. Tkáň se osuší do svého papíru, aby se odstranil přebytek krve, potom se několikrát stiskne na skleněnou destičku potřenou poly-L-lysinem. Vedle sebe jsou různé vzorky, které se však nepřekrývají, takže vzniká nepřerušovaná jednotná vrstva buněk. Krev a tkáňový mok nejsou vhodným materiálem pro tento test. Nesmí dojít k tomu, aby vzorek ledviny „vykapał“ na savý papír, neboť tím by mohlo dojít ke koagulaci krve a na testovací destičce by bylo uloženo velké množství sérových bílkovin. Vzorky se osuší na vzduchu, potom se uchovávají čerstvé, pokud nemají být fixovány neprodleně. Fixace vzorků se provádí do 72 hodin po odběru. Vzorky mohou být případně také zmrazeny po osušení na vzduchu, potom měsíc skladovány při teplotě maximálně $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ před fixací.
- II.2.4 Ryby vykazující příznaky chudokrevnosti mohou být omráčeny a vzorky heparinované krve se odeberou okamžitě k hematologickému vyšetření, jako je měření hematokritu.
- II.2.5 Tkáň pro analýzu RT-PCR se odebírá od všech ryb vzorku. Kousek přední nebo střední ledviny se rybám odebere pomocí sterilního nástroje a přenesou se do mikrozkušavky obsahující 1 ml RNK konzervačního roztoku s potvrzenou účinností. Do zkumavky s konzervačním roztokem je možné dát tkáň nejvýše pěti ryb. Hmotnost tkáně v jednom vzorku je přibližně 0,5 g. Pokud jsou ryby příliš malé na to, aby se získal vzorek požadované hmotnosti, mohou být odebrány kousky ledviny, srdce, sleziny, jater nebo pylorického slepého střeva, v uvedeném pořadí, aby jejich hmotnost byla 0,5 g.

II.3 Odeslání vzorků ryb

- II.3.1 Vzorky krve a zkumavky obsahující tkáň ryb určené k virologickému vyšetření nebo analýze RT-PCR se umístí do izolovaných nádob (například polystyrénových přepravek s úzkými přepážkami), spolu s dostatečným množstvím ledu nebo mrazicích bloků, aby se zajistilo zchlazení vzorků během přepravy do laboratoře. Nesmí dojít k jejich zmrazení a přepravní nádoba musí obsahovat led ještě při převzetí, nebo jeden či více mrazicích bloků musí být ještě částečně nebo úplně zmrazených. Za mimořádných okolností mohou být vzorky RT-PCR a vzorky pro virologické vyšetření zmrazeny a přepravovány do laboratoře při teplotě nejvýše $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- II.3.2 Destičky pro test IFAT se odesílají s podložkami destiček s dostatečným množstvím exsikátoru, aby vzorky zůstaly suché a zchlazené, jak se uvádí výše.
- II.3.3 Pokud jsou tkáň ryb přepravovány ve fixativu pro histologické vyšetření, odesílají se v utěsněných zkumavkách umístěných do nádob odolných vůči nárazům, jako například v polystyrénových přepravkách s úzkými přepážkami.

II.3.4 Pokud vzorky nebyly zmrazeny, musí se s virologickým vyšetřením začít co nejdříve, v každém případě nejpozději 72 hodin po odběru vzorků. Vzorek pro srovnávací analýzu se skladuje při teplotě přinejmenším $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ od dopravení do laboratoře.

II.3.5 Do laboratoře je též možné přepravovat ryby v celku, pokud mohou být splněny teplotní podmínky po dobu přepravy stanovené v části II.3.1. Ryby v celku se zabalí do svého papíru a odeslou v plastovém pytlí, zchlazené výše uvedeným způsobem.

II.3.6 Živé ryby je též možné odesílat, avšak pouze za dozoru úředního útvaru.

II.3.7 Pro analýzu RT-PCR tkání konzervovaných v *RNAlater* musí k extrakci RNA dojít ve lhůtě, která se mění podle teploty. Tyto lhůty jsou uvedeny níže:

— $37\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 den
— $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 týden
— $4\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 měsíc
— $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lhůta není stanovena.

II.3.8 Veškeré balení a označování musí být prováděno v souladu s platnými vnitrostátními a mezinárodními nařízeními o přepravě, jak je zapotřebí.

II.4 Sběr doplňujícího diagnostického materiálu

Po dohodě s diagnostickou laboratoří mohou být sbírány jiné tkáně ryb a mohou být připraveny za účelem doplňujících zkoušek.

III. Virologické vyšetření

III.1 Příprava vzorků

III.1.1 Pokud přetrvávají praktické těžkosti, které brání v naočkování buněk do 72 hodin po sběru vzorků tkání, je přípustné, aby tyto vzorky byly zmrazeny na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu nejdéle 28 dní. Tkáně musí být zmrazeny a rozmrazeny pouze jednou před vyšetřením.

III.1.2 Každý vzorek (směs tkání v přepravním roztoku) se zcela homogenizuje za pomoci drtiče, mísicího zařízení nebo třecí misky a paličky, odstředí se 2000 – 4000 x g za 15 minut při teplotě 0 až $6\text{ }^{\circ}\text{C}$, na povrchu plovoucí vrstva se filtruje ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) a inkubuje se stejným objemem směsi přiměřeně naředěné antiséry proti domácím sérotypům viru IPN. Titr antiséra musí být přinejmenším 1: 2000 v 50 % neutralizačního testu na destičce. Směs se inkubuje po dobu jedné hodiny při teplotě $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tak se připraví očkovací látka, inokulum.

Ošetření všech inokul antisérem na IPN virus (virus, který je v některých částech Evropy přítomen v 50 % vzorků ryb), má zabránit tomu, aby se v naočkovaných buněčných kulturách objevil cytopatický účinek CPE způsobený virem IPN. Tím se sníží doba virologických vyšetření, jakož i počet případů, v nichž by zjištění CPE mohlo být považováno za možný indikátor viru ISA.

Pokud vzorky pocházejí z výrobních závodů, které se považují za prosté viru IPN, pak ošetření očkovací látkou s antisérem na virus IPN není nutné.

III.2 Naočkování buněčných kultur

III.2.1 Buňky SHK-1 (přechod 80 nebo nižší) nebo buňky TO se kultivují v prostředí L-15 obsahujícím 5 % séra ze zárodku skotu, 2 % (v/v) 200 mM L-glutaminu a 0,08 (v/v) 50mM 2-merkaptetanolu ve 12 nebo 24 jamkách. Mohou být použity i jiné buněčné řetězce s ověřenou efektivitou a citlivostí na izolování viru ISA, přičemž je třeba zohlednit variabilitu kmenu a schopnost různých kmenů rozmnožovat se v různých buněčných řetězcích. Roztok orgánů ošetřených antisérem se naočkuje do mladých buněčných kultur ve fázi aktivního růstu, aby se dosáhlo konečného roztoku tkáňového materiálu v kultivační půdě v poměru 1:1000. U každé suspenze orgánů se přidá 40 μl inokula do jamky obsahující 2 ml kultivační půdy. Aby se minimalizovalo nebezpečí křížové kontaminace, doporučuje se použít samostatné destičky po 12 nebo 24 jamkách u vzorků pocházejících z různých hospodářství ležících na různých místech.

III.2.2 Jedna destička by měla zůstat nenaočkována, aby posloužila pro negativní kontrolu. Jiná destička se naočkuje referenčním izolátem viru ISA jako pozitivní kontrola za použití níže uvedeného postupu. Sto μl zásobního přípravku viru ISA (minimální titer je 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹) se naočkuje v první jamce a dobře promíchá. Objem této látky v první jamce se přenese do druhé, aby se získal roztok v poměru 1:10, a dobře se promíchá. Tento postup se opakuje u každé jamky, aby se získalo šest roztoků v poměru 1:10. Zásoba viru ISA může být skladována při teplotě -80 °C po dobu minimálně dvou let, avšak po rozmrazení musí být použita do tří dní. Poznámka: musí se zabránit křížové kontaminaci testovacích destiček s pozitivním kontrolním materiálem. Aby se toto nebezpečí vyloučilo, je třeba pozitivní vzorky zpracovávat a ošetřovat odděleně od testovacích destiček.

III.2.3 Vzorky se inkubují při teplotě 14 ± 2 °C po dobu maximálně 15 dní.

III.3 Pozorování mikroskopem

Buněčné kultury se dvakrát vyšetřují pod mikroskopem na zjištění CPE, nejprve od pátého do sedmého dne a potom od dvanáctého do čtrnáctého dne po naočkování. Pokud směs vykazuje CPE, je třeba neprodleně přistoupit k identifikaci viru (III.6). Pokud není žádný CPE pozorován čtrnáctý den, provede se hemadsorpční test (III.4).

III.4 Hemadsorpce

Rožmožení viru ISA v buněčných kulturách nemusí mít vždy za následek CPE. Proto se u každé jamky provádí hemadsorpční test, jak je popsáno níže, nebo se alternativně u každé jamky provádí test IF, jak je popsáno v bodě III.6.1.

III.4.1 Z každé jamky se odebere prostředí buněčné kultury, včetně jamek s pozitivními a negativními kontrolními vzorky, a umístí se do označených sterilních zkumavek. Do každé jamky se přidá 500 μl 0,2 % roztoku (v/v) omytých červených krvinek králíka nebo koně nebo 0,05 % roztok (v/v) omytých červených krvinek pstruha duhového nebo lososa obecného a nechá se inkubovat za pokojové teploty po dobu 45 minut. Červené krvinky se odstraní a každá jamka se dvakrát omyje pomocí živné půdy L-15. Každá jamka se vyšetří pod mikroskopem.

III.4.2 Přítomnost shluků červených krvinek přilnavých k ploše buněk SHK-1 nebo TO indikuje podezření na infekci orthomyxovirem. Pokud je hemadsorpční test pozitivní, neprodleně se provede test na zjištění viru (III.6).

III.5 Subkultivace nebo přechod

III.5.1 Subkultivace se provádí od třináctého do patnáctého dne. 225 μl kultury plovoucí na povrchu se přidá k jamkám obsahujícím čerstvé buňky SHK-1 v aktivní fázi růstu na dvanáctijamkových platech a inkubuje se při teplotě 14 ± 2 °C maximálně po dobu 18 dní. Buněčné kultury se dvakrát prohlédnou pod mikroskopem na zjištění CPE, nejprve od pátého do sedmého dne a potom od čtrnáctého do osmnáctého dne po naočkování. Pokud některý vzorek buněk vykazuje CPE, neprodleně se zahájí postup na identifikaci viru (III.6). Pokud se nezpozoruje žádný CPE v období mezi 14. a 18. dnem, provede se hemadsorpční test (III.4).

III.5.2 Pokud je zjištěna cytotoxicita během prvních sedmi dní po inkubaci, provede se subkultivace tak, že se buňky nechají inkubovat po dobu 14 až 18 dní a pak se provede nová subkultivace trvající dalších 14 až 18 dní. Pokud se objeví cytotoxicita po sedmi dnech, nechají se buňky inkubovat tak, aby se dospělo k celkovému počtu 28 až 36 dní inkubace od prvotního naočkování.

III.5.3 Pokud se v prvotní kultuře objeví bakteriální kontaminace, musí se test opakovat za použití homogenizované tkáně skladované při teplotě -80 °C. Před naočkováním se homogenizovaná tkáň odstředí na 4000 x g po dobu 30 minut při teplotě 0 až 6 °C a na povrchu plovoucí vrstva se filtruje na 0,22 μm . Pokud se bakteriální kontaminace objeví během subkultivačního stupně, na povrchu plovoucí vrstva se filtruje na 0,22 μm , naočkuje se do čerstvých buněk a nechá se inkubovat po dalších 14 až 18 dní.

III.6 Testy na identifikaci viru

Pokud je v kterémkoliv stádiu prokázán CPE nebo pokud je výsledek hemadsorpčního testu pozitivní, provede se identifikace viru. Dostupné metody identifikace viru ISA jsou imunofluorescence IF (III.6.1) a RT-PCR (část IV). Pokud se předpokládá, že mohou být přítomny i jiné viry, doporučuje se přistoupit k doplňujícím testům na identifikaci viru. Pokud tyto testy neumožní s konečnou platností identifikovat virus do jednoho týdne, musí být horní vrstva kapaliny odeslána do národní referenční laboratoře nebo do referenční laboratoře EU pro choroby ryb, aby se virus neprodleně identifikoval.

III.6.1 IF

III.6.1.1 Buňky SHK-1 (přechod 80 nebo nižší) nebo buňky TO se kultivují v živné půdě L-15 obsahující 5 % sérum ze zárodku skotu, 2 % (v/v) mM L-glutaminu a 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptoetanolu na destičkách s 24 nebo 96 jamkami a za použití hustoty vyvolávající více než 50 % spojování. Mohou se též použít jiné buněčné řetězce nebo kultivační půdy s prokázanou účinností. 225 μ l plovoucí vrstvy kultury podle předpokladu infikované virem se přidá do každé ze dvou jamek, promíchá se a přenesení 225 μ l do dvou dalších jamek s ředěním 1:5. Dvě další nenaočkované jamky poslouží jako kontrolní vzorky. Vzorky z každého rybářského hospodářství se umístí na samostatné destičky, stejně jako kontrolní vzorky viru. Kontrola viru se provádí za použití referenčního izolátu viru ISA.

III.6.1.2 Destičky se inkubují při teplotě 14 ± 2 °C a vyšetřují se pod mikroskopem po dobu maximálně sedmi dní. Pokud se zjistí předčasný CPE nebo pokud se nezjistí žádný CPE do sedmi dnů, pak je dalším krokem fixace. Destičky se omyjí PBS a fixují inkubací s 80 % acetonu po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Destičky se usuší na vzduchu a neprodleně obarví nebo se skladují při teplotě 0 až 6 °C maximálně po 24 hodin před obarvením.

III.6.1.3 Duplicitní jamky se obarví monoklonální protilátkou viru ISA 3H6F8 nebo jinou monoklonální protilátkou s prokázanou účinností a specifícností, rozředí se v PBS a inkubují při teplotě 37 ± 4 °C po dobu 30 minut. Monoklonální protilátka se odstraní a destičky se třikrát omyjí 0,05 % Tween 20 v PBS. Vzorek se pokryje konjugátem obsahujícím myší protilátku IgG FITC, ředěnou v PBS, a přidá se do každé jamky a inkubuje se při teplotě 37 ± 4 °C po dobu 30 minut. Poznámka: ředění různých šarží monoklonální protilátky a konjugátu FITC se optimalizuje v každé laboratoři. Protilátka se odstraní a destičky se třikrát opláchnou 0,05 % Tween 20 v PBS.

III.6.1.4 Jamky se neprodleně vyšetří za použití inverzního mikroskopu vybaveného fluorescenčním mikroskopem s filtrem upraveným pro vyvolání FITC. Test se považuje za pozitivní, pokud jsou zpozorovány fluorescenční buňky. Aby test byl platný, musí mít kontrolní vzorky také pozitivní výsledek a negativní vzorky výsledek negativní.

IV. Vyšetření vzorků pomocí RT-PCR

IV.1 *Tento oddíl popisuje postupy požadované pro zvětšení části dílu 8 genomu viru ISA pomocí PCR, které může být provedeno na tkáních ryb nebo v kultuře viru ISA*

IV.1.1 Extrakce RNA

- a) RNAlater se odstraní z každého vzorku. Do každé zkumavky se přidá 1 ml destilované vody ošetřené DEPC a zkumavky se pak odstředí při 13 000 rpm po dobu pěti minut při teplotě 0 až 6 °C.
- b) Plovoucí vrstva se odstraní z každého vzorku a 800 μ l TRIzol (Invitrogen) nebo alternativního činidla, u něhož je prokázáno, že má účinnost srovnatelnou nebo vyšší, se přidá do každého vzorku a do kontrolní zkumavky obsahující vhodný kontrolní materiál (400 μ l destilované vody nebo homogenizovanou hmotu ledvin odebranou z ryb prostých specifikovaných patogenních organismů). V případě potřeby se tkáně mohou opakovaně disociovat pomocí pipety. Zkumavky se inkubují při pokojové teplotě po dobu pěti minut. Do každé zkumavky se přidá 160 μ l chloroformu a zkumavky se řádně protřepou po dobu tří minut, potom se odstředí na 13 000 rpm po dobu 15 minut při teplotě 0 až 6 °C.
- c) Vrchní vodní vrstva se odstraní a přenesení se do kalibrované mikrozkušavky o obsahu 1,5 ml obsahující 500 μ l izopropanolu a pak se zkumavky inkubují po dobu 10 minut při pokojové teplotě, potom se odstředí na 6 500 rpm po dobu 15 minut při teplotě 0 až 6 °C.

- d) Plovoucí vrstva se odstraní a přidá se 1 ml 75 % etanolu k usazenině RNA. Zkumavky se odstředí na 6 500 rpm po dobu pěti minut při teplotě 0 až 6 °C.
- e) Plovoucí vrstva se odstraní a zkumavky se ponechají otevřené po dobu přibližně tří minut, aby se vypařil zbývající etanol. K usazenině přeměněné v suspenzi se přidá 15 µl destilované vody ošetřené DEPC a pokud je zapotřebí, rychle se přejde k vortexu.
- f) Ke stanovení koncentrace RNA a čistoty vzorků se použije spektrofotometr. Optické hustoty se změří na 260 a 280 nm.
- g) RNA, která musí být použita neprodleně (stejný den), se může dočasně skladovat při teplotě 0 až 6 °C. Nepoužitá RNA se skladuje při teplotě -80 °C.

IV.1.2 Obrácená transkripce RT

- a) Dva µg RNA se rozředí v destilované vodě ošetřené DEPC v mikrozukmavkách o objemu 1,5 ml. Pokud je koncentrace RNA vzorků příliš slabá na to, aby bylo možné použít 2 µg v reakci RT, použije se co možná největší množství RNA. Rozředěná RNA se inkubuje při teplotě 55 až 60 °C po dobu 10 minut.
- b) Zkumavky obsahující RNA se umístí do ledu a přidají se činidla RT, aby se získaly konečné koncentrace 1 x tampon, 1mM dNTP, 100 ng náhodných hexamerů, 20 J inhibitoru a 200 J MMLV-RT v celkovém objemu 20 µl.
- c) Zkumavky se inkubují při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny.
- d) cDNA se skladuje při teplotě 0 až 6 °C podle potřeby a použije se v PCR co nejrychleji.

IV.1.3 PCR

- a) Do směsi 45 µl PCR se přidá 5 µl cDNA, aby se získaly konečné koncentrace 1 x tampon, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM každé dNTP, 25 pmol každé barvy a 1 U Taq polymerázy. Matrice jsou ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (matrice po směru) a ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (matrice v protisměru). Musí se provést negativní kontroly pro extrakci, fáze RT a PCR.
- b) Zkumavky se umístí do termocykleru naprogramovaného na 94 °C po dobu pěti minut, pak následuje 35 cyklů při 94 stupních po dobu 1 minuty, 55 stupních po dobu 1 minuty a 72 stupních po dobu jedné minuty s konečnou inkubací při 72 °C po dobu pěti minut.
- c) Výsledky PCR se posoudí po elektroforéze za použití 2 % agarozového gelu zbarveného ethidiumbromidem a obsahujícím velikostní markery souběžně se vzorky a zahrnujícím negativní kontroly pro fáze RT a PCR. Jediný produkt PCR o 15 bp se považuje za ukazatel přítomnosti RNA viru ISA. Vzorky, které obsahují doplňující produkt o 310 bp, se též považují za obsahující RNA viru ISA. Vzorky, jejichž výsledky násobí produkty PCR, včetně přinejmenším jednoho s přibližně 155 bp, mohou obsahovat RNA viru ISA. Mohou být dále vyšetřeny sondami DNA nebo nukleotidovým sekvenováním.

IV.1.4 Potvrzení viru ISA izolovaného na tkáňové kultuře pomocí PCR

Pokud došlo k úplnému CPE během virologického vyšetření vzorků tkáně v buňkách SHK-1, odstraní se z jamky 400 µl plovoucí vrstvy a umístí se do sterilní zkumavky o objemu 1,5 ml. RNA se extrahuje z tohoto vzorku stejně jako v bodě III.1. a provede se test RT-PCR. Pokud se použijí kultury, u nichž CPE není úplný, plovoucí vrstva se odstraní, buňky se oškrábou z povrchu jamky nebo baňky a vloží se do sterilní zkumavky o objemu 1,5 ml pro extrakci RNA a test RT-PCR.

IV.1.5 Potvrzení produktů PCR sondou DNA

- a) Specifičnost produktu PCR o 155 bp může být posouzena sondáží s oligonukleotidem, který se kříží v oblasti produktu PCR, vlastní matricím. Produkty PCR podléhají elektroforéze v 1 % agarozovém gelu souběžně s markery velikosti a s pozitivní kontrolou a negativní kontrolou u fází RT a PCR.

- b) DNA se podrobí reakci Souther-blot na membráně a označený oligonukleotid (5'- CGGGAGTT-GATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') se inkubuje s membránou po příslušných prehybridizačních fázích.
- c) Omytím se vyloučí membrána nevázaných a nespecificky vázaných sond a vázaná sonda se vizualizuje.
- d) Sondy vázané na fragment 155 bp (a 310 bp, pokud je přítomen) představují důkaz specifčnosti PCR a ukazují, že RNA viru ISA byla ve vzorku přítomna.

IV.1.6 Nukleotidové sekvenování produktů PCR

Specifičnost PCR může být posouzena vyšetřením nukleotidového sekvenování 155 bp produktu PCR.

- a) Produkt PCR se očistí od agorózového gelu nebo roztoku.
- b) Fragment se sekvenuje pomocí stejných matric, jaké byly použity pro PCR, nebo vektorových matric, pokud byl fragment klonován ve vektoru před sekvenováním.
- c) Nukleotidová sekvence se porovná se sekvencemi segmentu 8 viru ISA dostupného v databázi nukleotidové sekvence EMBI (čísla přístupu Y10404, AJ012285, AJ242016).
- d) Přítomnost sekvence odpovídající sekvenci segmentu 8 viru ISA je důkazem, že vzorek obsahoval RNA viru ISA.

V. Vyšetření vzorků ledvin pomocí IFAT

V.1 *Níže uvedený protokol byl vypracován pro vyšetření vzorků ledvin pomocí testu IFAT*

V.2 Příprava a obarvení vzorků

V.2.1 Destičky se fixují v acetonu nebo metanolu/acetonu (1:1) po dobu tří minut a nechají se oschnout na vzduchu. Před zbarvením se každá destička vyšetří a vhodná pásma se obkreslí tužkou ImmEdge™ nebo tužkou jí podobnou a destička se usuší na vzduchu. Potom se destičky vloží do blokujícího roztoku (6 % odstředěné mléko v PBS obsahující 0,2 % Tween 20) a inkubují se za mírného protřepávání po dobu 30 minut za pokojové teploty. Každá destička se nechá odkapat a umístí se vodorovně do držáku na destičky obsahujícího vlhký ubrousek, aby se udrželo vlhké prostředí.

V.2.2 Každý vzorek se pokryje roztokem monoklonální protilátky 3H6F8 na virus ISA (nebo jinou protilátkou s ověřenou specifičností a účinností), přepravka se uzavře a inkubuje se za protřepávání po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Protilátka se normálně ředí v poměru 1:10 až 1:100 v 1 % odstředěném mléce, avšak skutečné ředění se musí určit pro každou šarži. Destičky se třikrát omyjí po dobu dvou minut v PBS obsahujícím 0,1 % Tween 20. Každý vzorek se pokryje roztokem obsahujícím konjugát FITC (goat anti mouse), ředěným v poměru 1:1000 v 1 % odstředěném mléce a inkubuje se ve vlhkém prostředí po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Destičky se třikrát po dvě minuty omyjí v PBS obsahujícím 0,1 % Tween 20. Každá destička se pokryje roztokem CITIFLUOR™ (500 µl Citifluoru™ smíchaného s 1,5 ml Tween 20 v 0,1 % (v/v) v PBS) nebo v jiné vhodné stavební živné půdě po dobu 10 minut. Destičky se třikrát omyjí v PBS obsahujícím 0,1 % Tween 20. Pokud je nutné dobarvovat, každý vzorek se pokryje propidiumjodidem (0,01 mg/ml) v PBS obsahujícím 0,1 % Tween 20 a inkubuje se po dobu tří minut při pokojové teplotě. Destička se třikrát omyje po dobu 2 minut v PBS obsahujícím 0,1 % Tween 20. Destičky se usuší a vloží se do CITIFLUORU™ nebo jiné vhodné stavební živné půdy. Destičky se skladují v temnu při teplotě 4 °C před mikroskopickým vyšetřením.

V.3 Vyšetření za pomoci fluorescenčního mikroskopu

Každá destička se vyšetří pod mikroskopem s epifluorescenčním osvětlením za použití patřičného filtru, který vyvolá FITC a způsobí, že se objeví charakteristická zelená fluorescence. Všechna pole ležící v pásmech označených tužkou ImmEdge™ se vyšetří objektivem x 10 a x 20 a podezřelá pásma (ta, která vykazují zelenou fluorescence) se znovu vyšetří objektivem x 40 a fázovým/fluorescenčním osvětlením, aby se zaručilo, že fluorescence je v buňce dobře lokalizována. Koordináty podezřelých pásem se zaznamenají, aby druhý laborant později potvrdil povahu fluorescence. Po vyšetření prvním laborantem se podezřelé nebo pozitivní destičky znovu vyšetří druhým laborantem a potvrdí se výsledky.

V.4 Kontroly

V.4.1 Každá šarže zbarvených destiček pro test IFAT musí zahrnovat tři typy kontrol:

- vzorek ledviny neinfikovaného lososa obecného (negativní kontrola),
- neinfikovaná buněčná kultura SHK-1 nebo jiná citlivá buněčná kultura (negativní kontrola),
- buněčná kultura SHK-1 infikovaná virem ISA nebo jiná citlivá buněčná kultura (pozitivní kontrola).

V.4.2 Pokud je k dispozici, doporučuje se vzorek ledviny lososa obecného infikovaného virem ISA jako doplňující pozitivní kontrola.

V.4.3 Pokud se z negativních kontrol získá pozitivní výsledek, test se považuje za neplatný pro všechny destičky dané šarže. Pokud jsou všechny destičky šarže, včetně pozitivních kontrol, negativní, test se považuje za neplatný pro všechny destičky této šarže. V případě, že chybné kontroly způsobí neplatnost šarže destiček, všechny tyto destičky se zničí a nové testování se provede za pomoci užití duplikátů vzorků.

V.5 Vyšetření jiných tkání

Tato technika se může použít na jiné rybí tkáně, jako na játra, slezinu a srdce, za podmínky, že na destičku je možné uložit dostatečné množství endotelových buněk, leukocytů a lymfocytů. Obarvování je stejné pro všechny tkáně, avšak u některých tkání se doporučuje zřídí se značení propidiumjodidem a upřednostnit fázové osvětlení, aby se identifikovaly typy buněk přítomných ve vzorku.

VI. HISTOLOGIE

Vzorky napuštěné do parafínu se nakrájí na kousky o velikosti 5 µm a obarví se za použití hematoxylinu a eosinu. Histologické změny související s ISA jsou popsány v novém vydání Diagnostické příručky pro choroby vodních živočichů OIE.

VII. Akronymy a zkratky

cDNA	Doplňující deoxyribonukleová kyselina
CPE	Cytopatický efekt
DEPC	Diethylpyrouhličitan
dNTP	deoxinukleotid trifosfát
FITC	Izothiokyanát fluoresceinu
IF	Imunofluorescence
IFAT	Nepřímý test na fluorescenční protilátku
OIE	Mezinárodní úřad pro nákazy zvířat („Office international des epizooties“)
IPN(V)	Infekční nekróza slinivky (virus)
ISA(V)	Nakažlivá chudokrevnost lososů (virus)
PBS	Slaný tlumivý fosfátový roztok
RNA	Kyselina ribonukleová
RZ-(PCR)	Obrácená transkripce (polymerázová řetězová reakce)
SHK-1	Hlavní ledvinové buňky lososa
TCID ₅₀	Dávka, která infikuje 50 % tkáňových kultur