

Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

► **B**

ROZHODNUTÍ KOMISE

ze dne 1. února 2002,

kterým se schvaluje diagnostická příručka s diagnostickými postupy, metodami odběru vzorků a kritérii pro hodnocení laboratorních testů na potvrzení klasického moru prasat

(oznámeno pod číslem K(2002) 381)

(Text s významem pro EHP)

(2002/106/ES)

(Úř. věst. L 39, 9.2.2002, s. 71)

Ve znění:

Úřední věstník

► **M1**

Rozhodnutí Komise 2003/859/ES, ze dne 5. prosince 2003

Č.	Strana	Datum
L 324	55	11.12.2003



ROZHODNUTÍ KOMISE

ze dne 1. února 2002,

kterým se schvaluje diagnostická příručka s diagnostickými postupy, metodami odběru vzorků a kritérii pro hodnocení laboratorních testů na potvrzení klasického moru prasat

(oznámeno pod číslem K(2002) 381)

(Text s významem pro EHP)

(2002/106/ES)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 2001/89/ES ze dne 23. října 2001 o opatřeních Společenství na tlumení klasického moru prasat⁽¹⁾, a zejména na čl. 17 odst. 3 a na čl. 29 odst. 1 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Na úrovni Společenství je nutné stanovit diagnostické postupy, metody odběru vzorků a kritéria pro hodnocení laboratorních testů na potvrzení klasického moru prasat.
- (2) Příloha IV směrnice 2001/89/ES stanoví funkce a povinnosti referenční laboratoře Společenství s cílem koordinovat na základě konzultací s Komisí metody používané v členských státech k diagnóze choroby. Mezi tyto funkce a povinnosti patří organizování pravidelných srovnávacích testů a poskytování standardních činidel na úrovni Společenství.
- (3) Virus klasického moru prasat se nepovažuje za nebezpečí pro zdraví lidí.
- (4) Nedávno byly vyvinuty laboratorní testy, které umožňují rychlou diagnózu klasického moru prasat.
- (5) Zkušenosti získané v posledních letech při tlumení klasického moru prasat vedly k nalezení nejvhodnějších metod odběru vzorků a kritérií pro hodnocení výsledků laboratorních testů pro správnou diagnózu choroby v různých situacích.
- (6) Opatření tohoto rozhodnutí jsou v souladu se stanoviskem Stálého veterinárního výboru,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

1. Členský stát zajistí, že je potvrzování klasického moru prasat založeno na:

- a) stanovení klinických příznaků a postmortálních lézí typických pro chorobu;
- b) zjištění viru, antigenu nebo genomu ve vzorcích tkání, orgánů, krve nebo výkalů prasat;
- c) prokázání specifické reakce protilátek ve vzorcích krve,

⁽¹⁾ Úř. věst. L 316, 1.12.2001, s. 5.

▼B

v souladu s postupy, metodami odběru vzorků a kritérii hodnocení výsledků laboratorních testů stanovených v příručce, která tvoří přílohu tohoto rozhodnutí.

2. Národní diagnostické laboratoře uvedené v příloze III oddíle 1 směrnice 2001/89/ES však mohou upravit testy uvedené v příručce tvořící přílohu tohoto rozhodnutí nebo použít jiné testy, pokud u nich lze prokázat stejnou citlivost a specifčnost.

Citlivost a specifčnost upravených nebo jiných testů musí být vyhodnocena v rámci pravidelných srovnávacích testů organizovaných referenční laboratoří Společenství pro klasický mor prasat.

Článek 2

Přílohy I a IV směrnice Rady 80/217/EHS ze dne 22. ledna 1980, kterou se zavádějí opatření Společenství pro tlumení klasického moru prasat ⁽¹⁾, naposledy pozměněné aktem o přistoupení Rakouska, Finska a Švédska, se zrušují.

Článek 3

Toto rozhodnutí se použije ode dne 1. listopadu 2002.

Článek 4

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 47, 21.2.1980, s. 11.



PŘÍLOHA

PŘÍRUČKA PRO STANOVENÍ DIAGNÓZY KLASICKÉHO MORU PRASAT

KAPITOLA I

Úvod, cíle a definice

1. S cílem zajistit jednotné postupy diagnózy klasického moru prasat tato příručka:
 - a) stanoví obecné zásady a minimální požadavky na diagnostické postupy, metody odběru vzorků a kritéria pro hodnocení výsledků klinických a postmortálních vyšetření a laboratorních testů s cílem dosáhnout správné diagnózy klasického moru prasat⁽¹⁾;
 - b) určuje minimální požadavky biologické bezpečnosti a normy jakosti, které musí dodržovat diagnostické laboratoře klasického moru prasat a které se musí dodržovat při přepravě vzorků;
 - c) určuje, které laboratorní testy je nutno používat k diagnóze klasického moru prasat a které laboratorní techniky je nutno používat při genetické klasifikaci izolátů viru klasického moru prasat.
2. Tato příručka je určena zejména orgánům odpovědným za tlumení klasického moru prasat. Proto klade důraz na zásady a provádění laboratorních testů a hodnocení jejich výsledků a nikoli na podrobný popis laboratorních technik.
3. Pro účely této příručky platí kromě definic uvedených v článku 2 směrnice 2001/89/ES tyto definice:
 - a) „podezřelým hospodářstvím“ se rozumí jakékoli hospodářství, v němž se nachází jedno nebo více prasat podezřelých z infekce virem klasického moru prasat nebo kontaktní hospodářství definované v čl. 2 písm. v) směrnice 2001/89/ES;
 - b) „ojedinělým případem“ se rozumí jakékoli prase, které má pozitivní výsledky v sérologických testech na klasický mor prasat, které se však nikdy předtím nedostalo do styku s virem klasického moru prasat a u něhož neexistují žádné důkazy, že šíří infekci na okolní prasata⁽²⁾;
 - c) „epizootologickou podjednotkou“ nebo „podjednotkou“ se rozumí budova, místo nebo okolní pozemek, v nichž se v hospodářství chovají skupiny prasat takovým způsobem, který umožňuje jejich častý přímý nebo nepřímý styk, ale zároveň je odděluje od ostatních prasat v hospodářství;
 - d) „okolními prasaty“ se rozumějí prasata, která se v hospodářství chovala v posledních 21 dnech v přímém kontaktu s jedním nebo více prasaty podezřelými z infekce virem klasického moru prasat.

KAPITOLA II

Popis klasického moru prasat s důrazem na diferenciální diagnózu

A. Úvod

1. Klasický mor prasat je způsoben obaleným virem RNA, který patří do rodu *Pestivirus* čeledi *Flaviridae*. Tento virus je příbuzný pestivirům přežvýkavců způsobujícím bovinní virovou diarrehoi (BVD) a pestivirózu ovcí (BDV). Tento vztah má vážné dopady na diagnózu, protože může dojít ke křížovým reakcím, které mohou vést k falešně pozitivním výsledkům laboratorních testů.
2. Virus klasického moru prasat je relativně stabilní ve vlhkých výkalech infikovaných prasat, v jatečně upravených tělech prasat, v čerstvém vepřovém masu a v některých výrobcích z vepřového masa. Rychle ho inaktivují detergenty, rozpouštědla tuku, proteinázy a běžné dezinfekční prostředky.

⁽¹⁾ Při rozhodování o počtu vzorků, které budou odebrány k laboratornímu vyšetření, je nutné vzít v úvahu také citlivost testů. Pokud citlivost použitých testů není příliš vysoká, bude počet zvířat, kterým budou odebrány vzorky, mnohem vyšší než počet uvedený v této příručce.

⁽²⁾ Ojedinělé případy mohou vykazovat titry protilátek neutralizujících vir od limitní hodnoty (což je nejčastější) po vysoce pozitivní hodnoty. Při novém odběru vzorků mohou tyto ojedinělé případy vykazovat snížený nebo stejný titr. Takového falešně pozitivní reakce se obvykle objeví jen u několika prasat ve stádě.

▼B

3. Hlavní přirozená cesta infekce je orálně-nazální, přímým nebo nepřímým stykem s infikovanými prasaty nebo podáním krmiva, které je zaměřeno virem. V oblastech s vysokou hustotou prasat snadno dochází k šíření viru mezi sousedícími chovy prasat. Může také dojít k přenosu choroby spermatem infikovaných kanců.
4. Inkubační doba je u jednotlivých zvířat asi jeden týden až deset dní, ale ve skutečných podmínkách se klinické příznaky mohou v hospodářství objevit až dva nebo čtyři týdny po zavlečení viru nebo dokonce déle, pokud jsou zasažena pouze dospělá plemenná prasata nebo pokud se jedná o slabý kmen viru.
5. Klinické příznaky klasického moru prasat jsou nesmírně proměnlivé a lze je zaměnit za příznaky mnoha jiných chorob. Závažnost příznaků závisí zejména na stáří zvířat a na virulenci viru. Mladší zvířata jsou obvykle zasažena mnohem vážněji než starší zvířata. U starších plemenných prasat je průběh infekce často mírný nebo dokonce subklinický.
6. Lze rozlišit akutní, chronickou a prenatalní formu klasického moru prasat.

B. Akutní forma

1. Odstávčata a prasata na výkrm nejčastěji vykazují akutní formu klasického moru prasat. Počátečními známkami jsou anorexie, letargie, horečka, zánět očních spojivek, oteklé lymfatické uzliny, respirační příznaky a zácpa následovaná průjemem.

Typické hemoragie kůže se obvykle vyskytují na uchu, ocase, břiše a vnitřní straně končetin od druhého a třetího týdne od infekce až do uhynutí. Často lze pozorovat neurologické příznaky, například vrávorání zadních končetin, nekoordinované pohyby a křeče.

Stálým nálezem je horečka. Je obvykle vyšší než 40 °C, ale u dospělých prasat nemusí přesáhnout 39,5 °C.

2. Vir klasického moru prasat způsobuje těžkou leukopenii a utlumení imunitní reakce organismu, což často vede k sekundárním střevním nebo dýchacím infekcím. Známky těchto sekundárních infekcí mohou zakrýt nebo překrýt netypičtější znaky klasického moru prasat, a tak mohou být pro chovatele nebo veterináře zavádějící.

K úhynu většinou dojde do jednoho měsíce. Dochází i k uzdravení a produkci protilátek, nejčastěji u dospělých plemenných zvířat, která nevykazují závažné klinické příznaky. Protilátky proti viru klasického moru prasat lze zjistit od druhého nebo třetího týdne po infikování.

3. Patologické změny viditelné při postmortálním vyšetření lze nejčastěji pozorovat v lymfatických uzlinách a v ledvinách. Lymfatické uzliny jsou oteklé a hemoragické. Hemoragie ledvin mohou mít různou velikost, od téměř neviditelných petechií po ekchymozní hemoragie. Podobné hemoragie lze pozorovat také v močovém měchýři, hrtanu, hrtanové příklopce a srdci a někdy na serózní bláně pobřišnice a pohrudnice. Často je zjištěn také nehnisavý zánět mozku. Lze pozorovat také změny způsobené sekundárními infekcemi, které mohou být pro veterináře zavádějící. Infarkty ve slezině se pokládají za patognomické příznaky, ale vyskytují se zřídka.

4. Akutní forma afrického moru prasat má většinou velice podobný klinický a patologický obraz jako klasický mor prasat. Hemoragie kůže a uší, pokud k nim dojde, lze snadno rozpoznat a nabýt podezření na akutní africký nebo klasický mor prasat. Málokteré jiné choroby způsobují podobné léze.

Akutní klasický mor prasat je nutno brát v úvahu také v případě podezření na eryspél, rozmnožovací a dýchací syndrom prasat, otravu kumarinem, tečkovité krvácení, multisystémový kachektický syndrom po odstavu, dermatitidu prasat a syndrom choroby ledvin, infekce *Salmonellou* nebo *Pasteurellou* nebo jakékoli střevní nebo dýchací syndromy s horečkou, které nereagují na léčbu antibiotiky.

5. Virus klasického moru prasat se přenáší slinami, močí a výkaly od chvíle, kdy se objeví klinické příznaky až po úhyn. Vir klasického moru prasat může být také přenesen spermatem.

C. Chronická forma

1. K chronickému průběhu infekce dochází, pokud prasata nejsou schopna vyvolat účinnou imunitní reakci na virus klasického moru prasat. Počá-

▼B

teční příznaky chronické infekce se podobají příznakům akutní infekce. Později převládají nespecifické příznaky, tj. přerušovaná horečka, chronická enteritida a kachexie. Nedochozí k typickým kožním hemoragiím.

Taková prasata mohou vykazovat klinické příznaky choroby 2 až 3 měsíce před úhynem. Od prvního výskytu klinických příznaků až po úhyn neustále šíří vir klasického moru prasat. Ve vzorcích séra lze dočasně zjistit protilátky.

2. Patologické změny jsou méně typické, mohou být zjištěny zejména hemoragie v orgánech a serózní bláně. U zvířat s chronickým průjmem jsou běžné nekrotické změny v ileu, ileocekální chlopni a v konečníku.
3. Vzhledem k tomu, že klinické příznaky klasického moru prasat jsou značně nespecifické, musí se u mnoha jiných chorob uvažovat o diferenciální diagnóze. U všech zvířat nedochází nutně ke zvýšení tělesné teploty, ale v zamořeném hospodářství bude horečka zjištěna přinejmenším u části prasat.

D. Prenatální forma a pozdní propuknutí choroby

1. Vir klasického moru prasat je schopen infikovat plod přes placentu prasnic, ale u prasnic samotných choroba často zůstane v subklinické formě.

Výsledek infekce plodů přes placentu závisí z velké části na stádiu gravidity a na virulenci viru. Infekce na počátku gravidity může vést k potratům, narození mrtvého selete, mumifikaci nebo malformacím. To vše vede ke snížení indexu plodnosti v hospodářství.

Infekce prasnic před devadesátým dnem gravidity může vést k narození trvale viremických selat, která mohou být při narození klinicky normální a mohou přežít několik měsíců. Po narození se u nich může projevit špatný růst, kachexie, občas i vrozený třes. Tento průběh infekce se označuje jako „pozdní propuknutí klasického moru prasat“. Tato selata mohou hrát hlavní roli při šíření choroby a udržování perzistence viru v populaci, protože až do svého úhynu neustále šíří vir.

2. Zjištění klasického moru prasat může být obzvláště obtížné v chovech plemenných prasat, protože průběh infekce může být velmi mírný a lze ho zaměnit za mnoho jiných patologických stavů. Příčinou snížené plodnosti a potratů může být vir klasického moru prasat stejně tak jako infekce parvovirem, rozmnožovací a dýchací syndrom prasat, leptospiróza a Aujeszkyho choroba. Těla nedonošených prasat potracených kvůli infekci virem klasického moru prasat nelze po patologické stránce rozlišit od potratů způsobených jinými patogenními činiteli.

V případech podezření na infekční chorobu rozmnožovacího ústrojí musí být okamžitě provedeno vyšetření na klasický mor prasat, pokud může být dané hospodářství považováno za rizikové (např. z důvodů umístění hospodářství v oblasti, ve které se klasický mor prasat vyskytuje u volně žijících prasat) a kdykoli byly vyloučeny běžnější infekční choroby rozmnožovacího ústrojí.

KAPITOLA III

Obecné zásady pro hlavní kritéria, která je nutno vzít v úvahu při označení hospodářství za hospodářství podezřelé ze zasažení klasickým morem prasat

Rozhodnutí označit hospodářství za podezřelé hospodářství se přijímá na základě následujících zjištění, kritérií a důvodů:

- a) klinické a patologické nálezy u prasat. Hlavní klinické a patologické nálezy, které se berou v úvahu, jsou:
 - horečka se zvýšenou nemocností a úmrtností,
 - horečka s hemoragickým syndromem,
 - horečka s neurologickými příznaky,
 - horečka neznámého původu, pokud léčba antibiotiky nezlepšila zdravotní stav,
 - potraty a zvýšené problémy s plodností v období posledních tří měsíců,
 - vrozený třes selat,
 - chronicky nemocná zvířata,

▼B

- mladá zvířata s opožděným růstem,
 - petechické a ekchymozní hemoragie, zejména v lymfatických uzlinách, ledvinách, slezině, močovém měchýři a hrtanu,
 - infarkty nebo hematomy, zejména ve slezině,
 - vředy tračníku v chronických případech, zejména u ileocekálního spoje;
- b) epizootologické nálezy. Hlavní epizootologické nálezy, které se berou v úvahu, jsou:
- pokud byla prasata v přímém nebo nepřímém styku s chovem prasat, u něhož je prokázána infekce klasickým morem prasat,
 - pokud hospodářství dodalo prasata, u nichž se později prokázala infekce klasickým morem prasat,
 - pokud byly prasnice uměle oplodněny spermatem pocházejícím z podezřelého zdroje,
 - pokud došlo k přímému nebo nepřímému styku s volně žijícími prasaty, v jejichž populaci se vyskytuje klasický mor prasat,
 - pokud se prasata chovají venku v oblasti, v níž jsou volně žijící prasata infikována klasickým morem prasat,
 - pokud byla prasata krmena pomyji a existuje podezření, že tyto pomyje nebyly ošetřeny takovým způsobem, který inaktivuje virus klasického moru prasat,
 - pokud mohlo dojít k vystavení riziku, například prostřednictvím osob, které vstupují do hospodářství, při dopravě, atd.;
- c) nálezy, které se vztahují k výsledkům sérologických testů. Hlavní laboratorní nálezy, které se berou v úvahu, jsou:
- sérologická reakce způsobená nezpozorovanou infekcí virem klasického moru prasat nebo očkováním ⁽¹⁾,
 - křížová reakce protilátek klasického moru prasat a jiných pestivirů ⁽²⁾,
 - zjištění ojedinělých případů ⁽³⁾.

KAPITOLA IV***Postupy při kontrole a odběru vzorků*****A. Obecné zásady a postupy pro klinické vyšetření prasat a pro odběr vzorků v podezřelém hospodářství**

1. Členské státy zajistí, aby v podezřelých hospodářstvích byla provedena příslušná klinická vyšetření, odběr vzorků a laboratorní vyšetření, která potvrdí nebo vyloučí klasický mor prasat podle obecných zásad a postupů stanovených v bodech 2 až 7.

Bez ohledu na přijetí opatření uvedených v čl. 4 odst. 2 směrnice 2001/89/ES v daném hospodářství, platí tyto obecné zásady a postupy také pro choroby, u nichž diferenciální diagnóza zvažuje klasický mor prasat. Týkají se i případů, v nichž klinické příznaky a epizootologický obraz choroby pozorované u prasat naznačují velice nízkou pravděpodobnost výskytu klasického moru prasat.

Ve všech ostatních případech, v nichž existuje podezření, že jedno nebo několik prasat je infikováno virem klasického moru prasat, se v daném podezřelém hospodářství přijmou opatření uvedená v čl. 4 odst. 2 směrnice 2001/89/ES.

V případě podezření na klasický mor prasat u prasat na jatkách nebo v dopravním prostředku obdobně platí postupy stanovené v bodech 2 až 7.

⁽¹⁾ Pokud byla prasata očkována konvenční očkovací látkou proti klasickému moru prasat, mohou být séropozitivní kvůli očkování nebo kvůli latentní infekci u očkováných zvířat.

⁽²⁾ Za určitých okolností může mít až 10 % prasat ve stádě protilátky proti pestivirům způsobujícím boviní virovou diarhoeu a pestivirózu ovcí. Například pokud jsou prasata v přímém kontaktu s dobytkem nebo ovci infikovanými virem těchto chorob nebo když se prasata dostávají do styku s materiálem zamořeným pestiviry přežvýkavců.

⁽³⁾ Ve všech současných sérologických testech na klasický mor prasat dává malá část sér falešně pozitivní výsledky, buď kvůli nedostatku specifčnosti testovacího systému, nebo kvůli séru od ojedinělých případů.

▼B

2. Když úřední veterinární lékař navštíví podezřelé hospodářství, aby potvrdil nebo vyvrátil výskyt klasického moru prasat:

- je nutné provést kontrolu výrobních a zdravotních záznamů hospodářství, pokud jsou dostupné,
- je nutné provést inspekci každé podjednotky hospodářství a vybrat prasata, která budou klinicky vyšetřena.

Klinické vyšetření musí zahrnovat změření tělesné teploty a musí se týkat zejména těchto prasat nebo skupin prasat:

- nemocných nebo anorektických prasat,
- prasat, která se v poslední době uzdravila z choroby,
- prasat přivezených v poslední době z potvrzených ohnisek nebo z jiných podezřelých zdrojů,
- prasat chovaných v podjednotkách, které v poslední době navštívily cizí osoby, jež byly krátce předtím v blízkém kontaktu s prasaty infikovanými klasickým morem prasat nebo s prasaty podezřelými z této choroby nebo u nichž byly zjištěny jiné zvláště nebezpečné kontakty s možným zdrojem viru klasického moru prasat,
- prasat, kterým již byly odebrány vzorky a u nichž byly provedeny sérologické testy na klasický mor prasat, pokud výsledky těchto testů nedovolují vyloučit klasický mor prasat, a okolních prasat.

Pokud inspekce v podezřelém hospodářství nezjistí přítomnost prasat nebo skupin prasat uvedených v předcházejícím bodu, zajistí příslušný orgán, aniž jsou dotčena jiná opatření, která se mohou na dané hospodářství vztahovat podle směrnice 2001/89/ES, a s ohledem na epizootologickou situaci, aby:

- v daném hospodářství byla provedena další vyšetření v souladu s níže uvedeným třetím bodem, nebo
- byl proveden odběr vzorků krve prasat z daného hospodářství pro laboratorní testy. V tomto případě se pro orientační účely využijí postupy stanovené v bodu 5 a v části F bodu 2, nebo
- v daném hospodářství byla až do dalšího šetření přijata nebo zachována opatření stanovená v čl. 4 odst. 2 směrnice 2001/89/ES, nebo
- došlo k vyloučení podezření na klasický mor prasat.

3. Pokud se odkazuje na tento bod, je nutné, aby bylo klinické vyšetření v daném hospodářství provedeno na náhodně vybraných prasatech v podjednotkách, u nichž bylo zjištěno riziko zavlečení viru klasického moru prasat nebo u nichž existuje podezření na takové riziko.

V těchto podjednotkách musí minimální počet vyšetřených prasat umožnit zjištění moru, pokud se vyskytuje, s jistotou 95 % při prevalenci 10 %.

Avšak v případě:

- plemenných prasnic musí minimální počet vyšetřených prasnic umožnit zjištění moru, pokud se vyskytuje, s jistotou 95 % při prevalenci 5 %,
- v inseminační stanici musí být vyšetřeni všichni kanci.

4. Pokud se v podezřelém hospodářství naleznou uhynulá nebo umírající prasata, musí být provedena postmortální vyšetření, pokud je to možné přinejmenším u pěti z těchto prasat, a to zejména u prasat:

- u nichž se před úhynem projeví velice jasné příznaky choroby,
- s vysokou horečkou,
- nedávno uhynulých.

Pokud tato vyšetření nezjistila změny poukazující na klasický mor prasat, ale pokud je kvůli epizootologické situaci považováno za nutné provést další šetření:

- musí být v podjednotce, kde byla chována uhynulá nebo umírající prasata, provedeno klinické vyšetření uvedené v bodu 3 a odběr vzorků krve uvedený v bodu 5, a
- u 3 až 4 okolních prasat musí být provedeno postmortální vyšetření.

▼B

Bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost změn poukazujících na klasický mor prasat musí být prasatům, u kterých se provádí postmortální vyšetření, odebrány vzorky orgánů nebo tkání k virologickým testům podle kapitoly V části B bodu 1. Tyto vzorky by měly být odebrány z nedávno uhynulých prasat.

Při provádění postmortálního vyšetření musí příslušný orgán zajistit, aby:

- byla přijata nezbytná bezpečnostní a hygienická opatření zabráňující jakémukoli šíření choroby a
- umírající prasata byla utracena humánním způsobem podle směrnice Rady 93/119/EHS.

5. Pokud jsou v podezřelém hospodářství zjištěny další klinické příznaky nebo změny, které mohou poukazovat na klasický mor prasat, ale příslušný orgán usoudí, že tyto nálezy nestačí k potvrzení ohniska klasického moru prasat a že jsou proto nutné laboratorní testy, musí být podezřelým prasatům a dalším prasatům v každé podjednotce, ve které jsou chována podezřelá prasata, odebrány v souladu s níže uvedenými postupy vzorky krve k laboratornímu vyšetření.

Minimální počet vzorků odebraných pro sérologické testy musí v dané podjednotce umožnit zjištění 10 % séroprevalence s jistotou 95 %.

Avšak v případě:

- plemenných prasnic musí minimální počet prasnic, kterým byl odebrán vzorek, umožnit zjištění 5 % séroprevalence s jistotou 95 % ⁽¹⁾,
- v inseminační stanici musí být odebrány vzorky krve všem kancům.

Počet vzorků odebraných k virologickým testům odpovídá pokynům příslušného orgánu, který vezme v úvahu škálu testů, jež mohou být provedeny, citlivost laboratorních testů, které budou použity, a epizootologickou situaci.

6. Pokud se v daném hospodářství vztahuje podezření z klasického moru prasat k výsledkům předchozích sérologických testů, uplatní se kromě odběru vzorků krve prasatům uvedeným v bodu 2 druhém pododstavci páté odrážce i tyto postupy:

- a) pokud jsou séropozitivní gravidní prasnice, některé z nich, pokud možno nejméně tři, se utratí a podrobí postmortálnímu vyšetření. Před utracením se odebere vzorek krve pro další sérologické testy. Na plodech se provede vyšetření viru klasického moru prasat, antigenu viru nebo genomu viru podle kapitoly VI zaměřené na zjištění nitroděložní infekce;
- b) pokud jsou séropozitivní prasnice se sajícími selaty, musí být všem selatům odebrány vzorky krve, které by měly být podrobeny vyšetření na virus klasického moru prasat, antigen viru nebo genom viru podle kapitoly VI. Vzorky krve pro další sérologické testy musí být odebrány také prasnicím.

7. Pokud po vyšetření provedeném v podezřelém hospodářství nejsou zjištěny klinické příznaky nebo změny typické pro klasický mor prasat, ale pokud příslušný orgán usoudí, že k vyloučení klasického moru prasat jsou nezbytné další laboratorní testy, použijí se pro orientační účely postupy odběru vzorků uvedené v bodu 5.

B. Postupy odběru vzorků v hospodářství, v němž po potvrzení choroby probíhá utrácení prasat

1. Aby mohl být zjištěn způsob zavlečení viru klasického moru prasat do zamořeného hospodářství a doba, která uplynula od zavlečení, musí být v hospodářství, v němž po potvrzení ohniska podle čl. 5 odst. 1 písm. a) směrnice 2001/89/ES probíhá utrácení prasat, těmto prasatům při utrácení namátkově odebrány vzorky krve k sérologickým testům.

⁽¹⁾ V některých případech, např. v případě podezření na klasický mor prasat v hospodářství s omezeným počtem mladých prasat, může být podíl infikovaných prasnic velice nízký. V takových případech je nutné odebrat vzorky většímu množství prasnic.

▼B

2. Minimální počet prasat, kterým jsou odebrány vzorky, musí umožnit zjištění 10 % séroprevalence s jistotou 95 % u prasat v každé podjednotce hospodářství⁽¹⁾.

Podle pokynů příslušného orgánu, který vezme v úvahu škálu testů, které je možno provést, citlivost laboratorních testů, které budou použity, a epizootologickou situaci, mohou být také odebrány vzorky pro virologické testy.

3. V případě sekundárních ohnisek však příslušný orgán může rozhodnout o odchylce od bodů 1 a 2 a zavést postupy odběru vzorků *ad hoc* se zřetelem k dostupným epizootologickým informacím o zdroji a způsobu zavlečení viru do hospodářství a o možném šíření choroby z hospodářství.

C. Postupy odběru vzorků v případě, kdy v podezřelém hospodářství probíhá utrácení prasat jako preventivní opatření

1. Pro potvrzení nebo vyloučení klasického moru prasat a pro získání dodatečných epizootologických informací se v podezřelém hospodářství, v němž probíhá usmrcování prasat jako preventivní opatření podle ustanovení čl. 4 odst. 3 písm. a) nebo čl. 7 odst. 2 směrnice 2001/89/ES, odebírají podle postupu stanoveného v bodu 2 vzorky krve k sérologickým testům a vzorky krve nebo mandlí k virologickým testům.

2. Odběr vzorků se týká zejména:

- prasat, na kterých se projevují známky nebo postmortální změny poukazující na klasický mor prasat, a okolních prasat,
- jiných prasat, která mohla být v nebezpečném kontaktu s infikovanými nebo podezřelými prasaty nebo která jsou podezřelá z infekce virem klasického moru prasat.

Těmto prasatům se musí odebrat vzorky podle pokynů příslušného orgánu, který vezme v úvahu epizootologickou situaci. V takovém případě se pro orientační účely použijí postupy odběru vzorků uvedené níže ve druhém, třetím a čtvrtém bodě.

Kromě toho musí být namátkově odebrány vzorky prasatům pocházejícím z každé podjednotky hospodářství⁽²⁾. V tomto případě musí minimální počet vzorků odebraných pro sérologické testy umožnit zjištění 10 % séroprevalence s jistotou 95 % v každé dotčené podjednotce.

Avšak v případě:

- plemenných prasnic musí minimální počet prasnic, kterým budou odebrány vzorky, umožnit zjištění 5 % séroprevalence s jistotou 95 %⁽³⁾,
- v inseminačním centru musí být vzorky krve odebrány všem kancům.

Typ vzorků odebraných pro virologické testy i další testy, které budou použity, jsou v souladu s pokyny příslušného orgánu, který vezme v úvahu škálu testů, které lze provést, citlivost těchto testů a epizootologickou situaci.

D. Postupy kontroly a odběru vzorků před udělením povolení k přemístění prasat z hospodářství umístěných v ochranném pásmu nebo v pásmu dozoru a pro případ porážení nebo utrácení takových prasat

1. Aniž jsou dotčena ustanovení čl. 11 odst. 1 písm. f) druhého pododstavce směrnice 2001/89/ES, je pro udělení povolení přemístit prasata z hospodářství umístěných v ochranném pásmu nebo v pásmu dozoru podle čl. 10 odst. 3 uvedené směrnice nezbytné, aby klinické vyšetření provedené úředním veterinárním lékařem:

⁽¹⁾ Pokud však byla použita odchylka stanovená v čl. 6 odst. 1 směrnice 2001/89/ES, musí být vzorky odebrány v podjednotkách, ve kterých byla prasata utrácena, aniž jsou dotčena další vyšetření a odběry vzorků u zbývajících prasat v hospodářství, která proběhnou podle pokynů příslušného orgánu.

⁽²⁾ Pokud však příslušný orgán omezil preventivní utrácení pouze na část hospodářství, v níž byla chována prasata podezřelá z infekce virem klasického moru prasat, podle čl. 4 odst. 3 písm. a) směrnice 2001/89/ES, musí být vzorky odebrány ve všech podjednotkách, v nichž bylo toto opatření použito, aniž tím jsou dotčena další vyšetření a odběry vzorků u zbývajících prasat v hospodářství, která proběhnou podle pokynů příslušného orgánu.

⁽³⁾ V některých případech, např. v případě podezření na klasický mor prasat v hospodářství s omezeným počtem mladých prasat, může být podíl infikovaných prasnic velice nízký. V takových případech je nutné odebrat vzorky většímu množství prasnic.

▼B

— bylo provedeno v období 24 hodin před přemístěním prasat,

— bylo v souladu s ustanoveními části A bodu 2.

2. Pokud budou prasata přemístěna do jiného hospodářství, musí být kromě vyšetření prováděných podle bodu 1 provedeno také klinické vyšetření prasat v každé podjednotce hospodářství, ve které se chovají prasata, která budou přemístěna. V případě prasat starších než tři nebo čtyři měsíce musí toto vyšetření zahrnovat změření tělesné teploty části prasat.

Minimální počet zkontrolovaných prasat musí v těchto podjednotkách umožnit zjištění horečky, pokud se vyskytuje, s jistotou 95 % při prevalenci 20 %.

Avšak v případě:

— plemenných prasnic musí být vyšetřen alespoň takový počet prasnic, aby bylo možno zjistit případnou horečku s jistotou 95 % při prevalenci 5 % v podjednotce, ve které se chovají prasata, která budou přemístěna,

— kanců musejí být vyšetřeni všichni kanci, kteří budou přemístěni.

3. Pokud budou prasata přemístěna na jatka nebo do zpracovatelského závodu nebo na jakékoli jiné místo, kde budou porážena nebo utracena, musí být kromě vyšetření prováděných podle bodu 1 provedeno také klinické vyšetření prasat v každé podjednotce, v níž se chovají prasata, která budou přemístěna. V případě prasat starších než tři až čtyři měsíce musí toto vyšetření zahrnovat změření tělesné teploty části prasat.

Minimální počet zkontrolovaných prasat musí v těchto podjednotkách umožnit zjištění horečky, pokud se vyskytuje, s jistotou 95 % při prevalenci 20 %.

U plemenných prasnic nebo kanců však musí minimální počet vyšetřených prasat umožnit zjištění horečky, pokud se vyskytuje, s jistotou 95 % při prevalenci 5 % v podjednotce, ve které se chovají prasata, která budou přemístěna.

4. V případě porážky nebo utracení prasat uvedených v bodu 3 musí být prasatům z každé podjednotky, ze které byly přemístěny, odebrány vzorky krve na sérologické testy a vzorky krve nebo mandlí na virologické testy.

Minimální počet odebraných vzorků musí umožnit zjištění 10 % séroprevalence nebo prevalence viru s jistotou 95 % v každé podjednotce.

U plemenných prasnic nebo kanců však musí minimální počet prasat, kterým budou odebrány vzorky, umožnit zjištění 5 % séroprevalence nebo prevalence viru s jistotou 95 % v podjednotkách, v nichž byla prasata chována.

Typ odebraných vzorků a použité testy odpovídají pokynům příslušného orgánu, který vezme v úvahu škálu testů, které lze provést, citlivost těchto testů a epizootologickou situaci.

5. Pokud jsou však po porážce nebo utracení prasat zjištěny postmortální změny poukazující na klasický mor prasat, platí odchýlně od bodu 4 ustanovení o odběru vzorků uvedená v části C.

E. Postupy kontroly a odběru vzorků v hospodářství, kde dochází k repopulaci

1. Pokud se do hospodářství znovu umísťují prasata v souladu s čl. 13 odst. 2 písm. a) nebo čl. 19 odst. 8 písm. b) druhým pododstavcem směrnice 2001/89/ES, musí být použity tyto postupy odběru vzorků:

— v případě umístění ověřovacích prasat musí být namátkově odebrány vzorky krve pro sérologické testy takovému množství prasat, které umožní zjištění 10 % séroprevalence s jistotou 95 % v každé podjednotce hospodářství,

— v případě úplné repopulace musí být namátkově odebrány vzorky krve pro sérologické testy takovému množství prasat, které umožní zjištění 20 % séroprevalence s jistotou 95 % v každé podjednotce hospodářství.

V případě plemenných prasnic nebo kanců však musí být počet odebraných vzorků takový, aby umožnil zjištění 10 % séroprevalence s jistotou 95 %.

▼B

2. Po umístění nových prasat příslušný orgán zajistí, aby v případě jakékoli choroby nebo úhynu prasat v hospodářství z neznámých příčin byla dotčená prasata okamžitě vyšetřena na klasický mor prasat. Tato ustanovení platí až do zrušení omezení uvedených v čl. 13 odst. 2 písm. a) druhém pododstavci a v čl. 19 odst. 8 písm. b) druhém pododstavci druhé větě směrnice 2001/89/ES pro dané hospodářství.

F. Postupy odběru vzorků v hospodářství v ochranném pásmu před zrušením omezení

1. Aby mohla být v ochranném pásmu zrušena opatření uvedená v článku 10 směrnice 2001/89/ES, musí být ve všech hospodářstvích v pásmu:
 - provedeno klinické vyšetření podle postupů stanovených v části A bodech 2 a 3,
 - odebrány vzorky krve pro sérologické testy podle bodu 2.
2. Minimální počet odebraných vzorků krve musí umožnit zjištění 10 % séroprevalence s jistotou 95 % u prasat v každé podjednotce hospodářství.
Avšak v případě:
 - plemenných prasnic musí minimální počet odebraných vzorků umožnit zjištění 5 % séroprevalence s jistotou 95 %,
 - v inseminačním centru musí být odebrány vzorky krve všem kancům.

G. Postupy odběru vzorků v hospodářstvích v pásmu dozoru před zrušením omezení

1. Aby mohla být v pásmu dozoru zrušena omezení uvedená v článku 11 směrnice 2001/89/ES, musí být ve všech hospodářstvích v pásmu provedeno klinické vyšetření podle postupů stanovených v části A bodu 2.
Kromě toho musí být odebrány vzorky krve prasat:
 - ve všech hospodářstvích, v nichž se nechovají žádná prasata stará dva až osm měsíců,
 - kdykoli příslušný orgán usoudí, že se klasický mor prasat mohl nepozorovaně rozšířit mezi plemennými prasnicemi,
 - v jakémkoli jiném hospodářství, pokud to příslušný orgán uzná za vhodné,
 - ve všech inseminačních centrech.
2. V každém případě odběru vzorků krve k sérologickým testům v hospodářství, které se nacházejí v pásmu dozoru, musí být počet odebraných vzorků krve v souladu s částí F bodem 2. Pokud se však příslušný orgán domnívá, že se klasický mor prasat mohl nepozorovaně rozšířit mezi plemennými prasnicemi, je možné provést odběr vzorků pouze v podjednotkách, v nichž jsou tato zvířata chována.

H. Postupy sérologického sledování a odběru vzorků v oblastech, v nichž existuje podezření z výskytu klasického moru prasat nebo v nichž byl klasický mor prasat potvrzen u volně žijících prasat

1. V případě sérologického sledování volně žijících prasat v oblastech, v nichž byl potvrzen klasický mor prasat nebo v nichž existuje podezření na jeho výskyt, by nejprve měla být definována velikost populace, které budou odebrány vzorky, a zeměpisná oblast, ve které žije, aby mohl být určen počet vzorků k odebrání. Počet vzorků je nutno stanovit podle odhadovaného počtu živých zvířat a nikoli podle zastřelených zvířat.
2. Pokud nejsou dostupné údaje o hustotě a velikosti populace, je nutné určit zeměpisnou oblast, v níž budou odebrány vzorky, a brát při tom v úvahu stálou přítomnost volně žijících prasat a existenci přirozených nebo umělých překážek, které účinně brání rozsáhlému a stálému pohybu zvířat. Pokud takové překážky neexistují nebo pokud se jedná o rozlehlé oblasti, doporučuje se určit oblast odběru vzorků, jejíž rozloha nepřesahuje 200 km², kde obvykle žije populace asi 400 až 1 000 volně žijících prasat.
3. Aniž jsou dotčena ustanovení čl. 15 odst. 2 písm. c) směrnice 2001/89/ES, musí minimální počet prasat, kterým budou v určené oblasti odběru odebrány vzorky, umožnit zjištění 5 % séroprevalence s jistotou 95 %. Pro tyto účely je v každé určené oblasti nutné odebrat vzorky nejméně 59 zvířatům.

▼B

Doporučuje se také, aby:

- v oblastech, kde probíhá pravidelný a rozsáhlejší lov nebo kde probíhá selektivní lov jako opatření pro tlumení chorob, patřilo přibližně 50 % zvířat, kterým jsou odebrány vzorky, do věkové kategorie tři měsíce až jeden rok, 35 % do věkové kategorie jeden až dva roky a 15 % do věkové kategorie zvířat starších dvou let,
 - v oblastech, kde je lov velice malý nebo k němu vůbec nedochází, byly v každé z těchto tří věkových kategorií odebrány vzorky přinejmenším 32 zvířatům,
 - odběr vzorků proběhl v krátkém časovém rozmezí, pokud možno do jednoho měsíce,
 - se věk zvířat, kterým jsou odebírány vzorky, určoval podle prořezávání zubů.
4. Shromažďování vzorků pro virologické testy z volně žijících prasat, která byla zastřelena nebo nalezena uhynutá, musí být provedeno podle kapitoly V části B bodu 1.

Pokud se usoudí, že je nezbytné virologické sledování zastřelených volně žijících prasat, musí se provádět zejména na zvířatech starších tří měsíců až jeden rok.

5. Ke všem vzorkům odeslaným do laboratoře musí být přiložen dotazník uvedený v čl. 16 odst. 3 písm. 1 směrnice 2001/89/ES.

KAPITOLA V

Všeobecné postupy a kritéria pro shromažďování a převoz vzorků

A. Všeobecné postupy a kritéria

1. Před provedením odběru vzorků v podezřelém hospodářství musí být vypracována mapa hospodářství a musí být určeny epizootologické podjednotky hospodářství.
2. Kdykoli se předpokládá, že by mohlo být nutné opakovat odběr vzorků, musí být každé prase, kterému byly odebrány vzorky, označeno vlastní značkou, což zjednoduší opakování odběru vzorků.
3. Aniž je dotčena kapitola IV část A bod 5 písm. b), nesmí se vzorky pro sérologické testy odebírat selatům, která ještě nedosáhla stáří osmi měsíců.
4. Všechny vzorky musí být zaslány do laboratoře spolu s příslušnými formuláři podle požadavků stanovených příslušným orgánem. Tyto formuláře obsahují podrobné údaje o anamnéze prasat, jimž byly odebrány vzorky, a o zjištěných klinických známkách nebo postmortálních změnách.

V případě prasat chovaných v hospodářství musí být u prasat, kterým byly odebrány vzorky, uvedeny jasné informace o stáří, kategorii a hospodářství původu. Doporučuje se, aby se u každého prasete, kterému byl odebrán vzorek, zaznamenalo kromě jeho vlastní identifikační značky i jeho umístění v hospodářství.

B. Sběr vzorků pro virologické testy

1. Ke zjištění viru, antigenu nebo genomu klasického moru prasat u uhynulých nebo utracených prasat jsou nejvhodnější vzorky tkání mandlí, sleziny a ledvin. Kromě toho se doporučuje získat dva vzorky dalších lymfatických tkání, například retrofaryngických, průšních, čelistních nebo mezenterických lymfatických uzlin nebo vzorek ilea. V případě těl, u nichž proběhla autolýza, je nejvhodnější vybrat si vzorek dlouhé nebo hrudní kosti.
2. U prasat s horečkou nebo jinými příznaky choroby musí být podle pokynů příslušného orgánu získány vzorky antikoagulované nebo koagulované krve.
3. V případě nemocných zvířat se doporučují virologické testy. Pokud se tyto testy použijí s cílem sledovat zvířata, na nichž se neprojeví klinické příznaky, mají obvykle jen omezenou hodnotu. Pokud je však cílem rozsáhlého odběru vzorků zjištění viru klasického moru prasat v inkubačním období, jsou nejvhodnějšími vzorky mandlí.

▼B**C. Přeprava vzorků**

1. Doporučuje se, aby všechny vzorky:
 - byly přepravovány a skladovány v nepropustných nádobách,
 - nebyly zmrazeny, ale byly zchlazeny na teplotu chladničky,
 - byly dodány do laboratoře co nejrychleji,
 - byly pro účely chlazení umístěny do sáčků, v nichž by se měly raději používat chladicí pytlíky než led,
 - tkání nebo orgánů byly uloženy do samostatného pevně uzavřeného umělohmotného sáčku a byly řádně označeny štítkem. Tyto sáčky pak musí být vloženy do větších a pevnějších nádob a obaleny dostatečným množstvím svého materiálu, který je ochrání před poškozením a zabrání protékání,
 - byly, pokud je to možné, dopraveny příslušnými zaměstnanci přímo do laboratoře, aby byla zajištěna rychlá a spolehlivá přeprava.
2. Balík musí být na vnější straně označen adresou přijímací laboratoře a musí na něm být výrazně uvedena tato sdělení: Živočišný patologický materiál; Podléhající zkáze; Křehké; Neotevírejte mimo laboratoř klasického moru prasat.
3. Laboratoř, pro kterou jsou vzorky určeny, musí být předem informována o době a způsobu dodání vzorků.
4. V případě letecké přepravy vzorků ze třetích zemí a z členských států vyjma Německa do referenční laboratoře Společenství pro klasický mor prasat ⁽¹⁾ musí být balíček označen podle předpisů IATA.

KAPITOLA VI***Zásady a použití virologických testů a hodnocení jejich výsledků*****A. Zjištění virového antigenu****1. *Test imunofluorescence (FAT)***

Principem testu je zjištění virových antigenů na tenkých kryogenních řezech materiálu z orgánů prasat podezřelých z infekce virem klasického moru prasat. Vnitrobuněčný antigen se zjišťuje za použití protilátky konjugované pomocí FITC. Pozitivní výsledek by měl být potvrzen opakováním zabarvení specifickou monoklonální protilátkou.

Vhodnými orgány jsou mandle, ledviny, slezina, různé lymfatické uzliny a ileum. U volně žijících prasat, u nichž nejsou tyto orgány k dispozici nebo u nichž proběhla autolýza, lze použít roztěr buněk kostní dřeně.

Test je možné provést v průběhu jednoho dne. Vzhledem k tomu, že vzorky orgánů lze získat pouze z mrtvých zvířat, je jeho použití ke sledování choroby omezené. Jistota testů může být omezena nejasným zabarvením, zejména pokud jsou menší zkušenosti s prováděním testu nebo pokud u orgánů proběhla autolýza.

2. *ELISA na zjištění antigenu*

Virový antigen se zjišťuje za pomoci různých technik ELISA. Citlivost antigenu ELISA by měla být dostačující k získání pozitivních výsledků u zvířat vykazujících klinické příznaky klasického moru prasat.

Použití techniky ELISA ke zjištění antigenu se doporučuje u vzorků ze zvířat s klinickými příznaky nebo patologickými lézemi typickými pro chorobu. Není vhodné pro zkoumání jednotlivých zvířat. Vhodnými vzorky jsou leukocyty, sérum, nekoagulovaná krev a suspenze orgánů uvedených v bodu 1 pocházejících ze zvířat, u nichž existuje podezření z infekce virem klasického moru prasat ⁽²⁾.

ELISA může být provedena během jednoho dne a může být provedena automatickým zařízením. Její nejvýznamnější výhodou je zpracování velkého počtu vzorků v krátké době. Doporučuje se užívat ten antigen

⁽¹⁾ Referenční laboratoř Společenství má časově neomezené oprávnění k přijímání diagnostických vzorků a izolátů klasického moru prasat. Před dopravou je možné vyžádat si od laboratoře kopii dovozního povolení a přiložit ho v obálce k balíčku.

⁽²⁾ Na trhu je dostupných několik antigenů ELISA klasického moru prasat, které jsou schváleny pro různé typy vzorků.

▼B

ELISA, který má uspokojivé výsledky na referenčním materiálu. V současné době jsou však všechny techniky ELISA, které jsou na trhu, méně citlivé než izolace viru na buněčné kultuře a jejich citlivost je výrazně lepší u vzorků krve ze selat než z dospělých prasat.

B. Izolace viru

1. Izolace viru je založena na inkubaci materiálu ze vzorku na citlivých buněčných kulturách pocházejících z prasat. Pokud se ve vzorku vyskytne virus klasického moru prasat, rozmnoží se v buňkách až na množství, které lze rozpoznat díky imunozbarvení buněk infikovaných konjugovanými protilátkami. Aby bylo možné přistoupit k diferenční diagnóze vůči k jiným pestivirům, je nutné mít k dispozici specifické protilátky klasického moru prasat.
2. Upřednostňovanými vzorky pro izolaci viru klasického moru prasat jsou leukocyty, plazma nebo čistá krev získaná z nekoagulovaných vzorků krve nebo orgánů uvedených v části A bodě 1.
3. Izolace viru je nejvýhodnější pro zkoumání vzorků malého počtu zvířat spíše než pro hromadný dozor. Postup izolace viru je náročný na práci a výsledky jsou k dispozici nejdříve za tři dny. Pro zjištění malého množství viru ve vzorku může být nutné využít další dvě buněčné kultury. To znamená, že konečný výsledek se získá až po deseti dnech zkoumání. Autolyzované vzorky mohou být cytotoxické vůči buněčné kultuře a tak omezit její použití.
4. Izolace viru se doporučuje také v případě předchozího potvrzení klasického moru prasat jinými metodami. Je nutné ji použít jako referenční test na potvrzení pozitivních výsledků předchozích antigenů ELISA, PCR nebo testem FAT založeném na nepřímém zbarvení peroxidázou.

Takto získané izoláty klasického moru prasat jsou užitečné pro charakterizaci viru včetně genetické klasifikace a molekulární epizootologie.

5. Všechny izoláty viru klasického moru prasat z primárních ohnisek, z primárních případů u volně žijících prasat nebo z případů na jatkách nebo v dopravních prostředcích musí být geneticky zařazeny národní referenční laboratoři v členských státech nebo jakoukoli schválenou laboratoří v daném členském státě nebo referenční laboratoří Společenství v souladu s částí E.

V každém případě musí být izoláty viru neprodleně zaslány do referenční laboratoře Společenství, která je shromažďuje.

C. Zjištění genomu viru

1. Ke zjištění genomu viru ve vzorcích krve, tkání nebo orgánů se používá řetězová reakce polymerázy (PCR). Malé fragmenty RNA viru jsou přepsány do fragmentů DNA, které PCR zvětší na zjiitelné množství. Vzhledem k tomu, že tento test zjistí pouze sekvenci genomu viru, může být PCR pozitivní, i když není přítomen žádný infekční vir (např. v autolyzovaných tkáních nebo ve vzorcích z uzdravujících se prasat).
2. PCR lze použít na malém počtu pozorně vybraných vzorků od podezřelých zvířat nebo na materiále z potracených plodů. U těl volně žijících prasat je možné tuto metodu vybrat, pokud je materiál autolyzovaný a kvůli cytotoxicitě není možné provést izolaci viru.
3. Vhodným materiálem pro diagnózu pomocí PCR jsou orgány popsané u izolace viru a nekoagulovaná krev.
4. PCR lze provést v průběhu 48 hodin. Vyžaduje příslušné laboratorní vybavení, oddělená zařízení a kvalifikovaný personál. Výhodou je, že se částice infekčního viru nemusí v laboratoři množit. Metoda je velice citlivá, ale často může dojít ke kontaminaci, což vede k falešně pozitivním výsledkům. Proto jsou zásadní přísné postupy kontroly jakosti. Některé metody jsou specifické spíše pro pestiviry než pro klasický mor prasat, což vyžaduje další potvrzující testy, například zjišťování sekvence produktu PCR.

D. Hodnocení výsledků virologických testů

1. Virologické testy jsou pro potvrzení klasického moru prasat nezbytné.

Izolaci viru je nutné pokládat za referenční virologický test a musí být v případě potřeby použita jako potvrzující test. Její provedení se doporučuje zejména tehdy, když pozitivní výsledky FAT, ELISA nebo PCR

▼B

nejsou doprovázeny zjištěním klinických příznaků nebo lézí typických pro chorobu a v jakýchkoli jiných sporných případech.

Primární ohnisko klasického moru prasat však může být potvrzeno, pokud byly u daných prasat zjištěny klinické příznaky nebo známky typické pro chorobu a pokud alespoň dva testy na zjištění antigenu nebo genomu měly pozitivní výsledky.

Sekundární ohnisko klasického moru prasat může být potvrzeno, pokud kromě epizootologického spojení s potvrzeným ohniskem nebo případem byly u dotčených prasat zjištěny klinické příznaky nebo léze typické pro chorobu a pokud měl jeden test na zjištění antigenu nebo genomu pozitivní výsledek.

Primární případ klasického moru prasat u volně žijících prasat může být potvrzen po izolaci viru nebo poté, co měly alespoň dva testy na zjištění antigenu nebo genomu pozitivní výsledky. Další případy klasického moru prasat u volně žijících prasat, u nichž bylo zjištěno epizootologické spojení s dříve potvrzenými případy, mohou být potvrzeny, pokud měl jeden test na zjištění antigenu nebo genomu pozitivní výsledek.

2. Aby test na zjištění genomu nebo antigenu klasického moru prasat měl pozitivní výsledek, musí být proveden za pomoci specifických protilátek nebo zárodků klasického moru prasat. Pokud není provedený test specifický pro vir klasického moru prasat, ale je specifický pouze pro pestiviry, je nutno ho zopakovat s použitím činidel specifických pro klasický mor prasat.

E. Genetická charakterizace izolátů klasického moru prasat

1. Genetická charakterizace izolátů viru klasického moru prasat se provádí určením sekvencí nukleotidů částí genomu viru, zejména specifických částí nekódujícího segmentu 5 a/nebo glykoproteinu E2. Podobnost mezi těmito sekvencemi a sekvencemi získanými z předchozích izolátů viru naznačuje, zda jsou ohniska choroby způsobena novými nebo již určenými kmeny. Takový údaj může potvrdit nebo vyvrátit hypotézy o trasách přenosu založené na epizootologickém šetření.

Genetická charakterizace izolátů viru klasického moru prasat je velice významná pro určení zdroje choroby. Blízká příbuznost mezi viry získanými z různých ohnisek však není absolutním důkazem přímé epizootologické vazby.

2. Pokud v národní laboratoři nebo v jakékoli jiné laboratoři oprávněné k diagnostice klasického moru prasat nemůže být v krátké lhůtě provedena charakterizace viru, musí být původní vzorek izolátu viru zaslán co nejrychleji do referenční laboratoře Společenství.

Údaje, které mají laboratoře oprávněné k diagnostice klasického moru prasat k dispozici o charakteru a sekvencích izolátů viru klasického moru prasat, musí být postoupeny referenční laboratoři Společenství, která tyto informace zanesou do své databáze.

Informace uložené v této databázi jsou dostupné všem národním referenčním laboratorům v členských státech. Pro účely publikace v odborném tisku však na žádost dotčené laboratoře zaručí referenční laboratoř Společenství důvěrnost těchto údajů až do jejich zveřejnění.

KAPITOLA VII

Zásady a použití sérologických testů a hodnocení jejich výsledků

A. Základní zásady a diagnostická hodnota

1. U prasat infikovaných virem klasického moru prasat lze obvykle zjistit protilátky ve vzorcích séra od dvou až tří týdnů po infikování. U uzdravených prasat lze nacházet ochranné neutralizační protilátky několik let nebo v průběhu celého jejich života. Protilátky lze také občas zjistit u smrtelně nemocných zvířat v konečném stadiu. U některých prasat s chronickou formou klasického moru prasat lze nalézt protilátky během několika dní na konci prvního měsíce po infekci.

Prasata infikovaná *in utero* mohou být imunotolerantní vůči homologickému viru klasického moru prasat a nevytvářejí žádné specifické protilátky. V prvních dnech života však mohou být zjištěny mateřské protilátky. Poločas mateřských protilátek je u neviremických zdravých selat asi dva týdny. Pokud jsou u selat starších než tři měsíce zjištěny protilátky

▼B

klasického moru prasat, je velice nepravděpodobné, že jsou mateřského původu.

2. Zjištění protilátek viru klasického moru prasat ve vzorcích séra nebo plazmatu se provádí jako podpora při diagnóze klasického moru prasat v podezřelém hospodářství, při zjišťování doby infekce v případě potvrzeného ohniska a pro účely sledování a dozoru. Sérologické testy však mají omezenou hodnotu pro zjišťování klasického moru prasat v případě nedávné infekce v hospodářství.

Několik séropozitivních prasat s nízkým titrem neutralizace může být znamením nedávné infekce (dva až čtyři týdny). Větší množství prasat s vysokým titrem neutralizace může být znamením, že vir byl vnesen do hospodářství dříve než před měsícem. Umístění séropozitivních prasat v hospodářství může poskytnout cenné informace o způsobu zavlečení viru klasického moru prasat do hospodářství.

Pro přesné vyhodnocení výsledků sérologických testů je však nutné brát v úvahu celkové klinické, virologické a epizootologické nálezy z vyšetření provedeného v případě podezření nebo potvrzení klasického moru prasat v souladu s článkem 8 směrnice 2001/89/ES.

B. Doporučené sérologické testy

1. Test neutralizace viru (VNT) a ELISA jsou nejvhodnější testy pro sérologickou diagnózu klasického moru prasat.

Kvalita a účinnost sérologické diagnózy provedené národními laboratorními musí být pravidelně kontrolována mezilaboratorními srovnávacími testy pravidelně organizovanými referenční laboratorii Společenství.

2. VNT se zakládá na určení neutralizační činnosti protilátek vzorku séra vůči viru, vyjádřené jako neutralizační 50 % titr.

Konstantní množství viru klasického moru prasat se inkubuje při teplotě 37 °C se zředěným sérem. Pro účely sledování je sérum nejprve zředěno v poměru 1:10. Pokud je nutná úplná titrace, lze připravit dvojnásobné ředění séra od poměru 1:2 do 1:5. Každý roztok je smíchán se stejným objemem suspenze viru obsahující 100 infekčních dávek (TCID₅₀).

Po inkubaci je směs naočkována buněčným kulturám, které se inkubovaly tři až pět dní. Po tomto inkubačním období se kultury fixují a systém imunoznačení odhalí jakoukoli replikaci viru v infikovaných buňkách. Lze použít buď neutralizaci imunoperoxydázou (NPLA), nebo neutralizaci imunofluorescencí (NIF).

Výsledky VNT se vyjadřují jako převrácená hodnota původního ředění séra, v němž u poloviny naočkovaných buněčných kultur (konečný titr 50 %) nedojde k jakékoli replikaci viru (neobjeví se žádné specifické značení). Odhadne se titr mezi dvěma roztoky. Konečný systém roztoku se zakládá na skutečném roztoku séra v průběhu neutralizační reakce, tj. po přidání viru, ale před přidáním buněčné suspenze.

3. VNT je nejcitlivější a nejspolehlivější test na zjištění protilátek proti klasickému moru prasat. Doporučuje se proto pro sérologické vyšetření jednoho zvířete stejně tak jako pro vyšetření stáda. Tento test však může zjistit protilátky specifické pro infekci prasat pestiviry přežvýkavců, které způsobují křížovou neutralizační reakci.

Test VNT používaný ke zjištění protilátek virů BVD a BD se také řídí výše uvedenými zásadami a provádí se pro stanovení diferenciální diagnózy klasického moru prasat.

4. Kmeny pestivirů použitých v neutralizačních testech musí odpovídat doporučením referenční laboratoře Společenství.
5. Byly vyvinuty některé techniky ELISA, které využívají monoklonální protilátky; mají dvě podoby: konkurenční a blokující ELISA nebo nekonkurenční ELISA.

Konkurenční nebo blokující ELISA je obvykle založena na monoklonálních protilátkách. Pokud vzorek séra obsahuje protilátky klasického viru, bude zabráněno vázání vybrané monoklonální protilátky konjugované peroxydázou na antigen viru, což vede ke snížení signálu.

V nekonkurenčních testech ELISA se vázání protilátek séra na antigen měří přímo za použití protiprasečích protilátek konjugovaných peroxydázou.

▼B

6. Národní laboratoře musí pravidelně provádět kontrolu jakosti citlivosti a specifčnosti každé šarže ELISA a používat při tom řadu referenčních sér poskytnutých referenční laboratoří Společenství. Tato řada zahrnuje:

- séra prasat v raných stádiích infekce virem klasického moru prasat (do 21 dnů po infikování),
- séra z uzdravujících se prasat (od 21 dnů po infikování),
- séra z prasat infikovaných pestiviry přežvýkavců.

Testy ELISA použité pro sérologickou diagnózu klasického moru prasat musí rozpoznat všechna referenční séra z uzdravujících se prasat. Všechny výsledky získané z referenčních sér musí být možno opakovat. Dále se doporučuje, aby testy byly schopné zjistit všechna pozitivní séra z raného stadia a aby vykazovaly minimální křížové reakce se séry prasat infikovaných pestiviry přežvýkavců.

Výsledky získané z referenčních sér pocházejících z prasat v raném stadiu infekce ukazují citlivost testu ELISA.

7. Soudí se, že citlivost testu ELISA je nižší než citlivost VNT, a proto je doporučeno ji používat pro účely vyšetření stád. Může však být provedena v méně specializovaných zařízeních a díky automatizovanému systému rychleji než VNT.

Testy ELISA musí umožnit identifikaci všech infekcí klasickým morem prasat ve stadiu rekonvalescence a musí být co nejvíce prosty jakékoli interference křížově reagujících protilátek pestivirů přežvýkavců.

C. Výklad sérologických výsledků a diferenciální diagnózy pro odlišení od infekcí způsobených pestiviry přežvýkavců (BVDV a BDV)

1. Aniž jsou dotčena ustanovení čl. 4 odst. 3 písm. a) směrnice 2001/89/ES, v případě zjištění titru neutralizace klasického moru prasat rovného nebo vyššího než 10 ND50 ve vzorcích séra odebraných jednomu nebo více prasatům nebo zjištění pozitivního výsledku testu ELISA ve vzorcích séra od skupiny prasat se neprodleně použijí nebo se budou nadále používat opatření uvedená v čl. 4 odst. 2 směrnice 2001/89/ES.

Vzorky, které již v tomto hospodářství byly odebrány, musí být podrobeny testu VNT konečnou srovnávací titrací neutralizačních protilátek viru klasického moru prasat a pestivirů přežvýkavců.

2. Pokud srovnávací testy prokáží protilátky pestivirů přežvýkavců a žádné nebo výrazně nižší (přinejmenším třikrát) titry protilátek viru klasického moru prasat, bude vyloučeno podezření z přítomnosti klasického moru prasat, pokud neexistují jiné důvody, které opravňují další používání opatření uvedených v čl. 4 odst. 2 směrnice 2001/89/ES v daném hospodářství.
3. Pokud srovnávací testy prokáží u více než jednoho prasete titr neutralizace viru rovný nebo vyšší než 10 ND50 a tento titr bude rovný nebo vyšší než titry ostatních pestivirů, zajistí příslušný orgán potvrzení klasického moru prasat, pokud se v daném hospodářství našel epizootologický důkaz choroby.
4. Aniž jsou dotčena ustanovení čl. 4 odst. 3 směrnice 2001/89/ES v případě, že nebyl nalezen epizootologický důkaz choroby nebo pokud nejsou výsledky předchozích testů přesvědčivé, zajistí příslušný orgán, aby v daném hospodářství:
- dále platila opatření uvedená v čl. 4 odst. 2 směrnice 2001/89/ES,
 - bylo co nejrychleji provedeno další šetření na potvrzení nebo vyloučení klasického moru prasat podle kapitoly IV.
5. Pokud však další kontroly a testy uvedené v bodu 4 neumožní vyloučení klasického moru prasat, musí být v hospodářství nejdříve dva týdny po provedení předchozích kontrol proveden další odběr vzorků krve pro sérologické testy.

V rámci tohoto dalšího odběru vzorků se prasatům, kterým již byly odebrány vzorky, znovu odeberou vzorky a provedou se srovnávací testy nových vzorků s dříve odebranými vzorky za účelem zjištění sérokonverze viru klasického moru prasat nebo pestivirů přežvýkavců, pokud jsou přítomny.

▼B

Pokud tyto další kontroly a testy neumožní potvrzení klasického moru prasat, mohou být opatření uvedená v článku 4 směrnice 2001/89/ES zrušena.

▼M1

KAPITOLA VIII

*Diskriminační test v případě nouzového očkování***A. Hlavní zásady**

1. Diskriminační sérologický test ELISA (diskriminační test) umožňuje úspěšně rozlišit prasata očkována markerovými očkovacími látkami, které způsobují vznik protilátek výhradně proti glykoproteinu E2 viru klasického moru prasat, od prasat, která byla infikována volně se vyskytujícím kmenem viru klasického moru prasat. Tento test je určen ke zjištění protilátek na glykoprotein E^{ms} viru klasického moru prasat. Je založen na principu, že zdravá zvířata očkována markerovými očkovacími látkami vylučují protilátky pouze proti glykoproteinu E2 viru klasického moru prasat, zatímco zvířata infikovaná volně se vyskytujícím virem reagují též proti jiným antigenům viru a vytvářejí proti nim protilátky.

Tento diskriminační test je citlivý a specifický ⁽¹⁾. Prasata, která však byla infikována pestiviry jinými, než je virus klasického moru prasat, např. viry BVD a BD, budou též vykazovat pozitivní reakci na E^{ms}. Navíc není citlivost testu ideální, jelikož některá zvířata očkována markerovými očkovacími látkami a později infikovaná nemusejí vykazovat pozitivní reakci na E^{ms}.

Současné dostupné údaje ukazují, že diskriminační test nemůže být spolehlivě použit pro testování vzorků séra odebraných z volně žijících prasat.

2. Diskriminační test je kapalná fáze blokujícího enzymatického imunopokusu. Vzorky k testování se inkubují na mikrotitrových destičkách předem povlečených monoklonálními protilátkami anti-E^{ms} společně s definovaným množstvím antigenu E^{ms}. Jakákoliv protilátka specifická pro E^{ms} váže určité množství antigenu E^{ms} v roztoku a vytvoří se komplex antigen/protilátka, který nereaguje na protilátky anti-E^{ms} umístěné na mikrotitrové destičce. Po omytí destiček, jímž se odstraní nevázaný materiál, se přidá peroxidáza označená anti-E^{ms} konjugátem, která se váže na antigen E^{ms} komplexovaný protilátkou umístěnou na mikrotitrové destičce. Nevázaný konjugát se odstraní omytím a přidá se chromogenový substrát. Stupeň zbarvení, který se objeví, je v obráceném poměru k množství specifických protilátek E^{ms} přítomných ve vzorku. Pokud vzorek neobsahuje protilátky (negativní vzorek), většina definovaného množství antigenu E^{ms}, která byla přidána, se může vázat na protilátky anti-E^{ms} na destičce, přičemž je pozorována silná barevná reakce.

Výsledku se dosáhne porovnáním optické hustoty (OD) v jamkách obsahujících testované vzorky s hustotou jamek obsahujících negativní a pozitivní kontroly.

B. Pokyny pro užití diskriminačního testu v případě nouzového očkování markerovou očkovací látkou v hospodářstvích s chovem prasat v rámci článku 19 směrnice 2001/89/ES

Diskriminační test je určen k ověření přítomnosti nebo nepřítomnosti pohybu viru klasického moru prasat v populaci prasat očkovaných markerovou očkovací látkou. Dostupné údaje ukazují, že test může být úspěšně použit pro tento účel, pokud jde o celé stádo, avšak že nemůže s jistotou vyloučit, že některá prasata jsou virem klasického moru prasat infikována. Zejména hrozí, že specifčnost diskriminačního testu bude nedostatečná na to, aby umožnila spolehlivě rozlišit prasata očkována markerovou očkovací látkou od infikovaných prasat v případě očkování dospělých prasat. V případě nejednoznačnosti výsledků však musejí být dotyčná prasata humánně poražena nebo utracena v souladu se směrnicí 93/119/ES, a jejich orgány musejí být testovány na virus klasického moru prasat. Izolace viru a PCR jsou pro tento účel nejvhodnějšími testy.

Tato hlediska je třeba vzít v úvahu při vypracování strategie nouzového očkování markerovými očkovacími látkami a při výkladu výsledků šetření na klasický mor prasat v populaci očkované markerovými očkovacími látkami.

⁽¹⁾ V souladu s výsledky studie provedené referenční laboratoří Společenství pro klasický mor prasat a národními laboratořemi pro klasický mor prasat je citlivost diskriminačního testu 94 % a jeho specifčnost je přibližně 98 %.

▼M1

Postup odběru vzorků a testování populace očkovaných prasat před zrušením omezení, která se použijí v očkované zeměpisné oblasti v souladu s článkem 19 směrnice 2001/89/ES, závisí na věku očkovaných prasat, kategorii prasat (prasata na výkrm/jatečná, plemenná) a na požadované úrovni bezpečnosti, pokud jde o absenci pohybu viru v populaci.

Jednotlivosti postupu odběru vzorků a testování je proto třeba stanovit v plánu nouzového očkování, který se předloží Komisi podle čl. 19 odst. 3 směrnice 2001/89/ES.

▼B

KAPITOLA IX

Minimální bezpečnostní požadavky pro laboratoře klasického moru prasat

1. Minimální požadavky definované v tabulce 1 je nutno dodržovat ve všech laboratořích, v nichž se pracuje s virem klasického moru prasat, a to i tehdy, pokud se jedná o malé množství nezbytné pro izolaci viru a neutralizační testy. Nicméně postmortální vyšetření, přípravu tkání pro test FAT a sérologické techniky využívající inaktivovaný antigen lze provést podle méně přísných předpisů, pokud jsou dodržovány základní hygienické zásady a pokud je po skončení práce provedena dezinfekce a bezpečné zničení tkání a séra.
2. Jakákoli laboratoř, v níž se provádějí postupy zahrnující rozsáhlou multiplikaci viru, musí dodržovat dodatečné požadavky stanovené v tabulce 1.
3. Jakákoli laboratoř, v níž se provádí na zvířatech experimenty s virem klasického moru prasat, musí dodržovat dodatečné požadavky stanovené v tabulce 2.
4. V každém případě je nutné skladovat všechny zásoby viru klasického moru prasat v bezpečných skladech, buď hluboce zmrazené, nebo lyofilizované. Doporučuje se používat mrazničky a chladničky jen pro vir klasického moru prasat a pro materiál, který je spojen s diagnózou klasického moru prasat. Každá nádobka musí být jasně označena a musí být vedeny kompletní záznamy o zásobách viru a také o datech a výsledcích kontrol jakosti. Je nutné vést také záznamy o virech přidaných do zásob, včetně podrobných údajů o jejich původu, a o virech poskytnutých jiným laboratořím.
5. Doporučuje se, aby biologicky bezpečné jednotky pro práci s virem klasického moru prasat měly zázemí, v němž se s virem klasického moru prasat nepracuje. Toto zázemí by mělo být k dispozici pro přípravu laboratorního skla a prostředí, pro údržbu a přípravu neinfikovaných buněčných kultur, zpracování sér a sérologické testy (vyjma metod používajících vir klasického moru prasat) a pro správné úkony.

Tabulka

Zásady biologické kontroly platné pro diagnostické laboratoře

	Dodatečné požadavky	Minimální požadavky
Obecné prostředí	Normální atmosférický tlak. Dvojitá kompletní filtrace vypouštěného vzduchu. Zvláštní místnosti vyhrazené pouze pro postupy diagnostiky klasického moru prasat.	Normální atmosférický tlak. Zvláštní místnosti vyhrazené pro určité postupy.
Laboratorní oděv	Úplné převlečení při vstupu. Laboratorní oděv používaný pouze v jednotce zabývající se virem klasického moru prasat. Rukavice na jedno použití pro jakoukoli práci s infikovaným materiálem. Sterilizace oděvu před jeho vnesením z jednotky nebo praní oděvu v jednotce.	Zvláštní svrchní oděv určený pouze pro použití v jednotce zabývající se virem klasického moru prasat. Rukavice na jedno použití pro jakoukoli práci s infikovaným materiálem. Sterilizace svrchního oděvu před jeho vnesením z jednotky nebo praní svrchního oděvu v jednotce.

▼B

Dohled nad zaměstnanci	Vstup do jednotky je povolen pouze pro určený, řádně vyškolený personál. Mytí a dezinfekce rukou při odchodu z jednotky. Zaměstnanci se 48 hodin po odchodu z jednotky nesmějí přiblížit k prasatům.	Vstup do jednotky je povolen pouze pro určený, řádně vyškolený personál. Mytí a dezinfekce rukou při odchodu z jednotky. Zaměstnanci se 48 hodin po odchodu z jednotky nesmějí přiblížit k prasatům.
Vybavení	Biologicky bezpečný oddělený prostor (třída I nebo II) vyživaný pro jakoukoli práci s živým virem. Oddělený prostor by měl být vybaven dvojitou kompletní filtrací vypouštěného vzduchu. Veškeré vybavení pro laboratorní postupy by mělo být dostupné uvnitř vyhrazených prostorů laboratoře.	

Tabulka 2

Požadavky na biologickou bezpečnost prostorů vyhrazených pro laboratorní zvířata

	Požadavky
Obecné prostředí	Ventilace negativním tlakem. Dvojitá kompletní filtrace vypouštěného vzduchu. Zařízení pro úplnou dezinfekci kouřem/dezinfekci po ukončení experimentu. U všech výkalů inaktivace viru klasického moru prasat (teplem nebo chemicky).
Laboratorní oděv	Úplné převlečení při vstupu. Rukavice na jedno použití pro jakoukoli práci. Sterilizace oděvu před jeho vynesemím z jednotky nebo praní oděvu v jednotce.
Dohled nad zaměstnanci	Vstup do jednotky je povolen pouze pro určený, vyškolený personál. Celková sprcha při odchodu z jednotky. Zaměstnanci se 48 hodin po odchodu z jednotky nesmějí přiblížit k prasatům.
Vybavení	Veškeré vybavení nezbytné pro laboratorní postupy musí být k dispozici uvnitř jednotky. Veškerý materiál musí být před opuštěním jednotky sterilizován a v případě živočišných vzorků dvojitě zabalen a pro přepravu do laboratoře zabývající se klasickým morem prasat vložen do nepropustné nádoby, jejíž povrch je dezinfikován.
Zvířata	U všech zvířat usmrcených před opuštěním jednotky musí být v biologicky bezpečné oblasti provedeno postmortální vyšetření a tělo musí být po dokončení vyšetření spáleno.