

32003D0422

2003 6 11

EUROPOS SAJUNGOS OFICIALUSIS LEIDINYS

L 143/35

**KOMISIJOS SPRENDIMAS****2003 m. gegužės 26 d.****patvirtinantis afrikinio kiaulių maro diagnostikos vadovą**

(pranešta dokumentu Nr. C(2003) 1696)

(tekstas svarbus EEE)

(2003/422/EB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 2002 m. birželio 27 d. Tarybos direktyvą 2002/60/EB, nustatančią specialias nuostatas dėl afrikinio kiaulių maro kontrolės ir iš dalies pakeičiančią Direktyvą 92/119/EEB dėl Tešeno ligos ir afrikinio kiaulių maro <sup>(1)</sup>, ypač į jos 18 straipsnio 3 punktą,

kadangi:

- (1) Remiantis Direktyva 2000/60/EB, būtina nustatyti vienodas diagnostines procedūras, mėginių ėmimo metodus ir laboratorinių tyrimų rezultatų įvertinimo metodus afrikiniam kiaulių marui patvirtinti.
- (2) Remiantis ta direktyva Bendrijos etaloninė laboratorija afrikiniam kiaulių marui nustatyti, konsultuodamasi su Komisija, turi koordinuoti valstybėse narėse taikomus minėtos ligos diagnozavimo metodus, organizuodama, *inter alia*, periodiškų lyginamuosius tyrimus ir tiekdamą Bendrijai standartinius reagentus.
- (3) Afrikinio kiaulių maro virusas nelaikomas pavojingu žmonių sveikatai.
- (4) Sukurti laboratoriniai tyrimai, užtikrinantys greitą afrikinio kiaulių maro patvirtinimą.
- (5) Patirtis, pastaraisiais metais įgyta kontroliuojant afrikinį kiaulių marą, leido nustatyti tinkamiausias mėginių ėmimo tvarką ir laboratorinių tyrimų rezultatų įvertinimo kriterijus siekiant teisingai diagnozuoti minėtą ligą įvairiose situacijose.
- (6) Todėl reikia patvirtinti vadovą, kuriame šios procedūros ir kriterijai nustatomi.
- (7) Nacionalinėms diagnostikos laboratorijoms turėtų būti leidžiama taikyti patvirtintų laboratorinių tyrimų modifikacijas arba naudoti kitokius tyrimus, jei šie pasižymės lygiaverčiu jautrumu ir specifiskumu.
- (8) Šiame sprendime numatytos priemonės atitinka Maisto grandinės ir augalų sveikatos nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

*1 straipsnis*

1. Patvirtinamas priede pateiktas afrikinio kiaulių maro diagnostikos vadovas.
2. Valstybės narės užtikrina, kad afrikinis kiaulių maras būtų patvirtintas remiantis minėtame vadove nustatytais procedūromis, mėginių ėmimo metodais bei laboratorinių tyrimų rezultatų įvertinimo kriterijais ir būtų pagrįstas:
  - a) ligos klinikinių požymių arba patologinių anatominių (*post-mortem*) pokyčių nustatymu;
  - b) viruso, viruso antígeno arba genomo nustatymu kiaulių audinių, organų, kraujo ar išskyrių mėginiuose;
  - c) specifinių antikūnų reakcijos kraujo mėginiuose pasireiškimu.
3. Nukrypstant nuo 2 dalies nuostatų, Direktyvos 2002/60/E IV priede nurodytos diagnostinės laboratorijos gali keisti (modifikuoti) vadove nurodytus laboratorinius tyrimus arba taikyti kitokius tyrimus, jei šie bus tokie pat jautrūs ir specifiški.

Taikant modifikuotus arba kitokius tyrimus, jų jautrumą ir specifiskumą būtina įvertinti atliekant periodiškų lyginamuosius tyrimus, organizuojamus Bendrijos etaloninės laboratorijos afrikiniam kiaulių marui nustatyti.

*2 straipsnis*

Šis sprendimas taikomas nuo 2003 m. liepos 1 d.

*3 straipsnis*

Šis sprendimas skirtas valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 2003 m. gegužės 26 d.

Komisijos vardu

David BYRNE

Komisijos narys

<sup>(1)</sup> OL L 192, 2002 7 20, p. 27.

## PRIEDAS

## AFRIKINIO KIAULIŲ MARO DIAGNOSTIKOS VADOVAS

## I skyrius

**Įvadas, tikslai ir sąvokų apibrėžimai**

1. Siekiant užtikrinti vienodas afrikinio kiaulių maro (toliau – AKM) diagnostikos procedūras, šiame vadove:
  - a) pateikiami nurodymai ir minimalūs reikalavimai, susiję su diagnostinėmis procedūromis, mėginių ėmimo metodais, klinikinių bei pataloginių anatominių (*post-mortem*) tyrimų rezultatų įvertinimo kriterijais ir laboratoriniais tyrimais teisingai AKM diagnozei nustatyti <sup>(1)</sup>;
  - b) nustatomi minimalūs biologinės saugos reikalavimai ir kokybės standartai, kurių privaloma laikytis AKM diagnostinėms laboratorijoms ir pristatant mėginius;
  - c) nustatomi laboratoriniai tyrimai, taikytini diagnozuojant AKM, ir laboratoriniai metodai, taikytini genetiškai tipizuojant išskirtą AKM virusą.
2. Šis vadovas iš esmės skirtas už AKM kontrolę atsakingoms institucijoms. Todėl jame pabrėžiami laboratorinių tyrimų principai ir taikymas bei šių tyrimų rezultatų vertinimas, o ne detalizuojami laboratorinių tyrimų metodai.
3. Šiame vadove be Direktyvos 2002/60/EB 2 straipsnyje nurodytų sąvokų apibrėžimų dar taikomi šie apibrėžimai:
  - a) „įtariamas ūkis“ – tai kiaulių ūkis, kuriame, kaip įtariama, yra viena arba daugiau AKM virusu užsikrėtusių kiaulių, arba Direktyvos 2002/60/EB 2 straipsnio k punkte apibūdintas sąlyčio ūkis;
  - b) „epidemiologinis padalinys“ arba „padalinys“ – tai šalia esantis pastatas, vieta arba žemė, kur ūkio kiaulių grupės laikomos kartu taip, kad gali dažnai tiesiogiai arba netiesiogiai kontaktuoti viena su kita, bet tuo pačiu jos yra atskirtos nuo kitų to ūkio kiaulių;
  - c) „turėjusios kontaktą kiaulės“ – tai kiaulės, kurios paskutiniąsias 21 dieną ūkyje tiesiogiai kontaktavo su viena arba daugiau kiaulių, įtariamų užsikrėtus AKM virusu.

## II skyrius

**AKM aprašymas pabrėžiant diferencinę diagnozę**

## A. ĮVADAS

1. AKM sukelia *Asfarviridae* šeimos *Asfivirus* rūšiai priskiriamas DNA virusas apvalkale. AKM viruso štamai skiriasi virulentiškumu, nors būna įvairių serotipų.
2. AKM virusas labai stabilus užsikrėtusių kiaulių išskyrose, kiaulių skerdenose, šviežioje kiaulienoje ir kai kuriuose kiaulienos produktuose. Jų neveiklumui (inaktyvacija) aplinkoje užtikrinti turi būti naudojamos atitinkamos dezinfekcijos priemonės.
3. Pagrindinis natūralus kiaulių infekcijos plitimo Europoje būdas yra per burną-nosį, tiesiogiai arba netiesiogiai kontaktuojant su infekuotomis kiaulėmis arba šeriant virusu užkrėstais pašarais. Tačiau tuose rajonuose, kuriuose yra ligos sukėlėjų pernešėjų <sup>(2)</sup>, ligos perdavimas per šiuos pernešėjus turi didelę reikšmę viruso išlikimui ir išplitimui. Be to, AKM gali išplisti tiesiogiai liečiantis su užkrėstomis medžiagomis ir per geliančius vabzdžius, kurie mechanškai nešioja AKM virusą. Liga dar gali būti perduodama per užkrėstų kuilių spermą.
4. Apytikslis inkubacijos laikotarpis atskiriems gyvūnams gali trukti nuo penkių iki 15 dienų, bet natūraliomis sąlygomis klinikiniai požymiai ūkyje gali išryškėti po užkrėtimo praėjus kelioms savaitėms ar net vėliau, jei viruso štamai (padermės) yra nedidelio virulentiškumo.

<sup>(1)</sup> Nustatant laboratoriniam tyrimui imtinų mėginių skaičių, būtina atsižvelgti ir į tyrimų, kurie bus atliekami, jautrumą. Jei taikytino tyrimo jautrumas nėra labai didelis, gyvūnų, kurių mėginius reikia paimti, skaičius turi būti didesnis už šiame vadove nurodytą skaičių.

<sup>(2)</sup> Kaip apibrėžta Direktyvos 2002/60/EEB 2 straipsnio r punkte.

5. AKM eiga būna ūmi, poūmė ir lėtinė. Šios ligos formos iš esmės priklauso nuo viruso virulentiškumo.
6. Po užsikrėtimo kliniškai pasveikusiose kiaulėse viremija laikosi 40–60 dienų, ir tos kiaulės tampa viruso nešiotojomis. Iš kiaulių nešiotojų AKM virusas gali būti išskiriamas po šešių mėnesių nuo užsikrėtimo.

#### B. ŪMI FORMA

1. Pakilusi temperatūra (daugiau kaip 40 °C) dažniausiai yra pirmas kliniškas ligos požymis, kurį lydi depresija, apetito praradimas, greitas ir sunkus kvėpavimas, nosies išskyros ir ašarojimas. Kiaulių judesiai nekoordinuoti, jos susimeta į būrį. Paršavedžių nėštumas gali nutrūkti bet kuriame jo etape. Kai kurios kiaulės gali vėmti arba joms užkietėja viduriai, tuo tarpu kitos gali viduriuoti su krauju. Išryškėja kraujosruvos arba hemoraginiai poodiniai plotai, ypač galūnėse ir ausyse. Prieš mirtį gyvūnus gali ištikti koma, atsirandanti per vieną – septynias dienas nuo tada, kai išryškėja kliniški požymiai. Sergamumas ir mirtingumas ūkyje gali siekti 100 %.

Atliekant pataloginį anatomicinį tyrimą nustatoma generalizuota pasyvi hiperemija, transudatas krūtinės ir pilvo ertmėse, padidėjusi blužnis, pakraujavimai limfiniuose mazguose, ypač inkstų, skrandžio ir kepenų mazguose, taškiniai pakraujavimai inkstuose (žievėje ir meduliarinėse piramidėse bei inkstų geldelėje), pilvo serozose, skrandžio ir žarnų gleivinėje ir širdyje (po epikardu ir endokarde), krūtinės ląstos vandenė, krūtinplėvės taškinėmiai pakraujavimai.

2. Apskritai klasikinio kiaulių maro ūmios formos kliniškas ir pataloginis anatomicinis vaizdas labai panašus į afrikinio kiaulių maro vaizdą. Jeigu jau odoje ar ausyse yra kraujosruvos, jas gana lengva nustatyti, ir tada kyla įtarimas dėl ūmios klasikinio arba afrikinio kiaulių maro formos. Panašius pokyčius sukelia nedaugelis kitų ligų.

Ūmi afrikinio kiaulių maro eiga turi būti įtarta kiaulėms, įtariamoms, kad serga raudonlige, paršelių reprodukcijos ir kvėpavimo sindromu, kad apsinuodijo kumarinu, hemoragine purpura, nujunkytų paršelių multisisteminiu išsekimo sindromu, paršelių dermatito ir nefropatijos sindromu, salmonelių arba *Pasteurella* bakterijų sukeltomis infekcijomis arba bet koku žarnų arba kvėpavimo organų uždegimu, kai jos karščiuoja ir liga nepasiduoda gydymui antibiotikais.

#### C. POŪMĖ FORMA

Poūmės ligos formos būdingesnės endemijos rajonuose. Poūmiam užsikrėtimui būdingas nepastovus karščiavimas, depresija ir plaučių uždegimas. Mirtis gali ištikti dėl širdies funkcionavimo sutrikimo. Pakitimai sergant poūmia forma panašūs, tačiau šiek tiek švelnesni nei sergant aštria forma. Būdingi pakraujavimai limfiniuose mazguose, inkstuose ir blužnyje, plaučių pasyvi hiperemija bei edema ir kartais intersticinė pneumonija.

#### D. LĒTINĖ (CHRONIŠKA) FORMA

Ligos chroniškos formos pasitaiko retai. Sergant šiomis formomis pastebimas antrinis užsikrėtimas bakterijomis. Kadangi kliniški chroniškojo AKM požymiai gana netipiški, turi būti atliekama daugelio kitų kiaulių ligų diferencinė diagnozė. Kūno temperatūra kiekvienam gyvūnui gali ir nepakilti, bet užkrėstame ūkyje gali karščiuoti bent jau kai kurios kiaulės.

AKM chroniškos formos kliniški simptomai gali būti šie: kvėpavimo sunkumai, abortai, artritas, chroniškos odos opos arba nekrozė, neprimenantį kliniško vaizdo, būdingo užsikrėtus AKM virusu. Pokyčiai gali būti minimalūs arba jų gali ir visai nebūti. Histopatologiniai duomenys rodo padidėjusius limfinius mazgus ir blužnį, pleuritą, fibrininę perikarditą ir infiltracinę pneumoniją. Be to aprašoma ir židininė kazeozinė nekrozė bei plaučių mineralizacija.

### III skyrius

#### **Nurodymai dėl pagrindinių kriterijų, į kuriuos būtina atsižvelgti pripažįstant ūkį užsikrėtusiu AKM**

1. Sprendimas pripažinti ūkį užsikrėtusiu ūkiu bus priimtas remiantis šiais duomenimis, kriterijais ir priežastimis:
  - a) kliniškais ir pataloginiais anatomiciais kiaulių duomenimis. Pagrindiniai kliniški ir pataloginiai anatomiciniai duomenys, į kuriuos būtina atsižvelgti, yra:
    - kiaulių karščiavimas ir sergamumas bei gaišimas visuose etapuose,
    - karščiavimas ir hemoraginis sindromas; taškiniai ir dėminiai pakraujavimai, ypač limfiniuose mazguose, inkstuose, blužnyje (kuri padidėjusi ir tamsi, ypač sergant ūmia forma), šlapimo pūslėje, ir tulžies pūslės opos;

- b) epidemiologiniai duomenys. Pagrindiniai epidemiologiniai duomenys, į kuriuos būtina atsižvelgti, yra tai, ar:
- kiaulės turėjo tiesioginį ar netiesioginį kontaktą su AKM virusu užkrėsto ūkio kiaulėmis,
  - ūkis išvežė kiaules, kurioms vėliau buvo nustatytas AKM,
  - paršavedės buvo dirbtinai apvaisintos sperma, gauta iš įtariamo šaltinio,
  - buvo tiesioginių arba netiesioginių kontaktų su šernais, kurių populiacijoje pasitaiko AKM,
  - kiaulės laikomos lauke tame regione, kur šernai užsikrėtę AKM virusu,
  - kiaulės buvo šeriamos maisto atliekomis, kurios, kaip įtariama, nebuvo apdorotos taip, kad AKM virusas taptų neveikliu,
  - kiaulės galėjo užsikrėsti nuo į ūkį patekusių asmenų ar transporto priemonių ir t. t., kurie prieš tai buvo AKM viruso užsikrėtimu įtariamuose arba juo užsikrėtusiuose ūkiuose,
  - tame rajone, kur yra ūkis, yra viruso nešiotojų.
2. Ūkis bet kuriuo atveju turi būti laikomas įtariamu ūkiu, jei iš klinikinių arba pataloginių anatominių duomenų kilo įtarimų, jog jis užkrėstas klasikinio kiaulių maru, nors klinikiniai, epidemiologiniai ir laboratoriniai tyrimai neleidžia patvirtinti tame ūkyje minėtos ligos arba identifikuoti kitų ligos šaltinių ar medžiagų.

#### IV skyrius

#### **Tikrinimo ir mėginių ėmimo tvarka**

#### A. NURODYMAI IR PROCEDŪROS, SUSIJĘ SU KIAULIŲ KLINIKINIŲ TYRIMŲ IR MĖGINIŲ ĖMIMU ĮTARIAMAME ŪKYJE

1. Valstybės narės užtikrina, kad, laikantis 2–6 punktuose nurodytų rekomendacijų ir procedūrų, įtariamuose ūkiuose būtų atliekami atitinkami klinikiniai tyrimai, imami mėginiai bei atliekami laboratoriniai tyrimai AKM patvirtinti arba paneigti.

Neatsižvelgiant į Direktyvos 2002/60/EB 4 straipsnio 2 dalyje nurodytų priemonių patvirtinimą minimuose ūkiuose, šios rekomendacijos ir procedūros taikomos visada, kai atliekama diferencinė diagnozė dėl AKM. Taip būna tais atvejais, kai kiaulių klinikiniai požymiai ir ligos epidemiologinis modelis rodo labai nedidelę AKM tikimybę.

Visais kitais atvejais, kai įtariama, kad viena arba daugiau kiaulių yra užsikrėtusios AKM virusu, įtariamuose ūkiuose patvirtinamos Direktyvos 2002/60/EB 4 straipsnio 2 dalyje nurodytos priemonės.

Įtarus, kad AKM serga skerdykloje arba transporto priemonėje esančios kiaulės, 2–6 punktuose nurodytos rekomendacijos ir procedūros taikomos *mutatis mutandis*.

2. Kai valstybinis veterinarijos gydytojas apsilanko įtariamame ūkyje, kad patvirtintų arba paneigtų AKM:

- turi būti atliekamas ūkio produktyvumo ir sveikatos būklės dokumentų patikrinimas, jei tokie yra; būtina patikrinti kiekvieną ūkio padalinį ir atrinkti kiaules klinikiniam tyrimui.

Atliekant klinikinį tyrimą turi būti matuojama kūno temperatūra, ypač šių kiaulių arba kiaulių grupių:

- sergančių arba anoreksiškų kiaulių,
- kiaulių, neseniai atvežtų iš patvirtintų protrūkio židinių arba kitų įtartinų šaltinių,
- kiaulių, laikomų padaliniuose, kuriuose neseniai lankėsi pašaliniai asmenys, neseniai turėję artimą kontaktą su AKM įtariamomis arba užsikrėtusiomis kiaulėmis, arba turėję ypač pavojingą kontaktą su galimu AKM viruso šaltiniu,
- kiaulių, kurių mėginiai jau buvo paimti ir serologiškai ištirti dėl AKM, o tyrimų rezultatai neleidžia paneigti AKM, taip pat – kontaktavusių kiaulių,
- neseniai pasveikusių kiaulių.

Jeigu patikrinus įtariamą ūkį nenustatoma ankstesnėje pastraipoje nurodytų kiaulių arba jų grupių, kompetentinga institucija, neprieštaraudama kitoms priemonėms, kurios minimame ūkyje gali būti taikomos remiantis Direktyva 2002/60/EB, ir atsižvelgusi į epidemiologinę padėtį:

- tame ūkyje atlieka tolesnius tyrimus, remdamasi 3 punkto nuostatomis, arba
- užtikrina, kad iš to ūkio kiaulių būtų paimti kraujo mėginiai laboratoriniams tyrimams tvarką),
- priima arba išsaugo Direktyvos 2002/60/EB 4 straipsnio 2 dalyje nustatytas priemones, kol tame ūkyje bus atlikti tolesni tyrimai,
- paneigia įtariamą AKM.

3. Taikant šią dalį, klinikinis tyrimas minėtame ūkyje turi būti taikomas kiaulėms, atsitiktinai atrinktoms padaliniuose, kuriuose nustatytas arba įtariamas įvežtas AKM virusas.

Turi būti tiriamas toks minimalus kiaulių skaičius tuose padaliniuose, kad būtų galima nustatyti 10 % kiaulių maro paplitimą 95 % patikimumu.

4. Jeigu įtariamame ūkyje aptinkama nugaišusių arba gaištančių kiaulių, turi būti atliekami patologiniai anatomiciniai tyrimai, pageidautina ne mažiau kaip penkių paskutiniųjų nugaišusių kiaulių, ypač tų, kurios:

- prieš nugaišimą turėjo ryškių ligos požymių,
- labai karščiuoja,
- nugaišo neseniai.

Jei šie tyrimai nerodo AKM leidžiančių įtarti pokyčių, dėl epidemiologinės padėties vis dėlto būtina atlikti šiuos tolesnius tyrimus:

- 3 punkte nustatytą klinikinį tyrimą ir paimti 5 punkte nurodytą kraujo mėginį ūkio padalinyje, kuriame buvo laikomos nugaišusios arba gaištančios kiaulės, ir
- galima atlikti trijų – keturių kontaktavusių kiaulių patologinius anatomicinius tyrimus, ypač jei tos kiaulės turi klinikinių požymių.

Neatsižvelgiant į tai, ar yra AKM leidžiančių įtarti pokyčių, laikantis V skyriaus B dalies I punkto nuostatų, būtina paimti kiaulių, kurioms buvo taikytas patologinis anatomicinis patikrinimas, organų arba audinių mėginius virusologiniams tyrimams atlikti. Pageidautina, kad šie mėginiai būtų imami iš neseniai nugaišusių kiaulių.

Kompetentinga institucija turi užtikrinti, kad, atliekant patologinius anatomicinius tyrimus:

- būtų imtasi būtinų atsargumo ir higienos priemonių, kad liga neišplistų,
- gaištančios kiaulės būtų nužudytos humaniškai, laikantis 1993 m. gruodžio 22 d. Tarybos direktyvos 93/119/EEB dėl gyvūnų apsaugos juos skerdžiant arba nužudant <sup>(1)</sup> su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 806/2003 <sup>(2)</sup>.

5. Jei įtariamame ūkyje ir toliau nustatomi kliniciniai požymiai arba pokyčiai, pagal kuriuos galima įtarti AKM, bet, kompetentingos institucijos nuomone, šių duomenų nepakanka AKM protrūkiui patvirtinti ar paneigti, o būtini laboratoriniai tyrimai, šioms tyrimams būtina paimti įtariamų kiaulių arba kitų kiaulių iš kiekvieno padalinio, kurioje laikomos įtariamos kiaulės, mėginius laikantis šios tvarkos:

- a) minimalus serologiniams tyrimams imamų mėginių skaičius turi būti toks, kad tame ūkio padalinyje būtų galima nustatyti 10 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu.
- b) virusologiniams tyrimams imamų mėginių skaičių nurodo kompetentinga institucija, atsižvelgusi į reikalingų atlikti tyrimų kiekį, laboratorinių tyrimų jautrumą ir epidemiologinę padėtį.

<sup>(1)</sup> OL L 340, 1993 12 31, p. 21.

<sup>(2)</sup> OL L 122, 2003 5 16, p. 1.

6. Jeigu įtariamame ūkyje atlikus tyrimą neaptinkama AKM klinikinių požymių ar patologinių anatominų pokyčių, bet kompetentinga institucija mano, kad reikia atlikti laboratorinius tyrimus, norint paneigti AKM įtarimą, laikomasi 5 punkte nustatytos mėginių ėmimo tvarkos.

#### B. MĖGINIŲ ĖMIMO TVARKAPATVIRTINUS AKM

1. Norint nustatyti, kaip ir prieš kiek laiko AKM virusas pateko į užkrėstą ūkį, pagal Direktyvos 2002/60/EB 5 straipsnio 1 dalies a punkto nuostatą jame patvirtinus AKM protrūkį kiaulės žudomos, o nužudytų kiaulių kraujo mėginiai serologiniams tyrimams turi būti imami atsitiktinės atrankos būdu.
2. Minimalus serologiniams tyrimams imamų kiekvieno ūkio padalinio kiaulių mėginių skaičius turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 10 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu <sup>(1)</sup>.

Mėginiai virusologiniams tyrimams turi būti imami pagal kompetentingos institucijos, kuri turi atsižvelgti į reikalingų atlikti tyrimų kieki, laboratorinių tyrimų jautrumą ir epidemiologinę padėtį, nurodymus.

Rajonuose, kuriuose anksčiau buvo pastebėti AKM virusu užsikrėtę nešiotojai, laikantis kompetentingos institucijos nurodymų ir Direktyvos 2002/60/EB III priedo nuostatų, turi būti imami atitinkami kraujasiurbių erkių mėginiai virusologiniams tyrimams.

3. Tačiau kilus antriniam AKM protrūkiams, kompetentinga institucija gali nuspręsti leisti nukrypti nuo 1 ir 2 punkto nuostatų ir nustatyti kitokią mėginių ėmimo tvarką, atsižvelgdama į turimą epidemiologinę informaciją apie viruso šaltinį ir jo patekimo į ūkį būdą bei apie potencialų viruso išplitimą iš ūkio.

#### C. MĖGINIŲ ĖMIMO TVARKA, KAI DĖL AKM PREVENCIJOS KIAULĖS ŽUDOMOS ĮTARIAMAME ŪKYJE

1. Norint patvirtinti arba paneigti AKM ir gauti papildomos epidemiologinės informacijos, pagal direktyvos 2002/60/EB 4 straipsnio 3 dalies a punkto arba 7 straipsnio 2 dalies nuostatas prevencijos tikslu įtariamame ūkyje kiaulės žudomos ir 2 punkte nustatyta tvarka paaimami jų kraujo mėginiai serologiniams tyrimams bei kraujo mėginiai virusologiniams tyrimams.

2. Mėginiai pirmiausia turi būti imami:

- kiaulėms, kurios turi AKM leidžiančių įtarti klinikinių požymių arba patologinių anatominų pokyčių, ir su jomis kontaktavusioms kiaulėms,
- kitoms kiaulėms, kurios galėjo turėti pavojingų kontaktų su užsikrėtusiomis arba AKM įtariamomis kiaulėmis, arba toms, kurios įtariamos, kad užsikrėtė AKM virusu. Šių kiaulių mėginiai turi būti imami laikantis kompetentingos institucijos, kuri atsižvelgs į epidemiologinę padėtį, nurodymų.

Be to, mėginiai iš kiekvieno ūkio padalinio kiaulių turi būti imami atsitiktinės atrankos būdu <sup>(2)</sup>. Šiuo atveju minimalus serologiniams tyrimams imamų mėginių skaičius kiekviename padalinyje turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 10 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu.

Mėginiai virusologiniams tyrimams imami ir tyrimai atliekami laikantis kompetentingos institucijos, kuri atsižvelgs į reikalingų atlikti tyrimų kieki, šių tyrimų jautrumą ir epidemiologinę padėtį, nurodymų.

<sup>(1)</sup> Tačiau jeigu taikoma Direktyvos 2002/60/EB 6 straipsnio 1 dalyje numatyta leidžianti nukrypti nuostata, mėginiai turi būti imami iš ūkio padaliniuose nužudytų kiaulių, neprieštaraujant tolesniems likusiųjų ūkio kiaulių tyrimams ir jų mėginių ėmimui pagal kompetentingos institucijos nurodymus.

<sup>(2)</sup> Tačiau jeigu kompetentinga institucija prevencinį žudymą taiko tik tai ūkio daliai, kurioje buvo laikomos infekuotos arba AKM virusu užsikrėtusios kiaulės, remiantis Direktyvos 2002/60/EB 4 straipsnio 3 dalies a punktu, mėginiai turi būti imami iš ūkio padalinio, kurioje ši priemonė taikyta, neprieštaraujant tolesniems likusiųjų ūkio kiaulių tyrimams ir jų mėginių ėmimui pagal kompetentingos institucijos nurodymus.

D. MĖGINIŲ ĖMIMO IR TYRIMO TVARKA PRIEŠ LEIDŽIANT IŠGABENTI KIAULES IŠ APSAUGOS AR PRIEŽIŪROS ZONOSE ESANČIŲ ŪKIŲ IR TADA, KAI KIAULĖS SKERDŽIAMOS AR ŽUDOMOS (DIREKTYVOS 2002/60/EB 10 IR 11 STRAIPSNIAI)

1. Nepažeidžiant direktyvos 2002/60/EB 11 straipsnio 1 dalies f punkto antros pastraipos nuostatų, norint gauti leidimą išgabenti kiaules iš apsaugos ar priežiūros zonose esančių ūkių remiantis minėtos direktyvos 10 straipsnio 3 dalimi, klinikinį tyrimą valstybinis veterinarijos gydytojas turi atlikti:

— per 24 val. iki kiaulių išgabenimo,

— pagal A dalies 2 punkto nuostatas.

2. Jeigu kiaulės išvežamos į kitą ūkį, be tyrimų, kurie turi būti atliekami remiantis 1 punkto nuostatomis, kiekviename ūkio padalinyje, kuriame tos kiaulės laikomos, turi būti atliekamas jų klinikinis tyrimas, įskaitant temperatūros matavimą tam tikram kiaulių skaičiui.

Minimalus tikrintųjų kiaulių skaičius minėtuose padaliniuose turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 10 % kiaulių karščiavimo paplitimą 95 % patikimumu.

3. Jeigu kiaulės išvežamos į skerdyklą, perdirbimo įmonę arba kitas vietas paskersti ar nužudyti, be tyrimų, kurie turi būti atliekami remiantis 1 punkto nuostatomis, kiekviename ūkio padalinyje, kuriame tos kiaulės laikomos, turi būti atliekamas jų klinikinis tyrimas. Jeigu kiaulės vyresnės kaip 3–4 mėnesių amžiaus, atliekant šį tyrimą tam tikram kiaulių skaičiui turi būti matuojama kūno temperatūra.

Minimalus tiriamųjų kiaulių skaičius minėtuose padaliniuose turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 20 % kiaulių karščiavimo paplitimą 95 % patikimumu.

4. Skerdžiant arba žudant 3 punkte nurodytas kiaules, turi būti imami visų ūkio padalinių, iš kurių jos atvežtos, kiaulių kraujo mėginiai serologiniams tyrimams ir kraujo ar organų, pavyzdžiui, migdolinių liaukų, blužnies arba limfinių mazgų, mėginiai virusologiniams tyrimams.

Minimalus imamųjų mėginių skaičius kiekviename padalinyje turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 10 % serologinį paplitimą arba AKM virusą 95 % patikimumu.

Mėginiai virusologiniams tyrimams imami ir tyrimai atliekami laikantis kompetentingos institucijos, kuri atsižvelgs į reikalingų atlikti tyrimų kiekį, šių tyrimų jautrumą ir epidemiologinę padėtį, nurodymų.

5. Tačiau jeigu skerdžiant ar žudant kiaules nustatomi AKM klinikiniai požymiai arba patologiniai anatomiciniai pokyčiai, nukrypstant nuo 4 punkto nuostatų, taikomos C dalyje nustatytos mėginių ėmimo nuostatos.

6. Taikyti Direktyvos 2002/60/EB 10 straipsnio 5 dalyje ir 11 dalies 4 dalyje numatytą leidžiančią nukrypti nuostatą galima tada, kai kompetentingos institucijos užtikrina, kad 2, 3 ir 4 punktuose nurodytų tikrintųjų kiaulių grupėms arba kiaulių, iš kurių imami mėginiai, grupėms būtų taikoma intensyvi mėginių ėmimo ir tyrimo sistema. Pagal minėtą sistemą minimalus imamųjų mėginių skaičius turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 5 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu kiekvienoje kiaulių grupėje.

E. MĖGINIŲ ĖMIMO IR TYRIMO TVARKA ŪKYJE ATNAUJINANT KIAULIŲ BANDA

1. Kai, atnaujinant ūkyje bandą, kiaulės į jį įvežamos pagal direktyvos 2002/60/EB 13 straipsnio 3 dalies nuostatas, turi būti taikoma ši mėginių ėmimo tvarka:

— per 45 dienas nuo įvežimo turi būti paimti kraujo mėginiai,

— įvežant kontrolines kiaules, atsitiktinės atrankos būdu turi būti imami kraujo mėginiai serologiniams tyrimams tokiam kiaulių skaičiui, kad būtų galima nustatyti 10 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu kiekviename ūkio padalinyje,

— kai atkurama visa banda, kraujo mėginiai serologiniams tyrimams turi būti atsitiktinės atrankos būdu imami tokiam kiaulių skaičiui, kad būtų galima nustatyti 20 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu kiekviename ūkio padalinyje.

2. Naujas kiaules įvežant į ūkį pagal Direktyvos 2002/60/EB 13 straipsnio 4 dalies nuostatas, turi būti atliekamos šios mėginių ėmimo procedūros:

- per 45 dienas nuo įvežimo turi būti paimti kraujo mėginiai,
- įvežant kontrolines kiaules, atsitiktinės atrankos būdu turi būti imami kraujo mėginiai serologiniams tyrimams tokiam kiaulių skaičiui, kad būtų galima nustatyti 5 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu kiekviename ūkio padalinyje,
- kai atkurama visa banda, kraujo mėginiai serologiniams tyrimams turi būti atsitiktinės atrankos būdu imami tokiam kiaulių skaičiui, kad būtų galima nustatyti 10 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu.

Visiškai atkūrus kiaulių bandą, trečioje įtraukoje nurodyta procedūra turi būti kartojama, bet ne anksčiau kaip po 60 dienų.

3. Kiekvieną kart įvežus naujas kiaules kompetentinga institucija turi užtikrinti, kad ūkyje bet kokia liga susirgusios ar dėl neaiškių priežasčių nugaišusios kiaušės nedelsiant būtų tiriamos dėl AKM.

Šios nuostatos taikomos tol, kol ūkiui nepanaikinami Direktyvos 2002/60/EB 13 straipsnio 3 dalies a ir b punktuose ir 4 dalyje nurodyti kiaulių judėjimo apribojimai.

#### F. MĖGINIŲ ĖMIMO TVARKA, APSAUGOS ZONOS KIAULIŲ ŪKIUOSE TAIKOMA PRIEŠ APRIBOJIMŲ PANAIKINIMĄ

1. Kad apsaugos zonoje būtų galima panaikinti direktyvos 2002/60/EB 10 straipsnyje nurodytas priemones, visuose toje zonoje esančiuose ūkiuose turi būti:

- atliktas klinikinis tyrimas laikantis A skirsnio 2 ir 3 punktuose nustatytų procedūrų,
- paimti kraujo mėginiai serologiniams tyrimams, kaip nustatyta 2 punkte.

2. Minimalus imamų kraujo mėginių skaičius turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 10 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu kiekviename ūkio padalinyje.

Tačiau Direktyvos 2002/60/EB 10 straipsnio 5 dalyje ir 11 straipsnio 4 dalyje numatytą leidžiančią nukrypti nuostatą galima taikyti tik tada, kai kompetentinga institucija užtikrina, kad paimtų mėginių skaičius leis nustatyti 5 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu kiekviename ūkio padalinyje.

#### G. MĖGINIŲ ĖMIMO TVARKA, PRIEŠ APRIBOJIMŲ PANAIKINIMĄ TAIKOMA PRIEŽIŪROS ZONOS KIAULIŲ ŪKIUOSE

1. Kad priežiūros zonoje būtų galima panaikinti direktyvos 2002/60/EB 11 straipsnyje nurodytas priemones, laikantis a skirsnio 2 punkte nustatytų procedūrų visuose toje zonoje esančiuose ūkiuose turi būti atliktas klinikinis tyrimas.

Be to, kraujo mėginiai serologiniams tyrimams turi būti imami kiaušėms:

- bet kuriame ūkyje, kuriame, kompetentingos institucijos nuomone, juos būtina paimti,
- visuose spermos surinkimo centruose.

2. Kai priežiūros zonos ūkiuose kiaušėms imami kraujo mėginiai serologiniams tyrimams, jų skaičius turi atitikti F skirsnio 2 dalies pirmame sakinyje nurodytą skaičių.

Tačiau Direktyvos 2002/60/EB 10 straipsnio 5 dalyje ir 11 straipsnio 4 dalyje numatytą leidžiančią nukrypti nuostatą galima taikyti tik tada, kai kompetentinga institucija užtikrina, kad kiekviename šios zonos ūkyje paimti kraujo mėginiai serologiniams tyrimams atlikti. Minimalus imamų kraujo mėginių skaičius turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 5 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu kiekviename ūkio padalinyje.



#### H. SEROLOGINĖ STEBĖSENA IR MĖGINIŲ ĖMIMO TVARKA TERITORIJOSE, KUR ŠERNAMS ĮTARIAMAS ARBA PATVIRTINTAS AKM

1. Atliekant serologinę šernų stebėseną teritorijose, kur patvirtintas arba įtariamas AKM, pirmiausia reikėtų nustatyti šernų populiacijos dydį ir geografinę teritoriją, kad būtų galima nustatyti, kiek mėginių reikia paimti. Mėginių skaičius nustatomas pagal paskaičiuotą teritorijoje esantį gyvų, o ne nušautų šernų skaičių.
2. Jeigu nėra duomenų apie šernų populiacijos tankumą ir dydį, būtina nustatyti geografinės teritorijos, kurioje bus imami mėginiai, ribas, atsižvelgiant į joje nuolat gyvenančių šernų skaičių ir į esamus natūralius ar dirbtinius barjerus, kurie gali riboti nuolatinį didelio skaičiaus šernų judėjimą. Kitomis aplinkybėmis arba jeigu teritorijos yra didelės, rekomenduojama nustatyti ne didesnę kaip 200 kvadratinį kilometrų mėginių ėmimo teritoriją, kurioje paprastai nuolat gyvena 400–1 000 šernų.
3. Nepažeidžiant Direktyvos 2002/60/EB 15 straipsnio 2 dalies 3 punkto nuostatų, minimalus tiriamų šernų skaičius apibrėžtoje teritorijoje turi būti toks, kad būtų galima nustatyti 5 % serologinį paplitimą 95 % patikimumu. Tam tikslui kiekvienoje nustatytoje teritorijoje būtina paimti ne mažiau kaip 56 žvėrių mėginius.
4. Nušautų arba rastų negyvų šernų mėginiai virusologiniams tyrimams turi būti imami taip, kaip nustatyta V skyriaus B skirsnio 1 dalyje.

Jeigu būtina vykdyti nušautų šernų virusologinę stebėseną, pirmiausia stebimi jaunesni kaip vienerių metų amžiaus gyvūnai.

5. Prie visų į laboratoriją siunčiamų mėginių turi būti pridėtas Direktyvos 2002/60/EB 16 straipsnio 3 dalies h punkte nurodytas klausimynas.

#### V skyrius

#### MĖGINIŲ ĖMIMO IR TRANSPORTAVIMO BENDROJI TVARKA

##### A. BENDROJI TVARKA IR KRITERIJAI

1. Prieš imant mėginius įtariamame ūkyje, turi būti parengtas ūkio planas ir nustatyti ūkio epidemiologiniai padaliniai.
2. Kiekvieną kartą, kai manoma, jog būtina imti pakartotinius kiaulių mėginius, visos kiaulės, iš kurių imami mėginiai, turi būti individualiai paženklintos taip, kad būtų lengva paimti pakartotinius mėginius.
3. Visi mėginiai turi būti siunčiami į laboratoriją su atitinkamos formos lydraščiais, laikantis kompetentingos institucijos nustatytų reikalavimų. Šiuose lydraščiuose įtraukiami duomenys apie tiriamas kiaules ir informacija apie pastebėtus klinišnius požymius ar pataloginius anatominius pokyčius.

Jei kiaulės laikomos ūkyje, turi būti nurodyta tiksli informacija apie kiaulių amžių, kategoriją ir kilmės ūkį. Rekomenduojama nurodyti kiekvienos kiaulės, kuriai ūkyje buvo paimtas mėginys, vietą ir unikalų identifikavimo ženklą.

##### B. MĖGINIŲ ĖMIMAS VIRUSOLOGINIAMS TYRIMAMS

1. Norint nustatyti AKM virusą, viruso antigeną arba genomą nugaišusioms arba humanišku būdu nužudytoms kiaulėms, geriausia imti migdolinių liaukų, limfinių mazgų (skrandžio ir kepenų, inkstų, pažandinių ir antryklinių), blužnies, inkstų ir plaučių audinių mėginius<sup>(1)</sup>. Jeigu skerdenos suirusios, reikia imti ilgųjų kaulų ir krūtinkaulio mėginius.
2. Antikoaguliantu apdoroto ir (arba) sukrešėjusio kraujo mėginiai karščiuojančioms ar kitų ligos požymių turinčioms kiaulėms turi būti imami laikantis kompetentingos institucijos nurodymų.

(1) Taip pat rekomenduojama imti zarnų mėginius, nes jie gali būti svarbus nustatyti klasikine kiaulių karstine.

## C. MĖGINIŲ TRANSPORTAVIMAS

## 1. REKOMENDUOJAMA, KAD VISI MĖGINIAI:

- būtų tinkamai paženklininti,
  - būtų transportuojami ir laikomi vandeniui nepralaidžiuose konteineriuose,
  - būtų laikomi šaltai, bet neužšaldyti; tačiau jeigu mėginius į laboratoriją numatyta pristatyti daugiau kaip per 48 valandas, būtina susisiekti su laboratorija ir gauti nurodymų dėl tinkamiausios transportavimo temperatūros,
  - būtų pristatomi į laboratoriją kuo greičiau,
  - būtų laikomi tokioje pakuotėje, kurioje vėsą palaiko ledo paketai arba sausas ledas,
  - audinių ar organų mėginiai būtų sudėti į atskirą sandarų plastikinį konteinerį ir tinkamai paženklininti etikete. Po to jie turi būti dedami į didesnius konteinerius ir pakuojami naudojant pakankamai absorbuojančios medžiagos, kuri apsaugotų nuo pažeidimo ir sugertų nutekėjusį skystį,
  - jei įmanoma, būtų kompetentingo asmens vežami tiesiai į laboratoriją, kad būtų užtikrintas skubus ir patikimas pristatymas.
2. Ant išorinės pakuotės turi būti aiškiai nurodytas laboratorijos, į kurią gabenama, adresas ir šis užrašas:  
„Gyvūninė patloginė medžiaga: neatspari; trapi. Atidaryti tik AKM laboratorijoje.“
3. Laboratorijos, į kurią siunčiami mėginiai, atsakingam darbuotojui turi būti laiku pranešta apie mėginių atvežimą.
4. Mėginius į Bendrijos AKM etaloningą laboratoriją <sup>(1)</sup> pristatant oro transportu, siunta turi būti paženklinta pagal IATA (Tarptautinės oro transporto asociacijos) nuostatus.

## VI skyrius

**Virusologinių tyrimų principai ir taikymas bei jų rezultatų įvertinimas**

## A. VIRUSO ANTIGENŲ NUSTATYMAS

## 1. Tiesioginės imunofluorescencijos tyrimas (TIFT, angl. DIFT)

Šio tyrimo tikslas – mikroskopu nustatyti viruso antigenų audinių atspauduose arba plonuose šaldomuoju mikrotomu atpjautuose organų pjūviuose, paimtų AKM įtariamoms kiaulėms, mėginiuose. Virusų antigenai ląstelėse aptinkami naudojant FITC konjuguotus <sup>(2)</sup> specifinius antikūnus. Fluorescenciniai interptiniai kūneliai arba granulės randamos infekuotų ląstelių citoplazmoje.

Tyrimui tinkamiausi organai yra inkstai, blužnis ir įvairūs limfiniai mazgai. Jeigu tiriant šernus šių organų nėra arba jie suirę, galima naudoti kaulų čiulpų ląstelių tepinėlius.

Tyrimą galima atlikti per dvi valandas. Kadangi organų mėginius galima gauti tik iš negyvų gyvulių, šio tyrimo taikymas stebėsenos tikslais yra ribotas.

Tai labai didelio jautrumo tyrimas, kai AKM eiga ūmi. Kai AKM yra poūmės arba lėtinės formos, TIFT jautrumas siekia apie 40 %, greičiausiai dėl antigeno – antikūno junginių, kurie blokuoja reakciją su AKM konjuguotu antikūnu. Tyrimo rezultatų patikimumas gali sumažėti neteisingai atliekant tyrimą (dėl blogo tepinėlio dažymo), ypač jei trūksta patirties arba tiriami organai yra suirę.

## 2. Imunofermeninės analizės metodas (IFA, angl. ELISA) viruso antigenui nustatyti

Viruso antigenai gali būti nustatomi taikant įvairius imunofermeninės analizės tyrimo metodus, tačiau šis tyrimas rekomenduojamas tik tada, kai ligos eiga ūmi, nes, kai yra antigeno-antikūnų junginiai, jo jautrumas nedidelis. Antigeno IFA jautrumas turėtų būti pakankamai didelis, kad būtų gaunamas teigiamas tyrimo rezultatas tiriant kiaules, kurios turi klinikinių ūmaus AKM požymių. Bet kuriuo atveju šį tyrimą rekomenduojama naudoti tik kaip „bandos“ tyrimą ir kartu su kitais virusologiniais tyrimais.

<sup>(1)</sup> Bendrijos etaloningą laboratoriją turi atvirą licenciją iš bet kurios valstybės narės gauti diagnostinius mėginius ir išskirtą AKM virusą. Jei mėginys yra iš EB nepriklausančios šalies, gali būti pareikalauta, kad laboratorija prieš transportavimą pateiktų importo leidimo kopiją, kuri įdedama į voką ir pritvirtinama prie išorinės pakuotės.

<sup>(2)</sup> Fluoresceino izotiocianatas.

**B. VIRUSO IŠSKYRIMAS IR IDENTIFIKAVIMAS TAIKANT HEMAADSORBCIJOS TYRIMĄ (HAT, ANGL. HAD)**

1. Viruso išskyrimas yra pagrįstas AKM virusui jautrių pirminių paršelių ląstelių kultūrų, monocitų ir makrofagų ląstelių užkrėtimu mėginių medžiaga. Geriausia AKM virusą išskirti stabilizuotame kraujyje, leukocituose, nesukrešėjusiame kraujyje arba iš a skirsnio 1 dalyje nurodytų organų. Jei mėginyje yra ASF virusas, jis dauginsis ląstelėse, o infekuotose ląstelėse išsivystys charakteringas citopatinis efektas.
2. Hemaadsorbcijos metodą dėl jo didelio jautrumo ir specifiskumo rekomenduojama taikyti išskirtiems ASF viruso izoliatams identifikuoti. Jis pagrįstas ASF viruso sugebėjimu pasidauginti kiaulių makrofaguose ir paskatinti kraujo adsorbciją dalyvaujant kiaulių eritrocitams. Apie infekuotus makrofagus susidaro tipiška eritrocitų „rozetė“. Tačiau nedidelis skaičius AKM lauko viruso kamienų gali nesukelti hemaadsorbcijos, bet sukelti citopatinį efektą. Šie kamieniai gali būti specifiskai indentifikuoti taikant TIFT ląstelių kultūrose arba PGR.
3. Viruso išskyrimą geriausiai taikyti tiriant nedidelio skaičiaus gyvulių mėginius. Viruso išskyrimo procedūra reikalauja daug darbo, o rezultatai gaunami po vienos – trijų dienų. Gali prireikti dar dviejų ląstelių kultūrų virusų pasažui, kol nustatomas nedidelis virusų kiekis mėginyje. Todėl galutinis tyrimo rezultatas gali būti gautas po 10 dienų. Suirę mėginiai gali būti citotoksiški ląstelių kultūroms ir todėl jų naudojimas ribotas.
4. Viruso išskyrimą ir identifikavimą HAT metodu rekomenduojama atlikti kaip referentinį tyrimą teigiamiems IFA, PGR (polimerazės grandininė reakcija) ir TIF rezultatams patvirtinti. Be to, jis rekomenduojamas ir tada, kai AKM jau patvirtintas kitais metodais, ypač pirminio AKM protrūkio arba susirgimo atveju.

Kiaulių makrofaguose išskirti AKM virusai gali būti naudojami viruso savybėms tirti ir molekulinei epidemiologijai.

5. Visi pirminių protrūkių, pirminių šernų susirgimų arba susirgimų skerdyklose ar transporto priemonėse atvejais išskirti AKM virusai turi būti genetiškai tipizuoti valstybių narių Nacionalinėse veterinarijos laboratorijose, kitoje atitinkamos valstybės narės patvirtintoje laboratorijoje arba Bendrijos etaloninėje laboratorijoje pagal E skirsnio reikalavimus.

Išskirti virusai visada turi būti nedelsiant siunčiami į Bendrijos etaloninę laboratoriją, kuri juos kolekcionuoja.

**C. VIRUSO GENOMO NUSTATYMAS**

1. Polimerazės grandininė reakcija (PGR) taikoma viruso genomui kraujo, serumo, audinių arba organų mėginiuose nustatyti. Maži virusinių DNR fragmentai PGR būdu padauginami iki aptinkamo kiekio. Daugelis išskirtų virusų, priklausančių visiems žinomiems virusų genotipams, įskaitant nehemaadsorbcinius virusus ir mažo virulentiškumo izoliatus, gali būti nustatomi naudojant genomo primerus iš aukšto koncervatiškumo regiono. Kadangi šiuo metodu galima aptikti tik viruso genomų seką, PGR gali būti teigiama net tada, kai išskiriant virusą nerandama AKM galinčio sukelti viruso, (pvz., Suirisuiuose audiniuose arba sveikstančių ar pasveikusių ir kliniškai normalių kiaulių audinių mėginiuose).
2. PGR gali būti taikoma tirti nedidelį skaičių mėginių, rūpestingai paimtų iš AKM įtariamų kiaulių. Šį metodą rekomenduojama taikyti citotoksiškiems organų mėginiams, kai dėl to neįmanoma išskirti viruso (pvz., šernų mėginiai).
3. Tinkamiausi PGR tyrimui yra viruso išskyrimui naudojamų organų ir serumo mėginiai. Be to, PGR metodu gali būti tiriami erkių homogenatai.
4. PGR galima atlikti per darbo dieną. Tyrimui reikalinga atitinkama laboratorinė įranga, atskiros patalpos ir kvalifikuotas personalas. Jo pranašumas tas, kad infekcinio viruso nereikia padauginti laboratorijoje. PGR yra labai jautrus metodas, bet gali lengvai įvykti mėginio tarša virusais, dėl kurios galima gauti neteisingus teigiamus rezultatus. Dėl to būtina griežta laboratorinės kokybės kontrolės tvarka.

#### D. REKOMENDUOJAMI VIRUSOLOGINIAI TYRIMAI IR JŲ REZULTATŲ VERTINIMAS

Virusologiniai tyrimai yra būtini norint patvirtinti AKM.

Viruso išskyrimas ir HAT turi būti laikomi referentiniais virusologiniais tyrimais ir prireikus taikomi kaip patvirtinamieji tyrimai. Juos rekomenduojama taikyti ypač tada, kai teigiami TIF arba PGR tyrimų rezultatai nėra susiję su klinikinį požymių arba patologinių anatominį pokyčių nustatymu (kiaulėms) ar kitais abejotinais atvejais.

Tačiau pirminį AKM protrūkį galima patvirtinti, jeigu toms kiaulėms nustatyti klinikiniai požymiai ar patologiniai anatominiai pokyčiai ir jeigu ne mažiau kaip dviem tyrimo metodais iš tos pačios įtariamoms kiaulės paimtuose mėginiuose buvo nustatytas antigenas, genomas arba antikūnas.

Antrinį AKM protrūkį galima patvirtinti, jeigu be epidemiologinių sąsajų su patvirtintu protrūkiu arba susirgimu kiaulėms nustatomi ligos klinikiniai požymiai ar patologiniai anatominiai pokyčiai ir antigeno, viruso genomo ar antikūno tyrimų rezultatai yra teigiami.

Pirminis AKM susirgimas šernams gali būti patvirtintas išskyrus virusą arba tada, kai ne mažiau kaip dviem tyrimo metodais buvo nustatytas antigenas, viruso genomas arba antikūnas. Tolesni šernų AKM susirgimai, kuriems nustatyti epidemiologiniai ryšiai su anksčiau patvirtintais susirgimais, gali būti patvirtinti, jeigu antigeno, viruso genomo arba antikūno tyrimų rezultatai yra teigiami.

#### E. GENETINIS IŠSKIRTŲ AKM VIRUSŲ TIPIZAVIMAS

1. Išskirtas AKM virusas genetiškai tipizuojamas nustatant apibrėžtą fermentų struktūrą ir viruso genomo dalies nukleotidų seką. Šių apibrėžtų struktūrų arba sekų panašumas su anksčiau išskirtų virusų genomo sekomis gali parodyti, ar ligos protrūkį sukėlė virusai, atitinkantys europinį arba amerikinį molekulinį modelį.

Išskirto AKM viruso genetinis tipizavimas yra labai svarbus siekiant praplėsti dabartines žinias apie AKM molekulinę epidemiologiją ir virusų genetinę įvairovę. Duomenys apie molekulę leidžia suklasifikuoti naujus išskirtus virusus ir pateikti informaciją apie galimą jų kilmę.

2. Jeigu nacionalinėje laboratorijoje ar kurioje nors kitoje laboratorijoje, patvirtintoje diagnozuoti AKM, negalima greitai tipizuoti viruso (molekulės), pirminis mėginys arba išskirtas virusas turi būti kuo skubiau siunčiami į Bendrijos kontrolinę laboratoriją.

Patvirtintų AKM diagnostikos laboratorijų turimi duomenys apie išskirto AKM viruso apibrėžtų fermentų tipizavimą ir genetinę seką turi būti perduoti ES AKM kontrolinei laboratorijai, kad ši medžiaga būtų įtraukta į laboratorijoje turimą duomenų bazę.

Į minėtą duomenų bazę įtraukta informacija turi būti prieinama visų valstybių narių nacionalinėms kontrolinėms laboratorijoms. Tačiau jeigu dėl publikacijų moksliniuose žurnaluose nacionalinė kontrolinė laboratorija prašo neviešinti šių rezultatų, Bendrijos kontrolinė laboratorija garantuoja duomenų konfidencialumą tol, kol jie nebus paskelbti spaudoje.

### VII skyrius

#### ***Serologinių tyrimų principai ir naudojimas bei rezultatų vertinimas***

##### A. BENDRIEJI PRINCIPAI IR DIAGNOSTINĖ VERTĖ

1. AKM specifinius antikūnus rekomenduojama nustatyti kiaulėms sergant poūme arba lėtine ligos forma, taip pat taikant plataus masto tyrimo ir akm likvidavimo programas dėl kelių priežasčių:
  - i) antikūnai infekuotoms kiaulėms gaminasi greitai. Paprastai jie aptinkami kraujo serumo mėginiuose, po užsikrėtimo praėjus septynioms – dešimčiai dienų;
  - ii) nėra vakcinų nuo AKM. Tai reiškia, kad AKM specifiniai antikūnai susidaro tik užsikrėtus AKM virusu;
  - iii) antikūnų ilgalaikiškumo. Didelis kiekis antikūnų daugelį mėnesių arba net visą gyvenimą gali būti nustatomas pasveikusioms kiaulėms.

Specifiniai motininiai antikūnai gali būti nustatyti paršeliams pirmosiomis jų gyvenimo savaitėmis. Motininių antikūnų dvigubo sunykimo trukmė sveikų paršelių organizme yra apie trys savaitės. Jeigu antikūnai nustatomi vyresniems negu trijų mėnesių amžiaus paršeliams, tai gali būti ne motininiai antikūnai.

2. Antikūnų prieš AKM virusą nustatymas iš pateiktų organų eksudatų serumo ar plazmos mėginiuose atliekamas siekiant diagnozuoti AKM įtariamame ūkyje, nustatyti infekcijos patekimo datą patvirtintų protrūkių atveju ir stebėsenos bei priežiūros tikslais.

Serologiškai teigiamų kiaulių buvimo ūkyje vieta gali suteikti vertingos informacijos apie tai, kaip ir iš kur AKM virusas pateko į ūkį.

Tačiau serologinių tyrimų rezultatai turi būti kruopščiai įvertinti, atsižvelgiant į visus klinikinius, virusologinius ir epidemiologinius duomenis, gautus iš Direktyvos 2001/60/EB 8 straipsnyje nurodytos apklausos, kuri turi būti atliekama įtarus ar patvirtinus AKM.

## B. REKOMENDUOJAMI SEROLOGINIAI TYRIMAI

1. AKM serologiniam patvirtinimui pasirinktinai taikomas IFA, netiesioginės imuninės fluorescencijos (NIF, angl. IIFT) ir immunoblottingo (IB) tyrimai.

Nacionalinių laboratorijų atlikto serologinio diagnostavimo kokybė ir veiksmingumas turi būti reguliariai tikrinami palyginamaisiais tyrimais tarp laboratorijų, kuriuos reguliariai organizuoja Bendrijos kontrolinė laboratorija.

2. IFA yra patikimiausias ir naudingiausias didelio masto serologiniams tyrimams. Jo tikslas – nustatyti AKM viruso antikūnus, prijungtus prie viruso baltymų, prijungtų kietoje fazėje, pridėdant A baltymo, konjuguoto su fermentu, kuriam reaguojant su atitinkamu substratu vyksta akivaizdi spalvinė reakcija.
3. Nacionalinės laboratorijos, pasinaudamos Bendrijos kontrolinės laboratorijos pateiktu kontrolinių serumų komplektu, turi reguliariai atlikti kiekvienos IFA partijos jautrumo ir specifiškumo kokybės patikrinimą. Minėtas komplektą sudaro:

— ankstyvos AKM stadijos kiaulių serumai (gauti praėjus ne daugiau kaip 17 dienų po infekcijos),

— sveikstančių kiaulių serumai (gauti praėjus daugiau kaip 17 dienų po infekcijos).

AKM serologiniam diagnostavimui naudojama IFA turi aptikti visus kontrolinius sveikstančių kiaulių serumus. Turi būti galimybė pakartoti gautus rezultatus, naudojant kontrolinius serumus. Be to, turi būti nustatomi teigiami ankstyvos AKM stadijos kiaulių serumai. Rezultatai, gauti tiriant ankstyvos AKM stadijos kiaulių serumą, parodo IFA jautrumą.

4. NIFT yra greitas didelio jautrumo ir specifiškumo metodas AKM antikūnams serumuose arba audinių eksudatuose nustatyti. Jis pagrįstas AKM antikūnų, kurie yra prisijungę prie adaptuoto AKM virusu užkrėstų monocitų ląstelių monosluoksnio, nustatymu. Antikūnų-antigeno reakcija yra nustatoma pagal prisijungusi fluorescuojanti proteiną A. Teigiamu atveju yra matoma fluorescencija apie infekuotų ląstelių branduolius.

TIFT ir NIFT taikant kartu tirti organus, kraują ir eksudatus, paimtus iš AKM požymių turinčių gyvūnų, galima greitai ir patikimai patvirtinti šią ligą.

5. IB tyrimas yra labai specifiškas ir jautrus metodas, pagrįstas nitroceliuliozės juostelių, padengtų viruso baltymu kaip antigenu, naudojimu. Specifinė antikūno-antigeno reakcija nustatoma pridėjus baltymo A-peroksidaze konjuguotų (antikūnų) ir atitinkamo substrato. Labai naudinga tirti serumus, kurie nedavė rezultato taikant IFA.

## VIII skyrius

### **Minimalūs saugos reikalavimai afrikinio kiaulių maro laboratorijoms**

1. Kiekviena laboratorija, kurioje reikia padauginti AKM virusą ląstelių kultūrose, turi laikytis I lentelėje nustatytų reikalavimų. Tačiau patologiniai anatomiciniai tyrimai, audinių apdorojimas IFA arba PGR metodais ir serologiniai tyrimai, naudojant inaktyvuotą antigeną, gali būti atliekami taikant mažesnius saugos reikalavimus, jeigu užtikrinami I lentelėje pateikti minimalūs reikalavimai, higienos sąlygos, o pasibaigus tyrimams atliekama dezinfekcija, saugiai sunaikinamos skerdenos, audiniai ir serumas.

2. Kiekviena laboratorija, atliekanti gyvulių eksperimentus su AKM virusu, turi laikytis 2 lentelėje nurodytų reikalavimų.
3. Visos AKM viruso atsargos turi būti laikomos saugiai, užšaldytos arba liofilizuotos. Kiekviena atskira ampulė turi būti aiškiai paženklinta, be to registruojama išsami informacija apie viruso atsargas nurodant datas ir kokybės kontrolės patikrinimų rezultatus. Taip pat turi būti saugomi duomenys apie viruso atsargų papildymą su nurodymais apie jų šaltinį ir apie virusus, atiduotus į kitas laboratorijas.
4. Rekomenduojama, kad biologinės saugos padaliniui, kuriame dirbama su AKM virusu, būtų išskirtos papildomos patalpos, kuriose nedirbama su AKM virusu. Jos reikalingos stikliniams indams ir laboratorinėms priemonėms paruošti, neužkrėstoms ląstelių kultūroms laikyti ir paruošti, serumui paruošti bei serologiniams tyrimams (naudojant inaktyvuotą KKM virusą) atlikti ir administraciniam bei kanceliariniam darbui.

## 1 lentelė

D i a g n o s t i k o s l a b o r a t o r i j o m s b ū d i n g o s b i o l o g i n ė s t a r š o s  
p r i n c i p a i

	Minimalūs reikalavimai	Papildomi reikalavimai
Bendroji aplinka	Įprastas atmosferos slėgis. Specialios patalpos, skirtos tik apibrėžtomis procedūroms.	Įprastas atmosferos slėgis. viengubas ištraukiamo oro HEPA filtravimas. Specialios patalpos, skirtos tik klasikinio kiaulių maro arba AKM diagnostikos procedūroms.
Laboratoriniai drabužiai	Specialūs išoriniai drabužiai, dėvimi tik AKM viruso patalpose. Bet kokiam darbui su infekuotomis medžiagomis naudojamos vienkartinės pirštinės. Prieš pašalinant iš patalpų specialūs išoriniai drabužiai yra sterilizuojami arba skalbiami patalpose.	Prieš įeinant į patalpas būtina visiškai persirengti. Laboratoriniai drabužiai dėvimi tik AKM viruso patalpose. Bet kokiam darbui su infekuotomis medžiagomis naudojamos vienkartinės pirštinės.
Darbuotojų kontrolė	Į patalpas gali įeiti tik įvardyti ir apmokyti darbuotojai. Prieš išeinant iš patalpų plaunamos ir dezinfekuojamos rankos. Darbuotojams neleidžiama prisitarti prie kiaulių 48 valandas po išėjimo iš patalpų.	Į patalpas gali įeiti tik įvardyti ir apmokyti darbuotojai. Prieš išeinant iš patalpų plaunamos ir dezinfekuojamos rankos. Darbuotojams neleidžiama prisitarti prie kiaulių 48 valandas po išėjimo iš patalpų.
Įranga	Visiems darbams su gyvu virusu naudojama biologiškai saugi spinta (I arba II klasės). Spintoje turėtų būti dvigubas ištraukiamo oro HEPA filtravimas. Visa laboratorinėms procedūroms reikalinga įranga turi būti laikoma specialioje laboratorijos dalyje.	

## 2 lentelė

B i o l o g i n ė s s a u g o s r e i k a l a v i m a i p a t a l p o m s , k u r i o s e v y k s t a  
b a n d y m a i s u g y v ū n a i s

	Reikalavimai
Bendroji aplinka	Neigiamu slėgiu valdoma ventilacija. Ištraukto oro HEPA filtravimas. Patalpos visiškai fumigacijai arba dezinfekcijai užbaigus bandymą. Visos kietos ir skystos atliekos išvalomos, kad būtų dezaktyvuotas AKM virusas (karščiu/deginiu arba cheminiu būdu).

	Reikalavimai
Laboratoriniai drabužiai	Prieš įeinant į patalpas būtina visiškai persirengti. Prieš pašalinant iš patalpų drabužiai yra sterilizuojami arba skalbiami patalpose.
Darbuotojų kontrolė	Į patalpas gali įeiti tik įvardyti ir apmokyti darbuotojai Prieš prausiantis duše drabužiai paliekami viduje. Prieš išeinant iš patalpų duše nuplautomas visas kūnas. Darbuotojams neleidžiama prisitarti prie kiaulių 48 valandas po išėjimo iš patalpų.
Įranga	Patalpose turi būti visa darbai su gyvūnais reikalinga įranga. Visos medžiagos sterilizuojamos prieš išnešant jas iš patalpų arba, o jei tai gyvūnų mėginiai – dvigubai supakuojami į sandarius konteinerius, kurių paviršius dezinfekuojamas, ir transportuojami į AKM laboratoriją.
Gyvūnai	Visi gyvūnai turi būti paskerdžiami prieš išvežant juos iš patalpų, patologiniai anatomiciniai tyrimai atliekami biologiškai saugiose patalpose, užbaigus tyrimus lavonai sudeginami.