

32003D0422

11.6.2003

URADNI LIST EVROPSKE UNIJE

L 143/35

**ODLOČBA KOMISIJE****z dne 26. maja 2003****o odobritvi Diagnostičnega priročnika za afriško prašičjo kugo**

(notificirano pod dokumentarno številko K(2003)1696)

**(Besedilo velja za EGP)**

(2003/422/ES)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 2002/60/ES z dne 27. junija 2002 o posebnih določbah za obvladovanje afriške prašičje kuge in spremembi Direktive 92/119/EGS v zvezi z nalezljivo ohromelostjo prašičev (Tešinska bolezen) in afriško prašičjo kugo <sup>(1)</sup> in zlasti člena 18(3) Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Ker je v skladu z Direktivo 2002/60/ES treba določiti enotne diagnostične postopke, metode vzorčenja in merila za vrednotenje rezultatov laboratorijskih preiskav za potrditev afriške prašičje kuge.
- (2) Ker mora v skladu z zgoraj navedeno direktivo referenčni laboratorij Skupnosti za afriško prašičjo kugo po posvetovanju s Komisijo uskladiti metode, ki jih uporabljajo države članice za ugotavljanje bolezni, s tem da organizira med drugim redne primerjalne teste in oskrbo s standardnimi reagenti na ravni Skupnosti.
- (3) Virus afriške prašičje kuge ne ogroža zdravja ljudi.
- (4) Najnovejše laboratorijske preiskave omogočajo hitro potrditev afriške prašičje kuge.
- (5) Izkušnje, pridobljene v zadnjih letih pri nadzoru nad afriško prašičjo kugo, so vodile do določitve najprimernejših postopkov vzorčenja in meril za vrednotenje rezultatov laboratorijskih preiskav za pravilno diagnostiko te bolezni v različnih okoliščinah.
- (6) Zato je primerno, da se odobri priročnik, ki določa te postopke in merila.
- (7) Državni diagnostični laboratoriji morajo biti pooblašteni, da prilagodijo priznane laboratorijske preiskave ali uporabljajo drugačne preiskave, če se lahko dokaže enaka občutljivost in specifičnost.
- (8) Ukrepi, predvideni s to odločbo, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehransko verigo in zdravstveno varstvo živali –

SPREJELA NASLEDNJO ODLOČBO:

*Člen 1*

1. Diagnostični priročnik za afriško prašičjo kugo v Prilogi se odobri.
2. Države članice zagotovijo, da se potrditev afriške prašičje kuge izvrši v skladu s postopki, metodami vzorčenja in merili za vrednotenje rezultatov laboratorijskih preiskav, kot so določeni v priročniku in na podlagi:
  - (a) ugotovitve kliničnih znakov bolezni in patoanatomskih sprememb, značilnih za bolezen;
  - (b) dokazu virusa, virusnega antigena ali genoma v vzorcih prašičjih tkiv, organov, krvi ali iztrebkov;
  - (c) dokazu specifičnih protiteles v krvnih vzorcih.
3. Z odstopanjem od odstavka 2 lahko državni diagnostični laboratoriji iz Priloge IV k Direktivi 2002/60/ES uvajajo spremembe v laboratorijske preiskave iz priročnika ali uporabijo druge preiskave, če je mogoče dokazati enako občutljivost in specifičnost.

Občutljivost in specifičnost teh spremenjenih ali drugačnih preiskav je treba ocenjevati v okviru rednih primerjalnih testov, ki jih organizira referenčni laboratorij Skupnosti za afriško prašičjo kugo.

*Člen 2*

Ta odločba se uporablja od 1. julija 2003.

*Člen 3*

Ta odločba je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 26. maja 2003

Za Komisijo  
David BYRNE  
Član Komisije

<sup>(1)</sup> UL 192, 20.7.2002, str. 27.

## PRILOGA

## DIAGNOSTIČNI PRIROČNIK ZA AFRIŠKO PRAŠIČJO KUGO

## Poglavje I

## Uvod, cilji in opredelitev pojmov

1. Da bi zagotovili enoten postopek za ugotavljanje afriške prašičje kuge (v nadaljevanju: APK), ta priročnik:
  - (a) daje smernice in minimalne zahteve za diagnostične postopke, metode vzorčenja in merila za vrednotenje rezultatov kliničnih, patoanatomskih in laboratorijskih preiskav za pravilno ugotavljanje APK (<sup>(1)</sup>).
  - (b) določa minimalne zahteve v zvezi z biološko varnostjo in standarde kakovosti, ki jih morajo upoštevati diagnostični laboratoriji za ugotavljanje APK in ob prevozu vzorcev;
  - (c) določa laboratorijske preiskave, ki se uporabljajo za ugotavljanje APK in laboratorijske postopke, ki se uporabljajo za genotipizacijo izolatov virusa APK.
2. Ta priročnik je namenjen predvsem organom oblasti, ki so odgovorni za nadzor nad APK. Zato poudarja načela in uporabo laboratorijskih preiskav in ocenjevanje rezultatov teh preiskav, ne pa podrobnih laboratorijskih postopkov.
3. V tem priročniku se, poleg izrazov iz člena 2 Direktive 2002/60/ES, uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:
  - (a) „sumljivo gospodarstvo“ pomeni prašičerejski obrat, za katerega obstaja sum, da je eden ali več prašičev okuženih z virusom APK, ali gospodarstvo, ki je v stiku s sumljivim gospodarstvom, v smislu člena 2(k) Direktive 2002/60/ES;
  - (b) „epidemiološka podenota“ ali „podenota“ pomeni bližnjo zgradbo, kraj ali zemljišče, kjer so skupine prašičev znotraj gospodarstva nastanjene tako, da imajo pogoste neposredne ali posredne medsebojne stike, hkrati pa so ločene od drugih prašičev na istem gospodarstvu;
  - (c) „prašiči, ki so bili v stiku z okuženimi prašiči“ pomeni prašiče, ki so v zadnjih 21 dneh bivali na gospodarstvu v neposrednem stiku z enim ali več prašiči, za katere se sumi, da so okuženi z virusom APK.

## Poglavje II

## Opis APK s poudarkom na diferencialni diagnozi

## A. UVOD

1. APK povzroča RNK virus z ovojnico, ki spada v rod *Asfivirus* iz družine *Asfarviridae*. Sevi virusa APK se razlikujejo po virulenci, vendar pa različnih serotipov ni mogoče določiti.
2. Virus APK je zelo obstojen v iztrebkih okuženih prašičev, prašičjih truplih in svežem mesu prašičev ter nekaterih izdelkih iz mesa prašičev. Za inaktivacijo teh virusov v okolju je treba uporabljati ustrezna razkužila.
3. V Evropi je glavna naravna pot okužbe oro-nazalna, z neposrednim ali posrednim stikom z okuženimi prašiči ali zaradi krmljenja s krmo, kontaminirano z virusom. V območjih, kjer obstajajo vektorji (<sup>(2)</sup>), pa igra prenos prek teh vektorjev pomembno vlogo pri ohranjanju virusa in njegovemu širjenju. APK se lahko širi tudi s posrednim stikom z okuženim materialom in z ugrizi žuželk, ki mehansko prenašajo virus APK. Bolezen se lahko prenaša tudi s semenom okuženih merjascev.
4. Inkubacijska doba traja pri posameznih živalih približno 15 dni, v razmerah na prostem pa se lahko klinični znaki na gospodarstvu pojavijo šele več tednov po vnosu virusa, v primeru blagih sevov virusa pa še kasneje.

(<sup>1</sup>) Pri določanju števila vzorcev, ki se odvzamejo za laboratorijske preiskave, se upošteva tudi občutljivost metod, ki se bodo uporabile. Število živali, na katerih se opravi vzorčenje, je večje od števila, navedenega v tem priročniku, če občutljivost uporabljene metode ni zelo velika.

(<sup>2</sup>) Kot je določeno v členu 2(r) Direktive 2002/60/ES.

5. Pojavljajo se akutne, subakutne in kronične oblike APK, ki se nastanejo predvsem zaradi različne virulence virusa.
6. Pri prašičih, ki okužbo prebolijo, traja viremija še 40 do 60 dni in ti prašiči postanejo prenašalci virusa. Virus APK virus je bil izoliran iz prašičev prenašalcev do šest mesecev po okužbi.

#### B. AKUTNA OBLIKA

1. Prvi klinični znak bolezni je ponavadi povišana telesna temperatura (nad 40 °C), ki jo spremljajo depresija, izguba apetita, hitro in težko dihanje ter izločki iz nosu in oči. Prašiči kažejo motnje v koordinaciji in se stiskajo skupaj. Pri svinjah je možno zvriganje v vseh fazah brejosti. Pri nekaterih prašičih se lahko pojavi bruhanje ali zaprtost, pri drugih pa krvava driska. Opazna so območja s polnokrvnostjo in krvavitvami v podkožju, še posebej na okončinah in ušesih. Pred smrtjo, ki nastopi en do sedem dni po nastanku kliničnih znakov, lahko nastopi koma. Stopnja obolenosti in umrljivosti na gospodarstvu je lahko 100 %.

Patoanatomski pregled kaže na značilen hemoragični sindrom s splošno polnokrvnostjo trupa, krvavo tekočino v prsih in trebušni votlini, povečano vranico temne barve, hemoragičnimi bezgavkami s krvnimi strdki, še posebej bezgavkami ledvic in gastrohepatičnimi bezgavkami, pikčaste krvavitve v skorji in sredici ledvic ter ledvičnem mehu, serozah trebušne votline, želodčni in črevesni mukozni in srcu (epikard in endokard), hidrotoraks ter pikčaste krvavitve po plevri.

2. Na splošno so klinični znaki in patoanatomske spremembe pri akutni obliki klasične prašičje kuge zelo podobne tisti pri afriški prašičji kugi. Kadar nastopijo, so krvavitve na koži in ušesih zlahka opazne, kar vodi do suma na akutno klasično ali afriško prašičjo kugo. Podobne spremembe so značilne le za malo drugih bolezni.

Na akutno afriško prašičjo kugo je treba pomisliti tudi pri sumu na: rdečico, prašičji respiratorni in reprodukcijski sindrom, zastrupitev s kumarinom, hemoragično purpuro, sindrom multisistemskega poodstavitvenega hujšanja, sindrom kožnega vnetja in odpovedi ledvic, okužbo s salmonelo ali pasterelo, in pri katerem koli obolenju črevesja ali dihal s povišano telesno temperaturo, ki ne reagira na zdravljenje z antibiotiki.

#### C. SUBAKUTNE OBLIKE

Subakutne oblike bolezni so pogostejše na endemičnih območjih. Za subakutno okužbo je značilna nihajoča povišana telesna temperatura, depresija in pljučnica. Smrt lahko nastopi zaradi odpovedi srca. Spremembe pri subakutni obliki so podobne tistim pri akutni obliki, vendar so milejše. Značilne so močne krvavitve v bezgavkah, ledvicah in vranici, polnokrvnost in edem pljuč, ter v nekaterih primerih intersticijska pljučnica.

#### D. KRONIČNE OBLIKE

Kronične oblike bolezni so redke. Pri kroničnih oblikah je mogoče opaziti sekundarne bakterijske okužbe. Ker so klinični znaki pri kronični APK precej nespecifični, je treba pri diferencialni diagnostiki upoštevati še mnoge druge bolezni. Povišana telesna temperatura ni nujno prisotna pri vsaki živali, vendar je na okuženem gospodarstvu mogoče opaziti povišano telesno temperaturo vsaj pri nekaterih prašičih.

Klinični znaki kronične APK lahko vključujejo težave pri dihanju, zvriganje, artritis, kronične kožne razjede ali nekroze, ki niso podobne klinični sliki, značilni za okužbe z virusom APK. Spremembe so lahko minimalne ali jih sploh ni. Rezultati patološko-histoloških preiskav kažejo na povečane bezgavke in vranico, plevritis in fibrinozni perikarditis ter pnevmonitis. Opisane so tudi fokalne nekroze in mineralizacija pljuč.

### Poglavje III

#### **Smernice za glavna merila za označitev gospodarstev za gospodarstva, sumljiva na afriško prašičjo kugo**

1. Sklep o označitvi gospodarstva za sumljivo gospodarstvo se sprejme na podlagi naslednjih ugotovitev, meril in utemeljitev:
  - (a) ugotovljeni klinični znaki in patoanatomske spremembe pri prašičih. Upoštevajo se naslednje glavne ugotovitve:
    - povišana telesna temperatura z obolenostjo in umrljivostjo prašičev vseh starosti,
    - povišana telesna temperatura s hemoragičnim sindromom; pikčaste in ehimotske krvavitve, zlasti v bezgavkah, ledvicah, vranici (ki je povečana in temne barve, še posebno pri akutnih oblikah) in sečnem mehurju, ter razjede na žolčniku;

- (b) epidemiološke ugotovitve. Upoštevajo se naslednje glavne epidemiološke ugotovitve:
- da so bili prašiči v neposrednem ali posrednem stiku z gospodarstvom, za katerega je dokazano, da je okuženo z virusom APK,
  - da je gospodarstvo dobavljalo prašiče, za katere se je naknadno izkazalo, da so okuženi z virusom APK,
  - da so bile svinje umetno osemnjene s semenom iz sumljivega vira,
  - da je prišlo do posrednega ali neposrednega stika z divjimi prašiči iz populacije, pri kateri se pojavlja APK,
  - da so prašiči rejeni na prostem na območju, kjer so divji prašiči okuženi z virusom APK,
  - da so prašiči krmljeni s pomijami in obstaja sum, da te pomije niso obdelane na način, ki bi inaktiviral virus APK,
  - da obstaja možnost, da je prišlo do izpostavljenosti virusu APK, npr. zaradi oseb, ki so vstopile na gospodarstvo, prevozov itd. z gospodarstev, za katera obstaja sum, da so okužena ali ki so okužena z virusom APK,
  - da se na območju gospodarstva pojavljajo vektorji.
2. V vsakem primeru velja gospodarstvo za sumljivo, če obstaja na gospodarstvu sum na klasično prašičjo kugo zaradi ugotovljenih kliničnih znakov ali patoanatomskih sprememb, vendar pa klinične, epidemiološke in laboratorijske preiskave niso potrdile te bolezni ali ugotovile vira ali povzročitelja druge bolezni na zadevnem gospodarstvu.

#### Poglavje IV

#### **Postopki preverjanja in vzorčenja**

#### A. SMERNICE IN POSTOPKI ZA KLINIČNO PREISKAVO IN ODVZEM VZORCEV PRI PRAŠIČIH NA SUMLJIVIH GOSPODARSTVIH

1. Države članice zagotovijo, da se na sumljivih gospodarstvih izvedejo ustrezne klinične preiskave, vzorčenje in laboratorijske preiskave, da se potrdi ali izključi APK, skladno s smernicami in postopki iz točk 2 do 6.

Ne glede na sprejem ukrepov iz člena 4(2) Direktive 2002/60/ES na zadevnem gospodarstvu, te smernice in postopki veljajo tudi v primerih bolezni, kjer se APK upošteva v diferencialni diagnozi. To velja tudi v primerih, kjer so možnosti pojava APK na podlagi opaženih kliničnih znakov in epidemioloških podatkov o bolezni pri prašičih zelo majhne.

V vseh drugih primerih pa se, kadar obstaja sum, da je eden ali več prašičev okuženih z virusom APK, na zadevnem sumljivem gospodarstvu sprejmejo ukrepi iz člena 4(2) Direktive 2002/60/ES.

V primeru suma na APK pri prašičih v klavnici ali med transportom se uporabijo tudi predpisane smernice in postopki iz točk 2 do 6, smiselno.

2. Kadar sumljivo gospodarstvo obišče uradni veterinar z namenom potrditve ali izključitve APK:

- je treba pregledati register prašičev na gospodarstvu in zdravstvene evidence gospodarstva, če so razpoložljive; je treba, da se izberejo prašiči za klinično preiskavo, pregledati vsako podenoto gospodarstva.

Klinična preiskava mora vključevati merjenje telesne temperature in mora zajeti predvsem naslednje prašiče ali skupine prašičev:

- bolne prašiče ali neješčje (anoreksične) prašiče,
- prašiče, ki so bili pred nedavnim pripeljani na gospodarstvo iz potrjenih izbruhov ali iz drugih sumljivih virov,
- prašiče, nastanjene v podenotah, ki so jih pred nedavnim obiskali zunanji obiskovalci, ki so bili pred kratkim v tesnem stiku s prašiči, osumljenimi okužbe ali okuženimi z virusom APK, ali za katere se ugotovijo drugi, posebej tvegani stiki s potencialnim virom virusa APK,
- prašiče, na katerih je že bilo izvedeno vzorčenje in serološke preiskave na APK, če na podlagi rezultatov opravljenih preiskav ni mogoče izključiti afriške prašičje kuge, in prašiče, ki so bili v stiku s temi prašiči,
- prašiče, ki so nedavno preboleli bolezen.

Če pregled sumljivega gospodarstva ne pokaže prisotnosti prašičev ali skupin prašičev iz gornjega pododstavka, pristojni organ, brez vpliva na druge ukrepe, ki se lahko uporabijo na zadevnem gospodarstvu, skladno z Direktivo 2002/60/ES in ob upoštevanju epidemiološkega stanja:

- opravi nadaljnje preiskave na zadevnem gospodarstvu skladno s točko 3, ali
  - zagotovi, da se prašičem na zadevnem gospodarstvu odvzamejo vzorci krvi za laboratorijske preiskave (v tem primeru se kot smernice uporabijo postopki vzorčenja iz točke 5 in oddelka F(2), ali
  - sprejme ali ohrani ukrepe iz člena 4(2) Direktive 2002/60/ES, do nadaljnjih preiskav na zadevnem gospodarstvu, ali
  - izključi sum na APK.
3. Ob sklicevanju na ta odstavek je treba na zadevnem gospodarstvu opraviti klinične preiskave na naključno izbranih prašičih v podenotah, za katere se ugotovi ali sumi možnost vnosa virusa APK.

Najmanjše število prašičev, določenih za preiskavo, mora omogočiti s 95 % zanesljivostjo ugotovitev povišane telesne temperature pri njeni 10 % razširjenosti v teh podenotah.

4. Če se na gospodarstvu ugotovijo poginuli ali poginjajoči prašiči, je treba opraviti patoanatomske preiskave, po možnosti na najmanj petih takšnih prašičih in zlasti na prašičih:
- ki so pred poginom kazali zelo očitne znake bolezni,
  - z zelo povišano telesno temperaturo,
  - ki so poginili pred nedavnim.

Če pri teh preiskavah niso bile ugotovljene spremembe, značilne za APK, vendar se zaradi epidemiološkega stanja ugotovi, da so potrebne nadaljnje preiskave:

- je treba v podenoti, kjer so bili nastanjeni poginuli ali poginjajoči prašiči, opraviti klinično preiskavo iz točke 3 in vzorčenje krvi iz točke 5, in
- treba je opraviti patoanatomske preiskave na treh do štirih prašičih, ki so bili v stiku z poginulimi ali poginjajočimi prašiči, še posebej, če ti prašiči kažejo klinične znake bolezni.

Ne glede na prisotnost ali odsotnost sprememb, značilnih za APK, je treba prašičem, na katerih je bila opravljena patoanatomska preiskava, odvzeti vzorce organov ali tkiv za virološke preiskave skladno s poglavjem V(B)(1). Priporočljivo je, da se vzorčenje izvede na prašičih, ki so poginili nedavno.

Med potekom patoanatomskih preiskav mora pristojni organ:

- zagotoviti potrebne varnostne in sanitarne ukrepe za preprečevanje morebitnega širjenja bolezni,
  - poskrbeti, da se poginjajoči prašiči usmrtijo na human način skladno z Direktivo Sveta 93/119/EGS z dne 22. decembra 1993 o zaščiti živali v času klanja ali usmrtitve<sup>(1)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (ES) št. 806/2003<sup>(2)</sup>.
5. Če se na sumljivem gospodarstvu ugotovijo nadaljnji klinični znaki ali spremembe, značilne za APK, vendar pristojni organ meni, da te ugotovitve ne zadostujejo za potrditev izbruha APK in da je zato treba opraviti laboratorijske preiskave, je treba sumljivim prašičem in drugim prašičem v vsaki podenoti, v kateri so nastanjeni sumljivi prašiči, odvzeti vzorce, skladno s spodaj opisanimi postopki.
- (a) najmanjše število vzorcev za serološke preiskave mora v zadevni podenoti omogočati ugotovitev 10 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo.
  - (b) število odvzetih vzorcev za virološke preiskave mora biti skladno z navodili pristojnega organa, ki mora upoštevati vrste preiskav, ki se lahko izvedejo, občutljivost laboratorijskih testov, ki se bodo uporabili, in epidemiološko stanje.

<sup>(1)</sup> UL 340, 31.12.1993, str. 21.

<sup>(2)</sup> UL 122, 16.5.2003, str. 1.

6. Če se po opravljeni preiskavi na sumljivem gospodarstvu klinični znaki ali spremembe, značilne za APK, ne ugotovijo, pristojni organ pa meni, da na podlagi teh ugotovitev afriške prašičje kuge ni mogoče izključiti in je zato treba opraviti nadaljnje laboratorijske preiskave, se kot smernice uporabijo postopki vzorčenja iz pododstavka 5.

#### B. POSTOPKI VZORČENJA OB USMRTITVI PRAŠIČEV PO POTRĐITVI BOLEZNI NA GOSPODARSTVU

1. Da bi lahko ugotovili, kako je virus APK prišel na okuženo gospodarstvo, in določili čas, ki je potekel od njegovega vnosa, je treba ob usmrtitvi prašičev na gospodarstvu, ki sledi potrditvi izbruha skladno s členom 5(1)(a) Direktive 2002/60/ES, prašičem odvzeti naključne vzorce krvi za serološke preiskave.
2. Najmanjše število prašičev za vzorčenje mora omogočati dokaz 10 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo v vsaki podenoti na gospodarstvu <sup>(1)</sup>.

Odvzamejo se tudi vzorci za virološke preiskave, skladno z navodili pristojnega organa, ki morajo upoštevati vrste preiskav, ki se lahko izvedejo, občutljivost uporabljenih laboratorijskih testov in epidemiološko stanje.

Na območjih, kjer je že bila ugotovljena prisotnost vektorjev, okuženih z virusom APK, se odvzamejo tudi ustrezni vzorci klopov za virološke preiskave, skladno z navodili pristojnega organa in Prilogo III k Direktivi 2002/60/ES.

3. Vendar se lahko v primeru sekundarnih izbruhov pristojni organ odloči za odstopanje od točk 1 in 2 ter zahteva druge postopke vzorčenja, ob upoštevanju razpoložljivih epidemioloških informacij o viru in sredstvu vnosa virusa na gospodarstvo ter o možnosti širjenja bolezni z gospodarstva.

#### C. POSTOPKI VZORČENJA OB PREVENTIVNI USMRTITVI PRAŠIČEV NA SUMLJIVEM GOSPODARSTVU

1. Da bi lahko potrdili ali izključili APK in pridobili dodatne epidemiološke podatke, je treba ob preventivni usmrtitvi prašičev na sumljivem gospodarstvu, skladno z določbami člena 4(3)(a) ali člena 7(2) Direktive 2002/60/ES, odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave, kakor tudi vzorce krvi za virološke preiskave, skladno s postopkom iz točke 2.

2. Vzorčenje mora zajeti predvsem:

- prašiče, ki kažejo znake ali pri katerih se ugotovijo patoanatomske spremembe, na osnovi katerih se sumi na APK, in prašiče, ki so bili v stiku s temi prašiči,
- druge prašiče, ki so morda bili v stikih z okuženimi ali sumljivimi prašiči, ali ki bi lahko bili okuženi z virusom APK. Tem prašičem je treba odvzeti vzorce skladno z navodili pristojnega organa, ki pri tem upošteva epidemiološko stanje.

Poleg tega se naključno vzorči prašiče iz vsake podenote gospodarstva <sup>(2)</sup>. V tem primeru mora najmanjše število vzorcev za serološke preiskave v zadevni podenoti omogočati ugotovitev 10 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo.

Vrsta vzorcev, odvzetih za virološke preiskave in uporabljeni test morata biti v skladu z navodili pristojnega organa, ki mora upoštevati vrste preiskav, ki se lahko izvedejo, občutljivost teh testov in epidemiološko stanje.

<sup>(1)</sup> Vendar se mora, ob uporabi odstopanja iz člena 6(1) Direktive 2002/60/ES, vzorčenje opraviti na podenotah gospodarstva, kjer so bili prašiči usmrčeni, kar pa ne vpliva na nadaljnje preiskave in vzorčenja, ki se izvedejo na preostalih prašičih na gospodarstvu, kar se izvede skladno z navodili pristojnega organa.

<sup>(2)</sup> Vendar, če je pristojni organ omejil uporabo preventivnih usmrtitev na tisti del gospodarstva, kjer so bili prašiči, osumljeni okužbe ali kontaminacije z virusom APK, nastanjeni, se, skladno s členom 4(3)(a) Direktive 2002/60/ES, vzorčenje opravi v tistih podenotah gospodarstva, kjer je bil ta ukrep uporabljen, kar pa ne vpliva na nadaljnje preiskave in vzorčenja, ki se izvedejo na preostalih prašičih na gospodarstvu, kar se izvede skladno z navodili pristojnega organa.

D. POSTOPKI PREVERJANJA IN VZORČENJA PRED ODOBRTVIJO PREMICOV PRAŠIČEV Z GOSPODARSTEV, KI SO NA OKUŽENIH ALI OGROŽENIH OBMOČJIH, IN V PRIMERU ZAKOLA ALI USMRITVE TEH PRAŠIČEV

1. Brez vpliva na določbe člena 11(1)(f), drugi pododstavek, Direktive 2002/60/ES, da se premik prašičev z gospodarstev, ki so na okuženih ali ogroženih območjih, lahko odobri skladno s členom 10(3) navedene direktive, mora biti klinična preiskava, ki jo opravi uradni veterinar:

- opravljena v 24 urah pred premikom prašičev,
- skladna z določbami iz A(2).

2. V primeru premika prašičev na drugo gospodarstvo je treba, poleg preiskav, ki se izvedejo skladno s točko 1, opraviti klinično preiskavo prašičev, vključno z merjenjem telesne temperature na ustreznem delu populacije prašičev, iz vsake podenote gospodarstva, od koder prihajajo prašiči, ki se premikajo.

Najmanjše število pregledanih prašičev v teh podenotah mora omogočati ugotovitev povišane telesne temperature ob njeni 10 % razširjenosti s 95 % zanesljivostjo.

3. V primeru premika prašičev v klavnico, predelovalni obrat ali na druga mesta zaradi usmrtitve ali zakola je treba, poleg poizvedb, ki se izvedejo skladno s točko 1, opraviti klinično preiskavo na prašičih v vsaki podenoti gospodarstva, v kateri so prašiči, ki se premikajo. Za prašiče, starejše od treh do štirih mesecev, mora ta preiskava vključevati merjenje telesne temperature na ustreznem delu populacije prašičev.

Najmanjše število prašičev za preiskavo v zadevnih podenotah mora omogočati ugotovitev povišane telesne temperature ob njeni 20 % razširjenosti s 95 % zanesljivostjo.

4. Ob zakolu ali usmrtitvi prašičev iz točke 3 je treba prašičem iz vsake podenote, iz katere so se prašiči premikali, odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave ali vzorce krvi ali organa, na primer tonzil, vranice ali bezgavk za virološke preiskave.

Najmanjše število odvzetih vzorcev v vsaki podenoti mora omogočati ugotovitev 10 % serološke prevalence ali razširjenosti virusa s 95 % zanesljivostjo.

Vrsta odvzetih vzorcev in uporabljeni test morata biti v skladu z navodili pristojnega organa, ki mora upoštevati vrste preiskav, ki se lahko izvedejo, občutljivost teh testov in epidemiološko stanje.

5. Vendar, če se ob usmrtitvi ali zakolu prašičev ugotovijo klinični znaki ali patoanatomske spremembe, na osnovi katerih obstaja sum na APK, se, kot odstopanje od točke 4, za vzorčenje uporabijo določbe iz C.
6. Odstopanje iz člena 10(5) in člena 11(4) Direktive 2002/60/ES se odobri, če pristojni organi zagotovijo, da se tudi za skupine prašičev iz točk 2, 3 in 4, ki se preverjajo ali vzorčijo, uporabi intenzivna shema vzorčenja in preiskovanja. V okviru te sheme mora najmanjše število vzorcev krvi, odvzetih iz zadevne skupine prašičev, omogočati ugotovitev 5 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo.

E. POSTOPKI PREVERJANJA IN VZORČENJA OB PONOVNEM VNOSU ŽIVALI NA GOSPODARSTVO

1. Ob ponovnem vnosu prašičev na gospodarstvo, skladno s členom 13(3) Direktive 2002/60/ES, se uporabijo naslednji postopki vzorčenja:

- vzorce krvi se odvzame ne prej kot 45 dni po ponovnem vnosu prašičev,
- v primeru poskusnega vnosa prašičev je treba v vsaki podenoti gospodarstva odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave tolikšnemu številu naključno izbranih živali, ki omogoča ugotovitev 10 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo,
- v primeru popolne obnove populacije je treba v vsaki podenoti gospodarstva odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave tolikšnemu številu naključno izbranih živali, da je možno ugotoviti 20 % serološko prevalenco s 95 % zanesljivostjo.

2. Ob ponovnem vnosu prašičev na gospodarstvo, skladno s členom 13(4) Direktive 2002/60/ES, se uporabijo naslednji postopki vzorčenja:

- vzorce krvi se odvzame ne prej kot 45 dni po ponovnem vnosu prašičev,
- v primeru poskusnega vnosa prašičev je treba v vsaki podenoti gospodarstva odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave tolikšnemu številu naključno izbranih živali, ki omogoča ugotovitev 5 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo,
- v primeru popolne obnove populacije je treba v vsaki podenoti gospodarstva odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave tolikšnemu številu naključno izbranih živali, da je možno ugotoviti 10 % serološko prevalenco s 95 % zanesljivostjo.

Potem je treba postopek iz tretje alineje zgoraj ponoviti, in sicer ne prej kot 60 dni po popolni obnovi populacije.

3. Po vsakem novem vnosu prašičev pristojni organ zagotovi, da se, v primeru kakršne koli bolezn ali pogina prašičev na gospodarstvu iz neznanih razlogov, na zadevnih prašičih takoj opravijo preiskave na APK.

Te določbe se uporabljajo do odprave omejitev premeščanja prašičev iz členov 13(3)(a), (b) in (4) Direktive 2002/60/ES na zadevnem gospodarstvu.

#### F. POSTOPKI VZORČENJA NA GOSPODARSTVIH NA OKUŽENEM OBMOČJU PRED ODPRAVO OMEJITEV

1. Da bi na okuženem območju lahko odpravili ukrepe iz člena 10 Direktive 2002/60/ES, je treba na vseh gospodarstvih na okuženem območju:

- opraviti klinične preiskave skladno s postopki iz A(2) in (3),
- odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave, skladno s točko 2.

2. Najmanjše število odvzetih vzorcev mora pri prašičih v vsaki podenoti na gospodarstvu omogočati ugotovitev 10 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo.

Odstopanje iz člena 10(5) in člena 11(4) Direktive 2002/60/ES se odobri, če pristojni organi zagotovijo, da število odvzetih vzorcev krvi v vsaki podenoti na gospodarstvu omogoča ugotovitev 5 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo.

#### G. POSTOPKI VZORČENJA NA GOSPODARSTVIH NA OGROŽENEM OBMOČJU PRED ODPRAVO OMEJITEV

1. Da bi na ogroženem območju lahko odpravili ukrepe iz člena 11 Direktive 2002/60/ES, je treba na vseh gospodarstvih na zadevnem območju opraviti klinične preiskave skladno s postopki iz A(2).

Poleg tega je treba prašičem odvzeti vzorce krvi za serološke preiskave:

- na katerem koli drugem gospodarstvu, za katerega pristojni organ meni, da je vzorčenje potrebno,
- v vseh osemenjevalnih središčih.

2. Kadar koli se na gospodarstvih na ogroženem območju opravi odvzem vzorcev krvi za serološke preiskave, mora biti število odvzetih vzorcev na teh gospodarstvih skladno z F(2), prvi stavek.

Odstopanje iz člena 10(5) in člena 11(4) Direktive 2002/60/ES se odobri le, če pristojni organi zagotovijo, da se vzorci krvi za serološke preiskave odvzamejo na vsakem gospodarstvu na ogroženem območju. Najmanjše število odvzetih vzorcev krvi v vsaki podenoti na gospodarstvu mora omogočati ugotovitev 5 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo.



#### H. POSTOPKI SEROLOŠKEGA SPREMLJANJA IN VZORČENJA NA OBMOČJIH, KJER OBSTAJA SUM PRISOTNOSTI APK ALI KJER JE TA POTRJENA PRI DIVJIH PRAŠIČIH

1. Za serološko spremljanje divjih prašičev na območjih, kjer je APK potrjena ali kjer obstaja sum o njeni prisotnosti, je treba predhodno opredeliti velikost in geografsko območje ciljne populacije, na kateri se izvaja vzorčenje, da bi določili število vzorcev za odvzem. Velikost vzorca se določi glede na ocenjeno število živih živali in ne glede na število odlovljenih živali.
2. Če ni razpoložljivih podatkov o gostoti in velikosti populacije, je treba geografsko območje vzorčenja opredeliti ob upoštevanju stalne prisotnosti divjih prašičev in prisotnosti naravnih ali umetnih ovir, ki učinkovito preprečujejo velike in nenehne premike živali. V odsotnosti takih razmer, ali za večja območja, je priporočljivo, da se območje vzorčenja omeji na 200 km<sup>2</sup>, kjer navadno živi populacija 400 do 1000 divjih prašičev.
3. Ne glede na določbe člena 15(2)(c) Direktive 2002/60/ES mora najmanjše število prašičev za odvzem vzorcev na opredeljenem območju vzorčenja omogočati ugotovitev 5 % serološke prevalence s 95 % zanesljivostjo. V ta namen je treba odvzeti vzorce najmanj 56 živalim na vsakem opredeljenem območju
4. Odvzem vzorcev za virološke preiskave ustrelnim divjim prašičem ali živalim, ki so bile najdene poginule, je treba izvesti skladno s poglavjem V(B)(1).

Kadar se oceni, da je potrebno virološko spremljanje odlovljenih divjih prašičev, se mora le-to izvajati predvsem na živalih v starosti do enega leta.

5. Vsi vzorci, ki se pošljejo v laboratorij, morajo biti opremljeni z vprašalnikom iz člena 16(3)(h) Direktive 2002/60/ES.

#### Poglavje V

#### **Splošni postopki in merila za odvzem in transport vzorcev**

##### A. SPLOŠNI POSTOPKI IN MERILA

1. Preden se izvede vzorčenje na sumljivem gospodarstvu, je treba pripraviti načrt gospodarstva in opredeliti epidemiološke podenote gospodarstva.
2. Kadar se oceni, da bo morda potrebno ponovno vzorčenje prašičev, je treba vse živali za vzorčenje označiti na način, ki omogoča enostavno ponovno vzorčenje.
3. Vse vzorce je treba poslati v laboratorij skupaj z ustreznimi obrazci, skladno z zahtevami, ki jih predpiše pristojni organ. Ti obrazci vključujejo podatke o časovnem razvoju sprememb v zdravstvenem stanju vzorčenih prašičev in opažene klinične znake ali patoanatomske spremembe

Za prašiče, ki so nastanjeni na gospodarstvih, je treba predložiti jasne podatke o starosti, kategoriji in gospodarstvu izvora vzorčenih prašičev. Priporoča se, da se mesto nastanitve vsakega vzorčenega prašiča na gospodarstvu zabeleži skupaj z njegovo individualno identifikacijsko oznako.

##### B. ODVZEM VZORCEV ZA VIROLOŠKE PREISKAVE

1. Za ugotavljanje virusa APK, njegovega antigena ali genoma pri poginulih ali usmrčenih prašičih, so najprimernejši vzorci tkiva tonzil, bezgavk (gastrohepatičnih, ledvičnih, submandibularnih in retrofaringealnih) vranice, ledvic in pljuč (!). V primeru razpadajočih trupov živali je najprimernejši vzorec celotna dolga kost ali grodnica.
2. Vzorce nekoagulirane krvi in/ali strjene krvi je treba odvzeti prašičem s povišano telesno temperaturo ali drugimi znaki bolezni, skladno z navodili pristojnega organa.

(!) Priporočeno je odvzeti tudi vzorce ileuma, ki lahko koristijo pri določanju APK.

### C. TRANSPORT VZORCEV

1. Priporoča se, da se vsi vzorci:
  - pravilno označijo,
  - transportirajo in hranijo v neprepustnih posodah,
  - hranijo na hladnem pri temperaturi hladilnika; če pa naj bi vzorci prispeli v laboratorij v času, daljšem od 48 ur, je treba pridobiti od laboratorija navodila o najprimernejših temperaturnih pogojih med transportom,
  - kar najhitreje dostavijo v laboratorij,
  - hranijo v embalaži, kjer se za vzdrževanje nizke temperature uporabijo hladilni vložki ali suh led,
  - tkiva ali organov shranijo v ločenih zapečatenih plastičnih in ustrezno označenih posodah. Te se nato shranijo v večje posode in obložijo z ustrezno količino vpojnega materiala za zaščito pred poškodbami in za vpijanje uhajajočih tekočin,
  - kadar koli je le mogoče, odpeljejo neposredno v laboratorij s strani odgovorne osebe, da se zagotovi hiter in zanesljiv transport.
2. Zunanost pošiljke mora biti opremljena z naslovom namembnega laboratorija in naslednjim besedilom, ki mora biti dobro vidno:

„Patološki material živalskega izvora; pokvarljivo; lomljivo; ne odpirati izven laboratorija za APK.“
3. O času prispetja vzorcev je treba pravočasno obvestiti odgovorno osebo v namembnem laboratoriju.
4. Za transport vzorcev po zraku v referenčni laboratorij Skupnosti za APK<sup>(1)</sup> je treba paket opremiti z nalepkami skladno s predpisi IATA.

### Poglavje VI

#### **Načela in uporaba viroloških preiskav in vrednotenje rezultatov**

### A. DOKAZOVANJE VIRUSNEGA ANTIGENA

#### 1. Direktni imunofluorescenčni test (DIFT)

Test temelji na mikroskopskem dokazovanju virusnega antigena na odtisih celičnih razmazov ali na tankih kriostatkih rezinah tkiv organov prašičev, za katere se sumi, da so okuženi z virusom APK. Antigen v celicah se nato dokazuje s specifičnimi protitelesi, konjugiranimi s FIT. V citoplazmi okuženih celic se pojavijo fluorescirajoča inkluzijska telesa ali granule.

Primerni organi so ledvice, vranica in različne bezgavke. V primeru preiskave vzorcev divjih prašičev se lahko, če navedeni organi niso razpoložljivi ali če razpadajo, uporabi tudi razmaz celic kostnega mozga.

Preiskave se lahko opravi v dveh urah. Ker se lahko vzorci organov pridobijo samo od mrtvih živali, je njeno uporaba za namene spremljanja okužbe omejena.

To je zelo občutljiv test za primere akutne APK. Za subakutne ali kronične oblike je občutljivost DIFT le okrog 40 %, verjetno zaradi prisotnosti kompleksov antigen-protitelo, ki blokirajo reakcijo s konjugiranim protitelesom. Zanesljivost rezultatov testa je lahko omejena zaradi dvomljivega barvanja, zlasti v primeru pomanjkanja potrebnih izkušenj pri izvedbi testa ali če se test izvaja na razpadajočih organih.

#### 2. Test ELISA za dokazovanje antigena

Virusni antigeni se dokazujejo tudi z uporabo različnih izvedb testa ELISA, ki pa se priporoča le pri akutnih oblikah bolezni zaradi nizke občutljivosti ob prisotnosti kompleksov antigen-protitelo. Občutljivost testa ELISA za dokazovanje antigena mora biti vsaj tolikšna, da zagotavlja pozitiven rezultat pri živalih, ki kažejo klinične znake APK. V vsakem primeru pa je priporočljivo uporabljati ta test le kot „čredni“ test in skupaj z drugimi virološkimi preiskavami.

<sup>(1)</sup> Referenčni laboratorij Skupnosti ima dovoljenje za sprejem diagnostičnih vzorcev in izolatov virusa APK iz katere koli druge države članice. Če vzorci izvirajo iz držav, ki niso članice EU, se lahko od tega laboratorija zahteva kopija uvoznega dovoljenja pred prevozom, ki ga je treba pritrčiti v ovojnici na zunanjo stran embalaže.

## B. IZOLACIJA VIRUSA IN DOKAZOVANJE S HEMOADSORPCIJSKIM TESTOM (HAD)

1. Izolacija virusa temelji na nanosu vzorčnega materiala na dovzetne primarne celične kulture tkiv prašičjega izvora, monocite in makrofage. Najboljši vzorci za izolacijo virusa APK so kri ali levkociti iz nekoaguliranih vzorcev krvi ali organov iz A(1). Če je v vzorcu prisoten virus APK, se bo v celicah namnožil in v okuženih celicah bo prišlo do značilnega citopatskega efekta.
2. Metoda HAD se priporoča za določanje virusa APK zaradi visoke občutljivosti in specifičnosti. HAD temelji na sposobnosti virusa APK, da se namnoži v makrofagih prašiča in izzove hemadsorpcijo v prisotnosti eritrocitov prašiča. Okrog okuženih makrofagov se tvorijo značilne „rozete“ eritrocitov. Vendar pa majhno število divjih sevov virusa APK ne more povzročiti hemadsorpcije, ampak povzročijo citopatski efekt. Te seve je mogoče dokazati z DIF testom sedimentov celičnih kultur ali s PCR.
3. Izolacija virusa je kot metoda najbolj primerna za preiskovanje vzorcev majhnega števila živali in ne za množični nadzor. Postopek izolacije virusa zahteva veliko dela, rezultati pa so v najboljšem primeru znani po treh dneh od začetka preiskave. Za ugotovitev majhne količine virusa v vzorcu sta lahko potrebni še dve nadaljnji pasaži na celičnih kulturah. Zaradi tega lahko traja preiskava do 10 dni, preden je znan končni rezultat. Razpadajoči vzorci so lahko citotoksični za celično kulturo in posledično omejijo uporabnost metode.
4. Izolacija virusa in določitev s HAD se priporočata kot referenčni metodi za potrditev pozitivnih rezultatov predhodno opravljenih testov ELISA, metode PCR ali DIFT. Priporočata se tudi, kadar je bila APK že dokazana z drugimi metodami, še posebej v primeru primarnega izbruha ali primera APK.

Izolati virusov APK se lahko uporabijo za virusno karakterizacijo in molekularno epidemiologijo.

5. Vsi izolati virusa APK iz vseh primarnih izbruhov, primarnih primerov pri divjih prašičih ali primerov v klavninah ali med transportom, morajo biti, skladno z določili iz oddelka E, genotipizirani v nacionalnih referenčnih laboratorijih držav članic ali v katerem koli drugem laboratoriju, ki ga odobri zadevna država članica, ali v referenčnem laboratoriju Skupnosti.

V vsakem primeru je treba te izolate virusa brez odlašanja poslati v referenčni laboratorij Skupnosti za zbiranje vzorcev.

## C. DOKAZOVANJE VIRUSNEGA GENOMA

1. Za dokazovanje virusnega genoma v vzorcih krvi, seruma, tkiv ali organov se uporablja metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR). Majhni odseki virusne DNK se s PCR namnožijo do količin, ki jih je mogoče ugotoviti. Z uporabo začetnih oligonukleotidov z visoko ohranjenih regij genoma je mogoče določiti mnoge različne izolate, ki pripadajo vsem znanim genotipom virusa, vključno z ne-hemoadsorpcijskimi virusi in izolati z nizko virulenco. Ker ta test ugotavlja zgolj zaporedje nukleotidov virusa, je lahko rezultat PCR pozitiven kljub temu, da v vzorcu ni kužnega virusa (npr. pri vzorcih razpadajočih tkivih ali vzorcih, pridobljenih od prašičev, ki so APK preboleli).
2. PCR se lahko uporabi na omejenem številu pazljivo izbranih vzorcev, pridobljenih od sumljivih živali. Metoda se priporoča za preiskavo vzorcev organov, ki so citotoksični, kjer izolacija virusa torej ni mogoča (na primer vzorci, odvzeti od divjih prašičev).
3. Material, primeren za PCR so organi, opisani pri izolaciji virusa, ali nestrjena kri. Tudi homogenate klopotov je mogoče analizirati s PCR.
4. PCR se lahko izvede v enem delovnem dnevu. Metoda zahteva ustrezno laboratorijsko opremo, ločene prostore in usposobljeno osebje. Prednost metode je v tem, da pomnoževanje virusa v laboratoriju ni potrebno. Metoda je izredno občutljiva, vendar lahko zaradi velike možnosti kontaminacije zlahka pride do lažno pozitivnih rezultatov. Zato so bistvenega pomena strogi postopki preverjanja kakovosti izvajanja postopka.

#### D. PRIPOROČENE VIROLOŠKE PREISKAVE IN VREDNOTENJE REZULTATOV

Virološke preiskave so bistvene za potrditev APK.

Izolacija virusa in HAD veljata za referenčni virološki preiskavi in se po potrebi uporabljata kot potrditvena testa. Njuna uporaba se zlasti priporoča v primeru, ko pozitivni rezultati testov DIF ali PCR niso povezani z ugotovitvijo ustreznih kliničnih znakov ali sprememb, značilnih za bolezen, kakor tudi v vseh drugih dvomljivih primerih.

Vendar pa se primarni izbruh APK lahko potrdi, če se pri zadevnih prašičih ugotovijo klinični znaki ali spremembe, značilne za bolezen, in je bil izvid pri vsaj dveh testih za dokazovanje virusnega antigena, genoma ali protiteles pozitiven na vzorcih, odvzetih od istega sumljivega prašiča.

Sekundarni izbruh APK se lahko potrdi, če se, poleg epidemiološke povezave s potrjenim izbruhom ali primerom bolezni, pri zadevnih prašičih ugotovijo klinični znaki ali patoanatomske spremembe, značilne za bolezen, in je bil izvid testa za dokazovanje virusnega antigena, njegovega genoma ali specifičnih protiteles pozitiven.

Primarni izbruh APK pri divjih prašičih se lahko potrdi po izolaciji virusa ali če je bil rezultat pri vsaj dveh testih za dokazovanje virusnega antigena, njegovega genoma ali specifičnih protiteles pozitiven. Nadaljnji primeri APK pri divjih prašičih, za katere je bila ugotovljena epidemiološka povezava s predhodno potrjenimi primeri, se lahko potrdi s pozitivnim rezultatom testa za dokazovanje virusnega antigena, njegovega genoma ali specifičnih protiteles.

#### E. GENOTIPIZACIJA IZOLATOV VIRUSA APK

1. Genotipizacija izolatov virusa APK se izvaja z določanjem vzorcev restrikcijskih encimov in zaporedja nukleotidov posameznih delov virusnega genoma. Primerjava dobljenih vzorcev restrikcijskih encimov ali nukleotidnih zaporedij s tistimi, ki so bili pridobljeni iz prejšnjih virusnih izolatov, lahko pokaže, ali so izbruhe bolezni povzročili virusi, ki povzemajo evropski ali afriški molekularni model.

Genotipizacija izolatov virusa APK je bistvenega pomena za izboljšanje poznavanja molekularne epidemiologije APK in genetske variabilnosti virusov. Na podlagi novih podatkov lahko razvrstimo nove izolate in dobimo podatke o njihovem možnem izvoru.

2. Če tipizacije virusa ni mogoče v kratkem času opraviti v nacionalnem laboratoriju ali v katerem koli laboratoriju, pooblaščenem za postavljanje diagnoze APK, je treba prvotni vzorec ali izolat virusa čim prej poslati v tipizacijo v referenčni laboratorij Skupnosti.

Podatke o analizi restrikcijskih encimov in določenem nukleotidnem zaporedjem izolatov virusa APK, s katerimi razpolagajo pooblaščen laboratoriji za ugotavljanje APK, je treba posredovati referenčnemu laboratoriju Skupnosti zaradi vnosa teh podatkov v podatkovno bazo tega laboratorija.

Podatki iz te podatkovne baze morajo biti dostopni vsem nacionalnim referenčnim laboratorijem v državah članicah. Vendar pa, zaradi objav v znanstvenih revijah, referenčni laboratorij Skupnosti na zahtevo zadevnega laboratorija zagotovi zaupnost teh podatkov do njihove objave.

### *Poglavje VII*

#### ***Načela in uporaba seroloških preiskav in vrednotenje rezultatov***

#### A. OSNOVNA NAČELA IN DIAGNOSTIČNA VREDNOST

1. Določanje protiteles, specifičnih za virus APK, se priporoča za subakutne in kronične oblike, kot tudi za programe spremljanja in izkoreninjenja APK, iz več razlogov:
  - (i) protitelesa se v okuženih prašičih tvorijo hitro. Pri teh prašičih je mogoče določiti protitelesa v vzorcih seruma od sedem do deset dni po okužbi;
  - (ii) na razpolago ni nobenega cepiva proti APK. To pomeni, da lahko tvorbo protiteles, specifičnih za APK, povzroči le okužba z virusom APK;
  - (iii) dolgo časa trajajoči protitelesni imunski odziv. Pri prašičih, ki so bolezen preboleli, lahko še več mesecev, pri nekaterih prašičih pa tudi vse življenje, ugotovimo veliko število specifičnih protiteles.

V prvih tednih po rojstvu je mogoče pri pujskih ugotoviti specifična protitelesa proti virusu APK, ki so maternalnega izvora. Razpolovna doba maternalnih protiteles pri pujskih je približno tri tedne. Za protitelesa proti virusu APK, ugotovljena pri prašičih, starejših od treh mesecev, je zelo malo verjetno, da so maternalna.

2. Dokazovanje protiteles proti virusu APK v vzorcih seruma ali plazme iz organov se izvaja zaradi lažjega postavljanja diagnoze APK na sumljivih gospodarstvih, za določanje datuma vnosa okužbe v primeru potrjenega izbruha ter za namene spremljanja in nadzora bolezni.

Opredelitev nahajanja serološko pozitivnih prašičev na gospodarstvu lahko da pomembne podatke o tem, kako je bil virus APK vnesen na gospodarstvo.

Vendar pa je treba v okviru preiskave, ki se izvede v primeru suma ali potrditve APK, skladno s členom 8 Direktive 2002/60/ES natančno ovrednotiti rezultate seroloških preiskav, upoštevajoč vse klinične, virološke in epidemiološke ugotovitve.

## B. PRIPOROČENE SEROLOŠKE PREISKAVE

1. Najprimernejše metode za serološko potrditev APK so ELISA, indirektni imunofluorescenčni test (IIFT) in metoda prenosa proteinov po Westernu z imunokemijsko detekcijo (immunoblotting, test IB).

Kakovost in učinkovitost serološke diagnostike, ki jo izvajajo nacionalni laboratoriji, je treba redno preverjati v okviru medlaboratorijskega primerjalnega preizkušanja laboratorijev, ki ga organizira referenčni laboratorij Skupnosti.

2. Test ELISA je najbolj zanesljiv in uporaben test za raznovrstne serološke preiskave. Temelji na ugotavljanju protiteles proti virusu APK, ki se vežejo na virusne beljakovine, vezane na trdno podlago, po dodatku proteina A, konjugiranega z encimom, ki omogoča nastanek vidne barvne reakcije po delovanju na ustreznem substratu.
3. Nacionalni laboratoriji morajo redno kontrolirati občutljivost in specifičnost vsake serije reagentov testa ELISA za uporabo izbora referenčnih serumov, ki ga zagotovi referenčni laboratorij Skupnosti. Ta izbor vključuje:
  - serume prašičev v zgodnjem stadiju okužbe z virusom APK (manj kot 17 dni po okužbi),
  - serume prašičev, ki so preboleli APK (več kot 17 dni po okužbi).

Test ELISA za uporabo v serološki diagnostiki APK mora prepoznati vse referenčne serume, pridobljene od prebolelih prašičev. Vsi rezultati testa, ki se nanašajo na referenčne serume, morajo biti ponovljivi. Priporočljivo je, da ugotovi vse pozitivne referenčne serume iz zgodnjega stadija bolezni. Rezultati, ki se nanašajo na referenčne serume, pridobljene od prašičev v zgodnjem stadiju okužbe, so pokazatelj občutljivosti testa ELISA.

4. Test IIFT je hitra metoda z visoko občutljivostjo in specifičnostjo za določanje protiteles proti virusu APK v serumu ali tkivnem eksudatu. Temelji na določanju protiteles proti virusu APK, ki se vežejo na enojno plast celic MS, okuženih s prilagojenim virusom APK. Reakcija med protitelesi in antigenom se določa s proteinom A, označenim s fluoresceinom. Pozitivni vzorci kažejo specifično fluorescenco blizu jedra okuženih celic.

Z uporabo kombinacije testov DIFT in IIFT za preiskovanje organov, krvi in izločkov živali, ki kažejo klinične znake APK, se lahko hitro in zanesljivo potrdi APK.

5. Test IB je izredno specifična in občutljiva metoda, ki temelji na uporabi nitroceluloznih trakov, ki vsebujejo virusne beljakovine kot antigene. Specifična reakcija protitelo-antigen se dokaže z dodatkom proteina A, konjugiranega s peroksidazo, in ustreznega substrata. Test IB je zelo uporaben pri testiranju serumov, ki so pri testu ELISA reagirali sumljivo.

### Poglavje VIII

#### **Minimalne varnostne zahteve za laboratorije za APK**

1. Vsak laboratorij, v katerem poteka razmnoževanje virusa APK v celičnih kulturah, mora izpolnjevati zahteve iz tabele 1. Vendar pa se lahko patoanatomske preiskave, obdelava tkiv za DIFT ali PCR in serološke preiskave z uporabo inaktiviranega antigena, izvajajo na nižji ravni obvladovanja, če so izpolnjene minimalne zahteve iz tabele 1, da se uporabljajo osnovni higienski ukrepi in razkuževanje po delu ob varnem ravnanju in odstranjevanju živalskih trupov, tkiv in serumov.

2. Vsak laboratorij, v katerem se izvaja okuževanje živali z virusom APK, mora izpolnjevati zahteve iz tabele 2.
3. Vse zaloge virusa APK je treba hraniti na varnem, bodisi globoko zamrznjene bodisi posušene z zmrzovanjem. Vsaka posamična ampula mora biti jasno označena, voditi pa je treba tudi obsežne evidence o zalogah virusa skupaj z datumi in rezultati preverjanj kakovosti. Evidence je treba voditi tudi o virusih, dodanih k zalogi, s podatki o viru, ter o virusih, izdanih drugim laboratorijem.
4. Priporoča se, da delovanje biološko-varne enote za delo z virusom APK podpirajo druge enote s prostori, v katerih ne potekajo postopki z virusom APK. Ti prostori morajo biti na voljo za pripravo steklovine in gojišč, za vzdrževanje in pripravo neokuženih celičnih kultur, obdelavo serumov in serološke preiskave (razen za metode, pri katerih se uporablja živ virus APK), in za zagotavljanje upravne in pisarniške dejavnosti.

Tabela 1

## N a č e l a b i o l o š k e g a o b v l a d o v a n j a z a d i a g n o s t i č n e l a b o r a t o r i j e

Minimalne zahteve	Dodatne zahteve	
Okolje v splošnem	Okolje v splošnem Namenski prostori, katerih uporaba je omejena na opredeljene postopke.	Normalen zračni pritisk. Enojno HEPA filtriranje izhodnega zraka. Namenski prostori, ki se uporabljajo izključno za diagnostične postopke v zvezi s klasično prašičjo kugo ali APK. Obdelane potencialne okužene odplake za inaktivacijo virusa APK (toplota ali kemično).
Laboratorijska oblačila	Namenska zunanja oblačila, ki se uporabljajo samo v enoti za virus APK. Rokavice za enkratno uporabo za delo z okuženim materialom. Zunanja oblačila, ki se, preden zapustijo enoto, sterilizirajo ali operejo v enoti pri visoki temperaturi.	Popolna zamenjava oblačil ob vstopu. Laboratorijska oblačila, ki se uporabljajo samo v enoti za delo z virusom APK. Rokavice za enkratno uporabo za delo z okuženim materialom. Oblačila, ki se, preden zapustijo enoto, sterilizirajo ali operejo v enoti pri visoki temperaturi.
Nadzor osebja	Vstop v enoto je omejen na imenovano in usposobljeno osebje. Umivanje in razkuževanje rok ob izhodu iz enote. Osebje se 48 ur po tem, ko zapusti enoto, ne sme približati prašičem.	Vstop v enoto je omejen na imenovano in usposobljeno osebje. Umivanje in razkuževanje rok ob izhodu iz enote. Osebje se 48 ur po tem, ko zapusti enoto, ne sme približati prašičem.
Oprema	Varnostna biološka komora (razreda I ali II), ki se uporablja za vse postopke z živim virusom. Komora mora imeti dvojno HEPA filtriranje izhodnega zraka. Vsa potrebna oprema za laboratorijske postopke mora biti na voljo v namenskih laboratorijskih prostorih.	

Tabulka 2

## B i o l o š k o - v a r n o s t n e z a h t e v e z a p r o s t o r e z a p o s k u s n e ž i v a l i

Zahteve	
Okolje v splošnem	Nadzorovano prezračevanje s podtlakom. Enojno HEPA filtriranje izhodnega zraka. Oprema za celovito fumigacijo/dezinfekcijo ob koncu poskusa. Vse odplake se (toplотно ali kemično) obdelajo, da se inaktivira virus APK.

Zahteve	
Laboratorijska oblačila	Popolna zamenjava oblačil ob vstopu. Oblačila, ki se, preden zapustijo enoto, sterilizirajo ali operejo v enoti pri visoki temperaturi.
Nadzor osebja	Vstop v enoto je omejen na imenovano in usposobljeno osebje. Obleko pred prhanjem pustiti notri. Popolno prhanje ob izstopu iz enote. Osebje se 48 ur po tem, ko zapusti enoto, ne sme približati prašičem.
Oprema	Vsa potrebna oprema za laboratorijske postopke mora biti na voljo v namenskih laboratorijskih prostorih. Vsi materiali se ob odstranitvi iz enote sterilizirajo ali se, če gre za živalske vzorce, zavijejo v dvojno embalažo in shranijo v neprepustne posode z razkuženo površino za prenos v laboratorij za APK.
Živali	Vse živali se, preden zapustijo enoto, usmrtijo, patoanatomske preiskave živali se zaključijo na biološko varnem območju, trupla pa se po končani preiskavi sežgejo.