



Státní veterinární správa

Diagnostická příručka afrického moru prasat

Obsahem této příručky jsou požadavky rozhodnutí Komise 2003/422/ES ze dne z 26. května 2003, kterým se schvaluje příručka pro diagnostiku afrického moru prasat (sděleno pod číslem dokumentu C(2003) 1696), (Úřední věstník Evropské unie č. L 143, 11. 6. 2003, s. 35)

Čl. 1

1. Orgány Státní veterinární správy zajistí, aby potvrzení afrického moru prasat bylo prováděno v souladu s postupy, metodami odběru vzorků a kritérii pro hodnocení výsledků laboratorních vyšetření stanovenými v příručce a založenými na:
 - a) zjišťování klinických příznaků a nálezů postmortálních změn, z nichž lze usoudit na přítomnost nákazy,
 - b) zjišťování přítomnosti viru, antigenu nebo virového genomu ve vzorcích tkání, orgánů, krve nebo exkrementů prasat,
 - c) prokázání specifické protilátkové odpovědi ze vzorků krve.
2. Národní referenční laboratoř pro africký mor prasat v SVÚ Jihlava smí, odchýlně od odstavce 2, používat modifikace laboratorních vyšetřovacích metod uvedených v příručce nebo odlišné vyšetřovací metody za předpokladu, že je prokazatelná stejná citlivost a specifičnost těchto metod.

Pokud jsou používány modifikované nebo odlišné vyšetřovací metody, musí být jejich citlivost a specifičnost posuzována v rámci periodických srovnávacích zkoušek, které pořádá Referenční laboratoř Společenství pro africký mor prasat - Centro de Investigación en Sanidad Animal, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain.

Čl. 2

PŘÍRUČKA PRO DIAGNOSTIKU AFRICKÉHO MORU PRASAT

KAPITOLA I

Úvod, cíle a definice

1. Aby se zajistily jednotné postupy při diagnostice afrického moru prasat (dále „AMP“), tato příručka:
 - a) uvádí pokyny a základní požadavky na laboratorní metody, metody odběru vzorků a kritéria pro posuzování výsledků klinických a postmortálních vyšetření a laboratorních vyšetření pro účinnou diagnostiku AMP⁽²⁾,
 - b) stanoví minimální požadavky na bezpečnost práce s biologickým materiálem a standardy jakosti, které mají být zachovávány v laboratořích zabývajících se diagnostikou AMP a při přepravě vzorků,
 - c) zavádí laboratorní vyšetření, jichž má být použito k diagnostice AMP a laboratorní metody genetické typizace izolátů viru AMP.
2. Tato příručka je určena hlavně krajským veterinárním správám zodpovědným za tlumení AMP. Proto je kladen důraz na principy a používání laboratorních vyšetřovacích metod a posuzování jejich výsledků, nikoliv na technické podrobnosti laboratorních metod.
3. Kromě definic uvedených v § 2 vyhlášky č. 202/2004 Sb., o opatřeních pro předcházení a zdolávání afrického moru prasat (dále jen „vyhlášky č. 202/2004 Sb.“) platí pro účely této příručky následující definice:
 - a) „podezřelé hospodářství“ znamená hospodářství s chovem prasat, v němž je jedno nebo více prasat podezřelých z nákazy virem AMP, nebo kontaktní hospodářství ve smyslu pojmu uvedeného v § 2 písm. k) vyhlášky č. 202/2004 Sb.,
 - b) „epizootologická jednotka“ nebo jen „jednotka“ znamená budovu, místo nebo pozemek, kde je v rámci hospodářství chována skupina prasat takovým způsobem, že prasata jsou v častém vzájemném přímém nebo nepřímém kontaktu, ale zároveň jsou od ostatních prasat téhož hospodářství oddělena,
 - c) „prasata v kontaktu“ znamená prasata chovaná v jednom hospodářství, která byla v přímém kontaktu s jedním nebo více prasaty podezřelými z nákazy virem AMP nejméně po dobu předchozích 21 dní.

KAPITOLA II

Popis AMP se zřetelem k diferenciální diagnostice

A. ÚVOD

1. AMP je vyvoláván obaleným DNA-virem, jenž náleží do rodu Asfvirus čeledi Asfarviridae. Kmeny viru AMP se liší virulencí, ačkoliv nemohou být rozlišeny různé sérotypy.

⁽²⁾ Při rozhodování o počtu vzorků, které mají být odebrány k laboratornímu vyšetření, má být brána do úvahy také citlivost vyšetřovacích metod, které jsou používány. Pokud není citlivost vyšetřovací metody příliš vysoká, vzorky se odeberou od většího počtu zvířat.

2. Virus AMP je ve vlhkých výmětech infikovaných prasat, kadáverech prasat, čerstvém vepřovém mase a některých výrobcích z vepřového masa velmi stabilní. K zajištění jeho inaktivace v prostředí musí být použito účinných dezinfekčních prostředků.
3. Hlavní přirozená cesta infekce prasat v Evropě je oronasální; k nakažení dochází přímým nebo nepřímým stykem s infikovanými prasaty nebo pozřením krmiva, které je kontaminováno virem. Avšak v lokalitách, v nichž se vyskytují vektorů⁽³⁾, hraje velmi významnou úlohu v přežívání a šíření viru cesta přenosu těmito vektory. AMP se může šířit také nepřímým kontaktem s kontaminovaným materiálem a bodnutím hmyzem, který mechanicky přenáší virus AMP. K přenosu nákazy dochází rovněž semenem infikovaných kanců.
4. Inkubační doba bývá u jednotlivých zvířat mezi pěti až 15 dny, avšak v terénních podmínkách mohou být klinické příznaky v chovu zjevné až za několik týdnů po vniknutí viru nebo, pokud jde o málo virulentní kmeny viru, dokonce ještě po delší době.
5. Vyskytuje se akutní, subakutní a chronická forma AMP; rozdíl závisí hlavně na virulenci viru.
6. U prasat, která se po infikování klinicky uzdravila, přetrvává 40 až 60 dní virémie a tato prasata se stávají nosiči viru. Virus AMP byl izolován z prasat-nosičů viru dokonce i za šest měsíců po překonané nákaze.

B. AKUTNÍ FORMA

1. Prvním klinickým příznakem onemocnění bývá obvykle nástup vysoké horečky (nad 40 °C), který je doprovázen depresí, nechutenstvím, zrychleným a obtížným dýcháním a výtokem z nosu a očí. Prasata provádějí nekoordinované pohyby a shlukují se. Prasnice mohou zmetat ve všech stadiích březosti. Některá prasata mohou zvracet a mít zácpu, kdežto u jiných se může vyskytnout krvavý průjem. Zvláště na končetinách a uších se mohou vyskytovat překrvené nebo krvácivé okrsky podkoží. Před úhynem, k němuž dochází za jeden až sedm dní po objevení se klinických příznaků, může nastat kóma. Morbidita a mortalita v chovu může dosáhnout 100 %.

Postmortální změny jsou tvořeny typickým hemoragickým syndromem s celkovým překrvením kadáveru, krvavě zbarvenou tekutinou v hrudní a břišní dutině, zvětšenou tmavou slezinou, překrvenými mízními uzlinami, které připomínají krevní sraženiny (zvláště mízní uzliny renální a gastrohepatické), petechiálními krváceninami v ledvinách (v korových a dřeňových pyramidách a pánvičce ledvinné), na abdominálních serózách, na sliznici žaludeční a střevní a v srdci (na epikardu a endokardu), a také hydrothoraxem a petechiálními krváceninami na pleuře.

2. Celkově vede ke klinickému a patologickému obrazu velmi podobnému obrazu afrického moru prasat i akutní forma klasického moru prasat. Pokud jsou krváceniny na kůži a uších přítomny, dají se snadno zjistit a vedou k podezření na akutní klasický nebo africký mor prasat. Podobné změny způsobuje i několik dalších nemocí.

Akutní africký mor prasat musí být brán do úvahy v případech podezření na červenku, na reprodukční a respirační syndrom prasat, na otravu kumarinem, na nemoc purpura haemorrhagica, na podstavový syndrom všeobecného chřadnutí, na dermatitidní a nefropatický syndrom prasat, a na infekci bakteriemi rodů *Salmonella* a *Pasteurella*, nebo při střevních a respiračních syndromech, které jsou provázeny horečkou a na něž nezabírá léčba antibiotiky.

⁽³⁾ Jak jsou definováni v § 2 písm. q) vyhlášky č. 202/2004 Sb., (dosud nebyla publikována ve sbírce zákonů)

C. SUBAKUTNÍ FORMY

V endemických oblastech jsou obvyklejší subakutní formy výskytu nákazy. Subakutní infekce je charakterizována intermitující horečkou, depresí a pneumonií. Smrt může nastat v důsledku selhání srdce. Změny při subakutní formě se podobají změnám v akutní formě, ale jsou slabší. Charakteristickými změnami jsou krváceniny v mizních uzlinách, ledvinách a slezině, překrvení plic a edém a v některých případech intersticiální pneumonie.

D. CHRONICKÉ FORMY

Chronické formy onemocnění jsou vzácné. U chronických forem může být pozorována sekundární bakteriální infekce. Poněvadž jsou klinické příznaky chronického AMP poněkud nespecifické, musí být při diferenciální diagnostice bráno do úvahy mnoho jiných nemocí. Zvýšená tělesná teplota není nezbytně přítomna u každého zvířete, ale v postiženém chovu může být horečka zjištěna alespoň u některých zvířat.

Klinické příznaky chronického AMP mohou představovat respirační problémy, zmetání, chronické vředy kůže nebo nekrózy, které nepřipomínají typický klinický obraz infekce virem AMP. Změny mohou být minimální nebo k nim nemusí dojít vůbec. Histopatologické nálezy jsou charakterizovány zvětšenými mizními uzlinami a slezinou, pleuritidou a fibrinózní perikarditidou a pneumonií s infiltrátem. Byla popsána také kaseózní nekróza a mineralizace plic.

KAPITOLA III

Hlavní kritéria pro považování hospodářství za podezřelé z výskytu afrického moru prasat

1. Rozhodnutí k tomu, aby bylo hospodářství považováno za podezřelé, bude přijato na základě těchto nálezů, kritérií a důvodů:
 - a) klinické a pitevní nálezy u prasat. Hlavní klinické a pitevní nálezy, jež je nutno brát do úvahy, jsou tyto:
 - horečka s morbiditou a mortalitou u prasat všech věkových skupin,
 - horečka s hemoragickým syndromem, petechiální a ekchymózní krváceniny, zvláště v mizních uzlinách, ledvinách, ve slezině (která je zejména při akutních formách zvětšená a tmavá) a močovém měchýři a ulcerace žlučového měchýře,
 - b) nálezové důvody. Závažné nálezové důvody jsou tyto:
 - prasata přišla do přímého nebo nepřímého kontaktu s chovem prasat, v němž byla prokázána infekce virem AMP,
 - hospodářství dodalo prasata, u nichž byla dodatečně prokázána infekce virem AMP,
 - prasnice byly uměle inseminovány spermatem pocházejícím z podezřelého zdroje,
 - došlo k přímému nebo nepřímému kontaktu chovaných prasat s populací divokých prasat, v níž se vyskytl AMP,
 - byla prasata krmena kuchyňskými odpady a je podezření, že tyto odpady nebyly upraveny tak, aby byl inaktivován virus AMP,
 - mohlo dojít k vystavení prasat riziku infekce, např. prostřednictvím osob, jež vnikly do hospodářství, prostřednictvím dopravních prostředků atd., které pocházely z hospodářství podezřelých z nákazy nebo infikovaných virem AMP,
 - v oblasti, v níž se nachází hospodářství, se vyskytují vektorů.

2. V každém případě musí být hospodářství považováno za podezřelé, jestliže na základě klinických a patoanatomických nálezů vzniklo podezření na klasický mor prasat, ale klinická, epizootologická a laboratorní vyšetření v prověřovaném hospodářství nevedla k potvrzení této nákazy nebo ke zjištění jiných zdrojů nákazy nebo původců.

KAPITOLA IV

Postupy kontroly a odběru vzorků

A. NÁVODY A POSTUPY PRO KLINICKÉ VYŠETŘOVÁNÍ A ODBĚR VZORKŮ U PRASAT V PODEZŘELÝCH CHOVECH

1. Orgány veterinární správy zajistí, aby potřebná klinická vyšetření, odběry vzorků a laboratorní vyšetření, jež jsou prováděna v podezřelých hospodářstvích pro potvrzení nebo vyloučení AMP, byla v souladu s pokyny a postupy uvedenými v odst. 2 až 6.

Bez ohledu na přijetí opatření uvedených v § 4 odst. 2 vyhlášky č. 202/2004 Sb., v prověřovaném hospodářství, mohou být tyto návody a metodiky použity také v těch případech onemocnění, kdy bude AMP brán do úvahy při diferenciální diagnostice. To bude v případech, kdy klinické příznaky a epizootologický vzorec nákazy zjištěný u prasat budou svědčit pro velmi malou pravděpodobnost výskytu AMP.

Ve všech ostatních případech, kdy je jedno či více prasat podezřelých z infikování virem AMP, jsou v podezřelých hospodářstvích ve stadiu prověřování přijímána opatření uvedená v § 4 odst. 2 vyhlášky č. 202/2004 Sb.

V případě podezření na AMP u prasat na porážce nebo v dopravních prostředcích bude s nutnými změnami v podrobnostech rovněž použito návodů a metodik uvedených v odst. 2 až 6.

2. Jestliže podezřelé hospodářství navštíví úřední veterinární lékař, aby potvrdil nebo vyloučil AMP:
 - musí být provedena kontrola údajů o produkci a zdravotní dokumentaci hospodářství, jsou-li tyto záznamy k dispozici; musí být provedena prohlídka každé jednotky (stáje, stáda) hospodářství, aby byla vybrána prasata, jež mají být klinicky vyšetřena.

Klinické vyšetření musí zahrnovat změření tělesné teploty a musí být provedeno hlavně u těchto prasat nebo v těchto skupinách prasat:

- nemocná nebo nechutenstvím trpící prasata,
- prasata právě zařazená do hospodářství, pocházející z potvrzených ohnisek nebo z jiných podezřelých zdrojů,
- prasata chovaná v jednotkách, které nedávno navštívily cizí osoby, které byly v těsném styku s prasaty podezřelými nebo infikovanými AMP nebo u nichž byl zjištěn jiný zvláště rizikový kontakt s potenciálním zdrojem viru AMP,
- prasata, od nichž již byly odebrány a na AMP sérologicky vyšetřeny vzorky, a to v případě, že výsledky těchto vyšetření neumožní vyloučit AMP, a prasata v kontaktu,
- prasata právě z nemoci uzdravená.

Jestliže se při prohlídce podezřelého hospodářství nezjistí přítomnost prasat nebo skupin prasat, o nichž se pojednává ve výše uvedených pododstavcích, krajská veterinární správa, bez ohledu na jiná opatření, jež byla zavedena v prověřovaném hospodářství v souladu vyhláškou č. 202/2004 Sb., a se zřetelem k nálezové situaci:

- provede v prověřovaném hospodářství další vyšetření podle odst. 3, nebo
- zajistí v prověřovaném hospodářství odběr vzorků krve od prasat k laboratornímu vyšetření. (V tom případě bude odběr vzorků prováděn podle návodů pro odběry vzorků, jež jsou uvedeny v odst. 5 a v části F odst. 2), nebo

- přijme opatření uvedená v § 4 odst. 2 vyhlášky č.202/2004 Sb., nebo jejich uplatnění prodlouží, a to v obou případech až do dalších vyšetření v prověřovaném podezřelém hospodářství, nebo
 - vyloučí podezření z AMP.
3. Jestliže se odkazuje na tento odstavec, musí být v prověřovaném hospodářství provedena klinická vyšetření náhodně vybraných prasat v jednotkách, v nichž bylo prokázáno riziko zavlečení viru AMP nebo v nichž je na toto riziko podezření.
- Minimální počet prasat, jež mají být vyšetřena, musí stačit pro zjištění horečky, pokud se vyskytuje, a to v 10% prevalenci, s 95% spolehlivostí.
4. Jestliže jsou v podezřelém hospodářství nalezena uhynulá nebo hynoucí prasata, musí být pitvána, a to nejméně 5 těchto prasat, a zejména prasata:
- která před úhynem jevila nebo jeví velmi výrazné příznaky nákazy,
 - s vysokou horečkou,
 - právě uhynulá.
- Jestliže při těchto pitvách nebyly nalezeny patomorfologické změny svědčící pro AMP, ale nakažová situace to vyžaduje, jsou považována za nezbytná další vyšetření:
- v jednotce, v níž byla mrtvá nebo hynoucí prasata, musí být provedeno klinické vyšetření uvedené v odst. 3 a odběr vzorků krve uvedený v odst. 5, a
 - mohou být pitvána tři až čtyři prasata v kontaktu, zejména když tato prasata jeví klinické příznaky.
- Bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost postmortálních změn svědčících pro AMP musí být pro virologické vyšetření získány vzorky orgánů nebo tkání pitvaných prasat v souladu s kapitolou V část B odst. 1. Tyto vzorky musí být získány především od právě uhynulých zvířat.
- Pokud je prováděno postmortální vyšetření, krajská veterinární správa musí zajistit, aby:
- byla zachována nezbytná bdělost a zavedena hygienická opatření pro zabránění šíření nákazy, a
 - jde-li o hynoucí prasata, aby byla utracena humánním způsobem v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších změn a doplňků.
5. Pokud jsou v prověřovaném hospodářství zjištěny další klinické příznaky nebo pitevní nálezy svědčící pro AMP, ale krajská veterinární správa se domnívá, že tyto nálezy nestačí k potvrzení ohniska AMP, a proto jsou nutná laboratorní vyšetření, musí být odebrány vzorky krve od podezřelých prasat a od ostatních prasat z každé jednotky, v níž byla chována podezřelá prasata, v souladu s níže uvedenými postupy:
- a) v prověřovaných jednotkách musí minimální počet vzorků, jež mají být odebrány k sérologickému vyšetření, stačit ke zjištění 10% séroprevalence, s 95% spolehlivostí;
 - b) počet vzorků, jež mají být odebrány k virologickému vyšetření, má být v souladu s pokyny krajské veterinární správy, která zvaží rozsah vyšetření, jež mohou být provedena, citlivost laboratorních vyšetřovacích metod, jichž má být použito, a nakažovou situaci.
6. Pokud vyšetřením provedeným v prověřovaném hospodářství nebyly zjištěny klinické příznaky nebo nalezeny patomorfologické změny svědčící pro AMP, avšak krajská veterinární správa považuje další laboratorní vyšetření za nezbytná pro vyloučení AMP, bude pro kontrolu proveden odběr vzorků podle návodu uvedeného v odst. 5.

B. ODBĚRY VZORKŮ V HOSPODÁŘSTVÍCH, POKUD JSOU UTRÁCENA PRASATA PO POTVRZENÍ VÝSKYTU NÁKAZY

1. Pokud jsou v hospodářství poté, co byl potvrzen výskyt nákazy podle § 5 odst. 1 písm. a) vyhlášky č. 202/2004 Sb., utrácena prasata proto, aby se zjistilo, jakým způsobem pronikl virus AMP do infikovaného hospodářství a jak dlouhá doba od proniknutí viru uplynula, musí být od těchto prasat v té době, kdy jsou utrácena, namátkově odebírány vzorky krve na sérologické vyšetření.
2. Minimální množství prasat, od nichž mají být odebrány vzorky, musí stačit ke zjištění 10% séroprevalence, s 95% spolehlivostí u prasat z každé jednotky hospodářství⁽⁶⁾.
Vzorky k virologickému vyšetření mohou být odebrány také v souladu s pokyny krajské veterinární správy, která zváží rozsah vyšetření, která lze provést, citlivost laboratorních metod, jež budou použity a nálezovou situací.
V oblastech, v nichž byla předtím zjištěna přítomnost vektorů infikovaných virem AMP, musí být odebrán reprezentativní vzorek měkkých klišťat k virologickému vyšetření v souladu s pokyny krajské veterinární správy a přílohy č. 3 vyhlášky č. 202 /2004 Sb.
3. Avšak v případě sekundárních ohnisek může krajská veterinární správa rozhodnout o odchylce od odst. 1 a 2 a požadovat odebírání vzorků jen pro tento případ. Přitom bere do úvahy již známou epizootologickou informaci o zdroji viru, způsobu jeho vniknutí do hospodářství a možnostech šíření nákazy z hospodářství.

C. ODBĚRY VZORKŮ PO UTRACENÍ PRASAT V RÁMCI PREVENTIVNÍHO OPATŘENÍ V PODEZŘELÉM HOSPODÁŘSTVÍ

1. Pokud jsou v podezřelém hospodářství v rámci preventivního opatření podle ustanovení § 4 odst. 3 písm. a) nebo § 7 odst. 2 vyhlášky č. 202/2004 Sb., utrácena prasata proto, aby se potvrdila nebo vyloučila přítomnost AMP a aby se získala další epizootologická informace, musí být vzorky krve pro sérologické vyšetření a rovněž tak i jako vzorky krve pro virologické vyšetření odebírány podle postupů stanovených v odst. 2.
2. Vzorky musí být odebírány především:
 - od prasat s klinickými příznaky nebo postmortálními změnami svědčícími pro AMP a od prasat, která byla s těmito prasaty v kontaktu;
 - od jiných prasat, jež mohla být v rizikovém kontaktu s infikovanými nebo podezřelými prasaty nebo která jsou podezřelá z nakažení virem AMP. Od těchto prasat musí být odebrány vzorky v souladu s pokyny krajské veterinární správy, která zváží nálezovou situaci.

Dále musí být namátkově odebrány vzorky od prasat pocházejících z každé jednotky hospodářství⁽⁷⁾. V tom případě musí minimální množství vzorků, jež mají být odebrány k sérologickému vyšetření v prověřované jednotce, stačit ke zjištění 10% séroprevalence, s 95% spolehlivostí.

Druh vzorků, jež mají být odebrány na virologické vyšetření, a vyšetřovací metoda, jíž má být použito, musí být v souladu s pokyny krajské veterinární správy, jenž zváží rozsah vyšetření, jež mohou být provedena, citlivost těchto vyšetření a nálezovou situaci.

⁽⁶⁾ Avšak jestliže byla uplatněna odchylka stanovená v § 6 odst. 1 vyhlášky č. 202/2004 Sb., musí být odběr vzorků prováděn v jednotkách hospodářství, kde byla zvířata utrácena (bez ohledu na další vyšetřování a odběry vzorků, ty jsou prováděny, v souladu s pokyny příslušných úřadů, u ostatních zvířat v chovu).

⁽⁷⁾ Pokud však krajská veterinární správa omezila preventivní utrácení pouze na část hospodářství, kde byla chována prasata podezřelá z nakažení nebo nakažená virem afrického moru prasat, v souladu s § 4 odst. 3 vyhlášky č. 202/2004 Sb., vzorky musí být odebrány v jednotce hospodářství, kde byla uplatněna tato opatření, bez ohledu na jiná vyšetření a odběr vzorků, které probíhají u ostatních prasat v hospodářství; ty jsou prováděny v souladu s pokyny krajské veterinární správy.

D. METODY KONTROLY A ODBĚRU VZORKŮ PŘED UDĚLENÍM POVOLENÍ K PŘEMÍSTĚNÍM PRASAT Z HOSPODÁŘSTVÍ NACHÁZEJÍCÍCH SE V OCHRANNÉM PÁSMU NEBO V PÁSMU DOZORU A V PŘÍPÁDECH PORÁŽENÍ NEBO UTRACENÍ PRASAT (§ 10 a 11 vyhlášky č. 202 /2004 Sb.)

1. Pokud je udělováno povolení k přemístění prasat z hospodářství, která se nacházejí v ochranném pásmu nebo v pásmu dozoru (podle § 10 odst. 3 vyhlášky č. 202/2004 Sb.) musí, bez ohledu na ustanovení § 11 odst. 1 písm. f) bodu 1 písm. bb) zmíněné vyhlášky, být klinické vyšetření, které provádí úřední veterinární lékař:
 - provedeno během 24 hodin před přesunem prasat,
 - v souladu s ustanoveními uvedenými v části A odst. 2
2. V případě, že mají být prasata přemístěna do jiného hospodářství (stáda), musí se, kromě vyšetření, jež mají být provedena v souladu s odst. 1, provést klinické vyšetření včetně změření teploty u reprezentativního počtu prasat z každé jednotky hospodářství, v němž jsou chována prasata, jež mají být přemístěna.

Minimální počet prasat, jež mají být vyšetřena, musí stačit ke zjištění horečky, pokud se vyskytuje v těchto jednotkách v 10% prevalenci, s 95% spolehlivostí.
3. V případě, že mají být prasata přemístěna na porážku, do asanačního podniku nebo jinam, aby byla utracena nebo porážena, musí být kromě vyšetření, jež mají být provedena v souladu s odst. 1, provedeno klinické vyšetření prasat v každé jednotce, v níž jsou chována prasata, jež mají být přemístěna. V případě prasat starších tří až čtyř měsíců, musí být při vyšetření změřena také teplota u reprezentativního počtu prasat.

Minimální počet prasat, jež mají být vybrána, musí stačit ke zjištění horečky, pokud se vyskytuje v těchto prověřovaných jednotkách v 20% prevalenci, s 95% spolehlivostí.
4. Pokud jsou prasata uvedená v odst. 3 porážena nebo utracena, musí být od prasat z každé jednotky, které se týká přesun, odebrány vzorky krve na sérologické vyšetření nebo vzorky krve nebo orgánů, jako jsou mandle, slezina nebo mízní uzliny, na virologické vyšetření.

Minimální počet vzorků, jež mají být odebrány, musí stačit k detekci 10% séroprevalence nebo prevalence viru s 95% spolehlivostí v každé podjednotce.

Druh vzorků, jež mají být odebrány a vyšetřovací metoda, již má být použito, bude v souladu s pokyny krajské veterinární správy, která zvažuje rozsah vyšetření, jež mohou být provedena, citlivost těchto vyšetření a epizootologickou situaci.
5. Avšak pokud byly zjištěny klinické příznaky nebo byly u poražených nebo utracených prasat nalezeny patomorfologické léze svědčící pro AMP, měla by být odchýleně od odst. 4 uplatněna ustanovení o odběru vzorků uvedená v oddílu C.
6. Výjimka uvedená v § 10 odst. 5 a § 11 odst. 4 vyhlášky č. 202/2004 Sb., může být udělena, pokud krajská veterinární správa zajistí, aby byly intenzivní odběr vzorků a vyšetřovací schéma použity také u skupin prasat, která mají být zkontrolována nebo od nichž mají být odebrány vzorky uvedené v odst. 2, 3 a 4. V kontextu tohoto schématu musí minimální počet vzorků krve, jež mají být odebrány, umožnit zjištění 5% séroprevalence, s 95% spolehlivostí ve skupině podezřelých prasat.

E. METODY KONTROLY A ODBĚRU VZORKŮ V HOSPODÁŘSTVÍ VE VZTAHU K REPOPULACI

1. Po novém zástavu prasat do hospodářství v souladu s § 13 odst. 3 vyhlášky č. 202/2004 Sb., musí být uplatňovány tyto metody odběru vzorků:
 - po novém zástavu prasat musí být odebrány vzorky krve do 45 dní,
 - v případě, že jsou znovu zastavena vnímavá indikátorová prasata (sentinel pigs), musí být namátkově odebrány vzorky krve na sérologická vyšetření v rozsahu počtu

- prasat, který stačí ke zjištění 10% séroprevalence, s 95% spolehlivostí v každé jednotce hospodářství,
- v případě úplné repopulace musí být odebrány vzorky krve na sérologické vyšetření namátkově od počtu prasat, který stačí ke zjištění 20% séroprevalence, s 95% spolehlivostí v každé jednotce hospodářství.
2. Po novém zástavu prasat do hospodářství v souladu s § 13 odst. 4 vyhlášky č. 202/2004 Sb., musí být použity tyto postupy odběru vzorků:
- vzorky krve musí být odebírány v prvních 45 dnech po novém zástavu prasat,
 - v případě, že jsou znovu dodávána vnímavá indikátorová prasata (sentinel pigs), musí být namátkově odebrány vzorky krve na sérologická vyšetření v rozsahu počtu prasat, který stačí ke zjištění 5% séroprevalence, s 95% spolehlivostí v každé jednotce hospodářství,
 - v případě úplné repopulace musí být odebrány vzorky krve na sérologické vyšetření namátkově od počtu prasat, který stačí ke zjištění 10% séroprevalence, s 95% spolehlivostí v každé jednotce hospodářství.

Potom musí být opakován postup stanovený výše ve třetí odrážce, a to v prvních 60 dnech po úplné repopulaci.

3. Po jakékoliv repopulaci prasat zajistí krajská veterinární správa, aby v případě jakéhokoliv onemocnění nebo úhynu v hospodářství z neznámých příčin byla tato prověřovaná prasata ihned vyšetřena na AMP.

Tato opatření zůstávají platná, dokud nejsou v prověřovaném hospodářství zrušeny zákazy přemísťování, o nichž pojednává § 13 odst. 3 písm. a), b) a odst. 4 vyhlášky MZe č. 202 /2004 Sb.

F. METODY ODBĚRU VZORKŮ V HOSPODÁŘSTVÍCH NACHÁZEJÍCÍCH SE V OCHRANNÉM PÁSMU PŘED ZRUŠENÍM OMEZENÍ

1. V případě, že mají být v ochranném pásmu zrušena opatření, o nichž pojednává § 10 vyhlášky č. 202/2004 Sb., musí být ve všech hospodářstvích v tomto pásmu:
- provedeno klinické vyšetření v souladu s postupy uvedenými v části A odst. 2 a 3,
 - odebrány vzorky krve k sérologickému vyšetření podle pokynů uvedených v odst. 2.
2. Minimální počet vzorků, jež mají být odebrány, musí stačit k detekci 10% séroprevalence nebo prevalence viru, s 95% spolehlivostí u prasat v každé jednotce hospodářství. Avšak výjimka uvedená v § 10 odst. 5 a § 11 odst. 4 vyhlášky č. 202/2004 Sb., může být poskytnuta pouze v tom případě, že krajská veterinární správa zajistí, aby počet odebraných vzorků krve stačil ke zjištění 5% séroprevalence, s 95% spolehlivostí v každé jednotce hospodářství.

G. METODY ODBĚRU VZORKŮ V HOSPODÁŘSTVÍCH NACHÁZEJÍCÍCH SE V PÁSMU DOZORU PŘED ZRUŠENÍM OMEZENÍ

1. V případě, že mají být v pásmu dozoru zrušena opatření, o nichž pojednává § 11 vyhlášky č. 202/2004 Sb., musí být ve všech hospodářstvích v tomto pásmu provedena klinická vyšetření v souladu s postupy uvedenými v části A odst. 2.
- Kromě toho musí být od prasat odebrány vzorky krve k sérologickému vyšetření:
- ve všech ostatních hospodářstvích, v nichž krajská veterinární správa pokládá odběr vzorků za nezbytný,
 - ve všech střediscích pro odběr spermatu.

2. Kdykoliv se provádí odběr vzorků k sérologickému vyšetření v hospodářstvích nacházejících se v pásmu dozoru, počet vzorků krve, jež mají být v těchto hospodářstvích odebrány, musí být v souladu s částí F odst. 2.

Avšak výjimka uvedená v § 10 odst. 5 a § 11 odst. 4 vyhlášky č. 202/2004 Sb., může být poskytnuta pouze v tom případě, že krajská veterinární správa zajistí, aby byly v každém hospodářství nacházejícím se v pásmu odebrány vzorky krve k sérologickému vyšetření. Nejnižší počet vzorků krve, které mají být odebrány, musí stačit ke zjištění 5% séroprevalence, s 95% spolehlivostí v každé jednotce hospodářství.

H. SÉROLOGICKÉ SLEDOVÁNÍ A METODY ODBĚRU VZORKŮ V LOKALITÁCH S PODEZŘENÍM NA VÝSKYT AMP NEBO POTVRZENÍM AMP U PRASAT DIVOKÝCH

1. V případě sérologického sledování prasat divokých v oblastech, v nichž byl potvrzen AMP nebo je na AMP podezření, by měla být nejdříve definována velikost a lokalita výskytu cílové populace, od níž mají být odebrány vzorky, aby byl stanoven počet vzorků, jež budou odebrány. Velikost vzorků musí být stanovena podle odhadnutého počtu živých zvířat, a nikoliv podle počtu ulovených zvířat.
2. Nejsou-li údaje o hustotě a velikosti populace dostupné, musí být vymezena lokalita výskytu, v níž mají být vzorky odebírány, přičemž se bere do úvahy stálá přítomnost prasat divokých a přítomnost přirozených nebo umělých bariér schopných zabránit velkým a nepřetržitým pohybům zvířat. Jestliže se tyto okolnosti nevyskytují nebo jsou lokality rozlehlé, doporučuje se vymezovat lokality pro odběr vzorků ne větší než 200 km², v nichž může obvykle žít populace 400 až 1000 prasat divokých.
3. Bez ohledu na ustanovení § 15 odst. 2 písm. c) vyhlášky č. 202/2004 Sb., musí minimální počet prasat, od nichž mají být ve vymezené lokalitě odebrány vzorky, stačit ke zjištění 5% séroprevalence, s 95% spolehlivostí. K tomuto účelu musí být odebrány vzorky nejméně od 56 zvířat z každé vymezené lokality.
4. Odběr vzorků k virologickému vyšetření od prasat divokých ulovených nebo uhynulých se musí provádět tak, jak je uvedeno v kapitole V část B odst. 1.
Pokud se pokládá za nezbytné virologické vyšetřování ulovených prasat divokých, musí být prováděno hlavně u zvířat mladších než jeden rok.
5. Všechny vzorky, jež mají být poslány do laboratoře, musí být doprovázeny dotazníkem, o němž pojednává § 16 odst. 3 písm. h) vyhlášky č. 202/2004 Sb.

KAPITOLA V

Obecné postupy a kritéria shromažďování a přepravy vzorků

A. OBECNÉ POSTUPY A KRITÉRIA

1. Před odběrem vzorků v podezřelém hospodářství musí být připraven plán chovu a musí být vymezeny epizootologické jednotky hospodářství.
2. V každé době, v níž by mohl být považován za nezbytný opětovný odběr vzorků, musí být všechna prasata, od nichž byly odebrány vzorky, nezměnitelně označena tak, aby od nich bylo možno snadno opětovně odebrat vzorky.
3. Všechny vzorky musí být poslány do laboratoře s vhodným formulářem (objednávkou), v souladu s požadavky stanovenými Státní veterinární správou. V těchto formulářích budou zaznamenány podrobnosti anamnézy prasat, od nichž byly odebrány vzorky, a údaje o pozorovaných klinických příznacích nebo postmortálních změnách.

Půjde-li o prasata z hospodářství, musí být uvedeny přesné údaje o věku, kategorii a hospodářství, ze kterého prasata, od nichž byly odebrány vzorky, pocházejí. Doporučuje se, aby u každého prasete, od kterého byly odebrány vzorky, bylo spolu s jeho nezaměnitelným označením zaznamenáno i jeho umístění v hospodářství.

B. ODBĚR VZORKŮ K VIROLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

1. K prokázání viru AMP, virového antigenu nebo virového genomu z uhynulých nebo humánně utracených prasat jsou nejvhodnější vzorky tkání mandlí, mízních uzlin (gastrohepatální, renální, submandibulární a retrofaryngeální), sleziny, ledvin a plic⁽⁹⁾. Pokud jsou kadávery v rozkladu, lze zvolit za vzorek neporušenou dlouhou kost nebo sternum (hrudní kost).
2. Nesražená krev nebo vzorky sražené krve musí být, v souladu s pokyny krajské veterinární správy, odebrány od prasat jevících příznaky horečky nebo jiné příznaky onemocnění.

C. PŘEPRAVA VZORKŮ

1. Doporučuje se, aby všechny vzorky:
 - byly pečlivě označeny,
 - byly přepravovány a uchovávány v přepravkách nepropouštějících tekutiny,
 - byly uchovávány v chladu při teplotě chladničky; avšak pokud se očekává, že bude vzorek dodán do laboratoře za více než 48 hodin, má být navázán kontakt s laboratoří, aby byly získány pokyny o nejvhodnějších tepelných podmínkách během přepravy,
 - byly doručeny do laboratoře co nejrychleji,
 - byly uchovávány v chlazeném kontejneru, buď proložené ledem nebo v kontejneru se suchým ledem,
 - vzorky tkání nebo orgánů byly uloženy každý zvlášť v uzavřených sáčkích z plastické hmoty a řádně označeny. Pak musí být vloženy do většího silného vnějšího obalu a obloženy dostatečným množstvím savého materiálu, jenž je chrání před poškozením a nasává prosakující tekutiny,
 - byly, je-li to možné, co nejkratší cestou přepravovány do laboratoře poučenou osobou, aby bylo zaručeno rychlé a spolehlivé doručení.
2. Vnější obal balíku musí být označen adresou přijímací laboratoře a měly by na něm být nápadně uvedeny tyto informace: „patologický materiál pocházející ze zvířat“, „rychle se kazící“, „křehký“, „otevřít pouze v laboratoři pro práci s africkým morem prasat“.
3. Odpovědný pracovník laboratoře přijímající vzorky musí být předem informován o době dodání vzorků.
4. Pokud mají být vzorky letecky dopraveny do Referenční laboratoře Společenství pro africký mor prasat⁽¹⁰⁾, musí být obal označen podle předpisů Mezinárodního leteckého dopravního sdružení (IATA, International Air Transport Association).

⁽⁹⁾ Doporučuje se odebírat také vzorky ilea (kyčelníku), neboť mohou být vhodné k diagnostice klasického moru prasat.

⁽¹⁰⁾ Referenční laboratoř společenství má neomezené povolení příjmu vzorků na vyšetření a izolátů AMP z ostatních členských států.

KAPITOLA VI

Principy a použití virologických vyšetřovacích metod a posuzování jejich výsledků

A. DETEKCE VIROVÉHO ANTIGENU

1. Přímá imunofluorescenční metoda (FAR)

Principem této vyšetřovací metody je detekce virových antigenů v otiskových preparátech nebo tenkých (kryokatových) řezech zmrazeného materiálu z orgánů prasat, u kterých je podezření na nákazu virem AMP. Intracelulární antigen je detekován při použití specifických protilátek konjugovaných s FITC⁽¹⁾. V cytoplasmě infikovaných buněk se objevují inkluzní tělíska nebo zrnka.

Vhodnými orgány jsou ledviny, slezina a různé mízní uzliny. Pokud jde o prasata divoká, jestliže jejich orgány nejsou k dispozici nebo jsou v rozkladu, mohou se použít také nátěry buněk z kostní dřeně.

Doba trvání testu je přibližně dvě hodiny. Protože vzorky orgánů mohou být získány pouze z mrtvých zvířat, je možnost použití tohoto testu pro účely screeningu omezena.

Pro případy akutního AMP je to vysoce citlivá vyšetřovací metoda. U subakutní nebo chronické formy je průměrná citlivost FAR 40%, pravděpodobně kvůli přítomnosti komplexů antigen-protilátka, které blokuje reakci s konjugovanou protilátkou proti AMP. Spolehlivost výsledků vyšetření může být snížena nespecifickým barvením, zvláště když nebylo nabyto značné zkušenosti ve vyšetřování touto metodou nebo když vyšetřované orgány byly v rozkladu.

2. ELISA k detekci antigenu

Virový antigen může být zjišťován také metodami ELISA, ale ELISA je doporučována pouze u akutní formy nákazy, poněvadž při přítomnosti komplexů antigen-protilátka má nízkou citlivost. Citlivost metody ELISA k detekci antigenu by měla být dostatečně vysoká, aby zaznamenala pozitivní výsledek u zvířat, která jeví klinické příznaky akutního AMP. V ostatních případech je doporučováno používat tuto metodu pouze jako „stádovou“ metodu a ve spojení s jinými virologickými metodami.

B. IZOLACE VIRU A IDENTIFIKACE HEMADSORPČNÍ METODOU (HAD)

1. Izolace viru je založena na inokulování materiálu vzorku na vnímavé prasečí primární buněčné kultury a na buňky monocytů a makrofágů. Pro izolaci viru AMP se dává přednost vzorkům celé krve a leukocytů získaných ze vzorků nesražené krve nebo vzorkům orgánů uvedených v A.1. Pokud se ve vzorku vyskytuje virus AMP, množí se v infikovaných buňkách a tvoří charakteristický cytopatický efekt.
2. Hemadsorpční metoda (HAD) je doporučována pro identifikaci izolátů viru AMP pro svou vysokou citlivost a specifčnost. HAD je založena na schopnosti viru AMP množit se v prasečích makrofázích a působit hemadsorpci v přítomnosti prasečích erytrocytů. Kolem infikovaných makrofágů se vytvářejí charakteristické „rosety“ erytrocytů. Avšak malý počet terénních kmenů viru AMP nevyvolává hemadsorpci, ale vytváří cytopatický efekt. Tyto kmeny mohou být specificky identifikovány použitím přímé imunofluorescenční metody (FAR) v sedimentech buněčných kultur nebo PCR.
3. Izolace viru je vhodnější k vyšetřování vzorků od malého množství zvířat než pro hromadná vyšetření. Metoda izolace viru je pracná a výsledky lze získat za jeden až tři dny. Pokud je viru ve vzorku malé množství, může být zapotřebí dalších dvou pasáží. Tím se může prodloužit doba vyšetřování, než je získán konečný výsledek, až na 10 dní. Vzorky

⁽¹⁾ Fluorescein isothiokyanát (FITC).

rozkládajícího se materiálu mohou být pro buněčné kultury cytotoxické, a proto nejsou použitelné.

4. Izolace viru a jeho identifikace metodou HAD jsou doporučovány jako ověřovací metody pro potvrzení pozitivních výsledků u antigenů nalezených metodami ELISA, PCR nebo FAR. Jsou také doporučovány, pokud byl AMP již potvrzen jinými metodami, zejména v případě prvotního výskytu nebo případu AMP.

Izoláty viru AMP izolované z prasečích makrofágů mohou být používány pro potřeby charakterizace izolovaného viru a pro potřeby molekulární epizootologie.

5. Všechny izoláty viru AMP získané ze všech prvotních primárních ohnisek, prvotních případů onemocnění divokých prasat nebo případů zjištěných na jatkách nebo při přepravě musí být typizovány národní referenční laboratoří nebo jinou laboratoří povolenou Státní veterinární správou nebo Referenční laboratoří Společenství v souladu s částí E.

V každém případě musí být tyto izoláty virů bez prodlení zaslány do Referenční laboratoře Společenství pro sbírku virů.

C. DETEKCE VIROVÉHO GENOMU

1. Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) se používá k detekci viru ve vzorcích krve, séra, tkání nebo orgánů. Malé zlomky virové DNA jsou rozmnoženy metodou PCR do zjiitelného množství. Použitím primerů z vysoce stabilní oblasti genomu může být zjišťována přítomnost široké škály izolátů náležející ke všem známým virovým genotypům včetně virů nevyvolávajících hemadsorpci a izolátů s nízkou virulencí. Jelikož tato metoda zjišťuje přítomnost pouhé genomové sekvence viru, může být PCR pozitivní dokonce i v případě, že ve vzorku není přítomen žádný infekční virus (tj. ve vzorcích rozkládajících se tkání nebo ve vzorcích od rekonvalescentních prasat nebo od prasat, která se uzdravila a nemají klinické příznaky onemocnění).
2. PCR lze použít k vyšetření malého množství vzorků, jež byly pečlivě odebrány od podezřelých zvířat. Je doporučovanou metodou u vzorků orgánů, které jsou cytotoxické, a proto z nich není možné izolovat virus (např. u vzorků od prasat divokých).
3. Vhodným materiálem k vyšetření metodou PCR jsou orgány popsané v pasáži o izolování viru a o séru. Metodou PCR mohou být vyšetřovány také homogenáty z klišťat.
4. PCR lze provést za jeden pracovní den. Vyžaduje odpovídající laboratorní vybavení, oddělené pracoviště a kvalifikované laboratorní pracovníky. Výhodou metody je, že nevyžaduje rozmnožování virových částic replikací v laboratoři. Tato metoda je vysoce citlivá, ale může snadno dojít ke kontaminaci, jež vede k falešně pozitivním výsledkům. Proto jsou nezbytné přísné kontroly jakosti.

D. DOPORUČENÉ VIROLOGICKÉ METODY A POSUZOVÁNÍ VÝSLEDKŮ VIROLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ

1. Virologická vyšetření jsou pro potvrzení AMP nezbytná. Izolace viru a metoda HAD musí být považovány za ověřovací virologické vyšetřovací metody a musí být v případě potřeby používány jako ověřovací vyšetření. Jejich použití je doporučováno zejména v případech pozitivních výsledků dosažených metodami FAR nebo PCR, pokud nebyly spojeny se zjištěním klinických příznaků nebo lézí způsobených nemocí nebo v jakémkoliv jiném případě pochybností. Avšak primární ohnisko AMP může být potvrzeno také tehdy, jestliže byly u podezřelých prasat zjištěny klinické příznaky nebo byly nalezeny patomorfologické změny a výsledky přinejmenším dvou vyšetřovacích metod zaměřených na detekci virového antigenu nebo virového genomu byly u týchž vyšetřovaných prasat pozitivní.

Sekundární ohnisko AMP může být potvrzeno v případě, že – kromě epizootologického článku k potvrzení ohniska nebo případu, kdy byly zjištěny klinické příznaky nákazy nebo patomorfologické změny u podezřelých prasat – výsledek vyšetření na přítomnost virového antigenu nebo genomu byl pozitivní.

Primární ohnisko AMP u prasat divokých může být potvrzeno, pokud je izolován virus nebo pokud byly výsledky přinejmenším dvou vyšetřovacích metod k detekci antigenu nebo genomu pozitivní. Další případy AMP u prasat divokých, u nichž byla zjištěna epizootologická souvislost s dříve potvrzenými případy, mohou být potvrzeny, pokud vyšetřovací metoda k detekci antigenu nebo genomu dává pozitivní výsledek.

E. GENETICKÁ TYPIZACE IZOLÁTŮ VIRU AMP

1. Genetická typizace izolátů viru AMP se provádí zjišťováním restričních enzymatických vzorců a sekvence (pořadí) nukleotidů v úsecích virového genomu. Podle podobnosti těchto restričních vzorců nebo sekvencí s restričními vzorci nebo sekvencemi, které již byly získány z dříve získaných izolátů viru, je možno usuzovat na to, zda byl výskyt nákazy způsoben virem, které náleží k evropskému nebo africkému molekulárnímu modelu.

Genetická typizace izolátů viru AMP má rozhodující význam pro zlepšení současné znalosti molekulární epidemiologie AMP a genetických variací virů. Tyto molekulární údaje umožňují zařadit nové izoláty a poskytnout informace o jejich možném původu.

2. Jestliže typizaci viru nelze provést v národní referenční laboratoři nebo v jakékoliv jiné laboratoři oprávněné k diagnostice AMP v krátkém časovém období, musí být původní vzorek nebo izolát viru co nejdříve zaslán do Referenční laboratoře Společenství k molekulární typizaci.

Údaje získané typizací a zjišťováním sekvencí izolátů viru AMP, jež jsou k dispozici v laboratořích oprávněných k diagnostice AMP, musí být zaslány do Referenční laboratoře Společenství, aby tam byly vloženy do databáze, kterou spravuje tato laboratoř.

Informace uchovávané v této databázi jsou dostupné všem národním referenčním laboratořím členských států. Avšak v případě uveřejnění ve vědeckých časopisech, jestliže si údaje vyžádá schvalovaná laboratoř, Referenční laboratoř Společenství zaručí důvěrnost těchto údajů až do jejich uveřejnění.

KAPITOLA VII

Principy a použití sérologických vyšetřovacích metod a posuzování jejich výsledků

A. ZÁKLADNÍ PRINCIPY A DIAGNOSTICKÁ HODNOTA

1. Zjišťování specifických protilátek proti izolátům viru AMP je doporučováno u subakutních a chronických forem, u plošného vyšetřování a u programů eradikace AMP z několika důvodů:

- (i) infikovaná prasata rychle vytvářejí protilátky; u těchto prasat bývají protilátky zjištěné ve vzorcích séra od sedmi do deseti dnů po infekci,
- (ii) proti AMP neexistuje vakcína; to znamená, že specifické protilátky proti AMP vznikají pouze při infekci virem AMP,
- (iii) protilátková odpověď je dlouhodobá; u prasat, která se uzdravila z nákazy, mohou být zjišťovány vysoké hladiny protilátek po mnoho měsíců nebo dokonce po celý život těchto prasat.

U selat mohou být ovšem během prvních týdnů života zjišťovány specifické protilátky mateřského původu. Poločas mateřských protilátek u selat je asi tři týdny. Pokud jsou protilátky proti AMP nalezeny u selat starších než tři měsíce, je velmi nepravděpodobné, že by pocházely od matek.

2. Detekce protilátek proti viru AMP ve vzorcích séra nebo plazmatických exsudátů z dodaných orgánů má napomoci diagnostice AMP v podezřelých hospodářstvích tím, že se v případě potvrzeného výskytu dá zjistit věk, v němž se prasata infikovala, a dále slouží účelům monitoringu a surveillance.

Na probíhající infekci (dva až čtyři týdny) může upozornit výskyt několika séropozitivních prasat s nízkými titry neutralizujících protilátek. Výskyt mnoha prasat s vysokými titry neutralizujících protilátek znamená, že virus vnikl do hospodářství s chovem prasat před dobou delší než jeden měsíc. Údaje o umístění séropozitivních prasat v hospodářství mohou poskytnout cennou informaci o tom, jak se virus AMP dostal do stáda.

Avšak při přesném posuzování výsledků sérologických testů musí být brány do úvahy veškeré klinické, virologické a epizootologické nálezy, v rámci epizootologického šetření, jež má být provedeno v případě podezření nebo potvrzování AMP, v souladu s § 8 vyhlášky č. 202/2004 Sb.

B. DOPORUČENÁ SÉROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ

1. Při sérologickém potvrzování AMP je možné si vybrat z těchto metod: metoda ELISA, metoda nepřímé imunofluorescence (IFAR) a imunoblotting (IB).

Jakost a účinnost sérologické diagnostiky, již se zabývá národní referenční laboratoř, musí být v rámci srovnávacích zkoušek laboratoř, jež pravidelně pořádá Referenční laboratoř Společenství, řádně přezkušována.

2. Metoda ELISA je nejspolehlivější a nejužitečnější metoda pro plošné sérologické studie. Je založena na zjišťování protilátek proti viru AMP navázaných na virové bílkoviny, které jsou upevněny k pevné fázi přidáním bílkoviny A konjugované s enzymem, který při reakci s vhodným substrátem vyvolává viditelnou barevnou reakci.
3. Národní referenční laboratoř musí pravidelně provádět kontrolu jakosti týkající se citlivosti a specifčnosti každé šarže reagentů ELISA, přičemž používá panel referenčních sér poskytnutý Referenční laboratoř Společenství. Tento panel obsahuje:

- séra prasat v počáteční fázi infekce virem AMP (méně než 17 dní od začátku infekce),
- séra prasat v rekonvalescentním stadiu (více než 17 dní po infekci).

Metoda ELISA, která má být použita k sérologické diagnostice AMP musí zjišťovat všechna referenční séra prasat v rekonvalescentním stadiu. Všechny výsledky získané s referenčními séry musí být reprodukovatelné. Je doporučováno, aby byla zjištělná také všechna pozitivní séra z počáteční fáze. Výsledky získané s referenčními séry prasat v počáteční fázi onemocnění ukazují citlivost metody ELISA.

4. Metoda nepřímé imunofluorescence (IFAR) je rychlá metoda s vysokou citlivostí a specifčností pro zjišťování protilátek proti AMP buď v sérech nebo v tkáňových exsudátech. Je založena na zjišťování protilátek proti AMP, které se naváží na monolayer buněk MS infikovaných adaptovaným virem AMP. Reakce protilátky s antigenem je prokazována bílkovinou A, která je označena fluoresceinem. V pozitivních vzorcích je patrna specifická fluorescence blízko jader infikovaných buněk.

Metody přímé a nepřímé imunofluorescence používané v kombinaci s vyšetřovanými orgány, krví a exsudáty získanými od zvířat, která jeví klinické příznaky AMP mohou vést k rychlému a spolehlivému potvrzení nákazy.

5. Metoda IB je vysoce specifická a citlivá metoda založená na používání nitrocelulóзовých proužků, které obsahují virové bílkoviny jako antigeny. Specifická reakce protilátky s antigenem je zjišťována přidáním konjugátu bílkoviny A s peroxidázou a vhodného substrátu. Je velmi užitečná k vyšetřování sér, u kterých nebylo možno metodou ELISA dojít k žádnému závěru.

KAPITOLA VIII

Minimální požadavky na bezpečnost laboratoří zabývajících se AMP

1. V každé laboratoři, v níž se má množit virus AMP replikací v buněčných kulturách, musí být dodržovány požadavky uvedené v tabulce 1. Avšak postmortální vyšetření, zpracovávání tkání pro FAR nebo PCR a sérologická vyšetření používající inaktivovaný antigen mohou být prováděny na nižší úrovni omezení za předpokladu, že budou dodržovány minimální požadavky tabulky 1, základní hygienická pravidla a po ukončení práce bude prováděna dezinfekce s bezpečným odstraněním kadáverů, tkání a sér.
2. Každá laboratoř, v níž jsou zvířata inokulována virem AMP, musí splňovat požadavky uvedené v tabulce 2.
3. Všechny zásoby viru AMP musí být uchovávány na bezpečném skladovacím místě, ve zmraženém nebo lyofilizovaném stavu. Všechny jednotlivé ampule musí být zřetelně označeny a mají na nich být vyčerpávajícím způsobem uvedeny údaje o udržované zásobě viru s údaji a výsledky zkoušek kontroly jakosti. Záznamy musí být vedeny také o virech přidaných k zásobě, s podrobnostmi o zdroji, a o virech vydaných do jiných laboratoří.
4. Doporučuje se, aby jednotka zaručující biologickou ochranu pro práci s virem AMP měla technické zázemí na místech, na nichž se s virem AMP nepracuje. Tato místa jsou k dispozici pro přípravu skla a médií, pro udržování a přípravu neinfikovaných buněčných kultur, pro zpracovávání sér a pro sérologické testy (jiné než metody využívající živý virus AMP), a pro zajištění správné a úřední činnosti.

Principy biologických omezení vhodných pro diagnostické laboratoře

	Minimální požadavky	Další požadavky
Prostředí obecně	Normální atmosférický tlak. Místnosti vyhrazené pro vybrané pracovní postupy.	Normální atmosférický tlak. Jedna filtrace HEPA nasávaného vzduchu. Místnosti vyhrazené pouze pro diagnostiku klasického moru prasat nebo AMP. Výtoky, u nichž lze předpokládat kontaminaci, mají být ošetřeny, aby byl virus AMP inaktivován (tepelně nebo chemicky).
Oděvy pro práci v laboratoři	Vnější oděv vyhrazen pouze pro pobyt v jednotce pro práci s virem AMP. Jednorázové rukavice k veškeré manipulaci s infekčním materiálem. Vnější oděv nesmí opustit jednotku, aniž by byl vysterilizován nebo vyprán při vysoké teplotě uvnitř jednotky.	Úplná výměna oděvů při vstupu. Oděvy pro práci v laboratoři používané pouze v jednotce pro práci s virem AMP. Jednorázové rukavice k veškeré manipulaci s infekčním materiálem. Oděv nesmí opustit jednotku, aniž by byl vysterilizován nebo vyprán při vysoké teplotě uvnitř jednotky.
Kontrola osob	Vstup do jednotky povolen pouze pověřeným a vyškoleným osobám. Mytí a dezinfekce rukou před odchodem z jednotky. Osobám není povolen přístup k prasatům do 48 hodin po odchodu z jednotky.	Vstup do jednotky povolen pouze pověřeným a vyškoleným osobám. Mytí a dezinfekce rukou před odchodem z jednotky. Osobám není povolen přístup k prasatům do 48 hodin po odchodu z jednotky.
Vybavení	Pracovna s biologickou ochranou (třída I nebo II) používaná pro veškerou manipulaci s živým virem. Pracovna by měla mít dvojitou filtrace HEPA nasávaného vzduchu. Vybranému týmu laboratorních pracovníků má být k dispozici veškeré zařízení potřebné pro laboratorní práci.	

Požadavky biologické ochrany v místnostech s pokusnými zvířaty

	Požadavky
Prostředí obecně	Ventilace kontrolovaná přetlakem. Jedna filtrace HEPA nasávaného vzduchu. Zařízení pro úplnou dekontaminaci nebo dezinfekci plynováním po ukončení pokusu. Všechny vytékající tekutiny upravit tak, aby byl inaktivován virus AMP (tepelně/spalováním nebo chemicky).
Oděvy pro práci v laboratoři	Úplná výměna oděvů při vstupu. Oděv nesmí opustit jednotku, aniž by byl vysterilizován nebo vyprán při vysoké teplotě uvnitř jednotky.
Kontrola osob	Vstup do jednotky je povolen pouze pověřeným a vyškoleným osobám. Před vstupem do sprch ponechat oděvy uvnitř jednotky. Úplné osprchování při odchodu z jednotky. Osobám není povolen vstup do podniků s chovem prasat do 48 hodin po odchodu z jednotky.
Vybavení	Všechno vybavení potřebné pro práci se zvířaty má být k dispozici uvnitř jednotky. Všechny materiály, které mají být sterilizovány při opuštění jednotky, nebo které jsou vzorky ze zvířat, mají být uloženy v dvojím obalu v nepropustné přepravce, jejíž povrch je před přepravou do laboratoře AMP dezinfikován.
Zvířata	Po ukončení vyšetření mají být před opuštěním jednotky utracena všechna zvířata, postmortální vyšetření mají být ukončena uvnitř biologického ochranného prostoru a kadávery spáleny.

Čl. 3

Tato příručka nabývá účinnosti dnem účinnosti vyhlášky č. 202/2004 Sb., o opatřeních pro předcházení a zdolávání afrického moru prasat.