II.

(Akty, ktorých uverejnenie nie je povinné)

KOMISIA

ROZHODNUTIE KOMISIE

zo 4. augusta 2006,

ktorým sa schvaľuje diagnostická príručka pre vtáčiu chrípku podľa smernice Rady 2005/94/ES

[oznámené pod číslom K(2006) 3477]

(Text s významom pre EHP)

(2006/437/ES)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na smernicu Rady 2005/94/ES z 20. decembra 2005 o opatreniach Spoločenstva na kontrolu vtáčej chrípky a o zrušení smernice 92/40/EHS [1], a najmä na jej článok 50 ods. 1 druhý pododsek,

keďže:

(1) Smernicou 2005/94/ES sa stanovujú určité preventívne opatrenia týkajúce sa sledovania a včasného odhalenia vtáčej chrípky, ako aj minimálne kontrolné opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v prípade ohniska tejto choroby u hydiny a iného vtáctva žijúceho v zajatí.

(2) Je potrebné stanoviť na úrovni Spoločenstva diagnostické postupy, spôsoby odberu vzoriek a kritériá na vyhodnotenie výsledkov laboratórnych testov na potvrdenie ohniska vtáčej chrípky.

(3) V prílohe VII k smernici 2005/94/ES sa stanovujú funkcie a povinnosti referenčného laboratória Spoločenstva pre vtáčiu chrípku s cieľom koordinovať, po porade s Komisiou, metódy používané v členských štátoch na diagnostikovanie tejto choroby. Medzi tieto funkcie a povinnosti patrí organizovanie pravidelných porovnávacích testov a dodávanie štandardných reagencií na úrovni Spoločenstva.

(4) V nedávnom období sa vyvinuli laboratórne testy zabezpečujúce rýchle diagnostikovanie vtáčej chrípky.

(5) Skúseností získané pri kontrole vtáčej chrípky v posledných rokoch mali za následok identifikáciu najvhodnejších postupov odberu vzoriek a kritérií na vyhodnocovanie výsledkov laboratórnych testov, pokiaľ ide o správne diagnostikovanie tejto choroby v rôznych situáciách.

(6) Opatrenia uvedené v tomto rozhodnutí sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

Článok 1

Diagnostická príručka stanovená v smernici 2005/94/ES a uvedená v prílohe k tomuto rozhodnutiu sa schvaľuje.

Článok 2

Členské štáty uplatňujú diagnostickú príručku od dátumu transpozície smernice 2005/94/ES alebo od 1. júla 2007, podľa toho, ktorý dátum nastane skôr.

[1] Ú. v. EÚ L 10, 14.1.2006, s. 16.

Článok 3

Toto rozhodnutie je určené členským štátom.

V Bruseli 4. augusta 2006

Za Komisiu
Markos KYPRIANOU
člen Komisie

PRÍLOHA

DIAGNOSTICKÁ PRÍRUČKA PRE VTÁČIU CHRÍPKU

KAPITOLA I

Úvod, ciele a vymedzenie pojmov

1. S cieľom zabezpečiť jednotné postupy na diagnostikovanie vtáčej chrípky (AI) v Spoločenstve sa touto diagnostickou príručkou stanovujú:

   a) usmernenia a minimálne požiadavky na diagnostické postupy, spôsoby odberu vzoriek a kritériá na vyhodnotenie výsledkov laboratórnych testov, pokiaľ ide o správne diagnostikovanie vtáčej chrípky;

   b) laboratórne testy, ktoré sa majú použiť na diagnostikovanie vtáčej chrípky, a laboratórne techniky, ktoré sa majú používať na genetickú typizáciu izolátov vírusov vtáčej chrípky;

   c) minimálne požiadavky biologickej bezpečnosti a normy kvality, ktoré sa majú dodržiavať v diagnostických laboratóriách a pri preprave vzoriek.

2. Táto diagnostická príručka je určená úradom zodpovedným za kontrolu vtáčej chrípky. Týka sa preto najmä zásad a uplatňovania laboratórnych testov a vyhodnocovania ich výsledkov, ako aj laboratórnych techník.

3. Na účely tejto diagnostickej príručky sa okrem definícií v článku 2 smernice 2005/94/ES uplatňuje aj táto definícia:

   „Diagnostická vzorka“ je akýkoľvek živočíšny materiál vrátane celého tela usmrteného zvieraťa, ktorý sa prepravuje na účely dignostikovania alebo vyšetrenia, ale okrem živých infikovaných zvierat.

4. Potvrdenie vtáčej chrípky u hydiny a iného vtáctva žijúceho v zajatí musí byť v súlade s postupmi, spôsobmi odberu vzoriek a kritériami na vyhodnotenie výsledkov laboratórnych testov stanovených v tejto diagnostickej príručke a musí sa zakladať na jednom alebo viacerých kritériách uvedených v písm. a), b) a c):

   a) zistenie infekčného vírusu, protilátky alebo špecifického genetického materiálu vo vzorkách tkanív, orgánov, krvi alebo exkrementov hydiny alebo iného vtáctva;

   b) zistenie klinických príznakov a posmrtných lézií choroby u tohto vtáctva;

   c) dôkaz o reakcii na konkrétnu protilátku vo vzorkách krvi z takéhoto vtáctva.

5. Potvrdenie infekcie cicavcov vírusom chrípky typu A vtáčieho pôvodu, ktorý je buď vysokopatogénny, alebo nízkopatogénny subtypov H5 alebo H7, sa musí zakladať na jednom alebo viacerých kritériách uvedených v písm. a) alebo b):

   a) zistenie infekčného vírusu vtáčej chrípky, antigénu alebo špecifického genetického materiálu vo vzorkách tkanív, orgánov, krvi alebo exkrementov cicavcov;

   b) dôkaz reakcie špecifickej protilátky na vtáčiu chrípku vo vzorkách krvi z cicavcov.

6. Postupy, spôsoby odberu vzoriek a kritériá hodnotenia výsledkov laboratórnych testov musia byť:

   a) tie, ktoré sú stanovené v diagnostickej príručke, alebo

   b) tie, ktoré povolil príslušný orgán za predpokladu, že:

      i) sa potvrdilo, že citlivosť a špecifickosť schválených laboratórnych testov bola účinná na základe porovnávacieho testu vykonaného v referenčnom laboratóriu Spoločenstva pre vtáčiu chrípku („referenčné laboratórium Spoločenstva“), alebo

      ii) v prípade, že referenčné laboratórium Spoločenstva nevykonalo žiadne vyhodnotenie konkrétneho typu laboratórneho testu, citlivosť a špecifickosť schváleného laboratórneho testu schválilo národné referenčné laboratórium, takže laboratórny test je vhodný na účely, na ktoré sa používa; výsledky tohto schválenia sa musia predložiť referenčnému laboratóriu Spoločenstva na preskúmanie.

KAPITOLA II

Opis vtáčej chrípky s dôrazom na diferenciálnu diagnostiku

1. **Etiológia a virulencia**

Vtáčia chrípka je vysokonákazlivou vírusovou infekciou spôsobenou vírusmi čeľade *Orthomyxoviridae*, rod vírusu chrípky typu A (*genus influenzavirus A*). Vírusy chrípky typu A sú jedinými orthomyxovírusmi, o ktorých je známe, že infikujú vtáky. Potvrdilo sa, že mnohé druhy vtákov sú vnímavé voči infekcii vírusmi chrípky typu A, hlavný rezervoár takýchto vírusov tvoria vodné vtáky, avšak prevažná väčšina izolátov vykazovala nízku patogenitu u kurčiat a moriakov, najvýznamnejšieho vtáctva hospodárskeho významu, ktoré môže byť postihnuté chorobou.

Vírusy chrípky typu A majú antigénovo príbuzné nukleoproteíny a proteíny s antigénovo príbuzným matrixom, sú však klasifikované na subtypy na základe antigénovej príbuznosti hemaglutinínu (HA) a neuraminidázy (NA) povrchových glykoproteínov. V súčasnosti sa rozoznáva 16 subtypov HA (H1 – H16) a 9 subtypov NA (N1 – N9). Každý vírus chrípky typu A má jeden antigén HA a jeden antigén NA, zjavne v ľubovoľnej kombinácii.

Vírusy A chrípky sú rozdelené do dvoch skupín na základe ich schopnosti spôsobiť chorobu u vnímavej hydiny:

a) **vírusy vysokopatogénnej vtáčej chrípky (HPAI),** ktoré spôsobujú mimoriadne závažnú chorobu charakterizovanú generalizovanou infekciou infikovanej hydiny, pričom môžu indukovať vysokú úmrtnosť kŕdľa (až do 100 %), a

b) **vírusy nízkopatogénnej vtáčej chrípky (LPAI),** ktoré spôsobujú miernu, primárne respiračnú chorobu hydiny, pokiaľ nedôjde k aktivácii inými súbežnými infekciami alebo faktormi.

Voľne žijúce vtáctvo, najmä sťahovavé vodné vtáctvo, zohráva veľmi dôležitú úlohu ako rezervoár vírusu chrípky typu A, ako sa potvrdilo izoláciou takmer všetkých možných kombinácií subtypov HA a NA u voľne žijúceho vtáctva. Spravidla okrem prípadov, keď sa HPAI rozšíril z infikovanej hydiny, u voľne žijúceho vtáctva sa zistili iba vírusy LPAI.

Primárne zavlečenia vírusov vtáčej chrípky na hydinárske farmy majú s najväčšou pravdepodobnosťou pôvod v priamom alebo nepriamom kontakte s voľne žijúcim vtáctvom.

U domácej hydiny existuje možnosť, že takéto vírusy LPAI, zavlečené z voľnej prírody, môžu cirkulovať neobjavené, keďže klinické príznaky sú často mierne alebo neprítomné.

Po zavlečení kmeňov vírusu LPAI subtypov H5 a H7 do kŕdľov hydiny môžu potom tieto kmene zmutovať na kmene HPAI. V súčasnosti je známe, že HPAI spôsobujú iba vírusy subtypov H5 a H7.

Hoci sa ukazuje, že niekoľko mechanizmov môže byť zodpovedných za mutáciu vírusu LPAI na vírus HPAI, faktory spôsobujúce takúto mutáciu nie sú známe. V niektorých prípadoch sa zdá, že k mutácii došlo rýchlo v primárnej lokalite po zavlečení z voľne žijúcich vtákov, v iných prípadoch vírus LPAI cirkuloval u hydiny celé mesiace pred zmutovaním. Preto nie je možné predvídať, či a kedy sa takáto mutácia vyskytne. Možno však reálne predpokladať, že čím rozšírenejšia bude cirkulácia LPAI u hydiny, tým vyššia bude šanca, že dôjde k mutácii na HPAI.

Je ťažké odhadnúť inkubačnú lehotu, tá sa pravdepodobne mení s kmeňom vírusu a hostiteľom, zvyčajne sa uvádza päť až šesť dní, ale rozmedzie pre jednotlivé vtáky siaha pravdepodobne od niekoľkých hodín po sedem dní.

2. **Klinické príznaky u vtákov infikovaných vírusom HPAI**

Klinické príznaky sú rozmanité a sú ovplyvnené takými faktormi, ako je virulencia infikujúceho vírusu, zasiahnutý druh, vek, pohlavie, paralelné choroby a životné prostredie.

Medzi skoré príznaky možno zahrnúť nechutenstvo, zníženie príjmu vody a relatívne nízku úmrtnosť. Alternatívne sa však táto choroba môže objaviť náhle v kŕdli a mnoho vtákov môže uhynúť buď bez varovných príznakov, alebo s minimálnymi príznakmi, ako je depresia, nechutenstvo, načuchrané perie a horúčka. Spravidla platí, že o čo dlhšie vtáky prežívajú, o to výraznejšie sú klinické príznaky. Časový model rozvinutia príznakov závisí od vírusu, hostiteľa, prvej infikujúcej dávky spolu so systémom chovu. Vírus sa šíri pomalšie u nosníc chovaných v klietkach alebo u vtákov žijúcich vo voľnej prírode v porovnaní s tými, ktoré žijú v zariadeniach na chov brojlerov.

Sliepky infikované vírusom HPAI môžu najprv znášať vajcia s mäkkou škrupinou, avšak čoskoro prestanú znášať. Choré vtáky často sedia alebo stoja v polokomatóznom stave, pričom sa ich hlavy dotýkajú zeme. Hrebene a podbradové laloky sú cyanotické a edematózne a na ich koncoch môžu byť petechiálne alebo ekchymózne krvácania. Často je prítomná silná vodnatá hnačka a vtáky sú nadmerne smädné. Dýchanie môže byť sťažené a dá sa pozorovať nadmerné slzenie. Hemorágie sa dajú pozorovať na častiach kože, ktoré nie sú pokryté perím. Úmrtnosť v kŕdli kolíše od 50 do 100 %.

U brojlerov sú príznaky HPAI často menej očividné ako u inej hydiny a zvyčajne medzi ne patrí ťažká depresia, nechutenstvo, prvou pozorovanou abnormalitou môže byť veľmi zvýšená úmrtnosť. Dajú sa pozorovať aj edémy tváre a krku a neurologické príznaky, ako je tortikolis a ataxia.

HPAI u moriakov je podobná ako HPAI pozorovaná u domáceho vtáctva, avšak niektoré vírusy HPAI sa u moriakov javia virulentnejšie, zatiaľ čo iné menej virulentné.

U husí infikovaných vírusom HPAI sú príznaky depresie, nechutenstvo a hnačky podobné príznakom u nosníc, hoci často s opuchnutými dutinami. Mladšie vtáky môžu vykazovať pneumologické príznaky.

Kačice nemusia pri infikovaní vírusmi HPAI vykazovať klinické príznaky, bolo však hlásené, že niektoré kmene vyvolávajú príznaky podobné príznakom u husí s určitou úmrtnosťou.

V prípade infekcií HPAI a LPAI u pštrosov môžu klinické príznaky absentovať. V prípade ohnísk HPAI, ako boli ohniská v Taliansku v roku 1999/2000, bolo hlásené, že perličky a japonské jarabice boli vnímavé na infekcie s príznakmi a úmrtnosťou podobnou ako v prípade choroby kurčiat alebo moriakov. V niektorých experimentálnych štúdiách sa však uvádzalo, že jarabice sú odolné voči niektorých kmeňom HPAI. U všetkých vtákov prítomnosť protilátok na ten istý subtyp H, či už vakcináciou, alebo prirodzenou infekciou, môže znamenať, že infekcia vírusom HPAI nebude mať za následok zjavné klinické príznaky .

3. **Posmrtné lézie u vtákov infikovaných vírusom HPAI**

Vtáky, ktoré uhynú perakútne, môžu vykazovať minimálne, voľným okom viditeľné lézie, ktoré pozostávajú z dehydratácie a viscerálnej a muskulárnej kongescie.

U vtákov, ktoré uhynú po predĺženom klinickom priebehu, sa môžu vyskytnúť petechiálne a ekchymotické hemorágie na celom tele, najmä v hrtane, priedušnici, svalnatom žalúdku a epikardiálnom tuku a na seróznych povrchoch priliehajúcich ku hrudnej kosti. Vyskytujú sa extenzívne podkožné edémy, najmä okolo hlavy a podkolení. Kadavér môže byť dehydrovaný. Na slezine, pečeni, obličkách a pľúcach môžu by prítomné žlté alebo šedé nekrotické ohniská. Vzdušný vak môže obsahovať výpotok. Slezina môže byť zväčšená a hemoragická.

AI je histologicky charakterizovaná vaskulárnymi poruchami, ktoré vedú k edému, hemorágiam a perivaskulárnemu manžetovaniu, najmä v myokarde, slezine, pľúcach, mozgu, pankrease a podbradových lalokoch. Nekrotické ložiská sú prítomné v pľúcach, pečeni a obličkách. V mozgu môže byť prítomná glióza, vaskulárna proliferácia a neuronálna degenerácia.

4. **Diferenciálne diagnostikovanie**

Pri diferenciálnom diagnostikovaní HPAI sa musia zvážiť najmä tieto choroby:

a) iné choroby, ktoré spôsobujú náhlu vysokú úmrtnosť, ako sú:

   i) pseudomor hydiny;

   ii) infekčná laryngotracheitída;

iii) mor kačíc;

iv) akútne otravy;

b) iné choroby spôsobujúce opuchnutie hrebeňov a podbradových lalokov, ako sú:

i) akútna cholera hydiny a ostatné septikemické choroby;

ii) bakteriálna celulitída hrebeňa a podbradových lalokov.

5. **Klinické príznaky u vtákov infikovaných vírusom LPAI**

Závažnosť choroby vyvolanej vírusmi LPAI je v značnej miere ovplyvnená:

a) kmeňom vírusu;

b) druhom a vekom hostiteľa;

c) imunitným stavom hostiteľa voči vírusu, a najmä prítomnosťou iných infekčných pôvodcov, ako sú:

i) *Pasteurella spp.*;

ii) vírusy pseudomoru hydiny (vrátane kmeňov vakcíny);

iii) vtáčí pneumovírus, vírus infekčnej bronchitídy;

iv) *E. coli*;

v) *Mycoplasma spp.*;

d) podmienkami imunodeficiencie;

e) environmentálnymi faktormi (ako je nadbytočný amoniak, prach, vysoké alebo nízke teploty).

Jedným extrémom je, že pozorované klinické príznaky choroby môžu byť nezjavné alebo mierne, vyvolávajúce iba mierne respiračné príznaky alebo problémy so znáškou vajec u nosníc. Druhým extrémom je, že infekcie vírusmi LPAI môžu byť spojené s ťažkými klinickými príznakmi choroby, najmä u moriakov, zvyčajne so šelestami, kašľom, opuchnutím dutín pod očnicami a horúčkovým stavom spojeným so stratou chute do jedla a s vysokou úmrtnosťou.

LPAI môže byť zamenená s mnohými chorobami s respiračnými alebo črevnými príznakmi alebo nimi skomplikovaná. S podozrením na vtáčiu chrípku sa musí počítať pri prepuknutí akejkoľvek choroby hydiny, ktorá pretrváva napriek uplatňovaniu preventívnych a terapeutických opatrení v prípade iných chorôb.

6. **Klinické príznaky u vtáctva žijúceho v zajatí**

Spektrum klinických príznakov môže byť veľmi široké, pokiaľ ide o hydinu, môže siahať od nezjavných až po ťažké príznaky choroby, ktoré spôsobujú vysokú úmrtnosť.

Infekcia sa spravidla šíri pomalšie v zbierke vtákov chovaných v zajatí, čo je spôsobené rozmanitosťou rôznych chovaných druhov, rôznou vnímavosťou, premenlivou úrovňou výskytu vírusu a často pomerne nízkym prenosom, čo je spôsobené nízkou frekvenciou kontaktov a pomerne nízkou hustotou vtáctva.

KAPITOLA III

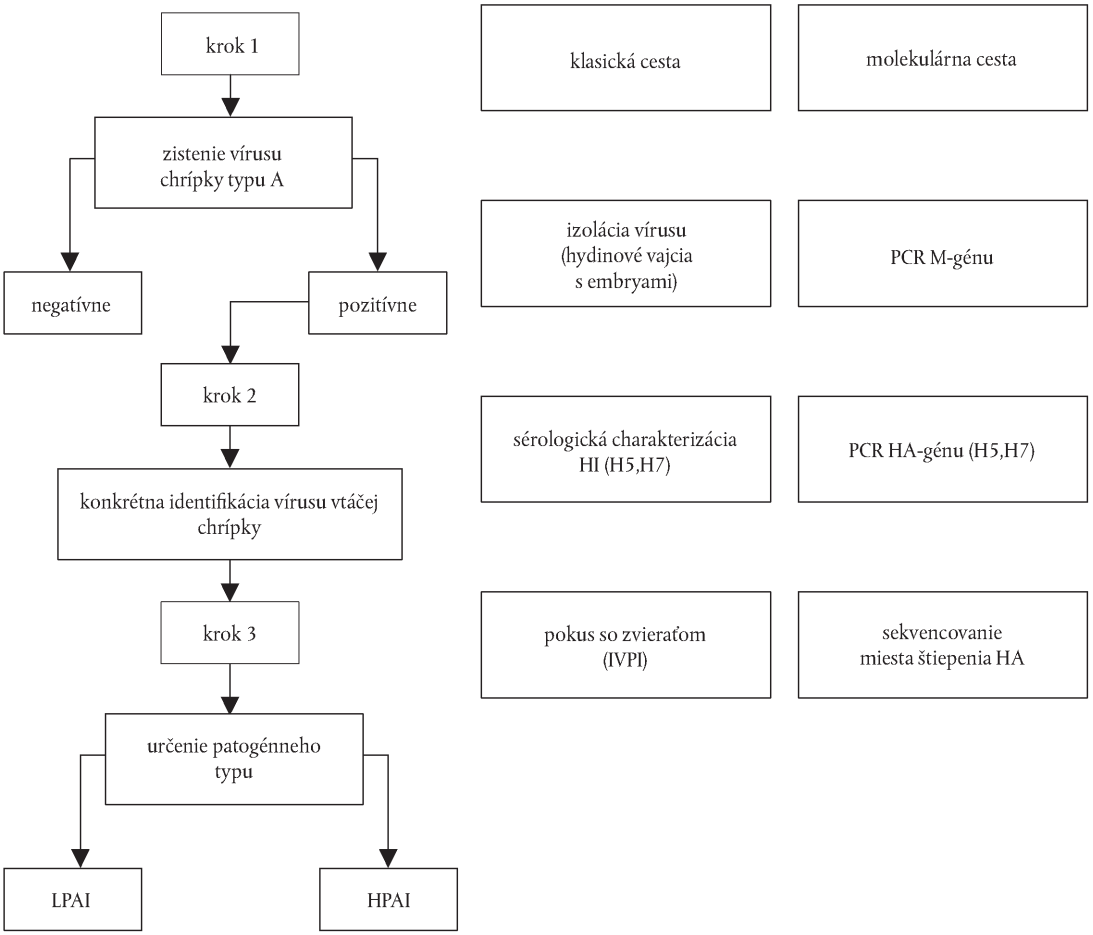
Usmernenia, ktoré sa majú brať do úvahy v prípade podozrenia na vtáčiu chrípku v chove

Rozmanitosť klinických príznakov v prípade HPAI a LPAI znamená, že neexistuje presné usmernenie v prípade podozrenia na ohnisko. Náhla vysoká úmrtnosť u hydiny, či už s príznakmi, alebo bez akýchkoľvek súvisiacich klinických príznakov opísaných v kapitole II, sa musí prešetriť predložením vzoriek na laboratórne vyšetrenie, ale v prípade neprítomnosti vysokej úmrtnosti je ťažšie vysloviť podozrenie alebo vylúčiť prítomnosť vtáčej chrípky.

Keďže rýchle diagnostikovanie HPAI alebo LPAI spôsobenej subtypmi H5 alebo H7 je z hľadiska ich včasnej kontroly a eradikácie mimoriadne dôležité, vtáčia chrípka sa musí vždy zvažovať pri diferenciálnom diagnostikovaní respiračných problémov, problémov s kladením vajec a zvýšenej úmrtnosti hydiny a na laboratórne vyšetrenie sa musia predložiť vhodné vzorky.

Obrázok

Schematický prehľad diagnostických krokov na potvrdenie vtáčej chrípky



KAPITOLA IV

Všeobecné postupy na zber a prevoz vzoriek

1. **Smernica 2005/94/ES a diagnostická príručka**

V prípade, že sú v smernici 2005/94/ES uvedené odkazy na diagnostickú príručku, musia sa vykonávať postupy vyšetrovania, odberu vzoriek a sledovania uvedené v tejto kapitole diagnostickej príručky.

2. **Postupy, ktoré sa majú dodržiavať v prípade podozrenia na ohniská vtáčej chrípky**

V prípade, že úradný veterinárny lekár má klinické podozrenie na ohnisko vtáčej chrípky, alebo v prípade, že výsledky akéhokoľvek laboratórneho testu na túto chorobu nie sú negatívne, príslušný orgán musí zabezpečiť, aby sa vyšetrenie uvedené v tejto kapitole diagnostickej príručky vykonalo v súlade s článkom 7 smernice 2005/94/ES a aby bolo úspešne uzavreté skôr, ako sa vylúči prítomnosť choroby.

3. **Interpretácia virologického testovania**

Príslušný orgán sa môže domnievať, že prítomnosť vírusu vtáčej chrípky môže byť vylúčená, ak bol v súlade s touto kapitolou predložený príslušný počet chorých alebo mŕtvych vtákov a tracheálnych/orofaryngeálnych alebo kloakálnych výterov na zistenie takéhoto vírusu alebo jeho genómu a ak sa dosiahnu negatívne výsledky pri testovaní s použitím jednej zo špecifikovaných metód zisťovania vírusu uvedených v kapitole V alebo VI alebo schválených príslušným orgánom v súlade s bodom 6 písm. b) kapitoly I.

4. **Štandardný súbor vzoriek na virologické alebo sérologické laboratórne testovanie**

Na vyšetrenie chovu, u ktorého je podozrenie, že je infikovaný vírusom vtáčej chrípky, sa musí odobrať a dodať priamo na virologické a sérologické laboratórne testy štandardný súbor vzoriek na virologické a sérologické testovanie, ako sa uvádza v písm. a) a b) („štandardné vzorky“).

a) Štandardným súborom vzoriek na virologické testovanie je:

   i) aspoň päť chorých/mŕtvych vtákov, ak existujú, a/alebo

   ii) aspoň 20 tracheálnych/orofaryngiálnych a 20 kloakálnych výterov.

   Musia sa odobrať kadavéry vtákov, ktoré uhynuli v poslednom období alebo ktoré sú ťažko choré alebo umierajúce a boli usmrtené humánnym spôsobom.

   Výtery musia byť odobraté od počtu vtákov uvedeného v písm. a) alebo od všetkých vtákov v podozrivom chove, ak je prítomný menší počet vtákov. Odber vzoriek sa musí zamerať na vtáky vykazujúce klinické príznaky choroby.

   Kloakálne výtery musia byť obalené vo výkaloch (optimálne 1 g). Ak je z akéhokoľvek dôvodu nepraktické odoberať kloakálne výtery zo živých vtákov, ako alternatíva môžu poslúžiť starostlivo odobrané vzorky čerstvých výkalov.

   Často je praktické odoberať tracheálne/orofaryngeálne výtery z ústnej dutiny.

   Hneď ako sú známe rastové charakteristiky vírusu, príslušný orgán môže rozhodnúť zvoliť si radšej buď tracheálne/orofaryngeálne, alebo kloakálne výtery, než odoberať tieto výtery v závislosti od toho, či sa vírus reprodukuje lepšie v dýchacom alebo žalúdočno-črevnom trakte, a taktiež berúc do úvahy príslušný druh.

b) Štandardným súborom vzoriek na sérologické testovavnie je minimálne 20 vzoriek krvi.

   Vzorky sa musia odobrať od počtu vtákov uvedeného v písm. b) alebo od všetkých vtákov v chove, ak je prítomný menší počet vtákov. Pri odbere vzoriek sa treba zamerať na vtáky, ktoré sa javia choré alebo ktoré sa zjavne zotavili.

   Príslušný orgán môže rozhodnúť, že netreba odobrať úplný rozsah štandardných vzoriek, ale že namiesto neho možno odobrať podsúbor štandardných vzoriek.

5. **Preprava vzoriek**

Mimoriadnu pozornosť treba venovať skladovaniu a preprave vzoriek do laboratória na testovanie.

Výtery musia byť ihneď ochladené na ľade alebo balíkmi zmrazeného gélu a dodané do laboratória čo možno najrýchlejšie. Pokiaľ to nie je absolútne nevyhnutné, vzorky nesmú byť zmrazené. Ak nie je zaručená rýchla preprava do 24 hodín do laboratória, vzorky musia byť ihneď zmrazené, skladované a následne prepravené na suchom ľade.

Okrem toho, nie ako alternatíva k ochladeniu, výtery musia byť vložené do antibiotického alebo špecifického média na prepravu vírusov pri teplote 4 °C, tak aby boli úplne ponorené. Ak takéto médium neexistuje, tak sa výtery musia vrátiť do obalu a dodať do laboratória na testovanie v suchom stave.

Skladovanie a preprava vzoriek môžu byť ovplyvnené celým radom faktorov, takže vybratý spôsob prepravy musí byť vhodný na tento účel.

6. **Antibiotické médium**

Základom antibiotického média uvedeného v bode 5 musí byť fosforečnanom regulovaný fyziologický roztok s hodnotou pH 7,0 – 7,4 (skontrolované po pridaní antibiotík).

Médiá na báze proteínov, ako je mozgovo-srdcová infúzia alebo tris- (trishydroxymethylaminomethanom)-regulovaná živná pôda s tryptózou, môžu zvýšiť stálosť vírusu, najmä počas prepravy. Použité antibiotiká a ich koncentrácie sa môžu meniť tak, aby vyhovovali miestnym podmienkam a dostupnosti.

Pre vzorky výkalov môžu byť potrebné veľmi vysoké hladiny antibiotík a príslušnými hladinami sú: 10 000 IU/ml penicilín, 10 mg/ml streptomycín, 0,25 mg/ml gentamycín a 5 000 IU/ml nystatín. Tieto hladiny môžu byť v prípade tkanív a tracheálnych výterov znížené až päťnásobne.

Ak je žiaduca kontrola chlamýdií, musí sa pridať 0,05 – 0,1 mg/ml oxytetracyklínu.

7. **Médium mozgovo-srdcová infúzia**

Roztok musí byť pripravený vo vode a obsahovať 15 % hm/obj. práškového vývaru mozgovo-srdcovej infúzie, pred sterilizáciou (autoklávovaním pri teplote 121 °C/15 minút).

Po sterilizácii sa musia pridať tieto antibiotiká: 10 000 IU/ml penicilín G, 20 µg amphotericín B a 1 000 µg/ml gentamycín. Médiá sa môžu uskladňovať pri teplote 4 °C maximálne dva mesiace.

8. **Postupy, ktoré sa musia uplatniť, pokiaľ ide o príslušné ustanovenia smernice 2005/94/ES**

8.A. Podozrenia na ohniská

8.1. *Článok 7 ods. 1 – Opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v chovoch, kde je podozrenie na výskyt ohnísk*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, v ktorom je podozrenie na ohnisko, musia sa uplatniť tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove. Úradný veterinárny lekár musí zdokumentovať v kontrolnej správe údaje o dennej úmrtnosti, o dennej produkcii vajec a o dennom príjme krmiva a/alebo vody za obdobie začínajúce jeden týždeň pred dátumom začatia klinických príznakov vtáčej chrípky a končiace dátumom kontroly chovu úradným veterinárnym lekárom.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Pokiaľ príslušný orgán nie je presvedčený, že podozrenie na ohnisko možno vylúčiť na základe klinickej prehliadky v súlade s písm. a) a b), z každej výrobnej jednotky sa musia odobrať štandardné vzorky.

d) Nezávisle od negatívnych výsledkov testovania štandardných vzoriek a v závislosti od miestnych faktorov sa pred zrušením úradného sledovania musí vykonať klinická prehliadka hydiny v každej výrobnej jednotke.

8.2. *Článok 10 ods. 3 – Dodatočné opatrenia na základe epidemiologického vyšetrenia*

V každej výrobnej jednotke sa musia odobrať štandardné vzorky z hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, ktoré sú usmrtené.

8.B. Vysokopatogénna vtáčia chrípka (HPAI)

8.3. *Článok 11 ods. 4 – Opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v prípadoch hydiny vyliahnutej z vajec odobratých z chovov, kde sa potvrdili ohniská*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov s hydinou, ktorá sa vyliahla už z vajec odobratých počas inkubačnej lehoty na hospodárstve, na ktorom sa potvrdila vysokopatogénna vtáčia chrípka (HPAI), musia sa uplatniť tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove. Úradný veterinárny lekár musí zdokumentovať v kontrolnej správe údaje o dennej úmrtnosti a údaje o dennom príjme krmiva a/alebo vody, ak sú k dispozícii, za obdobie začínajúce jeden týždeň pred dátumom začatia výskytu klinických príznakov vysokopatogénnej vtáčej chrípky (HPAI) a končiace dátumom kontroly farmy úradným veterinárnym lekárom.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky a klinické vyšetrenie hydiny, najmä takej, ktorá sa javí chorá alebo ktorá nerastie podľa očakávania.

c) Štandardné vzorky sa musia odobrať z hydiny vo veku od dvoch do troch týždňov.

d) Úradné sledovanie chovu môže byť zrušené po klinickom vyšetrení hydiny staršej ako 21 dní a v prípade negatívnych výsledkov testovania štandardných vzoriek.

8.4. *Článok 13 ods. 2 písm. b) – Výnimky týkajúce sa určitých chovov*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, ktorému bola udelená výnimka z prvého pododseku článku 11 ods. 2 smernice 2005/94/ES, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Namiesto štandardných vzoriek sa musia na laboratórne testovanie odoberať tieto vzorky 21 dní po dátume posledného pozitívneho nálezu vysokopatogénnej vtáčej chrípky (HPAI) z každej výrobnej jednotky a v 21-dňových intervaloch:

   i) vzorky z akejkoľvek mŕtvej hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, prítomných v čase odberu vzoriek;

   ii) tam, kde je to praktické, tracheálne/orofaryngeálne a kloakálne výtery z najmenej 60 kusov hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí alebo všetkých kusov takejto hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, keď je ich v chove menej ako 60; alebo ak sú vtáky malé, exotické a nie sú zvyknuté na manipuláciu alebo manipulácia s nimi by predstavovala pre ľudí nebezpečenstvo, musia sa odobrať vzorky čerstvých výkalov.

   Na základe výsledkov posúdenia rizika môže však príslušný orgán udeliť výnimky z veľkosti vzorky uvedenej v bodoch i) a ii).

d) Odber vzoriek uvedených v písm. c) a laboratórne testovanie takýchto vzoriek musí pokračovať dovtedy, kým sa nezískajú dva po sebe nasledujúce negatívne laboratórne výsledky, medzi ktorými musí uplynúť minimálne 21 dní.

8.5. *Článok 15 ods. 1 a 3 – Opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v kontaktných chovoch*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne kontaktný chov, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove. Úradný veterinárny lekár musí zdokumentovať v kontrolnej správe z farmy údaje o dennej úmrtnosti a údaje o dennom príjme krmiva a/alebo príjme vody, ak sú k dispozícii, za obdobie začínajúce jeden týždeň pred dátumom kontaktu s kŕdľom, u ktorého je podozrenie, že je infikovaný vtáčou chrípkou, a končiace dátumom kontroly chovu úradným veterinárnym lekárom.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Ak sa vyskytujú klinické príznaky u hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí alebo ak sú prítomné náznaky zvýšenia dennej úmrtnosti (> 3-násobok bežnej úmrtnosti kŕdľa), poklesu dennej produkcie vajec (> 5 %) alebo poklesu denného príjmu krmiva a/alebo vody (> 5 %), z každej výrobnej jednotky sa musia okamžite odobrať štandardné vzorky.

d) Ak nie sú žiadne príznaky uvedené v písm. b) a c), štandardné vzorky sa musia odobrať 21 dní po dátume posledného podozrivého kontaktu s infikovaným chovom alebo vtedy, keď sú hydina alebo ostatné vtáctvo žijúce v zajatí usmrtené.

8.6. *Článok 18 písm. b) a c) – Sčítanie a inšpekcie zo strany úradného veterinárneho lekára a sledovanie chovov v ochrannom pásme*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne komerčný chov, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove. Ak sú prítomné náznaky zvýšenia dennej úmrtnosti (> 3-násobok bežnej úmrtnosti kŕdľa), poklesu dennej produkcie vajec (> 5 %) alebo poklesu denného príjmu krmiva a/alebo vody (> 5 %), z každej výrobnej jednotky sa musia okamžite odobrať štandardné vzorky.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Ak sa u daných druhov hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí neočakáva, že sa u nich jednoznačne prejavia klinické náznaky choroby, alebo ak ide o vakcinované vtáky, príslušný orgán môže rozhodnúť na základe výsledku posúdenia rizika o tom, že štandardné vzorky sa musia odobrať z každej výrobnej jednotky.

d) Na základe výsledkov posúdenia rizika musí príslušný orgán rozhodnúť o ďalšom úradnom sledovaní formou klinických prehliadok a odberu vzoriek na laboratórne testy v cielených chovoch, úsekoch alebo chovných druhoch.

8.7. *Článok 19 písm. f) – Opatrenia, ktoré sa musia uplatňovať v chovoch v ochranných pásmach*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, v ktorom bola hlásená zvýšená chorobnosť, úmrtnosť alebo zmena produkčných údajov, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu. Ak sú prítomné náznaky zvýšenia dennej úmrtnosti (> 3-násobok bežnej úmrtnosti kŕdľa), poklesu dennej produkcie vajec (> 5 %) alebo poklesu denného príjmu krmiva a/alebo vody (> 5 %), z každej výrobnej jednotky sa musia okamžite odobrať štandardné vzorky.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

8.8. *Článok 23 písm. b) – Výnimky pre priamu prepravu hydiny na okamžitú porážku*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, ktorému bola udelená výnimka z článku 22 smernice 2005/94/ES, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia klinického priebehu a klinických prehliadok celej hydiny, najmä takej, ktorá sa javí byť chorá, menej ako 24 hodín pred časom odsunu hydiny.

c) Na základe výsledkov posúdenia rizika zo strany príslušného orgánu a namiesto štandardných vzoriek sa z hydiny z každej výrobnej jednotky, ktorá má byť zaslaná na bitúnok, musí menej ako 48 hodín pred časom odsunu hydiny odobrať aspoň 60 tracheálnych/orofaryngeálnych a/alebo 60 kloakálnych výterov.

8.9. *Článok 25 písm. b) – Výnimky pre priamy prevoz nosníc pred znáškou*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, ktorému bola udelená výnimka z článku 22, pred priamym prevozom nosníc pred znáškou, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia klinického priebehu a klinických prehliadok hydiny, najmä takej, ktorá sa javí byť chorá menej ako 24 hodín pred odsunom hydiny pred znáškou.

c) Na základe výsledkov posúdenia rizika zo strany príslušného orgánu a namiesto štandardných vzoriek sa z hydiny z každej výrobnej jednotky, ktorá má byť prepravovaná, musí menej ako 48 hodín pred časom odsunu hydiny pred znáškou odobrať aspoň 60 tracheálnych/orofaryngeálnych a/alebo 60 kloakálnych výterov.

8.10. *Článok 26 ods. 1 písm. a) – Výnimka pre priamu prepravu násadových a konzumných vajec*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov s rodičovským kŕdľom, ktorému bola udelená výnimka z článku 22, pred priamym prevozom násadových vajec, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky každých 15 dní.

c) Štandardné vzorky musia byť odobraté z každej výrobnej jednotky.

8.11. *Článok 29 ods. 1 – Trvanie opatrení*

Opatrenia, ktoré sa uplatňujú v ochrannom pásme v súlade s oddielom 3 kapitoly IV smernice 2005/94/ES, sa môžu zrušiť najskôr 21 dní po dátume ukončenia predbežnej očisty a dezinfekcie infikovaného chovu za predpokladu, že:

a) Všetky komerčné chovy nachádzajúce sa v ochrannom pásme boli prehliadnuté úradným veterinárnym lekárom a všetky kontroly a klinické prehliadky a laboratórne testy uvedené v bode 8.6 písm. a), b) a c) a v bode 8.7 poskytli negatívne výsledky.

b) Všetky identifikované nekomerčné chovy v ochrannom pásme boli prehliadnuté úradným veterinárnym lekárom a ani klinické vyšetrenie, ani výsledky žiadnych vykonaných laboratórnych testov neviedli k podozreniu na infikovanie vtáčou chrípkou.

c) Každé ďalšie vykonávané úradné sledovanie uvedené v bode 8.6 písm. d) poskytlo negatívne výsledky.

8.12. *Článok 30 písm. g) – Opatrenia, ktoré sa musia uplatňovať v pásmach dozoru*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, v ktorom bola hlásená zvýšená chorobnosť, úmrtnosť alebo zmena údajov o chove, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Štandardné vzorky musia byť odobraté z každej výrobnej jednotky.

8.13. *Článok 35 – Vyšetrovanie v prípade podozrenia na výskyt HPAI na bitúnkoch a v dopravných prostriedkoch*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov pôvodu vtákov na bitúnkoch alebo v dopravných prostriedkoch, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove.

b) Klinická prehliadka v každej výrobnej jednotke vrátane vyhodnotenia jej klinického priebehu a klinických vyšetrení hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, berúc do úvahy konzultácie s úradným veterinárnym lekárom na bitúnku, ktorý musí poskytnúť podrobné údaje o každej predchádzajúcej prehliadke a o výsledkoch vyšetrení pred usmrtením a po usmrtení.

c) Pokiaľ príslušný orgán nie je presvedčený, že podozrenie na výskyt HPAI možno vylúčiť na základe veterinárneho vyšetrenia v súlade s písm. a) a b), z každej výrobnej jednotky sa musia odobrať štandardné vzorky.

d) Okrem štandardných vzoriek sa musia dodať na laboratórne testy vzorky z aspoň piatich chorých, mŕtvych alebo na bitúnku porazených vtákov s patologickými nálezmi.

8.14. *Článok 36 ods. 1 – Opatrenia, ktoré sa uplatňujú na bitúnkoch*

Po ukončení vyšetrovaní uvedených v bode 8.13 a za predpokladu, že výsledky laboratórnych testov sú negatívne a že neexistuje žiadne klinické podozrenie na výskyt HPAI v chove pôvodu a na bitúnku, úradný dohľad sa môže zrušiť.

8.15. *Článok 37 ods. 1 a 2 – Opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať na hraničných kontrolných staniciach alebo v dopravných prostriedkoch*

8.15.1. Ak úradný veterinárny lekár vyšetrí hydinu alebo iné v zajatí žijúce vtáctvo držané v izolácii, ktoré boli premiestnené z hraničnej kontrolnej stanice alebo z dopravných prostriedkov v dôsledku podozrenia na HPAI alebo jej potvrdenia, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola príslušných dokumentov a záznamov, pokiaľ takéto záznamy existujú.

b) Klinické vyšetrenie takejto hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, ktoré sú v izolácii, a klinická prehliadka akejkoľvek inej hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, najmä takých, ktoré sa javia byť choré.

c) Štandardné vzorky sa musia odobrať z hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, vybraných z rôznych prepraviek alebo klietok.

8.15.2. Ak úradný veterinárny lekár prehliadne identifikovaný chov pôvodu, v prípade, že hydina alebo iné vtáctvo žijúce v zajatí sú usmrtené, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove.

b) Klinická prehliadka v každej výrobnej jednotke vrátane vyhodnotenia jej klinického priebehu a klinických vyšetrení hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, berúc do úvahy konzultácie s úradným veterinárnym lekárom na bitúnku, ktorý musí poskytnúť podrobné údaje o každej predchádzajúcej prehliadke a o výsledkoch vyšetrení pred usmrtením a po usmrtení.

c) Pokiaľ príslušný orgán nie je presvedčený, že podozrenie na výskyt HPAI možno vylúčiť na základe veterinárneho vyšetrenia v súlade s písm. a) a b), z každej výrobnej jednotky sa musia odobrať štandardné vzorky.

d) Okrem štandardných vzoriek uvedených v písm. c) sa musia dodať na laboratórne testy vzorky z aspoň piatich chorých, mŕtvych alebo na bitúnku porazených vtákov s patologickými nálezmi.

e) Za predpokladu, že výsledky laboratórnych testov vzoriek uvedených v písm. c) a d) sú negatívne a že neexistuje žiadne klinické podozrenie na výskyt HPAI v chove pôvodu a na bitúnku, úradný dohľad sa môže zrušiť.

8.C. Nízkopatogénna vtáčia chrípka (LPAI)

8.16. *Článok 39 ods. 6 písm. b) a h) – Opatrenia, ktoré sa uplatňujú v chovoch, kde sa potvrdili ohniská LPAI*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov pred prevozom hydiny na bitúnok alebo chov, v ktorom sa nachádza hydina, ktorá sa vyliahla už z vajec odobratých počas inkubačnej lehoty na hospodárstve, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jeho klinického priebehu a klinických vyšetrení hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí.

c) Štandardné vzorky sa musia odobrať z vtákov z každej výrobnej jednotky, ktoré sa majú zaslať na bitúnok menej ako 48 hodín pred časom odsunu hydiny.

d) Štandardné vzorky sa musia odobrať z každej výrobnej jednotky z hydiny, ktorá sa vyliahla už z vajec odobratých počas inkubačnej lehoty.

8.17. *Článok 40 ods. 2 písm. b) – Výnimka pre určité chovy z opatrení, ktoré sa uplatňujú v prípade potvrdenia ohnísk*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, ktorému bola udelená výnimka z článku 39 ods. 2 a písmena b) článku 39 ods. 5 smernice 2005/94/ES, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iného vtáctva chovaného v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Namiesto štandardných vzoriek sa musia na laboratórne testovanie odoberať tieto vzorky 21 dní po dátume posledného pozitívneho nálezu nízkopatogénnej vtáčej chrípky (LPAI) z každej výrobnej jednotky a v 21-dňových intervaloch:

i) vzorky z akejkoľvek mŕtvej hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí prítomných v čase odberu vzoriek;

ii) tracheálne/orofaryngeálne a kloakálne výtery zo 60 kusov hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí alebo všetkých kusov takejto hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, keď je ich v chove menej ako 60; alebo ak je hydina alebo iné vtáky žijúce v zajatí malé, exotické a nie sú zvyknuté na manipuláciu alebo manipulácia s nimi by predstavovala pre ľudí nebezpečenstvo, musia sa odobrať vzorky čerstvých výkalov.

Na základe výsledkov posúdenia rizika však môže príslušný orgán udeliť výnimky z veľkosti vzorky uvedenej v bodoch i) a ii).

d) Odber vzoriek uvedených v písm. c) a laboratórne testovanie takýchto vzoriek musí pokračovať dovtedy, kým sa nezískajú dva po sebe nasledujúce negatívne laboratórne výsledky, medzi ktorými musí uplynúť minimálne 21 dní.

8.18. *Článok 42 ods. 1 a ods. 3 – Opatrenia, ktoré sa uplatňujú v kontaktných chovoch*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne kontaktný chov, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Štandardné vzorky sa musia odobrať z každej výrobnej jednotky alebo ak sú hydina alebo iné vtáky žijúce v zajatí usmrtené.

8.19. *Článok 44 ods. 1 písm. b) – Opatrenia, ktoré sa uplatňujú v zónach s obmedzeným pohybom*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne komerčný chov v zóne s obmedzeným pohybom, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iných vtákov chovaných v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Štandardné vzorky musia byť odobraté z každej výrobnej jednotky.

d) Na základe výsledkov posúdenia rizika musí príslušný orgán rozhodnúť o ďalšom úradnom sledovaní formou klinických prehliadok a odberu vzoriek na laboratórne testy v cielených chovoch, častiach alebo výrobných druhoch.

8.20. *Článok 45 písm. a) a b) – Trvanie opatrení*

Opatrenia, ktoré sa uplatňujú v zóne s obmedzeným pohybom v súlade s oddielom 3 kapitoly V smernice 2005/94/ES, môžu byť zrušené najskôr 21 dní po dátume predbežnej očisty a dezinfekcie infikovaných chovov po depopulácii chovu alebo najskôr 42 dní po dátume potvrdenia LPAI za predpokladu že:

a) všetky komerčné chovy v zóne s obmedzeným pohybom boli prehliadnuté úradným veterinárnym lekárom a boli vykonané všetky laboratórne testy vzoriek uvedených v písm. c) a d) bodu 8.13 a ich výsledky sú k dispozícii;

b) sú k dispozícii výsledky všetkých ďalších klinických prehliadok a laboratórnych testov, ktoré môžu zahŕňať nekomerčné chovy, s cieľom stanoviť riziko šírenia LPAI;

c) príslušný orgán je na základe výsledku posúdenia rizika, berúc do úvahy epidemiologickú situáciu a výsledky laboratórnych testov uvedených v písm. a) a b), presvedčený že riziko šírenia LPAI je zanedbateľné; z takéhoto posúdenia je možno usúdiť, že v prípade pozitívnych sérologických nálezov a negatívnych virologických nálezov môžu byť obmedzenia zrušené.

8.D. Opatrenia zamerané na zamedzenie šírenia vírusov chrípky vtáčieho pôvodu na iné druhy

8.21. *Článok 47 ods. 1 a 6 – Laboratórne testy a iné opatrenia týkajúce sa ošípaných a ostatných druhov*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne chov, v ktorom sa zdržiavajú ošípané, po potvrdení vtáčej chrípky, musia sa vykonať tieto opatrenia:

a) Ak takéto záznamy existujú, kontrola produkčných a zdravotných záznamov o chove.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinického priebehu a klinických vyšetrení ošípaných, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Nosné/orofaryngeálne výtery z aspoň 60 ošípaných z každej výrobnej jednotky alebo od všetkých ošípaných, ak je vo výrobnej jednotke prítomných menej ako 60 ošípaných, sa musia odobrať pred dňom alebo v deň, keď bude infikovaná hydina alebo iné vtáky žijúce v zajatí zabité. Musí sa odobrať najmenej 60 vzoriek krvi z ošípaných, dva až štyri týždne po dátume zabitia. Vzorky musia byť odobraté takým spôsobom, aby sa získala aspoň jedna vzorka z každej zo skupín ošípaných, ktoré sú vzájomne v priamom kontakte.

d) Premiestnenie ošípaných do iných chovov možno povoliť, ak aspoň 60 nazálnych/orofaryngeálnych výterov a 60 vzoriek krvi od ošípaných z každej výrobnej jednotky 14 dní po dátume pozitívnych nálezov na prítomnosť vtáčej chrípky poskytlo negatívne výsledky.

Premiestnenie ošípaných na bitúnok možno povoliť, ak aspoň 60 nazálnych/orofaryngealnych výterov z každej výrobnej jednotky 14 dní po dátume pozitívnych nálezov na prítomnosť vtáčej chrípky poskytlo negatívne výsledky.

V prípade nepreukazujúcich alebo pozitívnych laboratórnych výsledkov akékoľvek ďalšie vyšetrenia vyžadované na vylúčenie infekcie alebo na prenos vtáčej chrípky medzi ošípané.

e) V prípade, že úradný veterinárny lekár má podozrenie, že iné domáce cicavce na hospodárstvách, najmä tie s identifikovanou vnímavosťou infekcií subtypmi H5 a H7 vírusov vtáčej chrípky, mohli byť v kontakte s infikovanou hydinou alebo s inými vtákmi žijúcimi v zajatí, musia sa odobrať vzorky na laboratórne testy.

8.E. Opätovná obnova populácie

8.22. *Článok 49 ods. 3 písm. a) a c) – Opätovná obnova populácie v chovoch*

Ak úradný veterinárny lekár prehliadne komerčný chov, v ktorom sa vykonala opätovná obnova populácie, musia sa uplatniť tieto opatrenia:

a) Kontrola produkčných a zdravotných záznamov chovu.

b) Klinická prehliadka každej výrobnej jednotky vrátane vyhodnotenia jej klinickej histórie a klinických vyšetrení hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí, najmä tých, ktoré sa javia choré.

c) Namiesto štandardných vzoriek sa musia z každej výrobnej jednotky odobrať tieto vzorky:

i) najmenej 20 vzoriek krvi, hneď ako bude hydina zaradená do chovu, okrem jednodňových kurčiat; ak to pripadá do úvahy, takýto odber vzoriek sa môže vykonať v chove pôvodu hydiny pred jej premiestnením do chovu určeného na opätovnú obnovu populácie;

ii) vzorky mŕtvej hydiny alebo výtery odobraté z ich kadavérov z maximálne 10 mŕtvych vtákov týždenne počas 21-dňového obdobia od dátumu opätovnej obnovy populácie.

d) V prípade, že daný chov bol predtým infikovaný HPAI, 20 tracheálnych/orofaryngeálnych a 20 kloakálnych výterov sa musí odobrať aj od vodného vtáctva (kačice/husi) z každej výrobnej jednotky tam, kde to pripadá do úvahy, v priebehu posledného týždňa 21-dňového obdobia od dátumu opätovnej obnovy populácie.

e) Ak bol daný chov predtým infikovaný LPAI, musí sa odobrať z každej výrobnej jednotky 20 tracheálnych/orofaryngeálnych a 20 kloakálnych výterov a 20 vzoriek krvi.

8.F. Vakcinácia

8.23. *Článok 56 ods. 2 písm. i) – Preventívna vakcinácia hydiny a iného vtáctva žijúceho v zajatí*

V prípade, že divý vírus je známy, musia sa u vakcinovanej hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí vykonať s použitím schválených vzoriek DIVA laboratórne testy, ako sa uvádza v kapitole IX smernice 2005/94/ES.

Ak sa používajú vtáky na indikovanie nákazy (sentinel), musia byť prítomné v každom vakcinovanom kŕdli, musia sa klinicky prezrieť a testovať s použitím hemaglutinačného inhibičného testu (HI). Na tieto účely sa musí odobrať 20 vzoriek krvi z nevakcinovaných vtákov na indikovanie nákazy (sentinel) v každom vakcinovanom chove aspoň každých 60 dní.

8.24. *Príloha IX – Požiadavky na premiestňovanie hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí a výrobkov z hydiny uplatniteľné vzhľadom na núdzovú vakcináciu*

S cieľom minimalizovať riziko ďalšieho šírenia infekcie AI sa musia na premiestňovanie živej hydiny a ostatných vtákov žijúcich v zajatí a ich vajec uplatňovať prísne monitorovacie opatrenia.

S cieľom minimalizovať riziko ďalšieho šírenia infekcie AI v rámci a mimo oblasti vakcinácie sa na tie isté účely musia na začiatku núdzovej vakcinačnej kampane uplatňovať rovnaké monitorovacie opatrenia týkajúce sa premiestňovania živej hydiny a iného vtáctva žijúceho v zajatí a ich vajec.

a) Pred prvým premiestnením v rámci oblasti vakcinácie násadových vajec a konzumných vajec a mimo nej a potom aspoň každých 30 dní musí úradný veterinárny lekár vykonať tieto opatrenia:

   i) klinickú prehliadku nevakcinovanej rodičovskej alebo nosnej hydiny v každej výrobnej jednotke vrátane vyhodnotenia klinického priebehu a klinických vyšetrení hydiny, najmä tej, ktorá sa javí chorá; štandardné vzorky sa musia odobrať z hydiny z každej výrobnej jednotky, alebo

   ii) klinickú prehliadku nevakcinovanej rodičovskej alebo nosnej hydiny v každej výrobnej jednotke vrátane vyhodnotenia klinického priebehu a klinických vyšetrení vtákov na indikovanie nákazy (sentinel) prítomných v týchto kŕďoch; od takýchto vtákov na indikovanie nákazy (sentinel) sa musia odobrať štandardné vzorky.

b) Na účely premiestnenia živej vakcinovanej hydiny alebo iného vtáctva žijúceho v zajatí do iných chovov alebo premiestnenia živej vakcinovanej hydiny v rámci alebo mimo oblasti vakcinácie musí úradný veterinárny lekár vykonať tieto opatrenia:

   i) kontrolu produkčných a zdravotných záznamov chovu;

   ii) klinickú prehliadku v každej výrobnej jednotke vrátane vyhodnotenia klinického priebehu a klinických vyšetrení hydiny a iného vtáctva žijúceho v zajatí v čase 72 hodín pred odsunom, pričom sa musí mimoriadna pozornosť venovať vtákom na indikovanie nákazy (sentinel);

   iii) v prípade, že výsledky kontrol a klinickej prehliadky a vyšetrení uvedených v bodoch i) a ii) nie sú uspokojivé, musia sa odobrať štandardné vzorky od vtákov na indikovanie nákazy (sentinel); ak sú však tieto výsledky uspokojivé, musia sa odobrať tieto vzorky:

      — vakcinovaná hydina alebo ostatné vtáky žijúce v zajatí: aspoň 20 tracheálno/orofaryngeálnych a 20 kloakálnych výterov a 20 vzoriek krvi určených na použitie s vhodnou vzorkou DIVA v čase 72 hodín pred odsunom a

      — vtáky na indikovanie nákazy (sentinel): 20 tracheálno/orofaryngeálnych a 20 kloakálnych výterov a 20 vzoriek krvi na účely sérológie s použitím testu HI pred odsunom.

KAPITOLA V

Diagnostické virologické testy a vyhodnotenie výsledkov

1. Až do príchodu a vývoja molekulárnych testov bola izolácia vírusu inokuláciou embryonovaných hydinových vajec považovaná za zďaleka najcitlivejší diagnostický test na vtáčiu chrípku a zásadný pre následnú identifikáciu a charakterizáciu infikujúceho vírusu. Hlavné kroky sú uvedené v tejto kapitole.

2. **Spracovanie vzorky**

Ak sa výtery dodávajú „suché“, musia sa vložiť do dostatočného množstva antibiotického média tak, aby boli úplne ponorené. Vzorky môžu byť spojené do dávok po päť za predpokladu, že pochádzajú z toho istého druhu, že boli získané v tom istom čase a v tej istej epidemiologickej jednotke.

Kadavéry dodávané do laboratórií musia byť podrobené vyšetreniu po usmrtení a musia sa odobrať vzorky z nasledujúcich orgánov: výkaly alebo obsah čriev, mozgové tkanivo, priedušnica, pľúca, pečeň, slezina a iné zjavne postihnuté orgány. Tieto orgány a tkanivá môžu byť spojené, ale samostatné ošetrenie výkalov je podstatné.

Vzorky výkalov a orgány musia byť homogenizované (v priloženom miešadle alebo s použitím tĺčika a mažiara a sterilného piesku) v antibiotickom médiu a upravené na 10 – 20 % hm/obj. suspenzie v médiu.

Ponorené výtery a suspenzie sa musia ponechať približne dve hodiny pri izbovej teplote (alebo dlhší čas pri teplote 4 °C) a potom vyčíriť odstredením (napríklad 800 až 1 000 x g počas 10 minút).

3. **Izolácia vírusu v embryonovaných hydinových vajciach**

Vyčírená kalová kvapalina sa musí inokulovať v množstvách 0,1 – 0,2 ml do alantoickej dutiny každého z minimálne štyroch embryonovaných hydinových vajec, ktoré boli inkubované 9 – 11 dní. Ideálne je, aby takéto vajcia boli získané od kŕdľa bez výskytu špecifikovaných patogénov (SPF), ak je však toto prakticky nemožné, môžu sa použiť vajcia získané z kŕdľa, u ktorého sa preukázalo, že je bez výskytu protilátok na vtáčiu chrípku (sérum negatívne na protilátku – SAN).

Inokulované vajcia sa musia skladovať pri teplote 37 °C a musia sa každý deň presvecovať. Vajcia s mŕtvymi alebo umierajúcimi embryami po vyplávaní a všetky ostatné vajcia šesť dni po inokulácii sa musia schladiť na 4 °C a alantoicko-amniotické tekutiny sa testujú na hemaglutinačnú aktivitu. Ak sa nezistí žiadna hemaglutinácia, tak sa tento postup musí zopakovať s použitím nezriedenej alantoicko-amniotickej tekutiny ako inokulum. Ak sa zistí hemaglutinácia, prítomnosť baktérií sa musí vylúčiť kultiváciou. Ak sú prítomné baktérie, tekutiny sa môžu prefiltrovať cez 450 nm membránový filter, môžu sa pridať ďalšie antibiotiká a inokulovať do embryonovaných vajec, ako sa už uviedlo.

S cieľom urýchliť stanovenie diagnózy niektoré laboratóriá používali dve trojdňové filtrácie alebo dvojdňovú a štvordňovú filtráciu a hlásili výsledky porovnateľné s dvomi šesťdňovými filtráciami, toto však ešte nebolo úplne vyhodnotené.

Pozitívne tekutiny sa musia testovať, či sú bez výskytu baktérií. Ak sú baktérie prítomné, tekutiny sa môžu prefiltrovať cez 450 nm membránový filter alebo odstrediť s cieľom odstrániť baktérie a po pridaní väčšieho množstva antibiotík vrátiť do vajec.

4. **Diferenciálne diagnostikovanie**

a) Predbežná diferenciácia

Keďže je dôležité, aby kontrolné opatrenia zamerané na obmedzenie šírenia vírusu vtáčej chrípky boli implementované čo možno najskôr, každé národné referenčné laboratórium, ktoré izolovalo hemoglutinačný vírus, musí byť schopné identifikovať tento vírus, či je to vírus chrípky typu A subtypu H5 alebo H7, alebo vírus pseudomoru hydiny. V hemoglutinačných inhibičných testoch sa musia používať hemoglutinačné tekutiny opísané v kapitole IX. Pozitívna inhibícia, ako je titer v rámci 2 – 3 $\log_2$ pozitívnej kontroly, s polyklonálnym antisérom špecifickým pre subtypy H5 alebo H7 chrípky typu A, môže slúžiť ako predbežná identifikácia, ktorá umožňuje uloženie dočasných kontrolných opatrení.

b) Potvrdzujúca identifikácia

Keďže existuje 16 subtypov hemaglutinínu a 9 neuraminidázových subtypov vírusov chrípky a v rámci každého z týchto subtypov sa vyskytujú variácie, nie je prakticky možné ani rentabilné, aby každé národné referenčné laboratórium uchovávalo antiséra, ktoré by umožnili úplnú identifikáciu subtypu izolátov chrípky. Každé národné referenčné laboratórium však musí ako minimum:

i) potvrdiť skutočnosť, že izolát je vírus chrípky typu A s použitím dvojitého imunodifúzneho testu na detekciu skupiny antigénov;

ii) určiť, či izolát patrí, alebo nepatrí k subtypu H5 alebo H7, pozitívna identifikácia si vyžaduje implementáciu kontrolných opatrení na LPAI subtypov H5 a H7;

iii) okamžite zaslať všetky izoláty HPAI a všetky izoláty H5 a H7 do referenčného laboratória Spoločenstva na potvrdenie a úplnú charakterizáciu, pokiaľ nebola udelená výnimka v súlade s písmenom d).

Okrem toho je žiaduce, aby sa v laboratóriách vybavených príslušnými zariadeniami:

iv) vykonal test indexu intravenóznej patogenity u kurčiat vo veku šesť týždňov podľa metódy opísanej v kapitole VII. Indexy intravenóznej patogenity vyššie ako 1,2 naznačujú prítomnosť vírusu a vyžadujú si úplnú implementáciu kontrolných opatrení pre HPAI.

Národné referenčné laboratóriá musia taktiež zvážiť uplatňovanie expertíz a zariadenia, ktoré umožní vykonať sekvenciu nukleotidov génu hemaglutinínu s cieľom stanoviť, či existujú, alebo neexistujú viacnásobné základné aminokyseliny v mieste štiepenia prekurzorového proteínu hemaglutinínu pre akýkoľvek vírus H5 alebo H7 LPAI. Hoci referenčné laboratórium Spoločenstva vykoná stanovenie patogenity s najvyššou prioritou ako súčasť povinností uvedených v prílohe VII bode 2 písm. b) k smernici 2005/94/ES, takáto charakterizácia vírusu na vnútroštátnej úrovni značne skráti čas diagnostikovania a v prípade, že je pozitívna, úplnej implementácie kontrolných opatrení pre HPAI.

c) Ďalšia typizácia a charakteristika izolátov

Referenčné laboratórium Spoločenstva musí získať od národných referenčných laboratórií každý hemaglutinujúci vírus na účely doplnenia antigénnych a genetických štúdií umožňujúcich lepšie pochopiť epizootológiu nákazy (alebo nákaz) vnútri Spoločenstva, v súlade s funkciami a povinnosťami referenčného laboratória Spoločenstva uvedenými v prílohe VII k smernici 2005/94/ES.

Okrem týchto funkcií a povinností musí referenčné laboratórium Spoločenstva vykonať kompletnú antigénnu typizáciu u všetkých obdržaných vírusov chrípky. Pokiaľ ide o vírusy H5 a H7, ktoré nemajú indexy intravenóznej patogenity vyššie ako 1,2, určenie sekvencie nukleotidov hemaglutinačného génu na účely zistenia, či sa nachádzajú alebo nenachádzajú viacnásobné základné aminokyseliny v mieste štiepenia prekurzorového hemaglutinínového proteínu, sa musí vykonať okamžite a národné referenčné laboratórium a príslušný orgán v krajine pôvodu musia byť informované okamžite po obdržaní výsledkov tak, aby sa dali v plnej miere implementovať kontrolné opatrenia pre HPAI.

d) Vzhľadom na epidemiologickú situáciu, pokiaľ ide o HPAI/LPAI, na základe dohody s Komisiou a s referenčným laboratóriom Spoločenstva je možné udeliť výnimku laboratóriám schopným vykonať rýchlu charakterizáciu vírusu, aby predložili podsúbor takýchto vírusov po kontrole údajov a aby referenčné laboratórium Spoločenstva vykonalo príslušnú selekciu. Takáto výnimka sa smie povoliť iba v prípade, keď národné referenčné laboratórium dokáže rýchlo generovať údaje a zdieľať ich s referenčným laboratóriom Spoločenstva.

KAPITOLA VI

Molekulárne testy a vyhodnotenie výsledkov

Súčasná definícia HPAI umožňuje molekulárnu identifikáciu faktorov virulencie a potvrdzuje používanie molekulárnych techník pri diagnostikovaní vtáčej chrípky. V poslednom období bol zaznamenaný vývoj v ich používaní na detekciu a charakterizáciu vírusu vtáčej chrípky priamo z klinických vzoriek od infikovaných vtákov. Konvenčné RT-PCR techniky môžu u klinických vzoriek so správne definovanými primérmi viesť k rýchlej detekcii a identifikácii subtypu (aspoň H5 a H7) plus k PCR amplikónového produktu, ktorý sa môže použiť na analýzu sekvencie nukleotidov, a preukázalo sa, že majú významné uplatnenie z toho dôvodu, že sa dajú rýchlo identifikovať následné ohniská, hneď ako boli zistené primárne infikované priestory a bol charakterizovaný vírus. Jednokrokový RT-PCR „v reálnom čase“ s použitím systémov primérovej/fluorogénovej sondy (rRT-PCR) umožňuje dokonca rýchlejšie a citlivejšie diagnostikovanie detekciou vírusov vtáčej chrípky a stanovenie subtypu H5 alebo H7 v klinických vzorkách.

Dôležitým problémom, pokiaľ ide o systémy RT-PCR a rRT-PCR, je v súčasnosti skutočnosť, že rôzne laboratóriá vyvinuli rôzne systémy, ktoré – hoci úplne legitímne – neboli validované a ani podrobené testom s veľkým počtom vzoriek v rôznych laboratóriách. Referenčné laboratórium Spoločenstva a špecifikované národné referenčné laboratóriá sa zaoberali týmto problémom ako súčasťou projektu financovaného zo strany Spoločenstva (EU AVIFLU) s cieľom vyhotoviť ratifikované protokoly pre konvenčné RT-PCR a rRT-PCR, ktoré by mohli prijať iné národné referenčné laboratóriá. Ak sa testovacie parametre, ako sú obdobia cyklovania a časového sledu, líšia od parametrov odporúčaných v špecifických protokoloch, musí sa preukázať, že sú vhodné na tieto účely ešte pred ich použitím v súlade s odsekom 6 kapitoly I tejto diagnostickej príručky.

Štandardné protokoly pre tieto molekulárne testy a ich vyhodnotenie používané referenčným laboratóriom Spoločenstva nájdete na internetovej stránke:

http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm

KAPITOLA VII

Test patogenity in vivo a vyhodnotenie výsledkov

Virulencia pre kurčatá vírusov chrípky typu A izolovaných z vtákov sa musí stanoviť pomocou testu indexu intravenóznej patogenity (IVPI), ktorý sa musí vykonať takto:

a) Čerstvá infekčná alantoidná tekutina s titrom HA > 1/16 (> 2^4 alebo > $\log_2$ 4, ak je vyjadrená ako obrátená hodnota) z najnižšej dostupnej hladiny filtrácie, najlepšie z prvej izolácie bez akejkoľvek selekcie, sa zriedi v pomere 1/10 v sterilnom izotonickom fyziologickom roztoku.

b) 0,1 ml zriedeného vírusu sa vstrekne intravenózne do každého z desiatich šesťtýždňových kurčiat bez výskytu špecifikovaných patogénov (SPF) alebo šesťdňových kurčiat so sérom negatívnym na protilátky.

c) Vtáky sa vyšetrujú v 24-hodinových intervaloch počas 10 dní. Pri každom pozorovaní bude každý vták bodovo ohodnotený: bežný stav 0, chorý 1, ťažko chorý 2 a mŕtvy 3. To, či je vták chorý alebo ťažko chorý, je vecou subjektívneho klinického posúdenia.

Zvyčajne „choré“ vtáky majú jeden z nasledujúcich príznakov a „ťažko“ choré vtáky viac ako jeden z týchto príznakov: dýchacie ťažkosti, depresia, hnačka, kyanóza vystavenej pokožky alebo podbradových lalokov, opuch tváre a/alebo hlavy, neurologické príznaky. Uhynuté vtáky musia byť bodovo ohodnotené 3 pri každom zo zvyšných denných pozorovaní po uhynutí.

Z dôvodov dobrých podmienok zvierat, ak sú vtáky príliš choré na jedenie alebo pitie, musia byť usmrtené humánnym spôsobom a bodovo ohodnotené ako mŕtve pri najbližšej prehliadke, keďže bez zásahu do 24 hodín uhynú. Tento prísľub je pre akreditačné orgány prijateľný.

d) Index intravenóznej patogentiky (IVPI) predstavuje priemerné bodové hodnotenie jedného vtáka počas jedného pozorovania za 10 dní. Index 3,00 znamená, že všetky vtáky uhynuli v priebehu 24 hodín, a index 0,00 znamená, že počas 10-dňového obdobia pozorovania žiadny vták nevykazoval žiadny klinický príznak.

Jednoduchý spôsob zaznamenávania výsledkov a výpočet indexov je uvedený na tomto príklade:

Klinické príznaky	Deň po inokulácii										Celkové bodové hodnotenie
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
normálne	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 x 0 = 0
choré	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 x 1 = 6
ťažko choré	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 2 = 12
uhynuté	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 x 3 = 228
											Spolu = 246

Poznámky:

10 vtákov pozorovaných počas 10 dní = 100 pozorovaní.

Index = priemerné bodové hodnotenie každého vtáka počas jedného pozorovania = 246/100 = 2,46.

Akýkoľvek vírus chrípky typu A bez ohľadu na subtyp vykazujúci v rámci testu na určenie indexu intravenóznej patogenity hodnotu vyššiu ako 1,2 sa považuje za vírus HPAI.

KAPITOLA VIII

Sérologické testy a vyhodnotenie výsledkov

Uprednostňovanou metódou používanou na preukázanie prítomnosti vírusu chrípky typu A je dokázať existenciu antigénov nukleoproteínu alebo matrixu, ktoré zdieľajú všetky vírusy chrípky typu A.

Toto sa dá vykonať s použitím dvojitých imunodifúznych testov zahŕňajúcich buď prípravky z koncentrovaného vírusu, alebo extrakty z infikovaných chorioalantoidných membrán.

Uprednostňovanými metódami používanými na sérologické testy na protilátky vírusu vtáčej chrípky sú hemaglutinačné testy (HA) a hemaglutinačné inhibičné testy (H1).

Kapitola 2.7.12 príručky o diagnostických testoch a vakcínach pre suchozemské zvieratá Svetovej organizácie pre zdravie zvierat (OIE) obsahuje podrobné informácie o laboratórnych technikách a o vyhodnocovaní výsledkov.

Štandardné protokoly pre tieto sérologické testy a vyhodnotenie ich výsledkov používané referenčným laboratóriom Spoločenstva nájdete na internetovej stránke:

http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm

KAPITOLA IX

Systémy monitorovania súvisiace s vakcináciou

1. **Smernica 2005/94/ES a diagnostická príručka**

Oddielami 2 a 3 kapitoly IX smernice 2005/94/ES sa umožňuje používanie núdzovej a preventívnej vakcinácie za určitých podmienok. Jednou z týchto podmienok je, že sa použije stratégia „DIVA“ (rozlišovanie medzi infikovaných a vakcinovanými zvieratami).

Vakcinácia musí byť zameraná na zabránenie infekcii a následnému šíreniu vírusu medzi kŕdľami. Existuje nesporný dôkaz, ktorý potvrdzuje, že vakcináciou sa zvyšuje množstvo vírusov potrebných na infikovanie vtákov a znižuje sa množstvo vylúčených vírusov. Avšak hoci vakcinované vtáky už naďalej neprejavujú klinické príznaky, ak prídu do styku s nákazou, môžu vírus ďalej šíriť. Takto môžu subtypy H5 a H7 vírusov HPAI nepozorovane cirkulovať, určitý čas v kŕdli sú suboptimálnymi úrovňami imunity rovnako ako vírusy LPAI v nevakcinovanom kŕdli. Musí preto existovať možnosť identifikovať vakcinované kŕdle pozitívne na vírus, ktoré sa infikovali divým vírusom, tak aby sa mohli implementovať iné kontrolné opatrenia ako napríklad porážka.

2. **Používanie indikátorov na monitorovanie infekcie**

Na úrovni kŕdľa je jednoduchou metódu pravidelne monitorovať indikátorové vtáky ponechané nevakcinované v každom vakcinovanom kŕdli, takýto prístup predstavuje určité problémy pre manažment, najmä pri identifikácii indikátorov vo veľkých kŕdľoch. Musí byť zabezpečený kontakt medzi indikátormi a vakcinovanými vtákmi.

3. **Laboratórny test DIVA na monitorovanie infekcie**

Ako alternatíva sa testovanie na vystavenie účinkom poľa môže vykonávať u samotných vakcinovaných vtákov použitím laboratórnych testov DIVA. V posledných rokoch sa vyvinulo niekoľko systémov testovania, ktoré umožňujú aj detekciu stimulovania vakcinovaných vtákov poľom. Jednou z metód, ktorá sa ukázala byť funkčnou, je použitie vakcíny obsahujúcej vírus rovnakého subtypu hemaglutinínu (H), avšak s odlišnou neuraminidázou (N), ako má prevládajúci divý vírus. Protilátky na N divého vírusu pôsobia ako prirodzené markery infekcie.

Tento systém bol použitý v Taliansku po opakovanom výskyte vírusu H7N1 LPAI v roku 2000. S cieľom doplniť priame kontrolné opatrenia bola implementovaná stratégia DIVA s použitím vakcíny obsahujúcej H7N3 na boj s divou infekciou H7N1. Vakcinované a účinkom poľa vystavené vtáky boli diferencované s použitím sérologického testu na zistenie špecifických protilátok proti N1. Rovnaká stratégia sa použila na kontrolu LPAI spôsobeného H7N3 v Taliansku v rokoch 2002 – 2003, v tomto prípade s vakcínou H7N1 a s použitím sérologického testu na stanovenie konkrétnych protilátok proti N3. V obidvoch prípadoch vakcinácia spolu so zničením za použitia tejto stratégie DIVA viedla k eradikácii divého vírusu.

Problémy s týmto systémom vyvstanú vtedy, ak sa objaví taký divý vírus, ktorý má rovnaký antigén N ako existujúci divý vírus, avšak iného subtypu H ako H5 alebo H7, alebo ak subtypy s rovnakými antigénmi N už cirkulujú. Najmä o kačiciach je známe, že sú nosičmi viac ako jedného subtypu. Bolo taktiež potrebné vyvinúť vhodný test, ktorý by umožnil bežné monitorovanie kŕdľov na protilátky antineuraminidázy. V Taliansku bol vyvinutý a používaný „*ad hoc*“ sérologický test založený na nepriamej fluorescenčnej skúške na protilátky, pričom ako antigén sa použijú proteíny N vyjadrené rekombinantmi tyčinkovitého vírusu. Po vyvinutí testu ELISA môžu mať širšie a ľahšie využitie.

Používanie vakcín používajúcich iba HA, ako sú rekombinantné vektorové vakcíny, umožňuje používať na zistenie infekcie u vakcinovaných vtákov klasické AGID testy alebo ELISA testy na báze nukleoproteínu, neštrukturálneho proteínu alebo matrixových proteínov.

Pokiaľ ide o inaktivované vakcíny, bol opísaný test, ktorý zisťuje protilátky na vírusy z neštrukturálnych proteínov, ktoré sa vytvárajú iba počas prirodzenej infekcie. Takýto systém sa musí ešte validovať v teréne, má však svoje obmedzenie v tom zmysle, že prirodzená infekcia kŕdľa akýmkoľvek vírusom chrípky, bez ohľadu na subtyp, má za následok tvorbu protilátok zameraných proti neštrukturálnemu proteínu.

Vývoj rýchlych a citlivých metód na zisťovanie vírusu, najmä takých, ktoré sa dajú automatizovať, ako je RT-PCR v reálnom čase, znamená, že tieto metódy by sa dali použiť na jednoduché, rozšírené a pravidelné testovanie vakcinovaných vtákov na prítomnosť divého vírusu. Zisťovanie pôvodcu však bude limitované na krátke okienko v akútnej fáze infekcie a nedá sa použiť na to, aby sa dalo dospieť k záveru, že kŕdeľ nebol vystavený vírusu v minulosti. Takýto prístup je najvhodnejší na testovanie vakcinovaných vtákov pred ich premiestnením s cieľom potvrdiť, že sú bez výskytu aktívnej infekcie.

Počet vzoriek, ktoré sa majú testovať s použitím vybratých systémov, musí umožniť vylúčenie prevládania infekcie vírusom vtáčej chrípky v kŕdli väčšom ako 15 % s úrovňou spoľahlivosti 95 %.

KAPITOLA X

Stratégie v diagnostikovaní vtáčej chrípky

Ako sa uvádza v prílohe IV k smernici 2005/94/ES, rozhodnutia uplatňovať opatrenia v konkrétnych oblastiach alebo v kontaktných chovoch a závažnosti takýchto rozhodnutí sa môžu meniť so závažnosťou rizika. Je pravdepodobné, že požadované diagnostické potvrdenie choroby bude v rovnováhe s prevažujúcou situáciou, závažnosťou nebezpečenstva a stupňom rizika. Je potrebné, aby veterinárne úrady prijali rozhodnutia o diagnostickom dôkaze, ktorým sa vyváži rýchla kontrola a eradikácia choroby s potenciálnym dosahom nesprávnej diagnózy. Takéto posúdenia sa musia vykonať na základe mnohých faktorov v danom čase, určité situácie sa však dajú predpovedať.

Nákazová situácia	Potenciálny problém	Diagnostické kritériá
žiadne špecifické príznaky, žiadne úradné podozrenie	izolovaný chov	vykonať rýchle zistenie na báze RT-PCR génu M; podľa požiadavky diferenciálne diagnostikovanie
podozrenie na primárne ohnisko	izolovaný chov	vykonať úplné diagnostické testovanie, izoláciu a charakterizáciu vírusu
podozrenie na primárne ohnisko	chov v oblasti s hustou populáciu hydiny	vykonať úplné diagnostické testovanie, izoláciu a charakterizáciu vírusu, koncentrujte sa však na rýchle metódy detekcie a charakterizácie, najmä na tie, ktoré sú založené na RT-PCR a sekvencovaní [1]
podozrenie na druhé a následné ohnisko	izolované chovy, epidemiologicky spojené s podozrením na primárne ohnisko	koncentrujte sa na rýchle metódy detekcie a charakterizácie, najmä na tie, ktoré sú založené na RT-PCR a sekvencovaní [1]
podozrenie na druhé a následné ohnisko	chovy v oblasti s hustou populáciou hydiny alebo s mnohými epidemiologickými súvislosťami	spoliehajte sa na rýchle metódy zistenia, ktoré poskytnú najrýchlejší dôkaz o prítomnosti akéhokoľvek vírusu vtáčej chrípky [1]
podozrenie na viacnásobné ohniská alebo rýchlo sa šíriaca choroba napriek sledovaniu	bez rýchleho zásahu sa šírenie stane nekontrolovateľným	Spoliehajte sa na rýchle metódy zistenia, ktoré poskytnú najrýchlejší dôkaz o prítomnosti akéhokoľvek vírusu vtáčej chrípky, alebo sa spoliehajte na klinické príznaky [1]

[1] V takýchto prípadoch sa musí vykonať úplný odber vzoriek a vzorky sa musia uskladniť na neskoršie vyhodnotenie.

KAPITOLA XI

Diagnostika infekcie vírusmi vtáčej chrípky u ošípaných a ostatných cicavcov

1. **Vtáčia chrípka u ošípaných**

Vírusy vtáčej chrípky ľahko infikujú ošípané a hoci je replikácia vo väčšine prípadov pomerne obmedzená, existuje potenciál, že infikované ošípané by mohli chorobu preniesť na hydinu a iné vnímavé zvieratá. V súčasnosti neexistuje žiadny dôkaz z terénu, že infikované ošípané prenášajú vírusy vtáčej chrípky subtypov H5 a H7.

Skúsenosti získané počas vypuknutia v Holandsku v roku 2003 naznačujú, že ošípané infikované H7N7 nevykazovali žiadne klinické príznaky, ktoré by sa dali pripísať infekcii H7N7. Okrem toho dodnes neboli počas vypuknutia H5N1 v Ázii a ani inde hlásené zjavne žiadne ošípané postihnuté chorobu.

Z toho dôvodu nie je možné spoliehať sa na klinické príznaky, ak sa má indikovať, či sú ošípané infikované, hoci klinický obraz spôsobený infekciou ošípaných inými vírusmi chrípky vtáčieho pôvodu sa môže vyskytnúť, hneď ako sa vírus prispôsobí hostiteľovi. Diagnostikovanie infekcií ošípaných vírusom vtáčej chrípky je v podstate podobné diagnostikovaniu vtáčích druhov, spoliehajúc sa na izoláciu vírusu, molekulárne techniky a detekciu špecifických protilátok s použitím hemaglutinačných inhibičných testov. Existujú však určité rozdiely a žiadny z týchto testov nie je v plnej miere schválený na použitie pre ošípané na potvrdenie infikovania vírusmi vtáčej chrípky .

2. **Vzorky na izoláciu vírusu**

Infekcie ošípaných vírusom vtáčej chrípky sú zvyčajne obmedzené na dýchacie cesty a vzorkami musia byť tkanivá z dýchacích ciest a prípadne orofaryngálne alebo nazálne výtery, prednostne odobraté z ošípaných, ktoré vykazujú príznaky takejto choroby. Tieto vzorky a výtery môžu byť spracované na izoláciu vírusu alebo molekulárnu detekciu vírusu s použitím rovnakých techník opísaných vyššie pre vzorky z vtákov. Ak sa však používajú techniky PCR, musia sa používať správne kontroly, pomocou ktorých sa zabezpečí, aby látky nachádzajúce sa vo vzorkách z ošípaných nebránili šíreniu.

3. **Inokulácia a inkubácia vajec**

S obvyklým postupom izolovania vírusov cicavčej chrípky u 9 až 11-dňových embryonovaných hydinových vajec je inokulovať každé vajce cez alantoidnú dutinu a do amniotickej dutiny. Ak sa však testujú ošípané, ktoré sú v kontakte s vírusmi vtáčej chrípky, v prípade, že vírus mal obmedzenú možnosť prispôsobiť sa, inokulácia alantoidnej dutiny bude pravdepodobne dostačujúca.

Podobne ako teplota inkubácie na izoláciu vírusov cicavčej chrípky typu A sa odporúča teplota 35 °C, ale na druhej strane pre vírusy, ktoré sa iba nedostatočne prispôsobili ošípaným, teplota 37 °C nie je pre izoláciu vírusu škodlivá.

4. **Test na špecifické protilátky pri testoch HI**

Je pravdepodobné, že najcitlivejšími metódami stanovenia infekcií vírusom vtáčej chrípky u ošípaných je izolácia vírusu alebo molekulárna detekcia. Ak sa izolácia alebo detekcia vírusu nevykonávala, u ošípaných boli zistené sérologické reakcie. Testy HI s použitím sér ošípaných si vyžadujú určité úpravy testu používaného pre vtáčie séra uvedeného v kapitole VIII.

Séra ošípaných sú notoricky známe svojou vlastnosťou nešpecifickej inhibície v testoch HI, a preto musí byť každá vzorka séra ošetrená receptorom – ničiacim enzýmom (RDED), aby sa zabránilo výskytu vyššie uvedeného. Musí sa použiť táto metóda:

a) K 100 µl prasačieho antiséra pridajte 400 µl RDE (vopred stanovené pracovné riedenie) a dôkladne premiešajte.

b) Inkubuje 1 hodinu pri teplote 37 °C.

c) Potom inkubujte 30 minút pri teplote 56 °C.

d) Vzorky chlaďte pri teplote 4 °C počas 15 minút.

e) Pridajte 10 µl 30 % (obj./obj. balené bunky) kuracích červených krvných buniek a intenzívne premiešajte.

f) Inkubujte v noci pri teplote 4 °C. Alternatívne, ak je podstatné použiť vzorky v ten istý deň, inkubujte hodinu pri teplote 37 °C a odstreďujte 5 minút 300 x g.

Ošetrené sérum sa potom použije pri testoch HI spôsobom opísaným pre vtáčie sérum v odseku [..], počiatočné zriedenie je 1: 10. Na posúdenie špecifickosti testu HU pre kmeň vírusov, ktorý sa má použiť (pozri použitie kmeňa vírusov pre sérológiu získaného z ohniska; kapitola VIII), sa musí použiť súbor sér ošípaných so známym séronegatívnym štatútom, pokiaľ ide o vtáčiu chrípku. Počas vypuknutia v Holandsku v roku 2003 bolo zistených až 2,6 % nešpecifických reaktorov pri teste HI s použitím prasačích sér, ktoré boli odobraté nezávisle na ohnisku.

5. **Odber vzoriek od ošípaných**

Najmä na farmách, ktoré chovanú aj ošípané aj hydinu, buď spolu alebo v samostatných domoch, sú ošípané ohrozené infikovaním vtáčou chrípkou priamo alebo nepriamo kontaktom s hydinou alebo výrobkami z hydiny. S cieľom vylúčiť takúto infekciu sa musia odobrať orofaryngeálne alebo nazálne výtery spolu so vzorkami krvi v súlade s postupmi opísanými v bode 8.21 kapitoly IV. Vzorky sa musia získať z ošípaných, ktoré vykazujú klinické príznaky choroby. Ak však nevykazujú žiadne klinické príznaky, vzorky sa môžu odobrať náhodne zo všetkých častí domu. Ak sa nachádzajú v laboratóriu, výtery sa musia testovať rýchlymi molekulárnymi testmi alebo izoláciou vírusu, RT-PCR museli byť príslušne schválené a vykazovať citlivosť aspoň rovnocennú izolácii vírusu vo vajciach na vírusy chrípky typu A.

Dva až štyri týždne po zabití hydiny infikovanej vtáčou chrípkou sa musí od ošípaných odobrať najmenej 60 vzoriek krvi takým spôsobom, aby aspoň niektoré vzorky boli získané zo skupín ošípaných, ktoré sú v priamom vzájomnom kontakte. Vzorky sa musia testovať testom HI s použitím vírusu získaného z ohniska hydiny. Vzorky tak z akútnej, ako aj rekonvalescentnej fázy sa musia testovať v rámci toho istého testu. Pozitívne vzorky sa môžu potvrdiť s použitím analýzy neutralizácie vírusu a/alebo analýzou Western blot.

Ak je výsledok testu ktorejkoľvek z týchto vzoriek pozitívny, musí sa vykonať epidemiologické prešetrenie všetkých prasačích fariem, ktoré sa nachádzajú v ochrannom pásme bez ohľadu na to, či ide alebo nejde o zmiešaný typ.

6. **Vírusy vtáčej chrípky u ostatných cicavcov iných ako ošípané**

Musia sa vykonať vyšetrenia ostatných cicavcov iných ako ošípané, ktoré sú vnímavé na vtáčiu chrípku, vrátane mačiek. So špecifickým odkazom na HPAI H5N1, pokiaľ ide o testovanie mačiek, sa musí vykonať toto:

Väčšie patologické lézie súvisiace s vírusovou replikáciou sa koncentrujú v pľúcach a v pečeni, preto musia byť vzorky na virologické vyšetrenia, pokiaľ možno, odobraté z týchto orgánov uhynutých zvierat. U živých zvierat sa musia na detekciu vírusu odobrať, pokiaľ možno, tracheálne/orofaryngeálne výtery. Okrem toho sa môžu samostatne odobrať fekálne výtery.

Vzorky krvi, ktoré sa majú vyšetriť skúškou HI, si vyžadujú ošetrenie teplom pri teplote 56 °C počas 30 minút a ošetrenie RDE možno vynechať.

KAPITOLA XII

Minimálne bezpečnostné požiadavky na prepravu vzoriek

1. Preprava vzoriek, o ktorých je známe, že obsahujú patogény, alebo existuje podozrenie na existenciu patogénov, podlieha prísnym vnútroštátnym a medzinárodným predpisom, ktoré sa musia stále dodržiavať. Izoláty vírusu nie sú klasifikované ako diagnostické vzorky, musia však byť zabalené v súlade s medzinárodnými normami.

Pokyny uvedené v tejto kapitole sú určené pre leteckú prepravu, podobné balenie sa však musí používať aj pri pozemnej alebo námornej preprave vzoriek.

2. **Balenie diagnostických vzoriek na prepravu**

Diagnostickým vzorkám pripravovaným podľa predpisov IATA sa priradí zodpovedajúce identifikačné číslo UN 2814, 2900 alebo 3373.

Kým príjemca nedostane zásielku, je za ňu zodpovedný prepravca, a nie prepravná spoločnosť.

3. **Primárny obal**

a) Primárna(-e) nádoba(-y) musí(-ia) byť vodotesná(-é), napríklad skrutkové uzávery musia byť utesnené parafínovou fóliou alebo lepiacou páskou, alebo sa musia chrániť podobnými ochrannými opatreniami.

b) Ak sú primárne nádoby vo väčšom počte, musia byť zabalené jednotlivo z dôvodu možného rozbitia.

c) Pri stanovovaní objemu prepravovaných diagnostických vzoriek sa musia brať do úvahy médiá na prepravu vírusov.

d) Primárna(-e) nádoba(-y) nesmie(-ú) mať obsah väčší ako 500 ml alebo 500 g.

Celkový obsah primárnej nádoby tvorí diagnostická vzorka.

4. **Druhotný obal**

a) V druhotnom kontajneri sa musí použiť dostatočné množstvo absorpčného materiálu tak, aby dokázalo absorbovať celý obsah primárnych nádob v prípade ich netesnosti alebo poškodenia.

b) Druhotný obal musí spĺňať požiadavky IATA na obaly pre diagnostické vzorky a musí vyhovovať pádovej skúške z výšky 1,2 metra (3,9 stopy). Ak obal infekčnej látky prekračuje požiadavky kladené na obal diagnostickej vzorky v pokyne IATA 602 o obaloch, môže sa použiť.

c) Na obale infekčných látok musia byť uvedené požadované označenia špecifikácie („UN“ sa nachádza v krúžku), napríklad:

„UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450“

d) Druhotný obal musí byť vodotesný. Musia sa dodržiavať pokyny na balenie výrobcu obalu alebo inej autorizovanej strany, ktoré sú súčasťou druhotného obalu.

e) Najmenší celkový vonkajší rozmer druhotného obalu musí byť aspoň 100 mm (štyri palce).

f) Druhotný obal musí byť dostatočne veľký pre sprievodné doklady, ako je napríklad letecký nákladný list.

5. **Vonkajší obal**

a) Obsah vonkajšieho obalu nesmie byť väčší ako 4 litre alebo 4 kg.

b) Ak sa to vyžaduje, z vonkajšej strany druhotného obalu sa musí vložiť suchý ľad alebo mokrý ľad. Ak sa používa suchý ľad, obal musí umožniť únik plynného oxidu uhličitého a nesmie umožniť hromadenie tlaku, ktorý by mohol obal roztrhnúť. Ak sa použije mokrý ľad, obal musí byť nepriepustný.

Každá zásielka a letecký nákladný list musia byť označené presne týmto textom:

**„UN 3373 DIAGNOSTICKÁ VZORKA
ZABALENÁ V SÚLADE S POKYNOM IATA 650
O OBALOCH“**

c) Medzi druhotný obal a vonkajší obal sa musí priložiť zoznam položiek tvoriacich obsah zásielky.

d) Vonkajší obal sa musí vložiť do zapečateného plastového vaku s cieľom chrániť ho pred vlhkosťou.

e) Vyhlásenie prepravcu o nebezpečných nákladoch sa nevyžaduje.

KAPITOLA XIII

Odosielanie vírusov a vzoriek do referenčného laboratória Spoločenstva

1. Vzorky, ktoré majú byť zaslané do referenčného laboratória Spoločenstva, musia byť v súlade s odporúčaniami na prepravu nebezpečných patogénov v rámci Spoločenstva, ako aj s predpismi a právnymi predpismi platnými v Spojenom kráľovstve.

Musia sa dodržiavať pokyny uvedené v tejto kapitole.

2. **Odosielanie vírusov alebo iných materiálov do referenčného laboratória Spoločenstva**

a) Všetky materiály musia byť zabalené v súlade s pokynmi uvedenými v tejto kapitole.

b) Vonkajší obal musí byť označený takto:

„ŽIVOČÍŠNY PATOGÉN – ZÁSIELKA SA MÔŽE OTVORIŤ IBA V SEKCII PRE VTÁČIU VIROLÓGIU, VLA, WEYBRIDGE. DOVOZ POVOLENÝ NA ZÁKLADE LICENCNÉHO ČÍSLA .....*..... VYDANÉHO NA ZÁKLADE PRÍKAZU O DOVOZE ŽIVOČÍŠNYCH PATOGÉNOV.“

c) Musí sa vložiť jedno z týchto licenčných čísel:

i) pre vírusy vtáčej chrípky : „**AHZ/2232/2002/5***“

ii) pre tkanivá a iné materiály: „**AHZ/2074C/2004/3***“

Keďže tieto licenčné čísla sa občas menia, laboratóriá, ktoré odosielajú vzorky, musia pred odoslaním zásielok zabezpečiť používanie aktuálnych licenčných čísel.

d) Zásielka sa musí odoslať na adresu:

Avian Virology
VLA Weybridge
New Haw, Addlestone
Surrey KT15 3NB
United Kingdom

e) Súčasťou zásielky musí byť sprievodný list, ktorý obsahuje čo možno najviac údajov o izolátoch, ako je druh a vek, oblasť/krajina izolácie, každá klinická anamnéza.

f) Zásielky sa musia zasielať leteckou poštou alebo leteckou nákladnou dopravou.

Ak sa zásielky zasielajú leteckou nákladnou dopravou, číslo leteckého nákladného listu sa musí oznámiť referenčnému laboratóriu Spoločenstva faxom, telefónom alebo e-mailom ešte pred príchodom materiálov.

Zásielky posielané leteckou nákladnou dopravou musia byť označené takto:

„CARE OF TRANSGLOBAL“ s cieľom zaistiť rýchle vybavenie na letisku.

Kontakty na referenčné laboratórium Spoločenstva:

Ian H. Brown, Director of the Reference Laboratory
priamy tel.: (44-1932) 35 73 39
priamy fax: (44-1932) 35 72 39
e-mail: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, Reference Laboratory Manager
priamy tel.: (44-1932) 35 77 36 alebo (44-1932) 35 77 08
priamy fax: (44-1932) 35 78 56
e-mail: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

KAPITOLA XIV

Minimálne bezpečnostné požiadavky na diagnostické laboratórium vtáčej chrípky

1. Bezpečnostné požiadavky v diagnostických laboratóriách, v ktorých sa pracuje s vírusmi vtáčej chrípky, sa musia vzťahovať tak na obmedzenie vírusov ako hrozby pre zdravie zvierat, ako aj na ochranu tých, ktorí pracujú v laboratóriu (a tých, ktorí pracujú mimo laboratória) pred akýmkoľvek zoonotickým rizikom.

V rámci Spoločenstva sú minimálne bezpečnostné požiadavky pre laboratóriá uvedené v niekoľkých smerniciach. Okrem toho sú prevádzkové aspekty opísané a stanovené v príslušných európskych normách (EN). Pre prevádzku laboratórií na diagnostické účely existujú dodatočné predpisy (EN), ako sú osvedčené laboratórne postupy.

2. **Smernice Spoločenstva o laboratóriách**

Smernica Rady 89/391/EHS z 12. júna 1989 o zavádzaní opatrení na podporu zlepšenia bezpečnosti a ochrany zdravia pracovníkov pri práci (Ú. v. ES L 183, 29.6.1989, s. 1)

Smernica Rady 90/679/EHS z 26. novembra 1990 o ochrane pracovníkov pred rizikami súvisiacimi s vystavením účinkom biologických pôvodcov pri práci (siedma samostatná smernica v zmysle článku 16 ods. 1 smernice 89/391/EHS) (Ú. v. ES L 374, 31.12.1990, s. 1)

Ak sa diagnostikovanie vykoná polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) a klonovaním produktov PCR na bakteriálny epizóm určený na šírenie, napríklad na účely sekvencovania DNA, okrem týchto dvoch smerníc sa uplatňuje nasledovná smernica a európske normy (EN):

Smernica Rady 90/219/EHS z 23. apríla 1990 o obmedzenom použití geneticky modifikovaných mikroorganizmov (Ú. v. ES L 117, 8.5.1990, s. 1)

3. Okrem smerníc Spoločenstva sa musia uznať európske normy (EN):

EN 12128 Biotechnológia. Laboratória pre výskum, vývoj a analýzu. Úrovne obmedzenia pre mikrobiologické laboratóriá, oblasti rizika, lokality a požiadavky na fyzickú bezpečnosť

EN 12738 Biotechnológia. Laboratória pre výskum, vývoj a analýzu. Usmernenie pre uzatvorenie zvierat inokulovaných mikroorganizmami počas pokusov.

EN 12740 Biotechnológia. Laboratória pre výskum, vývoj a analýzu. Usmernenie týkajúce sa manipulácie, inaktivácie a testovania odpadov

EN 12741 Biotechnológia. Laboratória pre výskum, vývoj a analýzu. Usmernenie pre prevádzku biologického laboratória

Na prevádzkovanie/riadenie laboratória sa uplatňujú tieto podmienky:

4. **Požiadavky na laboratóriá (úrovne izolácie 1 až 4)**

V súlade so **smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2005/54/ES** z 18. septembra 2000 o ochrane pracovníkov pred rizikami súvisiacimi s vystavením biologickým faktorom pri práci (siedma samostatná smernica v zmysle článku 16 ods. 1 smernice 89/391/EHS) (Ú. v. ES L 262, 17.10.2000, s. 21), smernicou 90/219/EHS a európskymi normami EN 12128, EN 12740, EN 12741.

Obmedzujúce opatrenia	Úroveň obmedzenia			
	1	2	3	4
skupina laboratórií: izolácia	nie	áno	áno	áno
laboratóriá oddelené dvermi	nie	áno	áno	áno
musí byť pozorovacie okienko alebo taká alternatíva, aby bolo vidieť na osoby zdržiavajúce sa vo vnútri	nepovinné	nepovinné	nepovinné	áno
pre pracovníkov musia byť zabezpečené zariadenia na umývanie rúk	áno	áno	áno	áno
musia byť zabezpečené dezinfekčné zariadenia (na ruky)	nepovinné	áno	áno	áno
obmedzený prístup	nie	áno	áno	áno
osobitné opatrenia na kontrolu aerosólov	nie	áno minimalizovať	áno zamedziť	áno zamedziť
výstražná tabuľka „biologické nebezpečenstvo“ umiestnená na dverách	nie	áno	áno	áno
sprcha	nie	nie	nepovinné	áno
vyplachovanie očí	áno	áno	áno	áno
laboratórium: utesniteľné proti zadymeniu	nie	nie	áno	áno
povrchy odolné voči vode, kyselinám, alkáliám, rozpúšťadlám, dezinfekčným prostriedkom, dekontaminačným reagenciám a ľahko čistiteľné	áno (laboratórny stôl)	áno (laboratórny stôl)	áno (laboratórny stôl, podlaha)	áno (laboratórny stôl, podlaha)
vstup do laboratória cez vzduchový uzáver	nie	nie	nepovinné	áno
podtlak vzhľadom na tlak bezprostredného okolia	nie	nie	nepovinné	áno
odsávaný a vstupný vzduch z a do laboratória musí byť prefiltrovaný cez HEPA	nie	nie	áno odsávaný vzduch	áno
autokláv	na mieste	v budove	v miestnosti	v laboratóriu, obojstranný

Obmedzujúce opatrenia	Úroveň obmedzenia			
	1	2	3	4
ochranný odev	vhodný ochranný odev	vhodný ochranný odev	vhodný ochranný odev, nepovinne obuv	kompletná výmena odevu
rukavice	nie	nepovinné	áno	áno
účinná vektorová kontrola (napr. pre hlodavce a hmyz)	nepovinné	áno	áno	áno
bezpečné skladovanie biologického činidla	áno	áno	áno	áno
laboratórium na izoláciu vlastného zariadenia	nie	nie	odporúčané	áno

Existujú ďalšie európske normy, ktoré sa zaoberajú riadením a organizáciou laboratórií.

Existujú iné národné a medzinárodné predpisy a odporúčania, ktoré sa musia dodržiavať. WHO (Svetová zdravotnícka organizácia) uverejnila príručku o laboratórnej biologickej bezpečnosti, 3. vydanie, na svojej internetovej schránke:

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

5. **Obmedzenie týkajúce sa zdravia zvierat**

Veterinárne úrady v členských štátoch musia uviesť do platnosti predpisy týkajúce sa obmedzenia vírusov vtáčej chrípky, najmä vysokopatogénnej vtáčej chrípky (HPAI), avšak zahŕňajúce aj všetky vírusy vtáčej chrípky subtypov H5 a H7. Určité usmernenie poskytla Svetová organizácie pre zdravie zvierat (OIE) v kapitole 1.4.5 Kódexu zdravia suchozemských zvierat z roku 2005 a HPAI sa považuje podľa OIE za patogén skupiny izolácie 4.

Veterinárne úrady členského štátu uvedú do platnosti predpisy, ktorými sa riadi manipulácia s vírusmi vtáčej chrípky.

Minimálne bezpečnostné opatrenia uplatňované referenčným laboratóriom Spoločenstva, ktoré sú vnútroštátnymi predpismi Spojeného kráľovstva, sú k dispozícii na internetovej stránke:

http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm

6. **Obmedzenie týkajúce sa zdravia ľudí**

Laboratóriá, ktoré pracujú s vírusmi vtáčej chrípky, si musia byť neustále vedomé, že tieto vírusy sú minimálne potenciálnymi ľudskými patogénmi a musia riadiť chod laboratória tak, aby sa zabránilo infikovaniu osôb, ktoré pracujú v laboratóriu, a akémukoľvek úniku vírusu smerom k ľudom zdržiavajúcim sa mimo laboratória.

Usmernenia o manipulácii so vzorkami, u ktorých je podozrenie, že obsahujú vírus vtáčej chrípky typu A, sú k dispozícii na internetovej stránke Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO):

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/