

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА

от 4 юли 2000 година

относно установяване на процедури за диагностициране, методи за вземане на проби и критерии за оценка на резултатите от лабораторните тестове за потвърждаване и диференциална диагноза на везикулозната болест по свинете

(нотифицирано под № С (2000) 1805)

(Текст от значение за ЕИП)

(2000/428/ЕО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 92/119/ЕИО на Съвета от 17 декември 1992 г. относно въвеждане на общи мерки на Общността за контрол на определени болести и на специални мерки по отношение на везикулозната болест по свинете¹, последно изменен с Акта за присъединяване на Австрия, Финландия и Швеция, и по-специално приложение II, параграф 3 към нея,

като има предвид, че:

- (1) На ниво Общност е необходимо да се установят процедури за диагностициране, методи за вземане на проби и критерии за оценка на резултатите от лабораторните тестове за потвърждаване на везикулозната болест по свинете, както и за диференциация на шапа, така че да се подобри контролът по отношение на тези две болести.
- (2) Приложение III към Директива 92/119/ЕИО на Съвета определя функциите и задълженията на референтната лаборатория на Общността по везикулозната болест по свинете, с цел координиране, съгласувано с Комисията, на методите, използвани в държавите-членки за диагностициране на тази болест. Тези функции и задължения включват периодично организиране на сравнителни тестове и предоставяне на стандартни реактиви на ниво Общност.
- (3) Наскоро бяха разработени лабораторни тестове за осигуряване на бързо диагностициране на везикулозната болест и за разграничаването ѝ от шапа.

¹ ОВ L 62, 15.3.1993 г., стр. 69.

- (4) Резултатите от най-новите сравнителни тестове, извършени на ниво на Общността, показват, по-специално, че има разработени надеждни тестове за откриване на антигена или генома на вируса на везикулозната болест по свинете и че тези тестове могат успешно да допълнят теста за изолиране на вируса за целите на вирусологичното диагностициране на везикулозната болест по свинете.
- (5) Натрупаният опит през последните години по отношение на контрола на везикулозната болест по свинете доведе до идентифицирането на най-подходящите процедури за вземане на проби и критерии за оценка на резултатите от лабораторните тестове за съставяне на правилна диагноза на тази болест в различни ситуации.
- (6) Становището и препоръките на Научния комитет по въпросите на здравето и хуманното отношение към животните във връзка с везикулозната болест по свинете бяха взети под внимание.
- (7) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Постоянния ветеринарен комитет,

РЕШИ:

Член 1

1. Държавите-членки следят за това потвърждаването на везикулозната болест по свинете и диференциалната диагноза спрямо шапа да се основават на:

- а) откриване на клиничните признаци на заболяването;
- б) откриване на вируса, антигена или генома в пробите от епителна тъкан, везикуозна течност или фекални маси;
- в) демонстриране на специфична реакция на антитела в серумните проби,

в съответствие с процедурите, методите за взимане на проби и критериите за оценка на резултатите от лабораторните тестове, описани в ръководството, приложено към настоящото решение.

2. Независимо от това, националните диагностични лаборатории, упоменати в приложение II, точка 5 от Директива 92/119/ЕИО, могат да внесат промени в лабораторните тестове, посочени в приложеното към настоящото решение ръководство, или да използват различни тестове, стига да може да се демонстрира същата чувствителност и специфичност.

Чувствителността и специфичността на тези изменени или различни тестове трябва да се оценява в рамките на периодични сравнителни тестове, организирани от Референтната лаборатория на Общността по везикулозната болест по свинете.

Член 2

Настоящото решение се прилага от 1 октомври 2000 г.

Член 3

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 4 юли 2000 година.

За Комисията:

David BYRNE

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

РЪКОВОДСТВО

ОТНОСНО ПРОЦЕДУРИТЕ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ, МЕТОДИТЕ ЗА ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ И КРИТЕРИИТЕ, КОИТО СЛЕДВА ДА СЕ ИЗПОЛЗВАТ ЗА ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ЛАБОРАТОРНИТЕ ТЕСТОВЕ ЗА ПОТВЪРЖДАВАНЕ И ДИФЕРЕНЦИАЛНА ДИАГНОЗА НА ВЕЗИКУЛОЗНАТА БОЛЕСТ ПО СВИНЕТЕ

ГЛАВА I

Въведение, цели и определения

1. Настоящото ръководство:

а) съдържа основните принципи и минимални изисквания по отношение на диагностичните процедури, методите за взимане на проби и критериите, които следва да се прилагат за оценка на резултатите от лабораторните тестове, така че да се осигури правилна диагноза на везикулозната болест по свинете, като същевременно поставя специален акцент върху диференциалната диагноза спрямо шапа;

б) включва разпоредбите на приложение II към Директива 92/119/ЕИО и, по-специално, точки 4, 7 и 8 от него;

в) е предназначено главно за органите, отговарящи за контрола на везикулозната болест по свинете. Поради тази причина то поставя акцент по-скоро върху принципите и приложното поле на лабораторните тестове, както и върху оценката на техните резултати, отколкото върху подробното изложение на лабораторните техники.

2. За целите на настоящото ръководство се прилагат следните определения:

а) под „серозопозитивно прасе” се разбира всяко прасе, чийто серум съдържа процентно съдържание на антитела, по-високо или равно на това на контролния серум № 4 на везикулозната болест по свинете, предвиден в глава X съгласно теста за неутрализиране на използвания от националната лаборатория вирус;

б) под „лъжливо позитивно” се разбира всяко серопозитивно прасе в животновъдно стопанство, положително реагиращо на серологичните тестове за откриване на везикулозна болест по свинете, без предварително да е било в контакт с вируса на везикулозната болест по свинете и за което

няма данни да е заразило контактни с него прасета. Едно серопозитивно прасе се потвърждава като лъжливо позитивно, когато са изпълнени условията на точка В от глава VIII;

в) под „контактни прасета” се разбират прасетата, които се намират в пряк контакт или са били в пряк контакт в течение на последните 28 дни с едно или няколко серопозитивни прасета или с едно или няколко прасета, за които има подозрение, че са заразени с вируса на везикулозната болест по свинете. Става дума за прасета, които се намират или са се намирали в един и същи бокс или в съседни боксове, ако съществува възможност за контакт между прасетата в боксовете.

ГЛАВА II

Основни принципи за контрола над прасета, показващи клинични признаци на везикулозната болест по свинете

1. Когато в определено животновъдно стопанство има съмнение за наличие на вируса на везикулозната болест по свинете, държавите-членки следят за това статистически значим брой прасета да бъдат подложени на контрол от страна на официален ветеринарен лекар с цел откриване възможно най-скоро на клиничните признаци на това заболяване, описани в глава IX.
2. Когато прасета покажат клинични признаци, пораждащи съмнение за наличие на везикулозна болест по свинете или на шап, държавите-членки следят за това във възможно най-кратък срок да се извърши диференциална диагноза, основаваща се на взимането на проби и на подходящи лабораторни изследвания, в съответствие с разпоредбите на глави IV, VII и VIII от настоящото ръководство.

ГЛАВА III

Основни процедури за взимане на проби и тяхното транспортиране

1. Всяко лице, което влиза на територията на животновъдно стопанство, където има съмнение за везикулозна болест по свинете, или което напуска такова стопанство, трябва да спазва най-строги хигиенни правила с цел ограничаване риска от заразяване със или разпространение на вируса.
2. Всички прасета, използвани за взимане на проби, трябва да бъдат маркирани по индивидуален начин, така че да могат да бъдат идентифицирани с оглед последващо повторно взимане на проби. За всяко прасе, използвано за взимане на проби, се препоръчва да се запишат едновременно индивидуалната

идентифицираща маркировка на животното и мястото му в животновъдното стопанство, по-специално в случай на взимане на проби от съмнителни прасета.

3. Пробите трябва да се изпратят в лабораторията заедно с подходящи формуляри, съдържащи данни за историята на използването за взимане на проби прасета и наблюдаваните клинични признаци, ако съществуват такива.
4. Тъй като всяко везикулозно заболяване при свинете може да бъде проява на шапа, следва да се предприемат специални предпазни мерки, за да се осигури надеждно опаковане на съмнителните проби. Тези предпазни мерки целят преди всичко да се предотврати каквото и да било разкъсване или изтичане на контейнерите и рискът от заразяване. Те играят също така важна роля за осигуряване пристигането на пробите в съответната лаборатория в задоволително състояние. Когато даден контейнер съдържа лед, следва да се предотврати всякакво изтичане на вода от него. Нито един контейнер, съдържащ проби, за които има съмнение, че съдържат вируса на везикулозната болест по свинете, не бива да се отваря след напускане на заразения обект до пристигането му в лабораторията.
5. Пробите, за които има съмнение, че съдържат вируса на везикулозната болест по свинете, трябва да се изследват само в лаборатория, оправомощена за работа с вируса на шапа с цел диагностициране, в съответствие със законодателството на Общността за борба с шапа, освен ако вече не е елиминиран какъвто и да бил риск за шап.
6. Всички проби могат да се транспортират при 4 °C, ако предвиденото време за транспортиране до лабораторията получател е под 48 часа. Във всички останали случаи те трябва да се съхраняват при температура не по-висока от - 20 °C.
7. Що се отнася до пробите, които се изпращат до Референтната лаборатория на Общността от държавите-членки, без Великобритания, единственият разрешен способ за превоз е въздушният транспорт в посока летище Лондон-Хитроу или Лондон-Гетуик. Преди изпращането, лабораторията трябва да бъде информирана по факс ((44-1483) 232621) или по електронна поща за подробности за полета и летателната компания, датата, предвидения час на пристигане и номера на въздушния коносамент, така че пратката да може да бъде идентифицирана още при пристигането си. Върху пратката трябва да бъде нанесен следният адрес:

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory
Community Reference Laboratory for swine vesicular disease
Ash Road, Pirbright, Woking
Surrey GU24 0NF
United Kingdom, UK

Етикетът върху пратката също така трябва да съдържа следната информация: „Патологичен материал със животински произход без търговска стойност. Нетрайно. Крехко. Следва да се приеме на летището от адресата. Да не се отваря извън лабораторията.”

Единствен персоналът на референтната лаборатория на Общността е оправомощен да получи пратките на летището по силата на специално общо разрешително за внос, издадено за тази цел от британското Министерство на земеделието, хранителната индустрия и риболова. Става дума за трайна договореност и следователно не е необходимо да се получава отделна лицензия за всеки внос. На територията на Великобритания не се разрешава пренасяне на ръка от страна на неоправомощен персонал на материал, за който има съмнение, че съдържа носител на везикулозната болест. Не се разрешава да се ползват услугите на куриерски дружества.

8. Превозът на пробите до националните лаборатории трябва да се извършва в съответствие с указанията на компетентния орган на държавите-членки.

ГЛАВА IV

Процедури за взимане на проби в животновъдно стопанство, когато прасета покажат съмнителни клинични признаци

1. Когато наблюдаваните клинични признаци дават възможност да се заподозре наличието на везикуозна болест по свинете в едно животновъдно стопанство, следва да се вземат подходящи проби от представителни групи прасета, имащи въпросните клинични признаци, с цел потвърждаване на заболяването и поставяне на диференциална диагноза спрямо шапа.
2. Предпочитаните проби за диагностициране в тези животновъдни обекти са епителът и везикулозната течност с произход от интактни или наскоро разкъсани везикули на прасета, показващи характерните признаци на това заболяване. Тези проби дават възможност да се установи наличието на вируса на везикулозната болест по свинете, на неговите антигени или на неговия геном. Препоръчва се да се вземат проби от пет или шест свине.
3. Дори ако има в наличност прясна епителна тъкан и везикуозна течност в достатъчни количества (1 g или повече), следва също така да се вземат:
 - а) кръвни проби от прасета, за които има съмнение, че са заразени и контактни на тях прасета, за целите на серологичните тестове;

- б) проби от фекални маси, взети от прасета които има съмнение, че са заразени, пода на бокса им и пода на прилежащите боксове, за целите на вирусологичните тестове.

4. Пробите могат да се събират и превозват съгласно следните процедури:

а) по отношение на пробите от епитела и везикулозна течност:

- ако е възможно, се взима най-малко 1 g от епителната тъкан на един интактен или наскоро разкъсан везикул. За да се избегне евентуално нараняване на персонала и от съображения, свързани с хуманното отношение към животните, препоръчва се на прасетата да се даде успокоително преди взимане на пробите,

- ако превозът до националната лаборатория е извършен незабавно (по-малко от 3 часа), епителните проби могат да се транспортират в сухо състояние в охладен контейнер. Ако обаче съществува вероятност необходимото време да надвиши три часа, пробите трябва да се поставят в малък обем транспортна среда, състояща се от равни части глицерин и 0.04 M фосфатен или друг (HEPES) буферен разтвор, така че да поддържа оптимални рН-условия, за да може вирусът на шапа да оцелее (от 7,2 до 7,6). Към транспортната среда следва да се добавят антибиотици с цел осигуряване на допълнително антимикробно действие. Препоръчват се следните антибиотици със следната окончателна концентрация в ml :

(i) пеницилин 1 000 UI

(ii) неомицин сулфат 100 UI

(iii) полимиксин В сулфат 50 UI

(iv) микостатин 100 UI

- ако е възможно да се вземе везикулозна течност от интактен везикул, същата трябва да се съхрани без да се разтваря в отделен контейнер;

б) по отношение на кръвните проби:

- кръвни проби могат да се взимат за серологични или вирусологични тестове. Независимо от това, те се взимат по принцип само за прасета, за които се счита, че са се възстановили от клиничната или субклинична инфекция, с цел търсене на антитела. Пробите от епитела, везикуларната течност или фекални маси от прасета, показващи клиничните признаци на заболяване, в действителност са по-добре индицирани за търсене на вируса, отколкото кръвните проби. Препоръчва се да се взимат цели кръвни проби с помощта

на вакутейнери, без добавка на антикоагулант, които да се транспортират неотворени;

в) по отношение на пробите от фекални маси:

- пробите от фекални маси, събрани по пода на помещения, за които има съмнение, че приютяват или са приютявали прасета, засегнати от везикулозната болест по свинете, както и пробите от фекални маси, събрани пряко или чрез импрегниране по живи прасета, за които има съмнение, че са заразени, трябва да се поставят в здрави и херметични контейнери.

Външната част на тези контейнери трябва да бъде дезинфекцирана преди изпращането им в лабораторията. За тази цел са подходящи следните дезинфектанти:

- сода каустик (разтвор 1:100),
- формалин (разтвор 1:9 на формалинов разтвор, съдържащ минимум 34% формалдехид),
- натриев хипохлорид (съдържащ 2% активен хлор).

Необходимо е внимателно да се борава с тези дезинфектанти.

ГЛАВА V

Процедури за взимане на проби за серологично наблюдение на везикулозната болест по свинете

1. Когато има установено серологично наблюдение с цел:

- а) наблюдение на животновъдни стопанства, когато няма доказателства или данни за евентуално наличие на болестта;
- б) наблюдение на кланици, пазари, събирателни центрове или други подобни места чрез рутинно взимане на серологични проби;
- в) недискриминационно наблюдение на прасета, получени от други държави-членки в животновъдното стопанство-вносител,

трябва да се вземат кръвни проби от прасетата за целите на серологичните тестове в съответствие с разпоредбите на програмите за последващо наблюдение или планове или програмите за унищожаване, одобрени в

рамките на Решение 90/424/ЕИО¹ или на Директива 90/425/ЕИО², или при липса на такива разпоредби - в съответствие с процедурите, установени от компетентния орган на държавите-членки.

2. Когато има установено серологично наблюдение с цел:

а) наблюдение на животновъдни стопанства, разположени в защитените зони, намиращи се под наблюдение, създадени след потвърждаване на болестните огнища в съответствие с приложение II, точки 7 и 8 от Директива 92/119/ЕИО;

б) наблюдение на животновъдните стопанства по член 9 от Директива 92/119/ЕИО,

трябва да се вземат кръвни проби от прасетата за целите на серологичните тестове съгласно следната схема:

- в случай на развъдни стопанства следва да се приложи процедура за взимане на случайни проби, позволяваща да се установи 5 %-но преобладаване на сероконверсии с 95 % достоверност,
- в случай на развъдни стопанства, включващи само прасета за угодяване, процедурата за взимане на проби трябва да осигури общия брой на взетите проби да бъде най-малкото равен на изискуемия брой за установяване на 5 %-но преобладаване с 95 % достоверност. При всички случаи пробите трябва да бъдат взети от възможно най-голям брой случайно подбрани боксове,
- в случай на смесени развъдни стопанства, които едновременно служат за възпроизводство и угодяване, взимането на проби трябва да засегне всяка от групите прасета, държани в отделни помещения, и да позволи установяването на 5%-но преобладаване на сероконверсии с 95 % достоверност.

ГЛАВА VI

Други дейности и процедури за повторно взимане на проби в случай на открити серопозитивни прасета

1. Когато в дадено животновъдно стопанство се открие едно единствено серопозитивно прасе, в резултат на наблюдението по глава V, точка 1, а) или глава V, точка 2, компетентният орган следи за това:

¹ ОВ L 224, 18.8.1990 г., стр. 19.

² ОВ L 224 18.8.1990 г., стр. 29.

а) във въпросното животновъдно стопанство да бъдат приложени мерките, предвидени в член 4 от Директива 92/119/ЕИО, ако това още не е направено;

б) да бъде извършена проверка на животновъдното стопанство в съответствие с разпоредбите на глава II, точка 1;

в) да бъдат взети кръвни проби за целите на серологичните тестове от:

- съмнителното за заразяване прасе,
- контактните прасета, живеещи в същия или прилежащи боксове на този, където живее съмнителното за заразяване прасе. Взимането на проби трябва да става по такъв начин, че да се позволи установяването на 50 %-но преобладаване на сероконверсии с 95 % достоверност в бокса.

2. Независимо от това, компетентният орган може да реши да преустанови прилагането на мерките, предвидени в точка 1, а), ако:

а) епидемиологичното проучване, извършено в съответствие с член 8 от Директива 92/119/ЕИО, позволява да се предположи, че животновъдното стопанство не е заразено с везикулозна болест по свинете;

б) в животновъдното стопанство не е открита каквато и да било клинична проява на везикулозна болест по свинете;

в) животновъдното стопанство не се намира в зона на наблюдение или ограничение, установена след възникването на потвърдено болестно огнище, нито е подложено на други ограничения, свързани с потвърдено болестно огнище,

и при условие че:

- нито едно прасе не бъде преместено от животновъдното стопанство с цел търговски обмен вътре в Общността, и
- прасетата биват премествани от въпросното животновъдно стопанство, само за да постъпят в кланица, за да бъдат заклани веднага, или в друго животновъдно стопанство, от където не излиза нито едно прасе за целите на търговския обмен вътре в Общността,

докато резултатите от нови проверки и серологични тестове не покажат, че окончателно може да се изключи всякакъв риск от везикулозна болест по свинете.

3. Ако проверките и серологичните тестове, извършени в съответствие с горните точки 1, б) и в):

- а) дадат отрицателни резултати или ако само едно прасе, което преди това е било позитивно бъде потвърдено като позитивно (лъжливо позитивно), везикулозната болест по свинете може да се изключи. В този случай могат да се преустановят мерките, предвидени в точка 1, а), освен ако животновъдното стопанство не се намира в зона на защита или наблюдение, установена около болестно огнище, където мерките за унищожаване трябва да останат в сила в съответствие с приложение II, точки 7 или 8 към Директива 92/119/ЕИО;
- б) покажат наличие в животновъдното стопанство на няколко серопозитивни прасета, трябва да се потвърди наличието на везикулозна болест по свинете или – ако не са спазени условията за потвърждаване на болестта, предвидени в приложение II, точка 4 към Директива 92/119/ЕИО – да се вземат нови проби от стопанството в съответствие с процедурите за взимане на проби, предвидени в точка 4 по-горе.
4. Ако се установи наличие на няколко серопозитивни прасета в едно животновъдно стопанство в резултат на взетите проби и серологичните тестове, предвидени в глава V, точка 1, а), точка 1, в) или 2, но не са спазени условията за потвърждаване на болестта, предвидени в приложение II, точка 4 към Директива 92/119/ЕИО, компетентният орган трябва да следи за това:
- а) да се прилагат или да продължи прилагането на разпоредбите на член 4 от Директива 92/119/ЕИО;
- б) да се извърши проверка на животновъдното стопанство в съответствие с разпоредбите на глава II, точка 1;
- в) да се вземат нови кръвни проби от серопозитивните и контактните с тях прасета за целите на серологичните тестове, в съответствие с точка 1, в);
- г) да се вземат кръвни проби за целите на серологичните тестове от прасета, живеещи в останалите сгради на животновъдното стопанство, в съответствие с процедурата, предвидена в глава V, точка 2;
- д) да се съберат, за целите на вирусологичните тестове, достатъчен брой проби от фекални маси от:
- серопозитивни прасета,
 - пода на боксовете, приютяващи серопозитивни прасета, и на прилежащите боксове;
 - случайно подбрани боксове в други сгради на животновъдното стопанство.

Събраните в съответствие с първо и второ тире проби от фекални маси трябва да се изследват възможно най-скоро. Ако тези проби са отрицателни, но резултатите на серологичните тестове позволяват да се предположи, че вирусът на везикулозната болест по свинете може да се е разпрострял до други сгради, следва да се изследват също и пробите от фекални маси, предвидени в третото тире.

Ако след тези нови проверки и тестове, не са изпълнени условията за потвърждаване на везикулозната болест по свинете, определени в приложение II, точка 4 към Директива 92/119/ЕИО, серопозитивните прасета се убиват или заколват в съответствие с разпоредбите на приложение II, точка 4, г) към Директива 92/119/ЕИО. Независимо от това, ако бъдат признати за серопозитивни други прасета, освен вече признатите за серопозитивни в резултат на предшестващо взимане на проби, следва отново да се приложат *mutatis mutandis* разпоредбите и процедурите, предвидени в букви а), б), в), г) и д).

5. Без да се накърнява прилагането на мерките, предвидени в член 9 от Директива 92/119/ЕИО, в случай на открити едно или повече серопозитивни прасета в резултат на дейностите по наблюдение, предвидени в глава V, точка 1, б) или глава V, точка 1, в), компетентният орган трябва да следи за това:

- а) да бъдат извършени, в рамките на необходимото и възможното, допълнителни проверки със събиране на проби, така че да се потвърди или изключи наличието на везикулозна болест по свинете на мястото, където са били открити въпросните прасета, при отчитане на местната специфика;
- б) в животновъдния обект, от който произхождат тези прасета, да се приложат мерките, предвидени в член 4 от Директива 92/119/ЕИО;
- в) в животновъдното стопанство, от който произхождат прасетата, да бъде извършена проверка в съответствие с разпоредбите на глава II, точка 1,
- г) за целите на серологичните тестове да се вземат кръвни проби от прасетата от животновъдното стопанство, от което произхождат серопозитивните прасета, в съответствие с разпоредбите на глава V, точка 2.

6. Независимо от това, компетентният орган може да реши да преустанови прилагането на мерките, предвидени в точка 5, б), ако:

- а) епидемиологичното проучване, извършено в съответствие с членове 4 и 8 от Директива 92/119/ЕИО, предполага, че животновъдното стопанство не е заражено с везикулозна болест по свинете;

- б) в животновъдното стопанство не е открита каквато и да било клинична проява на везикулозна болест по свинете;
- в) животновъдното стопанство не се намира в зона на наблюдение или ограничение, установена след възникването на потвърдено болестно огнище, нито е подложено на други ограничения, свързани с потвърдено болестно огнище,

и при условие че:

- нито едно прасе не напусне животновъдното стопанство в рамките на търговския обмен вътре в Общността, и
- прасетата биват преместени от животновъдното стопанство, само за да постъпят в кланица, за да бъдат заклани веднага, или в друго животновъдно стопанство, от което нито едно прасе не бива премествано за целите на търговския обмен вътре в Общността,

докато резултатите от нови проверки и серологични тестове, извършени на мястото, където са били открити серопозитивните прасета, а също и в животновъдното стопанство, откъдето произхождат, не покажат, че окончателно може да се изключи всякакъв риск от везикулозна болест по свинете.

ГЛАВА VII

Принципи и приложно поле на вирусологичните изпитания и оценка на резултатите от тях

A. Откриване на антигена на вируса

1. Съставният непряк метод Елайза се превърна в метод по избор, който замества реакцията на свързване на комплемента за откриване на антигена на вируса на везикулозната болест по свинете. Тестът е идентичен с използвания за диагностициране на шапа. Тестовите за двете болести трябва едновременно да се изпълняват, освен в случаите, когато шапът вече е бил изключен. Препоръчва се използването им именно при епителните проби или проби от течността, получавана от везикулните лезии, в които могат да се съдържат в значителни количества, ако инфекцията е сериозна, едновременно вируси на везикулозната болест по свинете и на шапа, което позволява откриването им само в рамките на няколко часа³.

³ Положителните реакции на теста Елайза указват за наличие поне на 10^5 TCID₅₀ (заразни дози на клетъчна култура) на вируса в пробата.

Двойните редове на плаките Елайза с множество отвори по тях са потопени в заешки противосерум срещу вируса на везикулозната болест по свинете и срещу всеки от седемте серотипа на вируса на шапа. Това са серуми-капани. Във всяка от редиците са добавени контролни суспензии. Включени са също така подходящи контроли. На следващия етап в съответните редове се добавя съответен опитен серум за откриване, след което се добавя заешки противосерум, в комбинация с ензим от типа на хряновата пероксидаза. Между различните етапи се прави щателно промивка с оглед отстраняване на несъединените реактиви. Тестът е положителен, ако с добавянето на хромогенен субстрат се предизвиква реакция на пигментация. Ако са достатъчно силни, положителните реакции са ясно видими с просто око, но също така е възможно резултатите да се отчетат чрез спектрофотометрия, в който случай абсорбция от 0,1 спрямо дъното указва за наличие на положителна реакция.

2. За да се открият антигените на везикулозната болест по свинете и за да се извърши диференциална диагноза спрямо шапа в пробите от епитела, везикулната течност или заразени тъканни култури, възможно е също така да се използва един алтернативен способ Елайза, основаващ се на моноклонални антитела, при който се използват като капани подобрени моноклонални антитела, а като детектори – моноклонални антитела, в комбинация с пероксидаза.
3. Възможно е тест Елайза на основата на моноклонални антитела да се използва за изследване антигенните колебания между щамове на вируса на везикулозната болест по свинете. Вирусните антигени, развили се в тъканните култури, се прихващат от хиперимунен заешки противосерум срещу везикулозната болест по свинете и се поглъщат от твърдата фаза. Тогава се предизвиква реакция на подходящи групи антитела и се съпоставя захващането на моноклоналните антитела към дивите щамове с това на моноклоналните антитела към щамове-майки. Подобно захващане указва за наличие на антигенни детерминанти, разделени между щамове-майки и дивите щамове.

Б. Изолиране и култивиране на вируса

1. Необходимо е редовно да се правят посеви на пречистените суспензии на пробите от епитела, течността от везикула или фекалните маси, съмнителни за съдържание на вируса на везикулозната болест по свинете върху чувствителни клетъчни култури. Ако количеството и качеството на пробите, получени от подложените на изследване везикулни лезии, се окажат не достатъчни, за да се направи веднага тест Елайза, вирусът ще трябва да се култивира сред тъканни култури, за да се увеличи производството на антигени.
2. За да се изолира и развие вирусът, пречистената епителна суспензия се депозира върху еднослоести култури от клетки IB-RS-2. Следва да се използват два разтвора на епителна суспензия – единият - силен (1/500), а вторият – слаб

(1/10), за да се предотврати евентуално блокиране на растежа на вируса от интерферона, който има свойството да препятства развитието на вируса на везикулозната болест по свинете. За да се изолира вирусът, към поддържащата среда се добавят само антибиотици. За целите на диференциалната диагноза на шамния вирус следва да се добавят също така първични клетки на тироидна жлеза на едър рогат добитък или на бъбречни клетки на новородени хамстери (ВНК-21).

3. В случай че се развие цитопатичен ефект, изплувалата на повърхността течност следва да се отдели от положителните култури, когато ефектът е пълен, и да се използва по време на теста Елайза за идентифициране на вируса. Отрицателните култури трябва да се посеят върху млади клетъчни култури на 48 или 72 часа. Този сяп процес се изследва след 72 часа. При липса на цитопатичен ефект след още един допълнителен сяп процес, пробата може да се обяви за отрицателна по отношение на наличието на жив вирус.
4. Суспензиите на проби от фекални маси могат да се обработят по начина, посочен по-горе в точка 1. Тъй като вирусната концентрация по принцип е по-малка във фекалните маси, отколкото в епитела, от съществено значение е да се пристъпи към трети сяп процес, ако първите два не са последвани от никакъв цитопатичен ефект.
5. Едновременната посевка на една линия свински клетки и на една от посочените по-горе системи от клетъчни култури (за предпочитане – първични клетки от щитовидна жлеза на едър рогат добитък) позволява да се направи полезна оценка за това дали везикулните проби съдържат вируса на везикулозната болест по свинете или този на шапа, тъй като първият се развива само в свински клетки. Независимо от това, изолираните шамни вируси с продължителна история на предаване от едно прасе на друга, също могат да се развият преференциално в системи от клетъчни култури от свински произход.

В. Верижна полимеразна реакция (PCR) за откриване на генома

1. Методите за разпознаване на нуклеиновата киселина могат да се използват за откриване на генома на вируса на везикулозната болест по свинете в клиничните материали и за установяване на връзки между изолираните вируси на везикулозната болест по свинете чрез определяне на последователността от нуклеиди в една част от генома. С цел подобряване чувствителността на диагнозата бяха разработени техники, използващи PCR. Описани са слабо различаващи се PCR-процедури, използващи обратна транскриптаза. Те използват слоеве, съответстващи на зони с висока степен на консервиране на гените 1 С и 1 D.
2. Способът PCR е един бърз способ (резултатите като правило се получават в рамките на период от 24 часа); той открива всички генотипове на вируса на

везикулозната болест по свинете и е достатъчно чувствителен, за да бъде приложен спрямо проби от клинически съмнителни случаи.

3. В случай на съмнение за субклинична инфекция, когато пробите са взети след изчезване на клиничните признаци или по време на обработката на пробите от фекални маси, подобрените RT-PCR-способи, използващи обратна транскриптаза, като например гнездовата RT-PCR, имунната PCR, PCR Елайза и други по-усъвършенствани методи за екстракция на РНК, представляват най-малкото поне също толкова чувствителни системи за откриване, но значително по-бързи, отколкото множеството процеси върху тъканни култури.
4. Последователността от около 200 нуклеиди на гена 1 D, който кодира главния структурен протеин VP1, позволява да се групират вирусни щамове на везикулозната болест по свинете, в зависимост от близостта между отделните елементи на тази последователност, и по този начин да се поставят във взаимна зависимост, в епидемиологичен план, щамовете, отговарящи за огнищата на зараза в различни райони или в различни периоди от време.

Г. Оценка на резултатите от вирусологичните тестове

Откриването на антигените или на генома на вируса на везикулозната болест по свинете с помощта на Елайза или PCR има същата диагностична стойност, както и изолирането на вируса.

Изолирането на вируса обаче трябва да се счита за контролен тест и трябва да се използва при нужда като тест за потвърждаване, а именно ако един положителен резултат, получен с Елайза или PCR, не е съчетан с нито един от следните елементи:

- а) откриване на клинични прояви на заболяването;
- б) откриване на серопозитивни прасета; или
- в) пряка епидемиологична връзка с потвърдено огнище.

ГЛАВА VIII

Принципи и приложение на серологичните тестове и оценка на резултатите от тях

А. Тест за неутрализиране на вируса

1. Микротестът за количествено неутрализиране на вируса за откриване на антитела срещу вируса на везикулозната болест по свинете се извършва с

помощта на клетки IB-RS-2 или на равностойна система от клетки, върху микротитърни плаки с плоско дъно от клетъчни култури.

2. Вирусът се култивира върху единичен слой от клетки IB-RS-2 и съхранява при – 20 °C (след добавяне на 50% глицерин) или при – 70 °C (без добавяне на глицерин). Серумите се дезактивират при 56 °C в продължение на 30 минути преди тестовете.

Б. Тестове Елайза

1. Тестът Елайза за откриване на антитела е моноклонален Елайза на основата на антитела. Ако серумната проба съдържа антитела срещу вируса на везикулозната болест по свинете, връзката между антигена на вируса и едно подбрано моноклонално антитяло, комбинирано с пероксидаза, е потисната.

В този Елайза вирусният антиген на везикулозната болест по свинете се захваща като в капан в твърдата фаза с помощта на моноклонални антитела. Впоследствие се пристъпва към култивиране на серумните проби в подходящ разтвор и се добавя моноклоналното антитяло в комбинация с пероксидаза. Накрая, потискането на захващането на моноклоналното антитяло се измерва с помощта на хромогенен субстрат.

2. Полезно е да се използва тест Елайза с непряко абсорбиране, използващ различни изотопно специфични моноклонални антитела за откриване на IgG или IgM, които са специфични за вируса на везикулозната болест по свинете, с цел да се оцени продължителността на инфекцията при прасето или на заразата в помещенията.

В теста Елайза със специфични изотопи вирусният антиген е хванат като в капан в твърдата фаза с помощта на антитяло за прихващане на антигена. Ако серумната проба съдържа антитела срещу вируса на везикулозната болест по свинете, възможно е те да бъдат открити с използване на моноклонално антитяло анти-IgC при прасето или анти-IgM при прасето, в комбинация с пероксидаза. Прихващането се измерва впоследствие с помощта на хромогенен субстрат.

Тестът Елайза със специфични изотопи може също така да спомогне за различаването на лъжливо позитивните прасета от действително серопозитивните, както е посочено по-долу в част В.

В. Изпълнение на серологичните тестове и оценка на резултатите от тях

1. Тестът за вирусна неутрализация и Елайза са препоръчителните серологични тестове. В глава X са изброени контролните серуми, които са на разположение в Референтната лаборатория на Общността с цел да се осигури използването на цялата територия на Общността на стандартни серологични тестове.

Тестът за вирусна неутрализация трябва да се разглежда като контролен тест, но има недостатъка, че отнема два или три дни и изисква оборудване за клетъчни култури.

Тестът Елайза е по-бърз и може по-лесно да се стандартизира. Тестът Елайза с моноклонални антитела е най-надеждният тест Елайза, описан към днешна дата, за търсене на антитела срещу везикулозната болест по свинете. Той се препоръчва като скринингов тест при голям брой проби.

Тестът за вирусна неутрализация трябва обаче да се използва, когато това е нужно с цел потвърждаване, а именно след първоначално откриване на положителни проби в едно животновъдно стопанство. Прасета, които са обявени за позитивни въз основа на тест Елайза, но са признати за негативни въз основа на теста за вирусна неутрализация, могат да бъдат игнорирани.

2. Възможно е да се породят съмнения за това, че едно прасе е лъжливо позитивно⁴, когато единствено то е признато за серопозитивно и са спазени следните условия:

- а) в животновъдното стопанство не се наблюдават никакви клинични признаци на заболяване;
- б) в историята на животновъдното стопанство няма нито един случай на клинични прояви на това заболяване;
- в) в историята на животновъдното стопанство няма нито един случай на връзка с доказано огнище на болестта;

3. Възможно е да се потвърди, че едно прасе е лъжливо позитивно, когато:

- а) допълнителните тестове не установят други серопозитивни прасета;
- б) анализът на взетите проби от контактни прасета след първоначалното установяване на предполагаемо лъжливо позитивно прасе не показва никаква сероконверсия;
- в) установеният процент на антителата по време на повторното вземане на проби се запазва константен или показва спад.

⁴ Всички серологични тестове, които се използват понастоящем при везикулозната болест по свинете, могат да установят само малка част от лъжливо позитивни. Не са известни причините за това явление. То би могло да се обясни с кръстосаната серологична реактивност на вируса на везикулозната болест по свинете и на един друг все още неидентифициран пикорнавирус или с присъствието в серума на други неспецифични фактори.

4. Преди всяко потвърждение на статут на лъжливо позитивно прасе обаче е важно да се държи сметка за следните допълнителни критерии и принципи:

- а) честотата на лъжливо позитивните е около едно прасе на 1 000;
- б) серумите на лъжливо позитивните като правило имат следния профил:
 - ниско ниво на антителата по време на теста за неутрализация на вируса,
 - слабо положителна реакция на теста Елайза, основан на моноклонални антитела,
 - присъствие на IgM по изключение и липса на IgG по време на теста Елайза със специфични изотопи за везикулозната болест по свинете⁵.

ГЛАВА IX

Клинични признаци и характеристики на везикулозната болест по свинете

Везикулозната болест по свинете е заразна болест, предизвикана от ентеровирус от семейство *Picornaviridae*. Това е везикулозно заболяване, което може да бъде в лека или тежка субклинична форма според въпросния вирусен щам, пътя и интензитета на инфекцията, както и според условията, при които се отглеждат прасетата.

Болестта се характеризира с леко повишена температура и появата на везикули в областта на копитата, по кожата на крайниците и – по-рядко, - рилото, устните, езика и гърдите. Заболеваемостта може да достигне 100%, но смъртността е много ниска, дори несъществуваща.

Инфекцията може да приеме асимптоматична или лека форма, изразяваща се само във временно влошаване на външния изглед на прасетата, но водеща след няколко дни до производството на антитела за неутрализиране на вируса⁶.

⁵ Обикновено се установяват само IgG или едновременно IgG и IgM в серумните проби от заразени прасета с вируса на везикулозната болест по свинете, докато серумите на лъжливо позитивните като правило съдържат само IgM. Не се установяват специфични IgG в серумните проби на заразени прасета с вируса на везикулозната болест по свинете в течение на предходните 10 до 14 дни, но по принцип е възможно те да бъдат открити в една втора кръвна проба. Обаче остава невъзможно надеждното разграничение на наскоро заразените прасета от лъжливо позитивните, докато имунната им система не премине от производството на IgM към това на IgG. Виж също така раздел IX и бележка под линия № 6.

⁶ Специфични IgM като правило могат да се открият в кръвта два или три дни след инфекцията и да изчезнат след около 30 до 50 дни; специфични IgG като правило могат да се открият в кръвта между 10 и 14 дни след инфекцията и да останат в нея в продължение на години. Изотипът Ig може да се определи с помощта на теста Елайза, описан в раздел VIII, част Б, точка 2.

Ако тя присъства в своята субклинична или лека форма, за болестта често има съмнения само след извършените серологични тестове за целите на наблюдението или сертифицирането за износ. Най-скоро наблюдаваните в Европа огнища на везикулозната болест по свинете се характеризира с дискретни симптоми или отсъствие на клинични прояви и често именно серологичните тестове позволяваха да се установи диагнозата.

Независимо от това, клиничните признаци на везикулозната болест по свинете са неразличими от тези на шамната болест. Ето защо всяко везикулозно заболяване трябва първоначално да се третира като съмнение за шап и е важно в най-кратък срок да се направи диференциална диагноза.

Инкубационният период на везикулозната болест по свинете при даден индивид като правило трае от два до седем дни, след което може да се наблюдава повишена температура най-много до 41 °C. В животновъдното стопанство клиничните признаци обаче могат да се проявят едва след продължителен период от време. В този случай се развиват везикули по копитата, главно в мястото на свързката с петата. Тези везикули могат да обхванат цялата венечна част на копитото и да предизвикат загуба на копитото. По-рядко е възможно да се появят везикули и по рилото, по-специално по неговата гръбна страна, устните, езика и гърдите. Може също така да се наблюдава и леко засягане на колената. Засегнатите прасета могат да накуцват и да откажат да се хранят в продължение на няколко дни.

Младите прасета са по-тежко засегнати, но болестта рядко е смъртоносна, за разлика от шапа при популациите от млади прасета.

Има данни за нервни прояви, но те са необичайни. Абортите не са характерни за везикулозната болест по свинете. Спирането на сърцето вследствие на многоогнищен миокардит е един от възможните ефекти на шапа и на енцефаломиокардита, по-специално при младите прасенца, но е изключено в случай на везикулозна болест по свинете.

Като правило възстановяването е пълно след две или три седмици и единствената следа от прекараното заболяване е една тъмна хоризонтална линия по копитото, там, където растежът временно е бил прекъснат.

Заразените прасета могат да имат секреция на вируса от носа или устата и в екскрементите си до 48 часа преди появата на клиничните признаци. Производство на вируса настъпва главно след две седмици. Вирусът може да се изолира в екскрементите до 20 дни след инфекцията, но е установяван в тях до три месеца след инфекцията. Той може да се задържи дълго време в некротизиралите тъкани, получени вследствие разкъсване на везикулите и в екскрементите.

ГЛАВА X

Контролни серуми за везикулозната болест по свинете

Контролен серум	Произход	Коментар ⁷
1	Серум от обикновено прасе	Отрицателен контролен серум
2	Серум, взет 21 дни след инфекцията, от заразено прасе с щама UKG 27/72 (чист) на везикулозната болест по свинете	Силно положителен контролен серум
3	Разтвор 1:10 в NPS на серум, взет 5 дни след инфекцията, от прасе, заразено с щама Италия 8/94 на везикулозната болест по свинете	Слабо положителен серум, взет от прасе малко след инфектирането с неотдавнашен европейски изолат на вируса на везикулозната болест по свинете. Серумът е бил разреден, за да даде слабо положителна реакция на теста Елайза и на теста за вирусно неутрализиране
4	Разтвор 1:40 на серум, взет 21 дни след инфекцията, от прасе, заразено с щама UKG 27/72 на везикулозната болест по свинете	Слабо положителен серум, определящ най-ниското ниво на антитела, способно системно да произвежда положителна реакция на текста Елайза и на теста за вирусна неутрализация в националните референтни лаборатории на Европейския съюз Равностоеен на серум RS 01-04-94 (⁸)

⁷ Тези коментари се отнасят до тестовите, използвани при различните прасета. По отношение на серонаблюдението, следва също така да се вземе под внимание чувствителността на използвания тест.

5	Серум, взет 4 дни след инфекцията, от прасе, заразено с щама UKG 27/72 (чист) на везикулозната болест по свинете	Слабо положителен серум от наскоро заразено прасе
6	Серум, взет 5 дни след инфекцията, от прасе, заразено с щама UKG 27/72 (чист) на везикулозната болест по свинете	Слабо положителен серум от наскоро заразено прасе

⁸ Т.е. серум с достатъчно по-висок титър от този на изключващия тест, за да произвежда системно положителна реакция на теста Елайза и на теста за вирусна неутрализация при повтарящи се тестове.