Този документ е средство за документиране и не обвързва институциите

►**B**

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА

от 1 февруари 2002 година

за одобряване на диагностично ръководство, с което се определят диагностичните процедури, методите за вземане на проби и критериите за оценка на лабораторните тестове за потвърждаване на класическата чума по свинете

(нотифицирано под номер C(2002) 381)

(текст от значение за ЕИП)

(2002/106/ЕО)

(ОВ L 39, 9.2.2002 г., стр. 71)

Изменено с

		Официален вестник		
		№	страница	дата
►**M1**	Решение 2003/859/ЕО на Комисията от 5 декември 2003 година	L 324	55	11.12.2003

▼B

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА

от 1 февруари 2002 година

за одобряване на диагностично ръководство, с което се определят диагностичните процедури, методите за вземане на проби и критериите за оценка на лабораторните тестове за потвърждаване на класическата чума по свинете

(нотифицирано под номер C(2002) 381)

(текст от значение за ЕИП)

(2002/106/ЕО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 2001/89/ЕО на Съвета от 23 октомври 2001 г. относно мерки в Общността за борба с класическата чума по свинете ([1]), и по-специално член 17, параграф 3 и член 29, параграф 1 от нея,

като има предвид, че:

(1) Необходимо е на общностно ниво да бъдат определени диагностичните процедури, методите за вземане на проби и критериите за оценка на резултатите от лабораторните тестове за потвърждаване на класическата чума по свинете.

(2) Приложение IV към Директива 2001/89/ЕО определя функциите и задълженията на референтната лаборатория на Общността за класическа чума по свинете, за да се координират, след консултация с Комисията, методите, използвани в държавите-членки за диагностициране на болестта. Тези функции и задължения включват организацията на периодични сравнителни тестове и предоставянето на стандартни реактиви на ниво на Общността.

(3) Вирусът на класическата чума по свинете не се счита за опасен за човешкото здраве.

(4) Скоро бяха разработени лабораторни тестове с оглед на бързото диагностициране на болестта класическа чума по свинете.

(5) Опитът, натрупан през последните години в борбата с класическата чума по свинете, позволи да се уточнят най-подходящите процедури за вземане на проби и критерии за оценка на резултатите от лабораторните тестове с оглед на правилното диагностициране на болестта в различни ситуации.

(6) Мерките, предвидени в настоящото решение, са в съответствие със становището на Постоянния ветеринарен комитет,

ПРИЕ НАСТОЯЩОТО РЕШЕНИЕ:

Член 1

1. Държавите-членки гарантират потвърждаването на класическата чума по свинете да се основава на:

([1]) ОВ L 316, 1.12.2001 г., стр. 5.

▼B

а) откриването на клинични признаци и постмортални изменения, характерни за заболяването;

б) откриване на вируса, на антигена или на генома в проби от тъканите, органите, кръвта или фекалиите на свинете;

в) демонстрирането на реакция на специфични антитела в кръвните проби,

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

2. Въпреки това националните диагностични лаборатории, посочени в приложение III, точка 1, към Директива 2001/89/ЕО, могат да променят лабораторните тестове, описани в ръководството от приложението към настоящото решение или да използват различни тестове, при условие че се докаже, че чувствителността и спецификата им са идентични.

Чувствителността и спецификата на тези променени или различни тестове се оценява чрез периодични сравнителни опити, организирани от референтната лаборатория на Общността за класическа чума по свинете.

Член 2

Приложения I и IV към Директива 80/217/ЕИО на Съвета от 22 януари 1980 г. относно мерки на Общността за борба с класическата чума по свинете ([1]), последно изменена с Акта за присъединяване на Австрия, Финландия и Швеция, се отменят.

Член 3

Настоящото решение се прилага от 1 ноември 2002 г.

Член 4

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

([1]) ОВ L 47, 21.2.1980 г., стр. 11.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ

ДИАГНОСТИЧНО РЪКОВОДСТВО ЗА КЛАСИЧЕСКАТА ЧУМА ПО СВИНЕТЕ

ГЛАВА I

Въведение, цели и дефиниции

1. За гарантирането на единни процедури за диагностика на класическата чума по свинете, това ръководство:

   а) посочва насоките и минималните изисквания към процедурите за диагностика, методите за вземане на проби и критериите за оценка на резултатите от клиничните прегледи и постмортални обследвания и лабораторните тестове за правилно диагностициране на класическата чума по свинете ([1]);

   б) определя минималните изисквания за биологична безопасност и стандартите за качество, които трябва да се съблюдават от диагностичните лаборатории на класическата чума по свинете и по време на транспорта на пробите;

   в) определя лабораторните тестове, които трябва да се използват за диагностика на класическата чума по свинете и лабораторните методи за генетично типизиране на изолатите на вируса на класическата чума по свинете.

2. Това ръководство е предназначено предимно за компетентните органи, които вземат мерки за борба с класическата чума по свинете. Поради това в него се набляга най-вече на принципите и прилагането на лабораторните тестове и оценката на резултатите от тях и не се навлиза в подробности в лабораторните методи.

3. По смисъла на настоящото ръководство, освен дефинициите, посочени в член 2 от Директива 2001/89/ЕО, се прилагат и следните дефиниции:

   а) „съмнителен обект“ е всеки свиневъден обект, в което са държани една или повече свине, за които се подозира, че са заразени от вируса на класическата чума по свинете, или контактен обект по смисъла на член 2, буква x) от Директива 2001/89/ЕО;

   б) „изолиран случай“ е всяка свиня, която реагира положително на серологичните тестове за откриване на класическа чума по свинете, без преди това да е била в контакт с вируса на класическата чума по свинете и за която се смята, че не е заразила останалите свине ([2]);

   в) „епидемиологично подразделение“ или „подразделение“ е сградата, мястото или съседния терен, където групи свине от един обект са държани, така че често са били в пряк или непряк контакт едни с други, но са били разделени от останалите свине в същия обект;

   г) „контактни свине“ са свинете от обекта, държани пред последните 21 дни в пряк контакт с една или повече свине, за които се подозира, че са заразени от вируса на класическата чума по свинете.

ГЛАВА II

Описание на класическата чума по свинете с акцент върху на диференциалната диагноза

A. **Въведение**

1. Класическата чума по свинете се предизвиква от RNA вирус с обвивка от рода *pestivirus* от семейство *flaviviridae*. Този вирус е сроден на чумния вирус по преживните животни, предизвикващ вирусната диария при говедата и „border disease“ по овцете. Тази връзка има голямо значение за диагностиката, защото се получават

([1]) При определяне на броя на пробите за вземане за лабораторните тестове трябва да се вземе предвид също така чувствителността на тестовете, които ще бъдат извършени. Броя на животните, от които са взети проби, е по-висок от този, посочен в настоящото ръководство, ако чувствителността на теста, който трябва да бъде използван, не е много висока.

([2]) Изолираните случаи могат да имат титри от неутрализиращи антитела на вируса, чиито стойности се колебаят от граничните стойности (което е и най-често срещания случай) до високо положителни такива. При повторно вземане на проби изолираните случаи могат да проявят нарастващ или константен титър. Като цяло прасетата от дадено стадо, които проявяват тези фалшиви/позитивни реакции, са твърде малко на брой.

▼B

кръстосани реакции, които могат да доведат до лъжливо положителни резултати от лабораторните тестове.

2. Вирусът на класическата чума по свинете е относително стабилен в мокрите екскреции на инфектираните свине, в свинските трупове, в прясното свинско месо и в някои продукти от свинско месо. Той лесно се инактивира от детергенти, мастни разтворители, протеази и обичайните дезинфекционни препарати.

3. Основният естествен път на инфектиране е орално-назален, чрез пряк или непряк контакт с инфектирани свине или чрез приемането от животните на храни, заразени с вируса. В зоните с висока плътност на свине, вирусът се разпространява лесно от една ферма в друга. Вирусът се предава и чрез спермата на инфектирани нерези.

4. Инкубационният период при отделните животни се движи между една седмица и десет дни, но в реални условия е възможно клиничните признаци в даден обект да се проявят от две до четири седмици и дори повече след появата на вируса, ако са били заразени само възрастни свине или ако вирусният щам е отслабен.

5. Клиничните прояви на класическата чума по свинете са изключително разнообразни и могат да бъдат объркани с тези на редица други заболявания. Сериозността на симптомите зависи предимно от възрастта на животното и от силата на вируса. Обикновено младите животни са по-тежко засегнати от по-възрастните. При по-възрастните свине еволюцията на заболяването често е смекчена, дори субклинична.

6. Различават се остра, хронична и конгенитална форма на класическата чума по свинете.

Б. **Остра форма**

1. Острата форма на болестта засяга най-често подрастващите прасенца и свинете за угояване. Първите признаци са анорексия, летаргия, температура, конюнктивит, увеличаване на лимфните възли, дихателни проблеми и запек, последван с диария.

   Типичните хеморагични лезии по кожата се наблюдават най-вече по ушите, опашката, корема и долната част на крайниците през втората и третата седмица от инфектирането до смъртта. Често се наблюдават и неврологични признаци като треперене на задните крака, некоординирани движения и конвулсии.

   Температурата е постоянно висока. Обикновено тя надвишава 40 °C, докато при възрастните свине тя никога не трябва да надвишава 39,5 °C.

2. Вирусът на класическата чума по свинете предизвиква тежка левкопения и потискане на имунната система, което често води до вторични респираторни или чревни инфекции Признаците на тези вторични инфекции могат да маскират или да замъглят най-типичните симптоми на класическата чума по свинете и да въведат в заблуда животновъда или ветеринарния лекар.

   Смъртта настъпва обикновено след около месец. Има и случаи на оздравяване благодарение на производството на антитела, най-често при възрастните животни, които нямат тежки клинични признаци. Антителата срещу вируса на класическата чума по свинете се откриват на втората до третата седмица след заразяването.

3. Патологичните изменения, които се установяват при постморталния преглед, засягат най-вече лимфните възли и бъбреците. Лимфните възли са увеличени, едематозни и хиперемирани. Хиперемията по бъбреците варира от едва видими петехии до истински хеморагични кръвонасядания. Подобни хеморагични лезии могат също да се наблюдават по пикочния мехур, ларинкса, епиглота и сърцето; те достигат понякога и серозните обвивки на корема и гръдния кош. Често се наблюдава и негноен енцефалит. Понякога лезиите, причинени от вторичните инфекции, могат да заблудят ветеринарния лекар. Инфарктът на далака се счита за патогномоничен признак, но не е често явление.

4. Най-общо острата форма на африканската чума по свинете дава клинична и патологична картина, много близка до тази на класическата чума по свинете. Когато се появят, хеморагиите по кожата и ушите лесно се откриват и предвещават остра африканска или

▼B

класическа чума по свинете. Малко други болести предизвикват подобни лезии.

Трябва да се мисли за остра форма на класическата чума по свинете и при съмнение за еризипел, репродуктивен и респираторен синдром при свинете, отравяне с кумарин, хеморагична пурпура, кахектичен мултисистемен синдром след отбиване, кожен и нефрозен синдром, инфекция със салмонела или пастьорела или всеки друг чревен или респираторен синдром, придружен с температура, която не реагира на антибиотичното лечение.

5. Вирусът на класическата чума по свинете се предава със слюнката, урината и изпражненията, в които той се съдържа от появата на клиничните признаци до смъртта. Вирусът може да се предаде и чрез спермата.

В. **Хронична форма**

1. Инфекцията еволюира хронично, когато свинете не могат да развият ефикасна имунна реакция на вируса на класическата чума по свинете. Първите признаци на хроничната инфекция са подобни на тези при острата форма. Впоследствие се появяват и доста неспецифични признаци като епизодична температура, хроничен ентерит и кахексия. Типичните кожни хеморагии отсъстват.

Свинете могат да проявяват клиничните признаци на болестта два или три месеца преди смъртта. Вирусът на класическата чума по свинете се разпространява непрекъснато от първата поява на клиничните признаци до смъртта. Временно могат да се открият антитела в серумните проби.

2. Патологичните изменения са по-малко типични; в частност хеморагичните лезии по органите и серозните обвивки могат да отсъстват. При животните с хронична диария често се наблюдават некротични лезии по илеума, илеоцекалните клапи и ректума.

3. Тъй като клиничните признаци на хроничната форма на класическата чума по свинете не са специфични, редица други заболявания трябва да бъдат взети предвид за поставяне на диференциална диагноза. Телесната температура не се покачва непременно при всички животни, но в заразен обект се констатира покачване на температурата поне при част от животните.

Г. **Конгенитална форма и късна проява на болестта**

1. Вирусът на класическата чума по свинете успява да премине през плацентата на бременните свине майки и да инфектира зародиша, като често у свинята майка заболяването остава в субклинична форма.

Изходът от заразяването на зародиша през плацентата зависи много от стадия на бременността и силата на вируса. Инфекция в началото на бременността може да доведе до спонтанен аборт или мъртво раждане, мумификация или увреждане на плода. Това води до намаляване на раждаемостта в обекта.

Заразяването на бременните свине преди 90-ия ден от бременността може да доведе до раждането на прасета в състояние на персистиращо наличие на вирус, които може да са клинично нормални при раждането и да преживеят няколко месеца. След раждането растежът им е забавен, намират се в състояние на кахексия; на моменти може да се наблюдава и конгенитален тремор. Подобна еволюция на инфекцията се диагностицира като късна проява на класическа чума по свинете Прасенцата могат да имат огромна роля в разпространяването на болестта и поддържането на вируса в обекта, защото непрекъснато го разнасят до смъртта си.

2. Класическата чума по свинете може да се окаже изключително трудна за откриване в свиневъдните обекти, ако еволюцията на инфекцията е замъглена и се смесва с редица други патологични състояния. Намаляването на раждаемостта и случаите на аборт може да се дължат както на вируса на класическата чума по свинете, така и на инфекция с парвовирус, репродуктивен и респираторен синдром при свинете, лептоспироза или болестта на Ауески. От патологична гледна точка резултатите от аборта, причинен от класическа чума по свинете, не се различават от тези при аборт, причинен от други патогенни агенти.

▼B

При съмнение за инфекциозна болест на половата система трябва незабавно да се търси класическа чума по свинете във всички случаи, когато въпросният обект се смята за рисково (намира се например в зона, където е обявена класическа чума по дивите свине) и при всяко положение, след като бъдат изключени най-честите заболявания на репродуктивната система.

ГЛАВА III

Насоки за основните критерии, приложими при преценка на един свиневъден обект като съмнителен по отношение на класическа чума по свинете

Един свиневъден обект се счита за съмнителен въз основа на следните констатации, критерии и мотиви:

а) клинични и патологични прояви у свинете. Основните клинични и патологични прояви са следните:

— треска, увеличена заболеваемост и смъртност,

— температура с хеморагичен синдром,

— температура с неврологични симптоми,

— температура с неустановен произход, която не спада от антибиотичното лечение,

— аборти и чести проблеми с раждаемостта през последните три месеца,

— конгенитален тремор при малките прасета,

— хронични заболявания на животните,

— забавен растеж при младите животни (хилави),

— петехии или хеморагични кръвонасядания, особено на лимфните възли, бъбреците, далака, пикочния мехур и ларинкса,

— инфаркт или хематоми, най-вече на далака,

— разрязвания на дебелото черво при хроничните случаи, особено близо до илеоцекалната връзка;

б) епидемиологични прояви. Основните епидемиологични прояви, които трябва да се вземат под внимание са следните:

— свине, които са били в пряк или непряк контакт със свине от обект, където е доказано наличието на класическа чума по свинете,

— обект, от който са изнесени прасенца, които впоследствие са се оказали заразени от класическа чума по свинете,

— свине майки, подложени на изкуствено осеменяване със семенна течност от съмнителен източник,

— свине, които са били в пряк или непряк контакт с диви свине от популация, където е установена класическа чума по свинете,

— свине, държани на открито в зона, заразени от класическа чума по свинете,

— свине, хранени с хранителни отпадъци, които най-вероятно не са били пречистени, за да се дезактивира вирусът на класическата чума по свинете,

— свине, които са били изложени на риск, например поради влизането на някои лица в обекта, транспорт и т.н.;

в) признаци, свързани с резултатите от серологичните тестове. Основните лабораторни признаци са следните:

_____

▼B

— серологична реакция, дължаща се на инфекция с вируса на класическата чума по свинете, останала незабелязана или отдадена на ваксинация ([1]),

— кръстосана реакция между антитела срещу класическата чума по свинете и други чумни вируси ([2]),

— откриване на изолирани реагенти ([3]).

ГЛАВА IV

Процедури за контрол и вземане на проби

A. **Насоки и процедури за клиничен преглед и за вземане на проби от свине в съмнителни свиневъдни обекти**

1. Държавите-членки следят да се извършва клиничен преглед, вземане на проби и подходящи лабораторни изследвания в съмнителните свиневъдни обекти за потвърждаване или отхвърляне на появата на класическа чума по свинете, съгласно насоките и процедурите, определени в точки 2 - 7.

   Независимо от приемането на мерките, посочени в член 4, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО в съответния обект, тези насоки и процедури се прилагат също за всички заболявания, за които диференциалната диагноза включва възможност за класическа чума по свинете. Това включва и случаите, когато клиничните признаци и епидемиологичната картина на болестта при свинете подсказват голяма вероятност за поява на класическа чума по свинете.

   Във всички други случаи на съмнение за инфекция с вируса на класическата чума по свинете на една или повече свине в съответния съмнителен свиневъден обект се прилагат мерките, посочени в член 4, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО.

   При съмнение за класическа чума по свинете при свине, намиращи се в кланица или в превозни средства, насоките и процедурите от точки 2—7 се прилагат *mutatis mutandis*.

2. Когато официален ветеринарен лекар посещава съмнителен свиневъден обект, за да потвърди или отхвърли наличието на класическа чума по свинете, е необходимо:

   — да се провери документацията, свързана с продукцията и със здравното състояние на животните, ако има такива,

   — да се извърши инспекция във всяко подразделение в обекта за подбор на свинете, върху които ще бъдат извършени клинични изследвания.

   Клиничният преглед включва измерване на телесната температура и обхваща на първо място следните свине или групи свине:

   — болни свине или свине, при които се наблюдава анорексия,

   — свине, скоро излекувани от заболяване,

   — свине, въведени неотдавна в свиневъдния обект и произхождащи от заразени зони или от други съмнителни местонахождения,

   — свине, държани в подразделения, посетени неотдавна от външни лица, които скоро преди това са били в близък контакт със съмнителни или заразени с класическа чума по свинете животни или, за които се знае, че са имали особено рискови контакти с потенциален източник на вируса на класическата чума по свинете,

([1]) Ако свинете са ваксинирани срещу класическа чума по свинете с конвенционална ваксина, те могат да се окажат серопозитивни вследствие на самата ваксинация или поради латентна инфекция при ваксинираните животни.

([2]) При определени обстоятелства до 10 % от свинете в дадено стадо могат да покажат наличие на антитела на чумни вируси по преживните животни, причиняващи вирусна диария по говедата или „border disease“. Такъв може да е например случаят, когато свинете влизат в пряк контакт с говеда или овце, заразени с вируса, причиняващ тези две болести, или когато свинете влизат в контакт с материали, заразени с чумни вируси по преживните животни.

([3]) Във всички актуални серологични тестове за класическа чума по свинете малка пропорция от серуми предизвикват фалшиви позитивни резултати, дължащи се или на липсата на специфичност на метода, или на серума от изолирани реагенти.

▼B

— свине, от които вече са вземани проби и на които са правени серологични тестове за откриване на класическата чума по свинете в случаите, когато резултатите от тестовете не позволяват да се изключи наличието на класическа чума по свинете, както и на свинете в контакт с тях.

Ако инспекцията в съмнителния свиневъден обект не установи наличие на нито едно от гореизброените животни, компетентният орган, спазвайки другите мерки, евентуално приложени във въпросния свиневъден обект съгласно Директива 2001/89/ЕО и отчитайки епидемиологичната ситуация, гарантира:

— извършването на нови изследвания във въпросния обект съгласно точка 3 или

— вземането на кръвни проби от свинете в обекта за лабораторни тестове. В този случай процедурите за вземане на проби, определени в точка 5 и в част Е, точка 2 служат като пример, или

— приемането или продължаване действието на мерките, предвидени в член 4, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО, докато бъдат направени допълнителни изследвания във въпросния обект, или

— изключването на наличие на класическа чума по свинете.

3. При позоваване на тази точка, клиничният преглед в обекта трябва да обхване случайно подбрани свине от подразделенията, където рискът от внасяне на вируса на класическата чума по свинете е установен, или в подразделения, където има съмнение за поява на вируса.

Минималният брой свине, които се изследват, трябва да позволи да се открие в подразделенията наличие на болестта в 10 % с 95 % сигурност.

Въпреки това:

— при свине майки за разплод минималният брой животни за преглед трябва да позволи откриването на висока температура при повече от 5 %, в случай на нужда с 95 % сигурност,

— в центрове за получаване и съхранение на сперма, всички нерези трябва да бъдат изследвани.

4. Ако в съмнителен обект е установено присъствието на мъртви или умиращи свине, след смъртта е необходимо да бъде направен преглед, за предпочитане поне на пет от свинете, и по-специално на свинете, които:

— преди смъртта са имали или имат явни прояви на болестта,

— са имали висока температура,

— са умрели неотдавна.

Ако при прегледа не се открият лезии, позволяващи да се заключи за появата на класическа чума по свинете, но епидемиологичната ситуация налага допълнителни проучвания, се извършва следното:

— в подразделението, където са държани умрелите или умиращите свине, се прави клиничен преглед съгласно точка 3 и се вземат проби съгласно точка 5, и

— може да бъде извършено постмортално обследване на три или четири от свинете, които са били в контакт.

Независимо от наличието или липсата на лезии, по които да се заключи за появата на класическа чума по свинете, проби от органите или тъканите на прегледаните след смъртта свине се изпращат за вирусологично изследване съгласно глава V, част Б, точка 1. Пробите се вземат за предпочитане от свине, умрели неотдавна.

По време на постморталното обследване, компетентният орган се уверява, че:

— са взети всички предпазни и хигиенни мерки за предотвратяване на разпространението на болестта и

— умиращите свине се умъртвяват по хуманен начин съгласно разпоредбите на Директива 93/119/ЕИО на Съвета.

▼B

5. Ако в съмнителен обект се установят други клинични признаци или лезии, насочващи към появата на класическа чума по свинете, но компетентният орган счете, че те са недостатъчни за потвърждаване на наличието на огнище на заболяването и се налагат лабораторни изследвания, кръвни проби се вземат от съмнителните свине и от други свине във всяко едно от подразделенията, в които са държани съмнителните свине, по описаните по-долу процедури.

   Минималния брой проби за серологични тестове трябва да позволи да се открие във въпросните подразделения 10 % серологично наличие с 95 % сигурност.

   Въпреки това:

   — при свинете майки за разплод минималният брой животни, от които се взема проба, трябва да позволи откриването на 10 % серологично наличие с 95 % сигурност ([1]),

   — в центровете за получаване и съхранение на сперма, кръвни проби се вземат от всички нерези.

   Броят проби за вирусологично изследване се съобразява с инструкциите на компетентния орган, който ще отчете цялата гама тестове, чувствителността на използваните лабораторни тестове и епидемиологичната ситуация.

6. Ако съмнението за наличие на класическа чума по свинете във въпросния обект е свързано с резултатите от предишни серологични тестове, освен кръвните проби от свинете, посочени в точка 2, алинея втора, пето тире, се извършват следните процедури:

   а) ако серопозитивните свине са бременни свине майки, някои от тях, за предпочитане поне три, се умъртвяват и преглеждат след смъртта. Преди умъртвяването се взема кръвна проба за допълнителни серологични тестове. Зародишите се изследват за откриване на вируса, на антигена или генома на вируса на класическата чума по свинете съгласно глава VI, с оглед на откриване на вътрешноутробна инфекция;

   б) ако серопозитивните свине са майки свине, които кърмят, от всички прасенца се вземат кръвни проби и се изследват за наличие на вируса на класическа чума по свинете, на антигена или генома на вируса съгласно глава VI. Кръвни проби трябва да бъда взети и от свинете майки за допълнителни серологични тестове.

7. Ако след извършените в съмнителния обект изследвания не се открият клинични признаци и лезии, насочващи към появата на класическа чума по свинете, но компетентният орган счете за необходимо да бъдат направени допълнителни лабораторни тестове, за да се отхвърли всякаква възможност за класическа чума по свинете, процедурите за вземане на проби, описани в точка 5, служат за модел.

Б. **Процедури за вземане на проби в свиневъден обект в случай на умъртвяване на свине вследствие на потвърждаване на заболяването**

1. За да се установят обстоятелствата, при които вирусът на класическата чума по свинете е проникнал в заразения свиневъден обект и времето от проникването му, при умъртвяването на свинете в обекта, след потвърждаване на огнището съгласно член 5, параграф 1, буква а) от Директива 2001/89/ЕО, се вземат кръвни проби за серологични тестове от случайно подбрани свине в момента на умъртвяването им.

2. Минималният брой свине, от които се вземат проби, трябва да позволи откриването на серологично наличие от 10 % с 95 %

([1]) В някои случаи, например, когато се подозира наличието на класическа чума по свинете в свиневъден обект с ограничен брой свине за угояване, пропорцията на заразените свине майки може да е много малка. В такива случаи трябва да се вземат проби от по-голям брой свине.

▼B

сигурност за свинете от всяко подразделение на свиневъдния обект ([1]).

Проби могат да се вземат и за вирусологично изследване по инструкциите на компетентния орган, отчитащи цялата гама тестове, чувствителността на използваните лабораторни тестове и епидемиологичната ситуация.

3. Въпреки това при появата на вторични огнища компетентният орган може да реши да въведе дерогация от точки 1 и 2 и да утвърди процедури за вземане на проби *ad hoc*, отчитайки установената епидемиологична ситуация в първоизточника, както и пътищата за проникване на вируса в обекта и евентуалното разпространение на болестта от него.

B. **Процедури за вземане на проби в случай на умъртвяване на свине в съмнителен обект като превантивна мярка**

1. За да се потвърди или отхвърли наличието на класическа чума по свинете и да се получат допълнителни епидемиологични данни, при умъртвяването на свине в съмнителен обект като превантивна мярка съгласно член 4, параграф 3, буква а) или член 7, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО, по процедурата, описана в точка 2, се вземат кръвни проби за серологично изследване и кръвни проби или проби от тонзилите за вирусологично изследване.

2. Вземането на проби се отнася предимно за:

— свине, при които постморталното обследване е установило признаци или лезии, насочващи към класическа чума по свинете, и контактните с тях свине,

— други свине, които са имали рискови контакти с инфектирани свине, или свине, за които има съмнение, че са заразени с вируса на класическата чума по свинете.

Пробите от свинете се вземат в съответствие с инструкциите на компетентния орган, отчитащи епидемиологичната ситуация. В този случай процедурите за вземане на проби, описани в следващите втора, трета и четвърта алинея, се използват като насока.

Освен това от свине от всяко подразделение на обекта се вземат проби на случаен принцип ([2]). В този случай минималният брой на пробите трябва да позволи откриване на серологично наличие от 10 % с 95 % сигурност за съответното подразделение.

Въпреки това:

— при свинете майки за разплод минималният брой животни, от които се взема проба, трябва да позволи откриването на 5 % серологично наличие с 95 % сигурност ([3]),

— в центровете за получаване и съхранение на сперма, трябва да се вземат кръвни проби от всички нерези.

Видът на вземаните проби за вирусологичните тестове и тестът, който трябва да се използва се съобразяват с инструкциите на компетентния орган, който отчита цялата гама тестове, които могат да бъдат използвани, тяхната чувствителност и епидемиологичната ситуация.

([1]) Въпреки това, ако се прилага дерогацията предвидена в член 6, параграф 1 от Директива 2001/89/ЕО, вземането на проби трябва да се направи в подразделенията на обекта, където са умъртвявани свине, без да се нарушават другите изследвания и вземане на проби, които ще се осъществяват с останалите свине от обекта, в съответствие с инструкциите на компетентния орган.

([2]) Въпреки това, ако компетентният орган е ограничил прилагането на умъртвяване единствено до частта на обекта, в която се срещат свинете, за които има съмнение, че са инфектирани или заразени с вируса на класическа чума по свинете, в съответствие с член 4, параграф 3, буква а) от Директива 2001/89/ЕО, вземането на проби трябва да се отнася до подразделенията на обекта, в които се прилага тази мярка, без да се нарушават другите изследвания и проби, които се извършват с останалите свине от обекта в съответствие с инструкциите на компетентния орган.

([3]) В някои случаи, например, когато има подозрения за наличие на класическа чума по свинете в дадено стопанство, разполагащо с определен брой млади свине, пропорцията на заразени свине майки може да е много малка. В този случай трябва да се вземат проби от по-голям брой свине майки.

▼B

Г. **Процедури за контрол и вземане на проби преди издаването на разрешение за преместване на свинете от свиневъдните обекти, разположени в защитни или надзорни зони и в случай на клане или умъртвяване на тези свине**

1. Без да се нарушават разпоредбите на член 11, параграф 1, буква е), втора алинея от Директива 2001/89/ЕО, за да се издаде разрешение за преместване на свинете от обект, разположен в защитна или надзорна зона съгласно член 10, параграф 3 от същата директива, клиничният преглед от официалния ветеринарен лекар трябва да се извършва:

   — през последните 24 часа преди преместването на свинете,

   — съгласно разпоредбите на буква А, точка 2.

2. Ако свинете се транспортират към друг обект, освен изследванията по точка 1 трябва да се извърши клиничен преглед на свине от всяко подразделение, където са държани свинете, които ще се преместват. За животните на повече от три или четири месеца прегледът включва измерване на температурата на определен брой свине.

   Минималният брой свине, които се преглеждат, трябва да позволи откриването на висока температура при повече от 10 % с 95 % сигурност за въпросните подразделения.

   Въпреки това:

   — при свинете майки за разплод, минималният брой животни, от които се взема проба, трябва да позволи откриването на 5 % наличие на висока температура, в случай на нужда, с 95 % сигурност в подразделението, в което се намират свинете, които трябва да се транспортират,

   — при нерези, трябва да бъдат прегледани всички нерези които ще бъдат транспортирани.

3. Ако свинете се транспортират до кланица, предприятие за преработка или друго място, където ще бъдат умъртвени или заклани, освен изследванията, предвидени от разпоредбите в точка 1, се извършва клиничен преглед на свине от всяко подразделение, където са държани свинете, които ще се транспортират. Ако животните са на повече от три или четири месеца, прегледът трябва да включва измерване на температурата на определен брой свине.

   Минималният брой свине, които трябва да се контролират, трябва да позволи откриването на висока температура при повече от 20 %, в случай на нужда, с 95 % сигурност във въпросното подразделение.

   Въпреки това при свинете майки или нерезите за разплод минималният брой свине, които се преглеждат, трябва да позволи откриването на висока температура при повече от 5 %, в случай на нужда, с 95 % сигурност в подразделението, в което са държани свинете, които трябва да се транспортират.

4. По време на клането или умъртвяването на свинете по точка 3, от свине от всяко едно от подразделенията, откъдето са преместени животните, трябва да се вземат кръвни проби за серологично изследване или кръвни проби, или проби от тонзилите за вирусологично изследване.

   Минималният брой проби трябва да позволи да се открие серологично наличие или наличие на вируса в повече от 10 % с 95 % сигурност във всяко подразделение.

   Въпреки това при свинете майки за разплод или при нерезите минималният брой свине, от които трябва се вземат проби, трябва да позволи да се открие серологично наличие на вируса в повече от 5 % с 95 % сигурност в подразделението, където са държани тези свине.

   Видът проби, които трябва да се вземат, и тестът, който трябва да се използва, ще бъдат съобразени с инструкциите на компетентния орган, който отчита гамата тестове, които могат да се направят, чувствителността им и епидемиологичната ситуация.

5. Въпреки това, ако при клането или умъртвяването на свинете се открият клинични признаци или лезии при аутопсията, подсказващи наличието на класическа чума по свинете, чрез дерогация от точка 4,

▼B

посочена по-горе, се прилагат разпоредбите за вземане на проби определени в точка В.

Д. **Процедури за контрол и вземане на проби във връзка с повторно зареждане на свиневъден обект със свине**

1. В случай на зареждане на обект със свине съгласно член 13, параграф 2, буква а) или параграф 2, буква б), или член 19, параграф 8, втора алинея, буква б) от Директива 2001/89/ЕО, трябва да се прилага следната процедура за вземане на проби:

   — при първоначално зареждане с възрастни свине се вземат кръвни проби за серологично изследване от достатъчен брой случайно избрани животни, позволяващ да се открие серологично наличие от 10 % с 95 % сигурност във всяко подразделение от обекта,

   — при пълно повторно зареждане трябва да се вземат кръвни проби за серологично изследване от достатъчен брой случайно подбрани свине, позволяващ да се открие серологично наличие от 20 % с 95 % сигурност във всяко подразделение от обекта.

   За свинете майки или нерезите за разплод обаче, броят проби трябва да бъде такъв, че да позволи откриването на серологично наличие от 10 % с 95 % сигурност.

2. След зареждането на обекта със свине компетентният орган се уверява, че при поява на заболяване или на смърт на свине в обекта без известна причина, въпросните свине ще бъдат незабавно обследвани за наличие на класическа чума по свинете. Тези разпоредби се прилагат, докато не се премахнат ограниченията, наложени на въпросния свиневъден обект съгласно член 13, параграф 2, буква а), втора алинея и член 19, параграф 8, втора алинея, буква б), второто изречение от Директива 2001/89/ЕО.

Е. **Процедури за вземане на проби в свиневъдни обекти в защитната зона преди премахването на ограниченията**

1. За да се позволи премахване на ограниченията, наложени по силата на член 10 от Директива 2001/89/ЕО в защитна зона, във всички свиневъдни обекти в зоната се извършва следното:

   — прави се клиничен преглед в съответствие с процедурите, определени в част А, точки 2 и 3,

   — вземат се кръвни проби за серологични изследвания съгласно посоченото в точка 2.

2. Минималният брой кръвни проби трябва да позволи откриването на серологично наличие от 10 % с 95 % сигурност при свинете за всяко подразделение на обекта.

   Въпреки това:

   — за свине майки за разплод минималният брой проби трябва да позволи откриването на серологично наличие от 5 % с 95 % сигурност,

   — в центровете за получаване и съхранение на сперма кръвни проби трябва да се вземат от всички нерези.

Ж. **Процедури за вземане на проби в стопанствата в надзорната зона преди премахването на ограниченията**

1. За да се премахнат ограниченията, наложени по силата на член 11 от Директива 2001/89/ЕО, в надзорна зона, във всички свиневъдни обекти в зоната трябва да се извърши клиничен преглед в съответствие с процедурите от част А, точка 2.

   Освен това трябва да се вземат кръвни проби за серологично изследване от свинете:

   — от всички обекти, в които няма свине на възраст от два до осем месеца,

   — във всички случаи, когато компетентният орган счете, че е възможно свине майки за разплод да са заразени с класическа чума по свинете, която да не е била открита,

   — във всеки друг обект, където компетентният орган сметне за необходимо,

▼B

— във всички центрове за получаване и съхранение на сперма.

2. При всяко вземане на кръвни проби за серологично изследване в стопанства, разположени в надзорната зона, броят проби отговаря на изискванията от част Е, точка 2. Ако обаче компетентният орган счита, че е възможно свине майки за разплод да са заразени с класическа чума по свинете, която не е открита, проби могат да бъдат взети само от подразделенията, в които са държани въпросните животни.

3. **Процедури за серологичен контрол и вземане на проби в райони, където има съмнение или потвърждение за наличие на класическа чума по дивите свине**

1. В случай на серологичен контрол на дивите свине в зона, където има потвърждение или съмнение за наличие на класическа чума по свинете, предварително се установява размерът и географския район на популацията, от който ще се вземат проби, за да се определи броя на пробите. Големината на пробата се определя в зависимост от предполагаемия брой живи животни, а не според броя на отстреляните на лов.

2. Ако няма налични данни за гъстотата и размера на популацията, географския район, от който ще се вземат проби, се определя в зависимост от постоянното присъствие на диви свине, наличието на естествени или изкуствени прегради, които ефикасно спират постоянните масови придвижвания на животните. Ако няма такива или районът е обширен, се препоръчва да се определят зони за вземане на проби от по 200 km^2 максимум, в които обикновено могат да живеят от 400 до 1 000 диви свине.

3. Без да се нарушават разпоредбите на член 15, параграф 2, буква в) от Директива 2001/89/ЕО минималният брой диви свине, от които се вземат проби в определена зона, трябва да позволи откриването на 5 % серологично наличие с 95 % сигурност. За тази цел трябва да се вземат проби от поне 59 животни за всеки отделен район.

Също така се препоръчва:

— в районите, където интензивно и редовно се ловува или се практикува селективен лов за борба с болестите, около 50 % от пробите да се вземат от животни на възраст от 3 месеца до една година, 35 % от животни от една до две години и 15 % от животни над две години,

— в районите, където интензивността на лова е слаба или липсва, проби се вземат от поне 32 животни от всяка една от трите възрастови групи,

— пробите се вземат в кратък период, за предпочитане по-малко от месец,

— възрастта на животните се определя по зъбите.

4. Вземането на проби за вирусологично изследване от отстреляни или открити мъртви диви свине трябва да се извършва съгласно разпоредбите на глава V, част Б, точка 1.

Когато се счете за необходимо да се извърши вирусологичен контрол на отстреляните на лов животни, той се прави приоритетно върху животни на възраст от три месеца до една година.

5. Всички проби, които трябва да бъдат изпратени в лабораторията, трябва да се придружават от въпросника, посочен в член 16, параграф 3, точка 1 от Директива 2001/89/ЕО.

ГЛАВА V

Общи процедури и критерии за вземане и транспортиране на пробите

А. **Общи процедури и критерии**

1. Преди да се вземат проби от съмнителен свиневъден обект, трябва да се състави карта на обекта и да се определят епидемиологичните подразделения.

2. Във всички случаи, когато е необходимо вземането на повторни проби, всички свине, от които се вземат проби, се маркират по

▼B

специфичен начин, така че от тях да могат да се вземат лесно нови проби.

3. Без да се засяга глава IV, част А, точка 5.б, проби за серологично изследване не трябва да се вземат от прасенца на възраст под осем седмици.

4. Всички проби се изпращат в лабораторията заедно с подходящите формуляри съгласно предписанията на компетентния орган. Формулярите съдържат данни за историята на изследваните животни и установените след смъртта клинични признаци или лезии.

   При свинете, държани в свиневъдни обекти, се дава ясна информация за възрастта, категорията и обекта по произход на всички животни, от които се вземат проби. Препоръчва се местонахождението на всяка една от свинете, от които се вземат проби в обекта, да се регистрира едновременно с уникалния идентификационен номер на марката ѝ.

Б. **Вземане на проби за вирусологично изследване**

1. Тъканите от тонзилите, далака и бъбреците на умрелите или умъртвени свине са най-подходящите проби за откриване на вируса, антигена или генома на класическата чума по свинете. Освен това се препоръчва да се вземат две проби от други лимфни тъкани като ретрофарингеалните, паротидните, мандибуларните или мезентерийните лимфни възли, както и проба от илеума. Когато се прави автолизата на труповете, за предпочитане са проби от цяла дълга кост или от стернума.

2. От животните с признаци на треска или други признаци на заболяване трябва да се вземат проби от несъсирена или съсирена кръв, в съответствие с инструкциите на компетентния орган.

3. Препоръчва се да се направят вирусологични изследвания на болните животни. Тези изследвания обикновено имат ограничено значение, когато се прилагат за наблюдение на животни, при които не се наблюдават клинични признаци. Ако обаче вземането на проби с широк обхват цели да се открие вирусът на класическата чума по свинете през инкубационния му период, най-подходящи са пробите от тонзилите.

В. **Транспорт на пробите**

1. Препоръчва се всички проби:

   — да се транспортират и складират в непропускливи съдове,

   — да не се замразяват дълбоко, но да се съхраняват на хладно при хладилна температура,

   — да се доставят в лабораторията възможно най-бързо,

   — да се поставят опаковани в хладилна чанта, а не в контакт с лед,

   — от тъкани и органи се поставят в херметично затворен и прилежно етикетиран полиетиленов плик. След това трябва да се поставят в големи устойчиви съдове, обвити с абсорбиращ материал, достатъчен за защита от повреда и за абсорбиране при евентуално изтичане,

   — по възможност директно се транспортират до лабораторията от компетентни лица, за да се гарантира бърз и надежден транспорт.

2. От външната страна на опаковката трябва да е отбелязан адресът на лабораторията получател и на видимо място да се постави следното указание: „Патологичен материал от животински произход. Нетрайно. Чупливо. Да се отвори единствено в лаборатория за класическа чума по свинете.“

3. Лабораторията, за която са предназначени пробите, трябва предварително да се информира за момента и обстоятелствата около пристигането на пробите.

▼B

4. При транспорта на проби със самолет до референтната лаборатория на Общността за класическа чума по свинете ([1]) от държавите-членки, с изключение на Германия, или от трети страни, на опаковката трябва да се поставя етикет съгласно разпоредбите на Международната асоциация за въздушен транспорт.

ГЛАВА VI

Принципи и използване на вирусологичните тестове и оценка на резултатите от тях

А. **Откриване на антиген на вируса**

1. *Пряк имунофлуоресцентен метод*

Принципът на метода е детекция на антиген на вируса във фини криосрезове от органични тъкани от свине със съмнение за инфекция с вируса на класическата чума по свинете. Вътреклетъчният антиген се открива с помощта на антитяло, конюгирано с флуоресцеин-изотиоцианат (ФИГЦ). Всеки положителен резултат се потвърждава с повтаряне на цветната реакция с помощта на специфично моноклонално антитяло.

Най-подходящи органи са сливиците, бъбреците, далакът, различните лимфни възли и илеумът. При дивите свине може да се използва и натривка от костен мозък, ако гореизброените органи не са на разположение или са автолизирани.

Тестът може да се извърши в рамките на един ден. Тъй като пробите се вземат само от органи на мъртви животни, приложението им за откриване на болестта е ограничено. Сигурността на резултатите от теста може да бъде намалена от съмнително оцветяване, особено когато извършващото лице няма достатъчно опит с метода, или когато изследваните органи са били автолизирани.

2. *Тест ЕЛАЙЗА за откриване на антиген*

Различни техники ЕЛАЙЗА позволяват да се открива антигенът на вируса. Антигенът ЕЛАЙЗА трябва да е достатъчно чувствителен, за да позволи получаването на положителен резултат при животни с клинични признаци на класическа чума по свинете.

Използването на методите ЕЛАЙЗА се препоръчва за откриване на антигена в проби от животни с клинични признаци или патологични лезии на заболяването. Те не са подходящи за обследване на индивидите. Най-подходящи са пробите от левкоцити, кръвен серум, несъсирена кръв, както и суспензия от органите, описани в точка 1, взети от свине, за които съществува съмнение за инфекция с вируса на класическата чума по свинете ([2]).

Тестът ЕЛАЙЗА може да се извърши в рамките на един ден с помощта на автоматизирана техника. Основното му предимство е възможността да се обработват голям брой проби за кратко време. Препоръчва се да се използват техниките ЕЛАЙЗА, които дават задоволителни резултати при работа с референтен материал. В момента обаче всички техники ЕЛАЙЗА, които се продават, са по-малко чувствителни от изолирането на вируса в клетъчна култура и чувствителността им е далеч по-висока при кръвните проби от прасенца, отколкото от възрастни свине.

Б. **Изолиране на вируса**

1. Изолирането на вируса се основава на инкубация на материала от пробата в чувствителна клетъчна култура от свине. Ако в пробата присъства вирусът на класическата чума по свинете, той се възпроизвежда в клетките във видими количества, които се установяват по имунното оцветяване на инфектираните клетки в конюгирани антитела. Необходимо е да има на разположение специфични антитела срещу класическата чума, за да се направи диференциална диагноза по отношение на останалите чумни вируси.

([1]) Референтната лаборатория на Общността разполага с ограничени правомощия да приема диагностични проби и изолати на вируса на класическа чума по свинете. Копие от разрешителното за внос може да се поиска от тази лаборатория преди транспортирането, за да се приложи в плик, залепен за външната страна на пакета.

([2]) На разположение на пазара са различни тестове ЕЛАЙЗА за откриване на антигена на вируса на класическата чума по свинете, които са валидирани за различни видове проби.

▼B

2. Най-подходящи за изолиране на вируса на класическата чума по свинете са левкоцитите, кръвна плазма или пълноценна кръв от проби, несъсирена кръв или проби от органите, описани в част А, точка 1.

3. Методът на изолиране на вируса е по-подходящ за анализ на проби от малък брой животни, отколкото за масов контрол. Той е много трудоемък и резултатите се получават най-малко след три дни. Може да се наложи да се направят още две клетъчни култури, за да се открие слабо наличие на вируса в пробата. Поради това периодът на изследване до получаването на крайния резултат може да продължи до десет дни. Автолизираните проби могат да се окажат цитотоксични за културата и да ограничат по този начин приложението на метода.

4. Изолирането на вируса се препоръчва, когато с други методи наличието на вируса на класическата чума по свинете вече е потвърдено. То се използва като референтен тест за потвърждаване на вече получените положителни резултати с метод ЕЛАЙЗА за откриване на антиген, полимеразна верижна реакция (PCR) или имунофлуоресцентен метод, непряко оцветяване с пероксидаза.

   Изолатите на вируса на класическа чума по свинете, получени по този начин, служат за характеризирането на вируса, и по-специално за генетичното типизиране и молекулярната епидемиология.

5. Всички изолати на вируса на класическата чума по свинете, взети от всички първични огнища, при първоначални случаи на инфекция при диви свине или от случаи на зараза, установени в кланица или транспортно средство, се изпращат за определяне на генетичния тип в националната референтна лаборатория на държавите-членки, във всяка друга лаборатория, одобрена от съответната държава-членка, или от референтната лаборатория на Общността съгласно точка Д.

   Във всички случаи изолатите на вируса се изпращат незабавно в референтната лаборатория на Общността, за да бъдат включени в набора от вируси.

В. **Откриване на генома на вируса**

1. Полимеразната верижна реакция служи за откриване на генома на вируса в пробите от кръв, тъкани и органи. Малки фрагменти от рибонуклеиновата киселина (РНК) на вируса се транскрибират във фрагменти дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) и се амплифицират от PCR до установими количества. Тъй като тестът позволява да се открие само сегмент от генома на вируса, PCR може да даде положителен резултат дори и при отсъствие на вируса на класическата чума по свинете (например при автолизирани тъкани или проби от възстановяващи се от заболяване свине).

2. PCR се използва за ограничен брой грижливо подбрани проби от съмнителни животни или материал от зародиша след аборт. Той може да бъде идеалният метод при трупове на диви свине, когато материалът е автолизиран и изолирането на вируса е невъзможно поради цитотоксичност.

3. Най-подходящият материал за PCR диагностика се пробите от органите, изброени в точката за изолиране на вируса, или несъсирена кръв.

4. Полимеразната верижна реакция може да се извърши за 48 часа. За нея са необходими подходяща лабораторна техника, отделни помещения и квалифициран персонал. Едно от предимствата на метода е, че инфектираните вирусни сегменти не трябва да се възпроизвеждат в лаборатория. Методът е много чувствителен, но лесно може да се получи контаминиране, което води до лъжливо положителни резултати. Затова е необходимо да се приложат строги процедури за качествен контрол. Някои методи са специфични общо за всички чумни вируси и налагат допълнителни тестове за проверка, като сегментиране на продукта от полимеразната верижна реакция.

Г. **Оценка на резултатите от вирусологичните изследвания**

1. Вирусологичните изследвания са необходими за потвърждаване на наличието на класическа чума по свинете.

▼B

Изолирането на вируса трябва да се счита за референтния вирусологичен тест и следва да се използва като тест за потвърждаване, когато се налага. Особено се препоръчва, в случай че въпреки положителните резултати от имунофлуоресцентния метод, тестовете ЕЛАЙЗА или PCR, не са установени клинични признаци или лезии от заболяването, и във всеки друг съмнителен случай.

Въпреки това за потвърждаването на първично огнище на класическа чума по свинете е достатъчно наличието на клинични признаци или лезии, характерни за заболяването, при съответните свине, съчетано с положителни резултати при поне в два от тестовете за откриване на антигена или на генома на вируса.

Вторично огнище на класическа чума по свинете се потвърждава, ако освен епидемиологична връзка с вече потвърдено огнище или случай, има открити и клинични признаци или лезии, характерни за заболяването в наблюдаваните свине и ако тест за откриване на антигена или генома на вируса е дал положителен резултат.

Появата на първично огнище на класическа чума по свинете при диви свине се потвърждава след изолиране на вируса или ако поне два от тестовете за откриване на антигена или на генома на вируса са дали положителен резултат. Могат да се потвърдят други случаи на класическа чума по свинете при диви свине, когато е установена епидемиологична връзка с вече потвърдени случаи, ако един тест за откриване на антиген или на генома на вируса е дал положителен резултат.

2. За да даде положителен резултат, тестът за откриване на генома или антигена на класическата чума по свинете трябва да се осъществи със специфични антитела или стартери срещу вируса на КЧС. Ако тестът не е специфичен за вируса на класическата чума по свинете, а само за чумния вирус, трябва да се повтори с използването на специфични реактиви на класическата чума по свинете.

Д. **Генетично типизиране на изолатите от вируса на класическата чума по свинете**

1. Генетичното типизиране на изолатите от вируса на класическата чума по свинете става чрез определяне на нуклеотидната последователност от дялове на генома на вируса, а именно специфични дялове от некодиращия сегмент 5 и/или от кодиращия ген на гликопротеин E2. Сходството на тези дялове с вече получените от предишни изолати на вируса дял показва дали появата на болестта се дължи на нови или на вече идентифицирани щамове, което може да потвърди или да отхвърли хипотезите за начина на предаване на заболяването, основани на епидемиологичното проучване.

Генетичното типизиране на изолатите на вируса на класическата чума по свинете е от основно значение за определяне на източника на болестта. При все това обаче тясната връзка между вируси, произлизащи от различни епизоотични огнища, не е абсолютно доказателство за съществуването на пряка епидемиологична връзка.

2. Ако типизирането на вируса не може да се извърши своевременно в националната лаборатория или всяка друга лаборатория, одобрена за диагностика на класическа чума по свинете, оригиналната проба с изолата на вируса се изпраща в референтната лаборатория на Общността, за да може типизирането да се извърши в най-кратки срокове.

Данните от типизирането и секвенирането на вируса на класическата чума по свинете, с които разполагат одобрените за диагностика на класическата чума по свинете лаборатории, трябва да се предават на референтната лаборатория на Общността, за да бъдат въведени в централната база данни на лабораторията.

Информацията от тази база данни се предоставя на разположение на всички референтни национални лаборатории в държавите-членки. Въпреки това за целите на публикации в научни списания, по искане на съответната лаборатория, референтната лаборатория на Общността гарантира конфиденциалността на данните до публикуването им.

▼B

ГЛАВА VII

Принципи и използване на серологичните изследвания и оценка на резултатите от тях

А. **Основни принципи и диагностична стойност**

1. При свинете, инфектирани с вируса на класическата чума по свинете, антитела могат да се открият и в пробите от серума две-три седмици след инфектирането. При оздравели свине защитните и неутрализиращи антитела се откриват в течение на години, дори през целия живот. Антитела се откриват епизодично при смъртно болни животни в крайна фаза. У някои свине с хронични форми на класическа чума по свинете, антитела могат да се открият в продължение на няколко дни в края на първия месец след инфектирането.

   Инфектираните в утробата прасета могат да бъдат имунотолерантни към съответстващия тип на вируса и да не произведат нито едно специфично антитяло. Въпреки това през първите дни след раждането могат да се открият антитела с произход от майката. Времето на полуживот на майчините антитела при здравите прасенца без виремия е около две седмици. Ако бъдат открити у прасета на над тримесечна възраст, е малко вероятно антителата срещу класическата чума по свинете да са с произход от майката.

2. Откриването на антитела срещу вируса на класическата чума по свинете в серумни или плазмени проби позволява да се потвърди диагнозата на класическа чума по свинете в съмнителните стопанства, да се установи периода от началото на инфекцията в потвърденото епизоотично огнище и да се вземат мерки за наблюдение и надзор. При все това обаче серологичните изследвания служат най-вече за откриване на класическа чума по свинете в неотдавна инфектиран свиневъден обект.

   Малък брой засегнати свине със слаба степен на неутрализация говори за скорошна инфекция (две-три седмици). Голям брой засегнати свине с висока степен на неутрализация означава, че вирусът е проникнал в свиневъдния обект най-малко преди месец. Местонахождението на серопозитивните свине в обекта може да даде полезна информация за начина, по който вирусът на класическата чума по свинете е проникнал в обекта.

   Въпреки това е необходимо да се направи точна оценка и интерпретация на резултатите от серологичните изследвания, като се отчетат всички клинични, вирусологични и епидемиологични данни в рамките на изследването, което се провежда в случай на съмнение или потвърждение на наличието на класическа чума по свинете съгласно член 8 от Директива 2001/89/ЕО.

Б. **Препоръчителни серологични тестове**

1. Вирусно неутрализационната реакция (ВНР) и ЕЛАЙЗА са най-подходящи за серологичната диагностика на класическата чума по свинете.

   Качеството и ефикасността на серологичната диагностика, извършвана от националните лаборатории, трябва непрекъснато да се контролират чрез междулабораторен сравнителен тест, организиран периодично от референтната лаборатория на Общността.

2. ВНР се базира на определянето на неутрализиращото действие върху вируса на антителата в серумна проба, изразена в крайна неутрализираща степен от 50 %.

   Постоянното количество на вируса на класическата чума по свинете се инкубира при 37 °C с разреден серум. За отсяване отначало се приготвя серумен разтвор 1/10. Когато е необходима пълна титрация, могат да се приготвят серумни разтвори 1/2 и 1/5. Всеки един разтвор се смесва с равен обем суспензия на вируса, съдържаща 100 инфекциозни дози (TCID 50).

   След инкубирането сместа се инокулира в клетъчни култури, които се инкубират от 3 до 5 дни. След този инкубационен период културите се фиксират и всяка вирусна репликация се открива чрез система за имунно маркиране. Могат да се използват, както имунопероксидазна, така и имунофлуоресцентна неутрализация.

▼B

Резултатите от ВНР се изразяват с реципрочната стойност на началния серумен разтвор, за който половината от инокулираните клетъчни култури (краен титър 50 %) не показват репликация на вируса (няма специфично маркиране). Прави се оценка на титъра между два разтвора. Системата на крайния разтвор се основава на ефективно разреждане на серума по време на неутрализиращата реакция, а именно след прибавянето на вируса, но без добавяне на клетъчна суспензия.

3. ВНР е най-чувствителният и най-надеждният метод за детекция на антитела срещу вируса на класическата чума по свинете. Затова се препоръчва за серологично изследване, както на изолирани животни, така и на стада. Тестът обаче позволява да се открият и антитела с кръстосана неутрализация, специфични за инфекциите на свине с чумни вируси по преживните животни.

   Прилагането на ВНР за детекция на антитела срещу вируса на вирусната диария по говедата и вирусната пестивироза по овцете („border disease“) почива на същите принципи и се използва за извършване на диференциална диагноза на класическата чума по свинете.

4. Щамовете на чумните вируси, които се използват във вирусно неутрализационните реакции, трябва да отговарят на препоръките на референтната лаборатория на Общността.

5. Разработени са различни варианти на ЕЛАЙЗА с използване на специфични моноклонални антитела; те са два вида: конкурентни или блокиращи методи и неконкурентни ЕЛАЙЗА.

   Конкурентният или блокиращ ЕЛАЙЗА тест обикновено се основава на моноклонални антитела. Ако серумната проба съдържа антитела срещу класическия вирус, свързването на моноклоналното тяло, съчетано с пероксидаза, с антигена на вируса, се инхибира, което води до намаляване на сигнала.

   При неконкурентните тестове ЕЛАЙЗА свързването на серумните антитела с антигена се измерва директно с помощта на антитела, съчетани с пероксидаза.

6. Националните лаборатории трябва редовно да извършват контрол на чувствителността и специфичността на всички партиди от тест ЕЛАЙЗА, като използват поредицата референтни серуми, предоставени от референтната лаборатория на Общността. Тази поредица включва:

   — серуми от свине в начална фаза на инфекция с вируса на класическата чума по свинете (до 21 дни от инфектирането),

   — серуми от оздравяващи животни (след двадесет и първия ден от инфекцията),

   — серуми от свине, заразени с чумни вируси по преживните животни.

   Тестовете ЕЛАЙЗА за серологична диагностика на класическата чума по свинете трябва да разпознават всички референтни серуми от оздравяващи свине. Всички получени резултати трябва да могат да се репродуцират. Препоръчва се още тестовете да могат да идентифицират всички положителни серуми от началната фаза и да представят минимум кръстосани реакции със серуми от свине, заразени с чумни вируси по преживните.

   Резултатите, получени с референтни серуми от свине в начална фаза на инфекцията, дават индикации за чувствителността на теста ЕЛАЙЗА.

7. Чувствителността на теста ЕЛАЙЗА се смята за по-ниска от тази на ВНР и се препоръчва той да се използва за откриване на заболяването в стада. Въпреки това за тестовете ЕЛАЙЗА е необходима по-малко специализирана техника и те се осъществяват много по-бързо от ВНР благодарение на автоматизираната техника.

   Тестовете ЕЛАЙЗА трябва да позволят да се открият всички инфекции с класическа чума по свинете на етапа на възстановяване от заболяването и трябва да са във възможно най-голяма степен освободени от интерференция с антитела, представляващи кръстосана реакция с чумни вируси по преживните.

▼B

B. **Интерпретация на резултатите от серологичните изследвания и диференциална диагноза с инфекциите, причинени от чумни вируси по преживните (вирусна диария по говедата и вирусна пестивироза по овцете („border disease“).**

1. Без да се нарушават разпоредбите на член 4, параграф 3, буква а) или член 7, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО, в случай на откриване на титър на неутрализация на вируса на класическата чума по свинете, равен или надвишаващ 10 ND_{50}, в серумни проби от една или повече свине, или при положителен резултат от тест ЕЛАЙЗА в серумни проби от група свине, мерките, предвидени в член 4, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО се прилагат незабавно или се продължават във въпросния обект.

   Вече взетите от обекта проби трябва да се подлагат на нов тест ВНР (сравнителна крайна титрация на вирусонеутрализиращите антитела срещу класическата чума по свинете и на чумни вируси по преживните).

2. Ако при сравнителните тестове се открият антитела срещу чумни вируси по преживните, а титрите на антитела срещу класическата чума по свинете отсъстват или са в по-малко (под една трета) количество, съмнението за класическа чума по свинете се отхвърля, освен ако не съществуват други причини, които оправдават продължаване прилагането на мерките, предвидени в член 4, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО във въпросния обект.

3. Ако при сравнителните тестове се установи титър на неутрализация на вируса, равен или надвишаващ 10 ND_{50} при повече свине, и този титър е равен или по-висок от титрите, свързани с други чумни вируси, компетентният орган следи да се направи потвърждение на наличието на класическа чума по свинете, при условие че в съответния обект са установени епидемиологични прояви на заболяването.

4. Без да се нарушават разпоредбите на член 4, параграф 3 от Директива 2001/89/ЕО, ако не е установена нито една епидемиологична проява или ако резултатите на предишни тестове са недостатъчни, компетентният орган следи в съответния свиневъден обект:

   — да бъде продължено действието на мерките по член 4, параграф 2 от Директива 2001/89/ЕО,

   — да бъдат направени допълнителни изследвания, колкото може по-бързо, за да се потвърди или отхвърли наличието на класическа чума по свинете, съгласно глава IV.

5. При все това, ако допълнителните контроли и тестове, посочени в точка 4, не позволят да се отхвърли наличието на класическа чума по свинете, е необходимо в съответния свиневъден обект да се извърши ново вземане на кръвни проби за серологични изследвания най-малко две седмици след предишните контроли.

   В контекста на това ново вземане на проби свинете, от които са взети и изследвани предишните проби, за да се направи сравнително серологично изследване с предишните проби, позволяващо да се открие серологично конвертиране на вируса на класическата чума по свинете или на *Pestivirus* по преживните, в зависимост от случая.

   Ако тези нови контроли и изследвания не позволят да се потвърди наличието на класическа чума по свинете, мерките, предвидени в член 4 от Директива 2001/89/ЕО, могат да бъдат премахнати.

▼M1

ГЛАВА VIII

Разграничителен тест в случай на спешна ваксинация

A. **Основни принципи**

1. Разграничителен серологичен тест Елайза (разграничителен тест) се използва за успешно разпознаване на свинете, които са били ваксинирани с маркерни ваксини, които изграждат антитела само срещу гликопротеина E2 на вируса на класическа чума по свинете, от свине, които са били заразени с див щам на вируса на класическа чума по свинете. Този тест е предназначен да открива антитела срещу гликопротеин ER^{NS} на вируса на класическа чума по свинете. Той се основава на принципа, че незаразените животни, ваксинирани с

▼M1

маркерни ваксини, произвеждат само антитела срещу гликопротеина E2 на вируса на класическа чума по свинете, докато животните, заразени с полеви вирус реагират и произвеждат антитела и срещу други вирусни антигени.

Разграничителният тест е прецизен и специфичен ([1]). Въпреки това и свине, които са заразени с вируси от рода *Pestiviruses*, различни от този на класическата чума по свинете, като например вирус BVD и вирус BD, също ще реагират положително на ER^{NS}.

Наличните данни към момента подсказват, че разграничителния тест не може да се използва надеждно при тестови серумни проби от диви свине.

2. Разграничителният тест е ензимен имунен анализ със стопиращо действие в течната фаза. Пробите за теста се отглеждат върху микротитърни плаки, предварително покрити от моноклонални антитела срещу гликопротеина ER^{NS}, с определено количество от ER^{NS} антиген. Всяко антитяло, специфично за ER^{NS}, се свързва с определеното количество от ER^{NS} антиген в разтвора и се образува комплекс от антиген/антитяло, който не реагира с антителата срещу гликопротеина ER^{NS} върху микротитърната плака. След промиване на плаките, за да се отстрани несвързания материал, се добавя свързан с пероксидаза белязан анти- ER^{NS} конюгат, който се свързва с ER^{NS} антигена, смесен с антитялото, образуващо покритието върху повърхността на микротитърната плака. Несвързаният конюгат се отмива и се добавя субстрат, съдържащ хромоген. Степента на цветната реакция, която се получава, е обратно пропорционална на количеството антитяло, специфично за ER^{NS}, присъстващ в пробата. Ако пробата не съдържа антитела (отрицателна проба), по-голямата част от определеното количество ER^{NS} антиген, което е добавено, може да се свърже с анти-ER^{NS} антителата върху повърхността на плаката и се наблюдава силна реакция на оцветяване.

   Резултатът се получава чрез сравняване на оптичната плътност в ямки, съдържащи тестови проби, с такива от ямки, съдържащи отрицателните и положителни контроли.

Б. **Указания за прилагането на разграничителния тест във връзка със спешна ваксинация с маркерна ваксина в помещения за свине, в рамките на член 19 от Директива 2001/89/ЕО**

Разграничителният тест е разработен, за да удостовери присъствието или отсъствието на вируса на класическа чума по свинете при популация свине, ваксинирана с маркерна ваксина. Наличните данни подсказват, че той може успешно да се използва за тази цел на база стадо, но не може надеждно да изключи факта, че отделни свине са заразени с вируса на класическа чума по свинете. По-специално, специфичността на разграничителния тест може да се окаже недостатъчна за надеждно разпознаване на маркерно ваксинираните свине от заразените свине в случай на ваксинация на възрастни свине. При получаване на съмнителни резултати обаче, свинете, за които има съмнение, трябва задължително да се заколят или умъртвят по хуманен начин в съответствие с Директива 93/119/ЕИО и техните органи да се тестват за вируса на класическа чума по свинете. Изолация на вируса и PCR са най-подходящите тестове за тази цел.

Тези аспекти трябва да се отчетат изцяло, когато се разработва стратегия за спешна маркерна ваксинация и след това при тълкуването на резултатите от изследването на вируса на класическа чума по свинете, извършено върху популацията, ваксинирана с маркерна ваксина.

Процедурата по вземане на проби и тестването на ваксинираната популация свине преди премахването на ограниченията, които трябва да се приложат в мястото на ваксинация съгласно член 19 от Директива 2001/89/ЕО, зависят от възрастта на ваксинираните свине, от тяхната категория (угояване/клане, развъждане) и от желаното ниво на безопасност що се отнася до отсъствие на разпространение на вируса в популацията.

([1]) В съответствие с резултатите от изследване, извършено от оторизираната лаборатория на Общността за класическа чума по свинете и националните лаборатории за класическа чума по свинете, прецизността на разграничителния тест е около 94 %, а специфичността е около 98 %.

▼M1

Следователно, подробностите за процедурата по вземане на проби и тестване трябва да се впишат в аварийния ваксинационен план, който се изпраща на Комисията в съответствие с член 19, параграф 3 от Директива 2001/89/ЕО.

▼B

ГЛАВА IX

Минимални условия за безопасност за лабораториите за класическа чума по свинете

1. Минималните изисквания, посочени в таблица 1, трябва да се спазват от всички лаборатории, които манипулират вируса на класическата чума по свинете, дори и в малки количества, по критериите на тестовете за изолация и неутрализиране на вируса. При все това постморталните обследвания, приготвянето на тъкани за имунофлуоресцентен метод на изследване и серологичните изследвания с инактивиран антиген могат да се извършват при по-ниско ниво на сигурност, при условие че се спазват основните хигиенни норми и след манипулациите се извърши дезинфекция и тъканите и серума се елиминират при безопасни условия.

2. Допълнителните условия, описани в таблица 1, трябва да се съблюдават от всички лаборатории, използващи процедури със значителна мултипликация на вируса.

3. Изискванията, включени в таблица 2, са задължителни за всяка лаборатория, която извършва опити върху животни с вируса на класическата чума по свинете.

4. При всяко положение, всички запаси от вируса на класическата чума по свинете се съхраняват на безопасно място в замразено или лиофилизирано състояние. Препоръчва се хладилниците и фризерите да се използват само за вируса на класическата чума по свинете и материали, използвани за диагностика на това заболяване. Всяка ампула трябва да има ясен етикет. В стриктна документация се описват наличните количества от вируса в лабораторията, датата и резултатите от качествения контрол. Води се и документация на вирусите, прибавени към запасите, с уточняване на източника, и на вирусите, предоставени на други лаборатории.

5. Препоръчва се към помещенията за манипулиране на вируса, биологично обезопасени, да се предвидят „чисти стаи“, в които не се извършват манипулации с вируса. Тези помещения служат за подготовка на стъклената посуда и на средата, за поддържане и възстановяване на неинфектираните клетъчни култури, за обработка на серумите и серологични изследвания (с изключение на методите, използващи жив вирус на класическата чума по свинете), както и за административна дейност.

Таблица 1

Принципи на биологична сигурност на лабораториите за диагностика

	Допълнителни изисквания	Минимални изисквания
Обща работна среда	Нормално атмосферно налягане Двойно филтриране на вдишвания въздух. Обособени помещения, които се използват изключително само за диагностика на класическата чума по свинете.	Нормално атмосферно налягане Помещения, обособени само за определени процедури.

▼B

	Допълнителни изисквания	Минимални изисквания
Лабораторно облекло	Пълно преобличане на персонала при влизане в помещението. Лабораторните облекла се използват само в помещението за работа с вируса на КЧС. Ръкавици за еднократна употреба за всички манипулации с инфектиран материал. Стерилизация на облеклата преди излизане от помещението или изпиране вътре в него.	Специално връхно лабораторно облекло, което се използва само в помещението за работа с вируса на КЧС. Ръкавици за еднократна употреба за всички манипулации с инфектиран материал. Стерилизация на облеклата след излизане от помещението или изпиране вътре в него.
Контрол на персонала	Достъп до помещението само на поименно обучен персонал. Измиване и дезинфекция на ръцете при излизане от помещението. Забрана за персонала да има достъп до свине 48 часа след напускане на помещението.	Достъп до помещенията само на поименно обучен персонал Измиване и дезинфекция на ръцете при излизане от помещението. Забрана за персонала да има достъп до свине 48 часа след напускане на помещението.
Оборудване	Ламинарен бокс за биологична безопасност (клас I или II) за всички манипулации с живи вируси. Ламинарния бокс трябва да бъде снабден с устройство за двойна HEPA-филтрация на вдишвания въздух. Цялата апаратура и техника за лабораторните процедури трябва да се намират вътре в предвидените за диагностика помещения.	

Таблица 2

Изисквания за биологична безопасност на помещения за опитни животни

	Изисквания
Обща работна среда	Контролирана вентилация с отрицателно налягане. Двойна HEPA-филтрация. Апарат за опушване/пълна дезинфекция след опита. Третиране на всички отпадъчни материи за инактивиране на вируса на КЧС (чрез термична или химична обработка).
Лабораторно облекло	Пълно преобличане при влизане. Ръкавици за еднократна употреба за всички манипулации. Стерилизация на облеклата след излизане от помещението или изпиране вътре в него.
Контрол на персонала	Достъп до помещението само на поименно обучен персонал. Душ след напускане на помещението. Забрана за персонала да има достъп до свине 48 часа след напускане на лабораторията.
Оборудване	Цялата апаратура и техника за лабораторните процедури трябва да се намира вътре в предвидените за диагностика помещения. Стерилизация на всички уреди след напускане на помещението, а за пробите от животински произход, опаковане с двойна опаковка, поставена в херметичен съд, дезинфекциран отвън, за транспорт до компетентната лаборатория за КЧС.

▼B

	Изисквания
Животни	Всички опитни животни се унищожават преди напускане на звеното, постморталните обследвания се извършват в биообезопасени помещения и труповете се изгарят след приключване на изследванията.