**Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet**

►**B**

# KOMMISSIONENS BESLUT

**av den 1 februari 2002**

**om godkännande av en diagnostikhandbok innehållande diagnostiska förfaranden, provtagningsmetoder och kriterier för utvärdering av laboratorietester för bekräftande av klassisk svinpest**

*[delgivet med nr K(2002) 381]*

**(Text av betydelse för EES)**

(2002/106/EG)

(EGT L 39, 9.2.2002, s. 71)

Ändrat genom:

| | | Officiella tidningen | | |
|---|---|---|---|---|
| | | nr | sida | datum |
| ►**M1** | Kommissionens beslut 2003/859/EG av den 5 december 2003 | L 324 | 55 | 11.12.2003 |

▼B

# KOMMISSIONENS BESLUT

**av den 1 februari 2002**

**om godkännande av en diagnostikhandbok innehållande diagnostiska förfaranden, provtagningsmetoder och kriterier för utvärdering av laboratorietester för bekräftande av klassisk svinpest**

*[delgivet med nr K(2002) 381]*

**(Text av betydelse för EES)**

(2002/106/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 2001/89/EG av den 23 oktober 2001 om gemenskapsåtgärder för bekämpning av klassisk svinpest [1], särskilt artiklarna 17.3 och 29.1 i detta, och

av följande skäl:

(1) Det är nödvändigt att på gemenskapsnivå fastställa diagnostiska förfaranden, provtagningsmetoder och kriterier för utvärdering av resultaten från laboratorietester för bekräftande av klassisk svinpest.

(2) För att de metoder för diagnostisering av klassisk svinpest som används i medlemsstaterna skall kunna samordnas i samråd med kommissionen, fastställs i bilaga IV till direktiv 2001/89/EG vilka befogenheter och uppgifter gemenskapens referenslaboratorium har när det gäller sjukdomen. Till dessa befogenheter och uppgifter hör att organisera återkommande jämförande tester och tillhandahålla standardreagenser inom gemenskapen.

(3) Klassisk svinpest-virus anses inte utgöra någon fara för människors hälsa.

(4) Det har under senare tid utarbetats laboratorietester för snabb diagnostisering av klassisk svinpest.

(5) De senaste årens erfarenheter från bekämpningen av klassisk svinpest har bidragit till att man kunnat fastställa vilka provtagningsförfaranden som är mest ändamålsenliga, samt vilka kriterier som bör användas vid tolkningen av resultaten från laboratorietesten för en korrekt diagnostisering av sjukdomen under olika förhållanden.

(6) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från Ständiga veterinärkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

*Artikel 1*

1. Medlemsstaterna skall säkra att diagnostiseringen av klassisk svinpest grundar sig på följande faktorer:

a) Kliniska tecken på sjukdomen och postmortala organskador.

b) Påvisande av virus, antigen eller genom i prov från vävnader, organ, blod eller avföring.

c) Påvisande av specifik antikroppsreaktion i blodprov.

De skall också se till att undersökningen sker med hjälp av de förfaranden, provtagningsmetoder samt utvärderingskriterier för resultat

[1] EGT L 316, 1.12.2001, s. 5.

▼B

från laboratorietester som fastställs i den handbok som bifogas detta beslut.

2. De nationella diagnoslaboratorier som avses i bilaga III.1 till direktiv 2001/89/EG får dock modifiera de laboratorietester som anges i den handbok som bifogas detta beslut eller använda sig av andra tester, under förutsättning att testerna har samma känslighet och specificitet.

Känsligheten och specificiteten hos dessa modifierade eller alternativa tester skall utvärderas genom de återkommande jämförande tester som organiseras av gemenskapens referenslaboratorium för klassisk svinpest.

*Artikel 2*

Bilagorna I och IV till rådets direktiv 80/217/EEG av den 22 januari 1980 om införande av gemenskapsåtgärder för bekämpning av klassisk svinpest ([1]) skall upphöra att gälla.

*Artikel 3*

Detta beslut skall tillämpas från och med den 1 november 2002.

*Artikel 4*

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

([1]) EGT L 47, 21.2.1980, s. 11.

▼B

*BILAGA*

## DIAGNOSTIKHANDBOK FÖR KLASSISK SVINPEST

### KAPITEL I

***Inledning, syfte och definitioner***

1. För att förfarandena för diagnos av klassisk svinpest skall vara enhetliga skall följande gälla för denna handbok:

   a) Handboken skall innehålla riktlinjer och minimikrav för diagnostiska förfaranden, provtagningsmetoder och kriterier för utvärdering av resultaten från kliniska undersökningar, postmortem-undersökningar och laboratorietester, vilka skall möjliggöra korrekt diagnostisering av sjukdomen ([1]).

   b) Handboken skall innehålla minimikrav för biosäkerhet och kvalitetsstandarder för de laboratorier som diagnostiserar klassisk svinpest och för transport av prov.

   c) Handboken skall ange vilka laboratorietester som skall användas för diagnostisering av klassisk svinpest och vilka laboratorietekniker som skall användas för den genetiska typningen av isolat av klassisk svinpestvirus.

2. Handboken riktar sig i första hand till de myndigheter som ansvarar för bekämpningen av klassisk svinpest. Tyngdpunkten ligger därför på principerna bakom laboratorietesten, tillämpningen av testen, samt utvärdering av resultaten från dessa, snarare än på detaljerad beskrivning av laboratorietekniker.

3. Utöver de definitioner som anges i artikel 2 i direktiv 2001/89/EG skall i denna handbok avses med

   a) *misstänkt anläggning*: varje anläggning för svinhållning där ett eller flera svin misstänks vara smittade med klassisk svinpest-viruset eller en kontaktanläggning i enlighet med artikel 2 v i direktiv 2001/89/EG.

   b) *singleton reactor*: ett svin som har genomgått ett serologiskt test avseende klassisk svinpest med positivt resultat, men som under sin levnad inte kommit i kontakt med viruset och för vilket det inte finns några belägg för att sjukdomen spridits till kontaktsvin ([2]).

   c) *epidemiologisk underavdelning eller underavdelning*: en angränsande byggnad, plats eller mark där en anläggnings djur hålls på ett sådant sätt att de ofta har direkt eller indirekt kontakt med varandra, men samtidigt är avskilda från övriga djur vid anläggningen.

   d) *kontaktsvin*: svin som hållits vid en anläggning i direkt kontakt med ett eller flera svin som under de senaste 21 dagarna misstänks ha smittats med klassisk svinpest-virus.

### KAPITEL II

***Beskrivning av klassisk svinpest med tyngdpunkt på differentialdiagnos***

A. **Inledning**

1. Klassisk svinpest orsakas av ett höljebärande RNA-virus av släktet *Pestivirus* av *Flavivirus*-familjen. Viruset är besläktat med det virus av släktet *Pestivirus* som drabbar idisslare och som orsakar bovin virusdiarré (BVD-virus) och border disease (BD-virus). Detta faktum kan få allvarliga konsekvenser då diagnos ställs eftersom det förekommer korsreaktioner, vilket kan resultera i att laboratorietester ger falskt positiva svar.

2. Svinpestviruset är relativt stabilt i utsöndringar från smittade svin, i slaktkroppar av svin, i färskt griskött och i vissa grisköttsprodukter. Det kan enkelt inaktiveras med hjälp av rengöringsmedel, fettlösande medel, proteaser och vanliga desinfektionsmedel.

([1]) Vid beslut om antal prov som skall tas för laboratorietest skall hänsyn tas till testens känslighetsgrad. Om det test som skall användas är mindre känsligt skall prov tas från fler djur än vad som anges i handboken.

([2]) En singleton reactor kan ha en virusneutraliserande antikroppstiter från gränsfall (vilket ofta är fallet) till tydligt positiv. Vid förnyad provtagning visar de vanligen minskande eller konstant antikroppstiter. Dessa falska positiva reaktioner erhålls vanligtvis endast för ett fåtal djur i varje flock.

▼B

3. Vanligtvis sprids infektionen oronasalt genom direkt eller indirekt kontakt med infekterade svin eller genom virus-förorenat foder. I områden där många svin hålls sprids viruset lätt från anläggning till anläggning. Viruset kan även spridas via sperma från smittade galtar.

4. Inkubationstiden för det enskilda djuret är mellan sju och tio dagar, men i praktiken kan det dröja upp till två till fyra veckor eller mer efter det att viruset infördes innan kliniska symtom kan konstateras på en anläggning, särskilt om det endast är fråga om vuxna avelssvin eller mindre virulenta virusstammar.

5. De kliniska tecknen på klassisk svinpest är mycket skiftande och kan förväxlas med andra sjukdomar. Djurets ålder och virusets sjukdomsalstrande förmåga avgör hur allvarliga symtomen blir. Vanligtvis drabbas unga djur svårare än äldre. Hos äldre avelssvin är sjukdomsförloppet ofta mildare eller till och med subkliniskt.

6. Det förekommer även akuta, kroniska och prenatala former av klassisk svinpest.

B. **Den akuta formen**

1. Den akuta formen av klassisk svinpest förekommer oftast hos avvanda smågrisar och slaktsvin. De första tecknen är aptitlöshet, slöhet, feber, bindhinneinflammation, svullna lymfkörtlar, andningsstörningar, förstoppning följd av diarré.

   De typiska inre blödningarna under huden visar sig vanligtvis på öron, svans, mage och insidan av benen under den andra och tredje veckan efter det att djuret smittades fram till dess att det dör. Neurologiska symtom är vanliga, som att djuret vacklar på bakbenen, inte kan koordinera sina rörelser och får konvulsioner.

   Feber förekommer alltid. Vanligtvis är febern högre än 40 ºC, men det kan förekomma att den inte överstiger 39,5 ºC hos vuxna svin.

2. Svinpestviruset orsakar allvarlig leukopeni och immunsuppression, vilket ofta leder till sekundärinfektioner i tarmarna eller andningsorganen. Symtomen på sekundärinfektionerna kan vilseleda lantbrukaren eller veterinären så att denne förbiser symtomen på klassisk svinpest.

   Döden inträder vanligtvis inom en månad. Det förekommer även att djur tillfrisknar och bildar antikroppar. Oftast gäller detta vuxna avelsdjur som inte visar några kliniska tecken på sjukdomen. Antikroppar mot klassisk svinpest-virus kan påvisas från och med två till tre veckor efter infektionstillfället.

3. Vid postmortal undersökning kan patologiska förändringar oftast observeras i lymfkörtlarna och njurarna. Lymfkörtlarna svullnar, blir ödematösa och inre blödningar förekommer. De inre blödningarna i njurarna kan variera i omfattning från knappt synliga petekier till echymoser. Liknande inre blödningar kan iakttas på urinblåsan, strupen, struplocket, hjärtat och ibland över slemhinnorna i buk- och brösthåla. Det förekommer ofta hjärnhinneinflammation utan varbildning. Dessutom förekommer organskador till följd av sekundärinfektioner, vilket kan vilseleda veterinären. Mjältinfarkter betraktas som patognomona skador, men de är inte så vanliga.

4. Sjukdomsbilden för afrikansk svinpest i dess akuta form liknar både kliniskt och patologiskt sjukdomsbilden för klassisk svinpest. Fläckar från inre blödningar på huden och öronen är lätta att upptäcka och tyder på att det kan vara fråga om akut afrikansk eller klassisk svinpest. Det är få andra sjukdomar som ger denna typ av skador.

   Klassisk svinpest skall även beaktas i de fall då man misstänker rödsjuka, porcin reproduktions- och respirationssyndrom (PRRS), kumarinförgiftning, purpura haemorragica, post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), svindermatit och nefrotiskt syndrom, salmonella- och pasteurellainfektioner eller andra sjukdomstillstånd i tarmar och luftvägar med feber som inte påverkas av behandling med antibiotika.

5. Klassisk svinpest-viruset sprids via saliv, urin och avföring från det att de kliniska tecknen uppträder till det att djuret dör. Viruset sprids också via sperma.

C. **Den kroniska formen**

1. Den kroniska infektionen uppstår när djurens immunsystem inte kan bekämpa viruset. De tidiga tecknen på den kroniska infektionen är mycket lika tecknen på den akuta infektionen. Senare förekommer ospe-

▼B

cifika symtom, t.ex. återkommande feber, kronisk enterit och avmagring. De typiska fläckarna på huden efter inre blödning förekommer inte.

Djur som drabbas av denna form visar kliniska tecken under två till tre månader innan de dör. Sjukdomen smittar från det att de kliniska tecknen uppträder till det att djuret dör. Antikroppar kan under perioder påvisas i serumprov.

2. Patologiska förändringar är mindre vanliga, särskilt inre blödningar i organ och slemhinnor förekommer inte alltid. Hos djur som får kronisk diarré är det vanligt med nekrotiska skador på ileum, ileocekalklaffen och ändtarmen.

3. Då de kliniska tecknen på kronisk klassisk svinpest är ganska ospecifika måste det i differentialdiagnosen beaktas att det kan röra sig om andra sjukdomar. Alla djur får inte nödvändigtvis förhöjd kroppstemperatur, men i en smittad anläggning kan feber förekomma hos åtminstone ett par djur.

D. **Den prenatala formen och sent sjukdomsutbrott**

1. Klassisk svinpest-virus kan tränga igenom moderkakan hos dräktiga djur och infektera fostren, medan sjukdomen hos suggan ofta är subklinisk.

Omfattningen av skadorna på fostren vid infektion via livmodern beror på dräktighetsstadium och virusets sjukdomsalstrande förmåga. Om suggan smittas tidigt under dräktigheten kan detta resultera i missfall, dödfödsel, mumifikation och missbildningar. Detta ger anläggningen ett lägre födelsetal.

Om en sugga smittas så sent som upp till 90 dagar av dräktigheten kan hon föda viremiska smågrisar, som kan vara kliniskt normala vid födseln och överleva i flera månader. Det är vanligt att dessa växer sakta, magrar och ibland att de drabbas av medfödd tremor. Denna form kallas för klassisk svinpest med sent sjukdomsutbrott. Dessa smågrisar får en avgörande betydelse för hur viruset sprids och för hur viruset kan leva kvar i en population, eftersom de är smittbärande fram tills de dör.

2. Det kan vara vanskligt att diagnostisera klassisk svinpest, särskilt i avelsanläggningar, eftersom infektionen hos avelssvin kan vara mycket mild och därför kan förväxlas med andra sjukdomstillstånd. Minskad fruktsamhet och missfall kan orsakas av klassisk svinpest-viruset, men även av parvovirus-infektioner, PRRS, leptospiros och Aujeszkys sjukdom. Foster som aborterats till följd av en klassisk svinpest-infektion skiljer sig patologiskt sett inte från foster som aborterats på grund av andra sjukdomsagens.

Om det misstänks att ett djur lider av en infektionssjukdom i fortplantningsorganen måste det, när anläggningen är belägen i ett riskområde, dvs. ett område där klassisk svinpest förekommer hos viltlevande svin, omedelbart utredas huruvida det är fråga om klassisk svinpest eller i vilket fall som helst så snart det kunnat uteslutas att det inte rör sig om vanligare infektionssjukdomar i fortplantningsorganen.

KAPITEL III

***Riktlinjer för vilka kriterier som skall användas för att bestämma att en anläggning klassificeras som misstänkt för klassisk svinpest***

Beslut om att en anläggning är att betrakta som en misstänkt anläggning skall fattas på grundval av följande undersökningsresultat, kriterier och grunder:

a) Kliniska och patologiska undersökningsresultat hos svin. De kliniska och patologiska undersökningsresultat som huvudsakligen skall beaktas är följande:

— Feber med ökad morbiditet och dödlighet.
— Feber med inre blödningar.
— Feber med neurologiska symtom.
— Feber av okänt ursprung som inte kunnat avhjälpas med antibiotika.
— Kastningar och ökande fertilitetsproblem under de föregående tre månaderna.
— Medfödd tremor hos smågrisar.
— Kronisk sjukdom.
— Försenad tillväxt hos smågrisar.
— Inre blödningar i form av petekier och echymoser, särskilt i lymfkörtlar, njurar, mjälte, urinblåsa och strupe.
— Infarkter och hematom, särskilt i mjälten.
— Ulcerös kolit, särskilt nära ileocekalklaffen.

▼B

b) Epidemiologiska undersökningsresultat. Följande epidemiologiska undersökningsresultat skall beaktas:

— Fall då svin har varit i direkt eller indirekt kontakt med en anläggning som har konstaterats som infekterad med klassisk svinpest.

— Fall då levererade svin har visat sig vara smittade med klassisk svinpest.

— Fall då suggor har inseminerats artificiellt med sperma av misstänkt ursprung.

— Fall då det förekommit indirekt eller direkt kontakt med viltlevande svin från en population där klassisk svinpest förekommer.

— Fall då svin hålls utomhus i regioner där viltlevande svin har klassisk svinpest.

— Fall då svin har utfordrats med matavfall och det finns misstanke om att matavfallet inte har behandlats på ett sådant sätt att klassisk svinpestviruset oskadliggjorts.

— Andra fall då djuren kan ha kommit i kontakt med viruset, dvs. genom personer som kommer till anläggningen, transporter, etc.

c) Resultat från serologiska undersökningar. De laboratorieresultat som huvudsakligen skall beaktas är följande:

— serologiska reaktioner på grund av en oupptäckt infektion med klassisk svinpest-virus eller vaccination ([1]).

— Korsreaktioner mellan antikroppar mot klassisk svinpest och mot andra virus av släktet *Pestivirus* ([2]).

— Upptäckt av singleton reactor-fall ([3]).

## KAPITEL IV

### *Förfaranden för provtagning och kontroll*

A. **Riktlinjer och förfaranden för klinisk undersökning och provtagning på svin vid misstänkta anläggningar**

1. Medlemsstaterna skall se till att det vid misstänkta anläggningar utförs lämpliga kliniska undersökningar, provtagningar och laboratorietester så att förekomsten av klassisk svinpest kan bekräftas eller uteslutas i enlighet med de riktlinjer och förfaranden som fastställs i punkterna 2–7.

   Utan hinder av de åtgärder som avses i artikel 4.2 i direktiv 2001/89/EG vid den aktuella anläggningen, skall dessa riktlinjer och förfaranden även vara tillämpliga i samtliga sjukdomsfall då klassisk svinpest ingår i differentialdiagnosen. Detta skall även avse fall då de kliniska tecknen hos svinen och det epidemiologiska mönstret är sådana att sannolikheten är liten att det rör sig om klassisk svinpest.

   I alla andra fall då ett eller flera svin misstänks vara smittade med klassisk svinpest-virus skall de åtgärder som avses i artikel 4.2 i direktiv 2001/89/EG genomföras vid den aktuella misstänkta anläggningen.

   I de fall då det finns misstanke om klassisk svinpest hos svin vid ett slakteri eller ombord på ett transportmedel skall riktlinjerna och förfarandena i punkterna 2–7 tillämpas i tillämpliga delar.

2. När en officiell veterinär besöker en misstänkt anläggning för att bekräfta eller utesluta klassisk svinpest skall följande utföras:

   — Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter finns tillgängliga.

   — Inspektion av samtliga underavdelningar på anläggningen, så att det är möjligt att välja ut vilka svin som skall undersökas kliniskt.

   Vid den kliniska undersökningen skall kroppstemperatur mätas, och undersökningen skall främst avse följande svin eller grupper av svin:

   — Sjuka svin eller svin med aptitförlust.

   — Svin som nyligen tillfrisknat från sjukdom.

([1]) Om svinen har vaccinerats mot klassisk svinpest med ett konventionellt vaccin kan detta ge positivt resultat enbart på grund av vaccinationen eller på grund av en subklinisk infektion hos vaccinerade djur.

([2]) Under vissa omständigheter kan upp till 10 % av svinen inom ett bestånd ha antikroppar mot pestivirus hos idisslare som orsakar bovin virusdiarré och border disease. Detta gäller exempelvis svin som har direkt kontakt med boskap eller får som är smittade med BVD-virus eller BD-virus eller svin som kommer i kontakt med foder som är förorenat med pestivirus som drabbar idisslare.

([3]) Alla de serologiska tester för klassisk svinpest som används för närvarande kan för ett mindre antal prover ge felaktigt positiva resultat, antingen på grund av att testsystemet inte är tillräckligt specifikt eller på grund av singleton reactors.

▼B

— Svin som nyligen kommit från bekräftat smittade anläggningar eller från källor som misstänks vara smittade.

— Svin som hålls vid underavdelningar som besökts av personer utifrån som nyligen varit i nära kontakt med svin som misstänks vara eller är smittade med klassisk svinpest eller svin för vilka det konstaterats att de haft en kontakt, innebärande en särskild risk, med andra potentiella smittkällor.

— Svin som redan testats serologiskt för klassisk svinpest, om resultaten av de testen inte var sådana att klassisk svinpest kunde uteslutas, samt kontaktsvin.

Om de svin eller grupper av svin som avses ovan inte påträffas vid en inspektion av den misstänkta anläggningen skall de behöriga myndigheterna, med beaktande av den epidemiologiska situationen och utan att det påverkar genomförandet av andra åtgärder vid anläggningen i enlighet med direktiv 2001/89/EG, utföra följande:

— Ytterligare undersökningar vid den aktuella anläggningen i enlighet med punkt 3 nedan, eller

— säkerställa att det tas blodprov för laboratorieundersökning från svinen på den aktuella anläggningen. Om så är fallet skall de provtagningsförfaranden som anges i punkt 5 och avsnitt F.2 tjäna som riktlinjer, eller

— anta eller bibehålla de åtgärder som fastställs i artikel 4.2 i direktiv 2001/89/EG i avvaktan på kompletterande undersökningar vid den aktuella anläggningen, eller

— utesluta förekomst av klassisk svinpest.

3. I de fall då det hänvisas till denna punkt skall den kliniska undersökningen av svinen vid den aktuella anläggningen göras på slumpmässigt utvalda svin från de underavdelningar för vilka det konstaterats eller misstänks att det föreligger en risk för att klassisk svinpest-virus har införts.

Kroppstemperaturen skall minst mätas på så många svin att det, om feber förekommer, med 95 % konfidensgrad kan påvisas att en prevalens på 10 % har feber vid de aktuella underavdelningarna.

Emellertid skall följande gälla i följande fall:

— När det gäller avelssuggor skall kroppstemperaturen minst mätas på så många suggor att det, om feber förekommer, med 95 % konfidensgrad kan påvisas feberprevalens på 5 %.

— Vid seminstationer skall alla galtar undersökas.

4. Om döda eller döende svin påträffas vid en anläggning skall postmortala undersökningar genomföras på minst fem av svinen och särskilt på svin enligt följande:

— Svin som innan döden inträder har visat eller visar mycket tydliga tecken på sjukdom.

— Svin som har hög feber.

— Svin som nyligen dött.

Om undersökningarna inte tyder på organskador till följd av klassisk svinpest men, om det med tanke på den epidemiologiska situationen, krävs ytterligare undersökning skall följande undersökningar utföras:

— En klinisk undersökning i enlighet med punkt 3 skall genomföras och blodprover tas i enlighet med punkt 5 vid den avdelning där de döda eller döende svinen hölls, och

— postmortala undersökningar får utföras på tre till fyra kontaktsvin.

Oavsett om det förekommer organskador som tyder på klassisk svinpest eller inte skall prover tas för virologiska test i enlighet med kapitel V.B.1 från organ och vävnader från de svin som undersökts postmortalt. Proven skall helst tas från svin som dött nyligen.

I samband med postmortala undersökningar skall de behöriga myndigheterna säkerställa följande:

— Att det vidtas nödvändiga säkerhets- och hygienåtgärder för att förhindra smittspridning, och

— att döende svin avlivas på ett humant sätt i enlighet med rådets direktiv 93/119/EEG.

5. I de fall då ytterligare kliniska tecken och organskador som tyder på klassisk svinpest upptäcks vid en anläggning, men de behöriga myndigheterna anser att dessa inte är tillräckliga för att bekräfta ett utbrott av klassisk svinpest och att det krävs laboratorietest, skall blodprov för laboratorietest i enlighet med de förfaranden som anges nedan tas från misstänkta svin

▼B

och från andra svin vid varje underavdelning där de misstänkta svinen hålls.

Det skall minst tas så många prov för serologisk testning att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas en seroprevalens på 10 % vid den aktuella underavdelningen.

Emellertid skall följande gälla i följande fall:

— När det gäller avelssuggor skall minst så många prov tas att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas en seroprevalens på 5 % ([1]).

— Vid seminstationer skall blodprov tas från alla galtar.

De behöriga myndigheterna skall besluta om hur många prov som skall tas för virologisk testning och skall i samband därmed beakta hur många olika test som kan utföras, laboratorietestens känslighetsgrad och den epidemiologiska situationen.

6. Om misstanken om klassisk svinpest vid en anläggning grundar sig på resultaten av tidigare serologiska tester skall utöver de blodprov som skall tas från svin enligt punkt 2 andra stycket femte strecksatsen följande förfaranden gälla:

   a) Om de seropositiva svinen är dräktiga suggor skall ett antal av dessa, helst fler än tre, avlivas och undersökas postmortalt. Innan djuren avlivas skall blodprov tas för kompletterande serologiska tester. Fostren skall undersökas för klassisk svinpest-virus, antikroppar mot viruset och virusgenom i enlighet med kapitel VI för påvisande av intrauterin infektion.

   b) Om de seropositiva svinen är suggor med diande smågrisar skall blodprov tas från samtliga smågrisar och undersökas för klassisk svinpest-virus, antikroppar mot viruset och virusgenom i enlighet med kapitel VI. Blodprov måste också tas från suggorna för kompletterande serologiska test.

7. I de fall då det vid undersökning av en misstänkt anläggning inte konstateras några kliniska tecken eller organskador som tyder på klassisk svinpest, men de behöriga myndigheterna anser att det krävs ytterligare laboratorietest för att det skall vara möjligt att utesluta klassisk svinpest, skall de provtagningsförfaranden som anges i punkt 5 tjäna som riktlinjer.

B. **Provtagningsförfaranden vid en anläggning i samband med att svin avlivas efter det att sjukdomen bekräftats**

1. I de fall då svin avlivas till följd av att ett utbrott bekräftas i enlighet med artikel 5.1 a i direktiv 2001/89/EG skall blodprov för serologisk undersökning tas slumpmässigt från djur som avlivas så att det är möjligt att utröna hur klassisk svinpest-viruset infördes till den smittade anläggningen och att avgöra hur länge viruset funnits på anläggningen.

2. Det skall minst tas prov från så många svin att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas en seroprevalens på 10 % vid den anläggningens samtliga underavdelningar ([2]).

   Prov får också tas för virologisk undersökning i enlighet med instruktioner från den behöriga myndigheten, och myndigheten skall beakta vilka olika tester som kan utföras, laboratorietesternas känslighetsgrad och den epidemiologiska situationen.

3. Vid ett sekundärt utbrott får den behöriga myndigheten besluta att bevilja undantag från punkterna 1 och 2 och anta särskilda provtagningsförfaranden och i samband därmed beakta den epidemiologiska information som redan finns tillgänglig om smittkällan och smittvägarna och om den potentiella spridningen av viruset vid en anläggning.

C. **Provtagningsförfaranden i samband med att svin på en misstänkt anläggning avlivas i förebyggande syfte**

1. När svin på en misstänkt anläggning avlivas i förebyggande syfte i enlighet med artikel 4.3 a och artikel 7.2 i direktiv 2001/89/EG skall blodprov tas för serologisk undersökning och blodprov eller prov från

([1]) I vissa fall, som när man misstänker klassisk svinpest vid en anläggning med ett begränsat antal smågrisar, kan antalet sjuka suggor vara mycket lågt. I sådana fall skall prov tas från ett större antal suggor.

([2]) Om det undantag som anges i artikel 6.1 i direktiv 2001/89/EG har tillämpats skall provtagningen göras vid de avdelningar vid anläggningen där djur har avlivats, utan att detta påverkar kompletterande undersökningar och provtagning på resterande djur vid anläggningen som skall utföras i enlighet med de behöriga myndigheternas direktiv.

▼B

tonsillerna för virologisk testning i enlighet med förfarandet i punkt 2 så att klassisk svinpest kan bekräftas eller uteslutas och epidemiologisk information samlas in.

2. Provtagningen skall huvudsakligen avse följande djur:

— Svin som visar symtom eller har postmortala organskador som tyder på klassisk svinpest, samt kontaktsvin.

— Andra svin som har haft kritisk kontakt med smittade eller misstänkt smittade svin eller svin som misstänks vara smittade med klassisk svinpest-viruset.

Prov skall tas från dessa svin i enlighet med de direktiv som den behöriga myndigheten utfärdar med beaktande av den epidemiologiska situationen. Om så är fallet skall de provtagningsförfaranden som anges i andra, tredje och fjärde styckena nedan tjäna som riktlinjer.

Vidare skall slumpmässiga prov tas från svin från varje underavdelning vid anläggningen ([1]). Det skall minst tas så många prov för serologisk testning att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas en seroprevalens på 10 % vid den aktuella underavdelningen.

Emellertid skall följande gälla i följande fall:

— När det gäller avelssuggor skall minst så många prov tas att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas en seroprevalens på 5 % ([2]).

— Vid seminstationer skall blodprov tas från alla galtar.

De behöriga myndigheterna skall besluta om vilka prov som skall tas för virologisk testning och skall i samband därmed beakta vilka olika tester som kan utföras, laboratorietesternas känslighetsgrad och den epidemiologiska situationen.

D. **Kontroll- och provtagningsförfaranden som skall tillämpas innan tillstånd beviljas för förflyttning av svin från anläggningar i skydds- eller övervakningszoner och om sådana svin slaktas eller avlivas**

1. För den kliniska undersökning som officiell veterinär skall utföra innan tillstånd beviljas för förflyttning av svin från anläggningar i skydds- och övervakningszonerna i enlighet med artikel 10.3 i direktiv 2001/89/EG skall, utan att det påverkar tillämpningen av artikel 11.1 f andra stycket i direktivet, följande gälla:

— Undersökningen skall utföras inom de 24 timmar som föregår förflyttningen.

— Undersökningen skall utföras i enlighet med kapitel A.2.

2. I de fall då svin flyttas till en annan anläggning skall det, utöver de undersökningar som skall genomföras enligt punkt 1, göras en klinisk undersökning av svinen på varje underavdelning där de svin som skall flyttas hålls. Om det rör sig om svin som är äldre än tre eller fyra månader skall även kroppstemperaturen mätas på ett antal svin.

Kroppstemperaturen skall minst mätas på så många svin att det, om feber förekommer, med 95 % konfidensgrad kan påvisas feberprevalens på 10 % vid de aktuella underavdelningarna.

Emellertid skall följande gälla i följande fall:

— När det gäller avelssuggor skall kroppstemperaturen minst mätas på så många suggor att det, om feber förekommer, med 95 % konfidensgrad kan påvisas feberprevalens på 5 % vid den underavdelning där de suggor som skall flyttas hålls.

— När det gäller galtar skall alla djur undersökas.

3. I de fall då svin flyttas till ett slakteri, en bearbetningsanläggning eller till en annan plats för avlivning eller slakt skall det, utöver de undersökningar som skall genomföras enligt punkt 1, göras en klinisk undersökning av svinen på varje underavdelning där de svin som skall flyttas hålls. Om det rör sig om svin som är äldre än tre eller fyra månader skall även kroppstemperaturen mätas på ett antal svin.

([1]) Om den behöriga myndigheten har begränsat avlivningen i förebyggande syfte till den del av anläggningen där misstänkt sjuka eller smittade svin hölls i enlighet med artikel 4.3 a i direktiv 2001/89/EG, skall provtagningen göras vid de underavdelningar vid anläggningen där åtgärden har tillämpats, utan att detta påverkar de kompletterande undersökningar och provtagning på resterande djur vid anläggningen som skall utföras i enlighet med de behöriga myndigheternas direktiv.

([2]) I vissa fall, som när man misstänker klassisk svinpest vid en anläggning med ett begränsat antal smågrisar, kan antalet sjuka suggor vara mycket lågt. I sådana fall skall prov tas från ett större antal suggor.

▼B

Kroppstemperaturen skall minst mätas på så många svin att det, om feber förekommer, med 95 % konfidensgrad kan påvisas feberprevalens på 20 % vid de aktuella underavdelningarna.

När det gäller avelssuggor och galtar skall kroppstemperaturen minst mätas på så många svin att det, om feber förekommer, med 95 % konfidensgrad kan påvisas feberprevalens på 5 % vid den underavdelning där de svin som skall flyttas hålls.

4. När de svin som avses i punkt 3 slaktas eller avlivas skall blodprov tas för serologisk testning eller blodprov eller prov från tonsillerna för virologisk testning från svin vid var och en av de underavdelningar från vilka svin har flyttats.

   Det skall minst tas så många prov att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas en seroprevalens eller virusprevalens på 10 % vid den aktuella underavdelningen.

   När det gäller avelssuggor och galtar skall det minst tas så många prov att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas en seroprevalens eller virusprevalens på 5 % vid den underavdelning där djuren hölls.

   De behöriga myndigheterna skall besluta om vilka prov som skall tas och skall i samband därmed beakta vilka olika tester som kan utföras, laboratorietesternas känslighetsgrad och den epidemiologiska situationen.

5. Om det i samband med avlivning eller slakt konstateras kliniska tecken eller postmortala organskador som tyder på klassisk svinpest skall de provtagningsförfaranden som fastställs i avsnitt C tillämpas genom undantag från punkt 4.

E. **Kontroll och provtagningsmetoder i samband med återinsättning av svin på en anläggning**

1. Vid återinsättning av svin på en anläggning enligt artikel 13.2 a eller 13.2 b eller artikel 19.8 andra stycket b i direktiv 2001/89/EG skall följande provtagningsmetoder användas:

   — Vid återinsättning av kontrollsvin skall blodprov för serologisk testning tas slumpmässigt från ett så stort antal svin att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas 10 % seroprevalens i varje underavdelning på anläggningen.

   — Vid fullständig återinsättning skall blodprov för serologisk testning tas slumpmässigt från ett så stort antal svin att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas 20 % seroprevalens i varje underavdelning på anläggningen.

   När det gäller avelssuggor och avelsgaltar skall antalet prover dock vara så stort att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas 10 % seroprevalens.

2. Om svin efter återinsättningen av okänd anledning insjuknar eller dör skall den behöriga myndigheten se till att svinen i fråga omedelbart undersöks med avseende på klassisk svinpest. Dessa bestämmelser skall gälla tills de restriktioner som avses i artikel 13.2 a andra stycket och artikel 19.8 andra stycket b andra meningen i direktiv 2001/89/EG har upphävts för anläggningen i fråga.

F. **Provtagningsmetoder på anläggningar i skyddszonen innan restriktioner hävs**

1. För att de åtgärder som avses i artikel 10 i direktiv 2001/89/EG skall få upphävas i en skyddszon skall det på samtliga anläggningar i zonen

   — göras en klinisk undersökning i enlighet med avsnitten A.2 och A.3,

   — tas blodprov för serologisk testning enligt punkt 2 nedan.

2. Det skall minst tas så många blodprov att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas 10 % seroprevalens hos svin i varje underavdelning på anläggningen.

   När det gäller

   — avelssuggor skall det minst tas så många prov att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas 5 % seroprevalens.

   — en seminstation skall blodprov tas från alla galtar.

G. **Provtagningsmetoder på anläggningar i övervakningszonen innan restriktioner hävs**

1. För att de restriktioner som avses i artikel 11 i direktiv 2001/89/EG skall få hävas i en övervakningszon skall det på samtliga anläggningar i zonen göras en klinisk undersökning i enlighet med avsnitt A.2.

▼B

Dessutom skall blodprov för serologisk undersökning tas från svin

— på samtliga anläggningar där det inte hålls några svin i åldern två till åtta månader,

— när den behöriga myndigheten anser att klassisk svinpest obemärkt kan ha spridits bland avelssuggor,

— på alla andra anläggningar där den behöriga myndigheten anser att prover bör tas,

— i alla seminstationer.

2. När det tas blodprov för serologisk undersökning på anläggningar i övervakningszonen skall det antal blodprov som tas på dessa anläggningar överensstämma med punkt F.2. Om den behöriga myndigheten anser att klassisk svinpest obemärkt kan ha spridits bland avelssuggor får provtagning dock begränsas till de underavdelningar där dessa djur hålls.

H. **Serologisk övervakning och provtagningsmetoder i områden där klassisk svinpest misstänks förekomma eller har bekräftats hos viltlevande svin**

1. När det gäller serologisk övervakning av viltlevande svin i områden där klassisk svinpest misstänks förekomma eller har bekräftats skall storleken på och det geografiska området för den målpopulation som skall undersökas först bestämmas så att det kan fastställas hur många prover som skall tas. Provstorleken skall fastställas med hänsyn till det uppskattade antalet levande djur och inte med hänsyn till antalet skjutna djur.

2. Om det inte finns uppgifter om populationens täthet och storlek skall det geografiska område inom vilket proverna skall tas avgränsas med hänsyn till den ständiga förekomsten av viltlevande svin och förekomsten av naturliga eller konstgjorda hinder som effektivt förhindrar omfattande och kontinuerliga förflyttningar av djuren. Om sådana förhållanden inte råder, eller när det gäller stora områden, bör det avgränsas provtagningsområden på högst 200 $km^2$ där det normalt finns en population på cirka 400–1 000 viltlevande svin.

3. Utan att det påverkar tillämpningen av bestämmelserna i artikel 15.2 c i direktiv 2001/89/EG skall det tas prov från minst så många svin inom det avgränsade provtagningsområdet att det med 95 % konfidensgrad kan påvisas 5 % seroprevalens. Detta innebär att det skall tas prov från minst 59 djur i varje avgränsat område.

Även följande rekommenderas:

— I områden där jakt bedrivs regelbundet och i stor skala, eller där selektiv jakt bedrivs i syfte att bekämpa sjukdomar, bör cirka 50 % av de djur som skall provtas vara tre till tolv månader, 35 % ett till två år och 15 % över två år gamla.

— I områden med mycket begränsad jakt eller där ingen jakt alls förekommer bör minst 32 djur provtas i var och en av de tre ålderskategorierna.

— Provtagningen skall göras på kort tid, helst inom en månad.

— Djurens ålder skall bestämmas utifrån tändernas utveckling.

4. Insamling av prov för virologisk undersökning från viltlevande svin som skjutits eller hittats döda skall ske enligt kapitel V.B.1.

När virologisk övervakning av skjutna viltlevande svin anses nödvändig skall den först och främst utföras på djur som är tre till tolv månader gamla.

5. Alla prover som skickas till laboratoriet skall åtföljas av det formulär som avses i artikel 16.3 1 i direktiv 2001/89/EG.

## KAPITEL V

### *Allmänna förfaranden och kriterier för insamling och transport av prover*

A. **Allmänna förfaranden och kriterier**

1. Före provtagning på en misstänkt anläggning skall det ritas en karta över anläggningen, och de epidemiologiska underavdelningarna på anläggningen skall identifieras.

2. Varje gång man anser att en ny provtagning av svin kan komma att krävas skall alla svin som provtas märkas på ett enhetligt sätt så att provtagningen lätt kan upprepas.

3. Utan att det påverkar tillämpningen av kapitel IV.A.5 b får prov för serologisk undersökning inte tas från smågrisar som är yngre än åtta veckor.

▼B

4. Alla prover skall skickas till laboratoriet tillsammans med relevanta dokument i enlighet med de krav som den behöriga myndigheten har fastställt. Dokumenten skall redogöra för bakgrunden för de svin som provtagits samt kliniska tecken eller postmortala organskador som eventuellt observerats.

   När det gäller svin som hålls på anläggningar skall det finnas tydliga uppgifter om de provtagna svinens ålder, klass och ursprungsanläggning. Det rekommenderas att man för varje svin som provtas på anläggningen registrerar var det befinner sig, liksom vilket identifikationsmärke det har.

B. **Insamling av prov för virologisk undersökning**

1. För påvisande av klassisk svinpest-virus, antigen eller genom från döda eller avlivade svin är vävnad från tonsiller, mjälte och njure de lämpligaste proverna. Dessutom bör det insamlas två prover av annan lymfvävnad såsom retrofaryngeal-, parotid-, mandibular- eller kröslymfknuta samt ett prov av ileum. När det gäller slaktkroppar som brutits ned genom autolys är ett helt rörben eller bröstbenet det lämpligaste provmaterialet.

2. Blodprov med tillsats av antikoagulans eller utan tillsats skall insamlas från svin som visar tecken på feber eller andra sjukdomstecken i enlighet med den behöriga myndighetens instruktioner.

3. Virologiska undersökningar rekommenderas när det gäller sjuka djur. De är vanligtvis av begränsat värde när de används för övervakning av djur utan kliniska tecken. Om syftet med en storskalig provtagning däremot är att påvisa klassisk svinpest-virus under inkubationstiden är tonsillerna det lämpligaste provtagningsmaterialet.

C. **Transport av prov**

1. Det rekommenderas att alla prover
   - transporteras och förvaras i behållare som inte läcker,
   - inte fryses men förvaras i kylskåpstemperatur,
   - levereras till laboratoriet så snabbt som möjligt,
   - förvaras i en förpackning som kyls med kylklampar i stället för med is,
   - av vävnad eller organ placeras i särskilda tättslutande och korrekt märkta plastpåsar. Påsarna skall sedan placeras i större starkare ytterförpackningar och packas med ett tillräckligt absorberande material som skyddar innehållet från skada och som har förmåga att suga upp eventuell läckande vätska,
   - när så är möjligt direkt transporteras till laboratoriet av behörig personal så att det garanteras en snabb och tillförlitlig transport.

2. Utsidan av förpackningen skall vara märkt med det mottagande laboratoriets adress och följande meddelande väl synligt: (Djurpatologiskt material. Lättfördärvligt. Ömtåligt. Får endast öppnas vid ett laboratorium för klassisk svinpest.)

3. Det mottagande laboratoriet skall i förväg informeras om när och hur proverna anländer.

4. Om prover transporteras med flygfrakt till gemenskapens referenslaboratorium för klassisk svinpest [1] från andra medlemsstater än Tyskland eller från tredje länder skall förpackningen märkas enligt IATA:s regler.

## KAPITEL VI

### *Principer för och användning av virologiska undersökningar samt utvärdering av resultatet från dessa*

A. **Påvisande av virusantigen**

1. *Fluorescerande antikroppstest (FAT)*

   Testprincipen är att påvisa virusantigen i tunna kryosnitt av organmaterial från svin som misstänks vara smittade med klassisk svinpest-virus. Intracellulär antigen påvisas med hjälp av en FITC-konjugerad antikropp. Ett positivt resultat bör bekräftas genom att färgningen upprepas med en specifik monoklonal antikropp.

[1] Gemenskapens referenslaboratorium har obegränsat tillstånd att ta emot diagnostiska prov och isolat av klassisk svinpest-virus. En kopia av importtillståndet kan krävas från detta laboratorium före transport och bifogas i ett kuvert utanpå förpackningen.

▼B

Lämpliga organ är tonsiller, njure, mjälte, olika lymfknutar och ileum. När det gäller viltlevande svin får även ett utstryksprov av benmärgsceller användas, om dessa organ inte går att skaffa fram eller har brutits ned genom autolys.

Testet kan utföras på en dag. Eftersom organprov endast kan fås från döda djur är de endast av begränsat värde vid screening. Testresultatets tillförlitlighet kan vara begränsad på grund av tveksam färgning, särskilt då det inte finns så stor erfarenhet av att utföra testet eller om de testade organen har brutits ned genom autolys.

2. *ELISA för att påvisa antigen*

Virusantigen påvisas med hjälp av olika ELISA-metoder. Känsligheten hos antigen ELISA bör vara tillräckligt hög för att ge ett positivt resultat från djur som visar kliniska tecken på klassisk svinpest.

Användningen av ELISA-test för att påvisa antigen rekommenderas på prover från djur med kliniska tecken på eller patologiska organskador av sjukdom. Den lämpar sig inte för undersökning av enskilda djur. Lämpliga prover är leukocyter, serum, ej koagulerat blod samt suspensioner av de organ som avses i punkt 1 från svin som misstänks vara smittade med klassisk svinpest-virus ([1]).

ELISA-test kan utföras på en dag och med automatisk utrustning. Den största fördelen är att ett stort antal prover kan behandlas på kort tid. Det rekommenderas att man använder antigen ELISA som ger tillfredsställande resultat på referensmaterialet. För närvarande är dock de ELISA-test som finns på marknaden mindre känsliga än virusisolering i cellkultur och deras känslighet är betydligt bättre i blodprov från smågrisar än från vuxna svin.

B. **Virusisolering**

1. Virusisolering är baserad på inkubering av provmaterial på mottagliga cellkulturer från svin. Om klassisk svinpest-virus förekommer i provet reproducerar det sig i cellerna till en mängd som kan påvisas genom immunfärgning av de smittade cellerna med konjugerade antikroppar. Det krävs antikroppar som är specifika för klassisk svinpest för differentialdiagnos när det gäller andrapestivirus.

2. De lämpligaste proverna för isolering av klassisk svinpest-virus är leukocyter, plasma eller helblod som erhållits från prov av ej koagulerat blod eller de organ som anges i avsnitt A.1.

3. Virusisolering lämpar sig bäst för undersökning av prover från ett litet antal djur och inte för massövervakning. Virusisolering är arbetskraftsintensiv och kräver minst tre dagar innan det föreligger resultat. Ytterligare två passager i cellkultur kan krävas för att en liten mängd virus skall kunna påvisas i provet. Detta kan leda till en undersökningstid på upp till tio dagar innan slutresultatet erhålls. Prover som har brutits ned genom autolys kan vara cytotoxiska för cellkulturen och därmed begränsa dess användning.

4. Det rekommenderas att virusisolering även görs i de fall då klassisk svinpest tidigare har konstaterats med hjälp av andra metoder. Virusisolering skall användas som referenstest för att bekräfta positiva resultat av tidigare antigen ELISA, PCR, FAT eller indirekt peroxidasfärgning.

Isolat av klassisk svinpest-virus som har erhållits på detta sätt är användbara för viruskarakterisering och även för genetisk typning och molekylär epidemiologi.

5. Alla isolat av klassisk svinpest-virus från alla primärutbrott, primärfall hos viltlevande svin eller fall i slakterier eller transportmedel skall genomgå genetisk typning vid ett nationellt referenslaboratorium i medlemsstaten eller vid ett annat laboratorium som medlemsstaten i fråga har godkänt eller vid gemenskapens referenslaboratorium i enlighet med avsnitt E.

Under alla omständigheter skall dessa virusisolat omedelbart skickas till gemenskapens referenslaboratorium så att de kan föras in i virussamlingen.

([1]) Det finns flera ELISA-metoder på marknaden för att påvisa klassisk svinpestantigen, som kan genomföras med olika typer av prover.

▼B

C. **Påvisande av virusgenom**

1. Polymeras-kedjereaktion (PCR) används för att påvisa virusgenom i blod-, vävnads- eller organprov. Små fragment virus-RNA transkriberas till DNA-fragment som förökas med PCR till påvisbara mängder. Eftersom denna test endast påvisar en genomsekvens av viruset kan PCR ge positivt resultat även om det inte förekommer något infektiöst virus (t.ex. i vävnad som brutits ned genom autolys eller prov från svin som håller på att tillfriskna).

2. PCR kan användas för att undersöka ett litet antal omsorgsfullt utvalda prover från misstänkta djur eller material från aborterade foster. PCR kan vara en lämplig metod för viruspåvisning i slaktkroppar från viltlevande svin om materialet har brutits ned genom autolys och virusisolering inte längre är möjlig på grund av cytotoxicitet.

3. Lämpligt provmaterial för diagnostisk PCR är de organ som anges för virusisolering eller blod med tillsats av antikoagulans.

4. PCR kan utföras inom 48 timmar. Den kräver lämplig laboratorieutrustning, avskilda utrymmen och rutinerad personal. En fördel är att infektiösa viruspartiklar inte behöver reproduceras i laboratoriet. Metoden är mycket känslig, men det kan lätt uppstå kontaminationer vilket leder till falskt positiva resultat. Därför är sträng kvalitetskontroll av största vikt. Vissa metoder är snarare specifika för pestivirus än klassisk svinpest och kräver ytterligare bekräftande test, såsom sekvensering av PCR-produkten.

D. **Utvärdering av resultaten från de virologiska undersökningarna**

1. Virologiska undersökningar är av största vikt för att bekräfta klassisk svinpest.

   Virusisolering skall betraktas som ett virologiskt referenstest och skall vid behov användas som bekräftande test. Virusisolering rekommenderas särskilt om positiva FAT-, ELISA- eller PCR-resultat inte är förbundna med påvisande av kliniska tecken på eller organskador orsakade av sjukdom i andra tveksamma fall.

   Ett primärutbrott av klassisk svinpest kan emellertid bekräftas om kliniska tecken på eller organskador orsakade av sjukdom har påvisats hos svinen i fråga och minst två test för att påvisa antigen eller genom har givit positivt resultat.

   Ett sekundärutbrott av klassisk svinpest kan bekräftas om det, utöver det epidemiologiska sambandet med det bekräftade utbrottet eller fallet, har påvisats kliniska tecken på eller organskador orsakade av sjukdom hos svinen i fråga och en test för att påvisa antigen eller genom har givit positivt resultat.

   Ett primärfall av klassisk svinpest hos viltlevande svin kan bekräftas efter virusisolering eller om minst två test för att påvisa antigen eller genom har givit positivt resultat. Ytterligare fall av klassisk svinpest hos viltlevande svin för vilka ett epidemiologiskt samband har funnits med tidigare bekräftade fall kan bekräftas om ett test för att påvisa antigen eller genom har givit positivt resultat.

2. Ett positivt resultat på klassisk svinpest vid ett test för att påvisa genom eller antigen förutsätter att testet i fråga har utförts med antikroppar som är specifika för klassisk svinpest-virus eller primer. Om det test som användes inte var särskilt avsett för klassisk svinpest-virus utan endast för Pestivirus måste det upprepas med reagenser som är specifika för klassisk svinpest.

E. **Genetisk typning av isolat av klassisk svinpest-virus**

1. Genetisk typning av isolat av klassisk svinpest-virus görs genom bestämning av nukleotidsekvensen för delar av virusgenomet, närmare bestämt vissa delar av den icke-kodande regionen i 5'-änden och/eller av E2-glykoproteingenen. Dessa sekvensers överensstämmelse med de som redan erhållits från tidigare virusisolat kan indikera huruvida sjukdomsutbrott beror på nya eller redan kända stammar. Detta kan underbygga eller motbevisa de hypoteser om överföringsvägar som epidemiologisk spårning har givit upphov till.

   Genetisk typning av isolat av klassisk svinpest-virus är av mycket stor betydelse för bestämning av sjukdomskällan. Ett nära samband mellan virus från olika utbrott betyder dock inte nödvändigtvis att det finns ett direkt epidemiologiskt samband.

▼B

2. Om virustypning inte kan utföras i ett nationellt laboratorium eller i ett annat laboratorium som har godkänts för diagnos av klassisk svinpest på kort tid skall originalprovet eller virusisolatet snarast möjligt skickas till gemenskapens referenslaboratorium för typning.

   De uppgifter om typning och sekvensering av isolat av klassisk svinpest-virus som de laboratorier som godkänts för diagnos av klassisk svinpest har tillgång till skall skickas till gemenskapens referenslaboratorium så att de kan matas in i referenslaboratoriets databas.

   Uppgifterna i denna databas skall vara tillgängliga för alla nationella referenslaboratorier i medlemsstaterna. Om avsikten är att uppgifterna skall publiceras i vetenskapliga tidskrifter skall gemenskapens referenslaboratorium på begäran från det berörda laboratoriet garantera att de behandlas konfidentiellt tills de publiceras.

KAPITEL VII

***Principer för och användning av serologiska test samt utvärdering av resultatet från dessa***

A. **Grundprinciper och diagnostiskt värde**

1. Hos svin som är smittade med klassisk svinpest-virus kan antikroppar vanligtvis påvisas i serumprov från och med två till tre veckor efter infektion. Hos svin som har återhämtat sig från sjukdomen kan skyddande neutraliserande antikroppar påvisas i flera år eller till och med under hela djurets livstid. Antikroppar kan också påvisas sporadiskt i sjukdomens slutstadium hos dödligt sjuka djur. Hos vissa svin med kronisk form av klassisk svinpest kan antikroppar påvisas under några få dagar i slutet av den första månaden efter infektion.

   Svin som smittats in utero kan vara immuntoleranta mot homologt klassisk svinpest-virus och inte producera några specifika antikroppar. Antikroppar från moderdjuret kan emellertid påvisas under djurets första levnadsdagar. Halveringstiden för antikroppar från moderdjuret hos friska icke-viremiska smågrisar är cirka två veckor. Om antikroppar mot klassisk svinpest konstateras hos smågrisar som är äldre än tre månader härstammar de troligen inte från moderdjuret.

2. Påvisande av antikroppar mot klassisk svinpest-virus i serum- eller plasmaprover utförs för att stödja diagnosen klassisk svinpest på misstänkta anläggningar och för att fastställa infektionens varaktighet när det gäller bekräftade utbrott och sjukdomsövervakning. Serologiska test är emellertid av begränsat värde för att påvisa klassisk svinpest om det nyligen uppstått smitta på en anläggning.

   Några få seropositiva svin med låg titer vid neutralisationstest kan tyda på nyligen inträffad smitta (två till fyra veckor). Många svin med hög titer vid neutralisationstest kan tyda på att viruset fördes in till anläggningen för mer än en månad sedan. Lokaliseringen av seropositiva svin på anläggningen kan ge värdefull information om hur klassisk svinpest-virus fördes in till anläggningen.

   Det bör dock utföras en korrekt utvärdering av resultaten av de serologiska testerna med hänsyn till samtliga kliniska, virologiska och epidemiologiska resultat av den undersökning som skall göras enligt artikel 8 i direktiv 2001/89/EG om klassisk svinpest misstänks eller bekräftas.

B. **Rekommenderade serologiska test**

1. Virusneutralisationstest (VN-test) och ELISA-test är lämpliga för serologisk diagnostisering av klassisk svinpest.

   Kvaliteten på och effektiviteten av den serologiska diagnos som ställs på de nationella laboratorierna skall regelbundet kontrolleras som ett led i de jämförande test som gemenskapens referenslaboratorium med jämna mellanrum genomför mellan olika laboratorier.

2. VN-test grundas på bestämning av den virusneutraliserande effekten av antikropparna i serumprovet, uttryckt som 50 % neutralisation i sista spädningssteget.

   En konstant mängd klassisk svinpest-virus inkuberas vid 37 ºC med utspätt serum. Vid screeningundersökningen späds serumen först 1:10. När det krävs en fullständig titrering kan tvåfaldiga serumspädningar göras med början vid spädning 1:2 eller 1:5. Varje spädningssteg blandas med lika stor mängd virussuspension som innehåller 100 infektiösa doser (TCID 50).

▼B

Efter inkubering ympas blandningen på cellkulturer som inkuberas i tre till fem dagar. Efter inkuberingstiden fixeras cellkulturerna, och eventuell virusreplikation i de smittade cellerna påvisas genom ett immunmärkningssystem. För analysen kan användas antingen en neutraliserande antikropp märkt med peroxidas (NPLA) eller neutralisation-immunofluorescens (NIF).

VN-testresultaten uttrycks som det reciproka värdet av den första serumspädningen vid vilken hälften av de ympade cellkulturerna (50 % i sista spädningssteget) inte visar någon virusreplikation (ingen specifik märkning). En punkt bestäms mellan två spädningssteg. Slutspädningen grundas på den faktiska serumspädningen under neutralisationsreaktionen, dvs. efter tillsats av virus, men före tillsats av cellsuspension.

3. VN-test är det känsligaste och mest tillförlitliga testet för att påvisa antikroppar mot klassisk svinpest-virus. Det rekommenderas därför för serologisk undersökning av både enskilda djur och hela besättningar. Korsreagerande antikroppar som bara uppträder i samband med infektioner av idisslarpestivirus hos svin kan påvisas genom detta test.

   VN-test för att påvisa antikroppar mot bovin virusdiarré-virus (BVD) eller border disease-virus (BD) följer samma principer som ovan och utförs för differentialdiagnos av klassisk svinpest.

4. De pestivirusstammar som skall användas i neutralisationstest skall överensstämma med rekommendationerna från gemenskapens referenslaboratorium.

5. Det har utvecklats flera ELISA-metoder med specifika monoklonala antikroppar, nämligen kompetitiva eller blockerande ELISA-test och icke-kompetitiva ELISA-test.

   Kompetitiva eller blockerande ELISA-test grundar sig vanligtvis på monoklonala antikroppar. Om serumprovet innehåller antikroppar mot klassisk svinpest-virus kommer bindningen av en viss peroxidaskonjugerad monoklonal antikropp till virusantigenet att hindras, vilket medför en svagare signal.

   I icke-kompetitiv ELISA-test mäts bindningen av serumantikroppar till antigen direkt med hjälp av peroxidaskonjugerade anti-svin-antikroppar.

6. De nationella laboratorierna skall regelbundet utföra kvalitetskontroll av känslighet och specificitet i varje batch ELISA-test med hjälp av den panel av referensserum som tillhandahålls av gemenskapens referenslaboratorium. Denna panel skall omfatta

   — serum från svin i tidigt stadium av klassisk svinpest-virusinfektion (före 21 dagar efter infektion),

   — serum från svin som tillfrisknat (efter 21 dagar efter infektion),

   — serum från svin som smittats med pestivirus som drabbar idisslare.

   De ELISA-test som skall användas för serologisk diagnos av klassisk svinpest måste känna igen alla referensserum från svin som tillfrisknat. Alla resultat som erhålls med referensserum skall vara repeterbara. Dessutom bör alla positiva serum från det tidiga stadiet påvisas, och det bör endast förekomma ett minimum av korsreaktioner med serum från de svin som är smittade med pestivirus som drabbar idisslare.

   De resultat som erhålls med referensserum från svin i tidigt infektionsstadium ger en indikation på ELISA-testets känslighet.

7. ELISA-testet anses vara mindre känsligt än VN-testet och bör därför användas som screeningtest för hela besättningar. ELISA-test kräver däremot mindre specialiserad utrustning och kan tack vare automatiska system utföras mycket snabbare än VN-test.

   ELISA-test skall garantera identifiering av alla infektioner av klassisk svinpest i tillfriskningsstadiet och måste vara så fria som möjligt från inverkan av antikroppar som korsreagerar med pestivirus som drabbar idisslare.

C. **Tolkning av serologiska resultat och differentialdiagnos med infektioner framkallade av pestivirus som drabbar idisslare (BVD-virus och BD-virus).**

1. Om det vid neutralisationstest påvisas titer för klassisk svinpest-virus som är lika med eller högre än 10 $ND_{50}$ i serumprov som insamlats från ett eller flera svin eller ett positivt ELISA-resultat i serumprov från en grupp av svin skall de åtgärder som föreskrivs i artikel 4.2 i direktiv 2001/89/EG omedelbart vidtas eller fortsätta vidtas på anläggningen i fråga utan

▼B

att det påverkar tillämpningen av artikel 4.3 a eller artikel 7.2 i direktiv 2001/89/EG.

De prov som redan samlats in från denna anläggning skall undersökas på nytt med VN-test med jämförande titreringar i sista spädningssteget av de neutraliserande antikropparna mot klassisk svinpest-virus och pestivirus som drabbar idisslare.

2. Om de jämförande testerna visar antikroppar mot pestivirus som drabbar idisslare och inga eller klart lägre (mindre än det tredubbla) antikroppstiter för klassisk svinpest-virus skall misstanken om klassisk svinpest uteslutas, såvida det inte av andra skäl finns anledning att fortsätta vidta de åtgärder som föreskrivs i artikel 4.2 i direktiv 2001/89/EG på anläggningen i fråga.

3. Om de jämförande testerna visar titer vid virusneutralisationstest i fler än ett svin som är lika med eller högre än 10 $ND_{50}$ och denna titer är lika med eller högre än titer för andra pestivirus skall den behöriga myndigheten se till att klassisk svinpest bekräftas, under förutsättning att det har funnits epidemiologiska bevis på sjukdomen på anläggningen i fråga.

4. Om epidemiologiska bevis på sjukdom inte har funnits eller om det inte går att dra några slutsatser av de tidigare resultaten skall den behöriga myndigheten, utan att det påverkar bestämmelserna i artikel 4.3 i direktiv 2001/89/EG se till att

   — de åtgärder som avses i artikel 4.2 i direktiv 2001/89/EG fortsätter att vidtas på anläggningen i fråga,

   — ytterligare undersökningar görs på anläggningen i fråga snarast möjligt för att bekräfta eller utesluta klassisk svinpest enligt kapitel IV.

5. Om de ytterligare kontroller och tester som avses i punkt 4 inte gör det möjligt att utesluta klassisk svinpest skall ytterligare blodprov för serologisk testning tas på anläggningen minst två veckor efter den föregående kontrollen.

   Vid denna ytterligare provtagning skall provtagningen på de svin som redan provtagits och testats upprepas för en jämförande serologisk undersökning med de tidigare insamlade proven för att påvisa eventuell serokonversion till klassisk svinpest-virus eller pestivirus som drabbar idisslare.

   Om de ytterligare kontrollerna och testen inte gör det möjligt att bekräfta klassisk svinpest får de åtgärder som avses i artikel 4 i direktiv 2001/89/EG hävas.

▼M1

## KAPITEL VIII

### *Särskiljande test vid nödvaccination*

A. **Grundprinciper**

1. Det finns ett särskiljande serologiskt ELISA-test (nedan kallat ”särskiljande test”) som gör det möjligt att skilja svin som har vaccinerats med markörvacciner, vilka framkallar antikroppar endast mot E2-glucoproteinet i klassisk svinpest-virus, från svin som på ett naturligt sätt smittats med klassisk svinpest-virus av vild typ. Genom testet påvisas antikroppar mot $E^{rns}$-glycoproteinet i klassisk svinpest-virus. Grundprincipen för testet är att icke-smittade djur som har vaccinerats med markörvacciner endast bildar antikroppar mot E2-glycoproteinet i klassisk svinpest-virus, medan djur som smittats med fältvirus reagerar och bildar antikroppar även mot annat virusantigen.

   Detta särskiljande test är känsligt och specifikt ([1]). Emellertid reagerar även svin som smittats med andra pestivirus än klassisk svinpest-virus, t.ex. BVD-virus och BD-virus, positivt på $E^{rns}$. Dessutom är testets känslighet inte idealisk, eftersom vissa svin som vaccinerats med markörvirus och därefter smittas inte nödvändigtvis reagerar positivt på $E^{rns}$.

   Tillgängliga uppgifter tyder på att de särskiljande testen inte är tillförlitliga när det gäller att testa serumprov från viltlevande svin.

2. Det särskiljande testet är ett blockerande ELISA-test i vätskefas. De prov som skall testas inkuberas på mikrotiterplattor belagda med monoklonala

([1]) Enligt en studie som utförts av gemenskapens referenslaboratorium för klassisk svinpest och av de nationella laboratorierna för klassisk svinpest är det särskiljande testets känslighet cirka 94 % och dess specificitet cirka 98 %.

▼M1

anti-$E^{rns}$-antikroppar, tillsammans med en bestämd mängd $E^{rns}$-antigen. Antikroppar som är specifika för $E^{rns}$ binder till $E^{rns}$-antigenet i lösningen, vilket leder till att det bildas ett antigen-antikroppskomplex som inte reagerar med anti-$E^{rns}$-antikropparna på mikrotiterplattan. Efter det att obundet material avlägsnats genom sköljning av plattorna tillsätts ett peroxidasmärkt anti-$E^{rns}$-konjugat som binder till det $E^{rns}$-antigen som är komplexbundet till antikroppen på mikrotiterplattans yta. Obundet konjugat avlägsnas genom sköljning, och ett kromogenhaltigt substrat tillsätts. Styrkan hos den färg som utvecklas är omvänt proportionell mot mängden $E^{rns}$-specifika antikroppar i provet. Om provet inte innehåller några antikroppar (negativt prov) kan en stor del av det tillsatta $E^{rns}$-antigenet binda till anti-$E^{rns}$-antikropparna på mikrotiterplattan och en kraftig färgreaktion observeras.

Resultatet erhålls genom att man jämför absorbansen mellan de brunnar som innehåller prov och dem som innehåller positiv och negativ kontroll.

B. **Riktlinjer för användning av särskiljande test vid nödvaccination med ett markörvaccin på anläggningar för svinhållning inom ramen för artikel 19 i direktiv 2001/89/EG**

Det särskiljande testet gör det möjligt att kontrollera huruvida spridning av klassisk svinpest-virus i en svinpopulation som vaccinerats med markörvaccin förekommer eller ej. Enligt tillgängliga uppgifter kan testet med gott resultat användas för detta ändamål när det gäller hela besättningar, men kan inte på ett tillförlitligt sätt utesluta att enskilda svin är smittade med klassisk svinpest-virus. Framför allt är det möjligt att det särskiljande testet inte är tillräckligt specifikt för att vid vaccinering av vuxna svin på ett tillförlitligt sätt skilja markörvaccinerade svin från smittade svin. Om resultaten är osäkra måste svinen emellertid slaktas eller avlivas på ett humant sätt i enlighet med direktiv 93/119/EG, och det måste testas huruvida deras organ är smittade med klassisk svinpest-virus eller ej. Virusisolering och PCR är de mest lämpliga testen för detta ändamål.

Dessa aspekter måste beaktas till fullo när en strategi för nödvaccination med markörvaccin utarbetas och när undersökningresultat rörande klassisk svinpest-virus därefter tillämpas på den markörvaccinerade populationen.

Förfarandet för provtagning och testning av den vaccinerade svinpopulationen före upphävande av de restriktioner som skall tillämpas i det vaccinerade området i enlighet med artikel 19 i direktiv 2001/89/EG skall bero på de vaccinerade svinens ålder, på kategorin av svin (uppfödning/slakt, avel) och på den säkerhetsnivå som eftersträvas beträffande frånvaro av virusspridning i populationen.

Noggranna uppgifter om förfarandet för provtagning och testning skall därför fastställas i den plan för nödvaccinering som skall inges till kommissionen i enlighet med artikel 19.3 i direktiv 2001/89/EG.

▼B

## KAPITEL IX

### *Minimikrav på säkerhet vid laboratorierna för klassisk svinpest*

1. De minimikrav som fastställs i tabell 1 skall uppfyllas på alla laboratorier där klassisk svinpest-virus hanteras, även om det är i små mängder, i enlighet med kraven för virusisolering och neutralisationstest. Postmortala undersökningar, hantering av vävnad för FAT och serologi med användning av inaktiverad antigen får dock utföras med lägre inneslutningsnivå under förutsättning att grundläggande hygien och postoperativ desinfektion med säker destruktion av vävnad och serum kan garanteras.

2. De ytterligare krav som fastställs i tabell 1 skall uppfyllas på alla laboratorier där omfattande virusförökning äger rum.

3. De krav som fastställs i tabell 2 skall uppfyllas på alla laboratorier där djurförsök med klassisk svinpest-virus äger rum.

4. Under alla omständigheter skall alla lager av klassisk svinpest-virus förvaras säkert, antingen i djupfryst eller frystorkad form. Det rekommenderas att frysarna och kylskåpen inte används för andra virus än klassisk svinpest eller för andra material som inte har anknytning till diagnostiseringen av klassisk svinpest. Alla enskilda ampuller skall vara tydligt märkta och det skall föras utförliga register över viruslagren samt över datum för och resultat av kvalitetskontroller. Register skall också föras över tillförsel av virus till lagret, med utförliga uppgifter om källa, och om virus som lämnats till andra laboratorier.

5. Det rekommenderas att det i anslutning till det säkerhetsområde där man arbetar med klassisk svinpest-virus även finns utrymmen där klassisk svinpest-virus inte hanteras. Dessa andra utrymmen skall kunna användas för att

▼B

bereda glas och media, underhålla och bereda icke-infekterade cellkulturer, hantera serum och för serologisk testning (utan användning av levande klassisk svinpest-virus) samt för administrativt stöd.

Tabell 1

**Principer för biologisk inneslutning som är lämplig för diagnoslaboratorier**

| | Ytterligare krav | Minimikrav |
|---|---|---|
| Allmän arbetsmiljö | Normalt lufttryck.<br>Dubbel HEPA-filtrering av frånluft.<br>Särskilda rum som endast används vid diagnostisering av klassisk svinpest. | Normalt lufttryck.<br>Särskilda rum som endast används för specifika rutiner. |
| Laboratorieklädsel | Fullständigt klädombyte vid ankomst.<br>Laboratoriekläderna får endast användas i arbetsområdet för klassisk svinpest-virus.<br>Engångshandskar för all hantering av infekterat material.<br>Kläderna steriliseras innan de avlägsnas från området eller tvättas inom området. | Särskilda skyddskläder som endast används i arbetsområdet för klassisk svinpest-virus.<br>Engångshandskar för all hantering av smittat material.<br>Skyddskläderna steriliseras innan de avlägsnas från området eller tvättas inom området. |
| Kontroll av personal | Endast utbildad, namngiven personal har tillträde till arbetsområdet.<br>Händerna tvättas och desinficeras innan området lämnas.<br>Personal får inte komma i närheten av svin 48 timmar efter att ha lämnat arbetsområdet. | Endast utbildad, namngiven personal har tillträde till arbetsområdet.<br>Händerna tvättas och desinficeras innan området lämnas.<br>Personal får inte komma i närheten av svin 48 timmar efter att ha lämnat arbetsområdet. |
| Utrustning | Biologisk säkerhetsbänk (klass I eller II) för all hantering av levande virus. Bänken bör ha dubbel HEPA-filtrering av frånluft.<br>All utrustning som behövs för laboratoriearbetet skall finnas tillgänglig inom det avsedda laboratorieområdet. | |

Tabell 2

**Krav för biosäkerhet i utrymmen med försöksdjur**

| | Krav |
|---|---|
| Allmän arbetsmiljö | Kontrollerad undertrycksventilation.<br>Dubbel HEPA-filtrering av frånluft.<br>Utrustning för fullständig rökning/desinfektion vid försökets slut.<br>Allt avfall skall behandlas för att inaktivera klassisk svinpest-virus (kemisk eller med värme). |
| Laboratorieklädsel | Fullständigt klädombyte vid ankomst.<br>Engångshandskar för all hantering.<br>Kläderna steriliseras innan de avlägsnas från området eller tvättas inom området. |

▼B

| | Krav |
|---|---|
| Kontroll av personal | Endast utbildad, namngiven personal har tillträde till arbetsområdet.<br>Personal duschar innan arbetsområdet lämnas.<br>Personal får inte komma i närheten av svin 48 timmar efter att ha lämnat arbetsområdet. |
| Utrustning | All utrustning som behövs för djurförsök skall finnas inom arbetsområdet.<br>Allt material steriliseras när det avlägsnas från arbetsområdet eller, när det gäller djurprover, förpackas i två behållare som inte läcker, en inner- och en ytterbehållare, och desinficeras på utsidan innan det transporteras till laboratoriet för klassisk svinpest. |
| Djur | Alla djur skall slaktas innan de avlägnas från arbetsområdet, postmortala undersökningar skall göras inom biosäkerhetsområdet och slaktkropparna skall brännas när undersökningen är avslutad. |