32006D0437

31.8.2006 ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИЯ СЪЮЗ L 237/1

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА
от 4 август 2006 година
относно одобряване на наръчник по диагностика за инфлуенца по птиците, както е предвидено в Директива 2005/94/ЕО на Съвета

(нотифицирано под номер C (2006) 3477)

(текст от значение за ЕИП)

(2006/437/ЕО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Директива 2005/94/ЕО на Съвета от 20 декември 2005 г. относно мерки на Общността за борба с инфлуенцата по птиците и за отмяна на Директива 92/40/ЕИО [1], и по-специално втората алинея от член 50, параграф 1 от нея,

като има предвид, че:

(1) Директива 2005/94/ЕО предвижда определени превантивни мерки, свързани с наблюдението и ранното откриване на инфлуенца по птиците, както и минимални мерки за контрол, които следва да бъдат приложени в случай на избухване на това заболяване при домашни птици и други птици, отглеждани на закрито.

(2) Необходимо е в Общността да бъдат определени процедури за диагностициране, методи за вземане на проби и критерии за оценяване на резултатите от лабораторните резултати за потвърждение на избухване на инфлуенца по птиците.

(3) Приложение VII към Директива 2005/94/ЕО установява функциите и задълженията на референтната лаборатория на Общността за инфлуенца по птиците с цел координиране, при консултация с Комисията, на методите, използвани в държавите-членки за диагностициране на това заболяване. Цитираните функции и задължения включват организацията на периодични сравнителни изследвания и осигуряването на стандартни реагенти на ниво Общността.

(4) Наскоро бяха проведени лабораторни изследвания, за да се гарантира бързо диагностициране на инфлуенцата по птиците.

(5) Опитът, натрупан по отношение на контрола върху инфлуенцата по птиците през последните години, даде резултати при разработването на най-подходящите процедури за вземане на проби и критериите за оценяване на резултатите от лабораторните изследвания с цел правилно диагностициране на това заболяване при различни ситуации.

(6) Мерките, предвидени в настоящото решение, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните,

ПРИЕ НАСТОЯЩОТО РЕШЕНИЕ:

Член 1

Наръчникът по диагностика, предвиден в Директива 2005/94/ЕО и включен в приложението към настоящото решение е одобрен.

Член 2

Държавите-членки прилагат наръчника по диагностика от датата, на която те транспонират Директива 2005/94/ЕО или от 1 юли 2007 г., в зависимост от това, коя от двете дати е по-ранна.

[1] ОВ L 10, 14.1.2006 г., стр. 16.

Член 3

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 4 август 2006 година.

За Комисията

Markos KYPRIANOU

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

НАРЪЧНИК ПО ДИАГНОСТИКА НА ИНФЛУЕНЦА ПО ПТИЦИТЕ

ГЛАВА I

Въведение, цели и определения

1. С цел да бъдат осигурени уеднаквени процедури за диагностициране на инфлуенца по птиците (ИП) в Общността, настоящият наръчник по диагностика определя:

   а) насоки и минимални изисквания за процедурите за диагностициране, методи за вземане на проби и критерии за оценяване на резултатите от лабораторни изследвания с цел правилното диагностициране на ИП;

   б) лабораторните изследвания, които следва да се използват за диагностициране на ИП, както и лабораторната техника, която следва да се използва за определяне на генотипа на изолатите на вируса на ИП;

   в) минимални изисквания за биологична безопасност и стандарти за качество, които следва да бъдат съблюдавани от лабораториите за диагностициране и при пренасянето на пробите.

2. Настоящият наръчник по диагностика е адресиран до властите, отговорни за контрола върху ИП. Следователно, той се отнася основно до принципите и прилагането на лабораторни изследвания и до оценка на резултатите от тях, както и до лабораторната техника.

3. За целите на настоящия наръчник по диагностика, в допълнение към определението в член 2 от Директива 2005/94/ЕО, се прилага също и следното определение:

   „образец за диагностициране“ означава всякакъв животински материал, включително цялото трупно месо, транспортирано с цел диагностициране или изследователски цели, но с изключение на живи заразени животни.

4. Потвърждението на ИП при домашни и други птици, отглеждани на закрито трябва да се извършва в съответствие с процедурите, методите за вземане на проби и критериите за оценяване на резултатите от лабораторните изследвания, определени в настоящия наръчник по диагностика, и се основава на един или повече от критериите в букви а), б) и в):

   а) откриването на заразен вирус, антиген или специфичен генетичен материал в проби от домашни птици или други тъкани от птици, органи, кръв или други;

   б) откриването на клинични признаци и постмортални поражения, нанесени от болестта върху тези птици;

   в) доказването на реакция на специфични антитела в кръвни проби при тези птици.

5. Потвърждението на заразяване на бозайници с вирус А на инфлуенца с птичи произход, който високо или нископатогенен от подтипове Н5 или Н7 трябва да се основава на един или повече от критериите в букви а) или б):

   а) откриването на заразния вирус на ИП, антиген или специфичен генетичен материал в проби от тъкани, органи, кръв или други от бозайници;

   б) доказването на реакция на специфични антитела на ИП в кръвни проби от бозайници.

6. Процедурите, методите за вземане на проби и критериите за оценка на резултатите от лабораторните изследвания трябва да бъдат:

   а) онези, които са определени в настоящия наръчник по диагностика; или

   б) онези, които са разрешени от компетентния орган, при условие че:

      i) чувствителността и спецификата на разрешените лабораторни изследвания са доказани като ефективни след сравнително изследване, организирано от референтната лаборатория на Общността за инфлуенца по птиците (референтна лаборатория на Общността); или

      ii) ако такава оценка не е била организирана от референтната лаборатория на Общността за определен тип лабораторно изследване, чувствителността и спецификата на разрешеното лабораторно изследване са били потвърдени от националната референтна лаборатория, така че лабораторното изследване е подходящо за целта, за която се използва; резултатите от такова потвърждение трябва да бъдат представени за преглед на референтната лаборатория на Общността.

ГЛАВА II

Описание на ИП с акцент върху диференциалната диагноза

1. **Етиология и вирулентност**

ИП е силно заразна вирусна инфекция, причинявана от вируси от семейство *Orthomyxoviridae*, вид *Influenzavirus* A. Вируси тип А на инфлуенцата са единствените познати ортомиксовируси при инфектирани птици. Много видове птици са показали податливост на заразяване с вируси тип А на инфлуенцата; водоплаващи птици са основните резервоари на тези вируси, но голямата част от изолатите са с ниска патогенност при пилета и пуйки, основните птици с икономическо значение, податливи на заразяване с болестта.

Вируси тип А на инфлуенцата са антигенно свързани с нуклеопротеини и антигенно свързани с междуклетъчни протеини, но са класифицирани в подтипове въз основа на антигенната им връзка с гликопротеините хемаглутин (HA) и невраминидаза (NA), които се намират на повърхността на вируса. Понастоящем са познати подтипове 16 HA (H1-H16) и подтипове 9 NA (N1-N9). Всеки вирус тип А на инфлуенцата съдържа един HA и един NA антиген, поотделно във всяка комбинация.

Вируси тип А на инфлуенца са разделени в две групи въз основа на тяхната способност да причиняват заболяване при податливи домашни птици:

а) вируси на **високопатогенна инфлуенца по птиците (HPAI),** които причиняват изключително сериозно заболяване, което се характеризира с разпространение на заразата сред заразените домашни птици, при което те могат да причинят много висока смъртност в ятото (до 100 %); и

б) вируси на **нископатогенна инфлуенца по птиците (LPAI)**, които причиняват слабо, предимно респираторно заболяване при домашните птици, освен ако не настъпи влошаване на състоянието поради допълнителни инфекции или други фактори.

Дивите птици, особено мигриращите водни птици играят много важна роля като резервоар на вирус тип А на инфлуенца, както се вижда от изолирането на почти всички възможни комбинации на подтипове HA и NA от диви птици. В повечето случаи, освен когато има разпространение на HPAI от заразени домашни птици, при дивите птици са открити само вируси на LPAI.

Първоначалното внасяне на вируси на ИП във ферми за домашни птици най-вероятно е в резултат от директен контакт с диви птици.

При домашните птици съществува възможността такива вируси на LPAI, внесени от резервоар в дивата природа, да се разпространят незабелязано, тъй като клиничните симптоми често са слаби или липсват.

Веднъж внесени при домашните птици, щамовете на вирус LPAI от подтипове H5 и H7 могат да мутират в щамове на HPAI. До този момент само вируси от подтипове H5 и H7 са се оказали причинители на HPAI.

Макар да изглежда, че мутацията на вируса от LPAI в HPAI се осъществява чрез няколко механизма, факторите, предизвикващи тази мутация не са известни. В някои случаи мутация изглежда настъпва незабавно на първоначалното място след внасянето от диви птици, в други случаи вирусът на LPAI се е разпространявал в продължение на месеци сред домашните птици, преди да мутира. Следователно, невъзможно е да се предскаже дали и кога ще настъпи такава мутация. Въпреки това, може да се направи обосновано предположение, че колкото по-широкоразпространен е вирусът на LPAI при домашните птици, толкова по-големи са възможностите да настъпи мутация в HPAI.

Инкубационният период е трудно да бъде определен и вероятно варира според щама на вируса и гостоприемника. Обикновено е от пет до шест дни, но диапазонът за отделни птици вероятно е от няколко часа до около седем дни.

2. **Клинични симптоми при птици, заразени с вируса на HPAI**

Клиничните симптоми са много разнородни и се влияят от различни фактори: като вирулентността на заразния вирус, заразените видове, възраст, пол, успоредни заболявания и околна среда.

Ранните симптоми могат да включват загуба на апетит, намаляване количеството на изпитата вода и сравнително ниската смъртност. Въпреки това, съществува възможност болестта да настъпи внезапно в ятото и много птици могат да умрат, или без да са показали предварителни симптоми, или с минимални симптоми за депресия, загуба на апетит, окапване на перата и треска. Най-общо, колкото по-дълго оцелеят птиците, толкова по-очевидни са клиничните симптоми. Периодът на развитие на симптомите зависи от типа на вируса, гостоприемника и първоначалната заразна доза, заедно със системата в селското стопанство. Вирусът се разпространява по-бавно при кокошки носачки, отглеждани на закрито, или свободни птици, в сравнение с разпространението му в стопанства за пилета бройлери.

Кокошки, заразени с вируса на HPAI, може да започнат отначало да снасят яйца с меки черупки, но скоро спират да снасят. Болните птици често лежат или стоят в полулетаргично състояние с глави, докосващи земята. Гребените и менгушите им са синьозеленикави и подути, а могат да имат и петехии и хеморагични кръвонасядания по връхчетата. Обилната водниста диария се наблюдава много често, а птиците са необичайно жадни. Дишането може да бъде затруднено, а може да се наблюдава и необичайно сълзене. Хеморагиите могат да бъдат наблюдавани върху неоперените области на кожата. Смъртността в ятото варира от 50 до 100 %.

При бройлерите симптомите на HPAI обикновено са по-малко очевидни, отколкото при други домашни птици и обикновено включват остра депресия, загуба на апетит и твърде чувствителното повишаване на смъртността може да бъде първата наблюдавана аномалия. Също така могат да се забележат отоци по лицето и шията и неврологични симптоми, като схващане и нарушения в походката.

HPAI при пуйки е подобна на тази, която се среща при домашните птици, но някои вируси на HPAI се оказват по-вирулентни при пуйки, докато други се оказват по-малко вирулентни.

При гъски, заразени с вируса на HPAI, симптомите, като депресия, загуба на апетит и диария са подобни на тези при кокошки носачки, но често заедно с подути синуси. По-млади птици могат да проявят неврологични симптоми.

Патиците могат да не покажат клинични симптоми при заразяване с вируси на HAPI, но за някои щамове е установено, че причиняват симптоми, подобни на тези при гъските с определена смъртност.

При заразяване с HPAI и LPAI при щрауси могат да липсват клинични симптоми. При избухвания на HPAI, като тези в Италия през 1999 г. и 2000 г., беше докладвано, че токачките и японските пъдпъдъци са податливи на заразата, като симптомите и смъртността са подобни на тези при заболяване на пилета или пуйки. Въпреки това, при някои експериментални изследвания е докладвано, че пъдпъдъците са резистентни към някои щамове на HPAI. При всички птици наличието на антитела на същия подтип H, независимо дали вследствие на ваксиниране или естествено заразяване, може да означава, че заразяването с вируса на HPAI не предизвиква явни клинични симптоми.

3. Постмортални поражения при птици, заразени с вируса на HPAI

Птици, умрели от перакутната смърт могат да покажат минимум очевидни поражения, заключаващи се в дехидратация и претоварване на вътрешните органи и мускулите.

При птици, които умират след дълго клинично развитие, по тялото се появяват петехии и хеморагични кръвонасядания, по-специално в ларинкса, трахеята, провентрикула и епикардиалните мастни тъкани, както и върху сериозните обвивки, разположени непосредствено до гръдната кост. Наблюдават се обширни подкожни отоци, особено около главата и краката. Трупното месо може да бъде дехидратирано. Жълти или сиви некротични огнища могат да се наблюдават в далака, черния дроб, бъбреците и белите дробове. В алвеолите може да се съдържа ексудат. Далакът може да бъде уголемен и хеморагичен.

ИП се характеризира хистологично със смущения във васкуларната система, водещи до отоци, хеморагии и периваскуларни смущения, особено при миокарда, далака, белите дробове, мозъка, панкреаса и менгушите. Наблюдават се некротични огнища в белите дробове, черния дроб и бъбреците. Глиоз, васкуларна пролиферация и невронна дегенерация могат да се появят в мозъка.

4. Диференциална диагностика

При диференциалната диагноза на HPAI трябва да бъдат разгледани по-специално следните заболявания:

а) други заболявания, причиняващи внезапно висока смъртност, като:

i) Нюкасълска болест;

ii) инфекциозни ларинготрахеити;

iii) чума по патките;

iv) остри отравяния;

б) други заболявания, причиняващи тумори на гребените и менгушите, като:

i) остра холера по птиците и други септицемични болести;

ii) бактериални целулити на гребените и менгушите;

5. **Клинични симптоми при птици, заразени с вируса на LPAI**

Тежестта на заболяването, предизвикано от вируса на LPAI до голяма степен е се определя от:

а) щама на вируса;

б) вида и възрастта на гостоприемника;

в) имунния статус на гостоприемника срещу вируса и по-специално наличието на други заразни агенти, като:

i) *Pasteurella spp.*;

ii) вируси на Нюкасълска болест (включително щамовете на ваксината);

iii) птичи пневмовирус, вирус на заразния бронхит;

iv) Ешерихия коли, *E. coli*;

v) *Mycoplasma spp.*;

г) условия за имунна недостатъчност;

д) фактори на околната среда (такива като прекомерни количества амоняк, прах, много високи или ниски температури).

При едната крайност, наблюдаваните клинични симптоми на болестта могат да бъдат незабележими или слаби, предизвикващи само леки респираторни симптоми или проблеми с продуктивността на яйца при снасящите птици. При другата крайност заразяването с вируса на LPAI може да бъде свързана със силно изразени клинични симптоми на болестта, особено при пуйки, обикновено с хрипове, кашлица, подуване на инфраорбиталните синуси и фебрилно състояние, придружавани със загуба на апетит и с висока смъртност.

LPAI може да бъде сбъркана с или да доведе до усложнения чрез много от болестите с респираторни или чревни симптоми. Трябва да бъде допускано наличието на ИП при всяко избухване на заболяване при домашни птици, което се запазва, въпреки прилагането на превантивни и терапевтични мерки при други заболявания.

6. **Клинични симптоми при птици, отглеждани на закрито**

Спектърът от клинични симптоми може да бъде много широк и, както и при домашните птици, може да обхваща диапазон от незабележими до силно изразени клинични симптоми на болестта, водеща до висока смъртност.

Обикновено заразата се разпространява по-бавно при събиране на птици, отглеждани на закрито поради разнообразието на отглежданите различни видове с различна податливост, променливи нива на разпространение на вируса и често относително бавно пренасяне поради ограничена степен на контакти и относително ниска гъстота на птиците.

ГЛАВА III

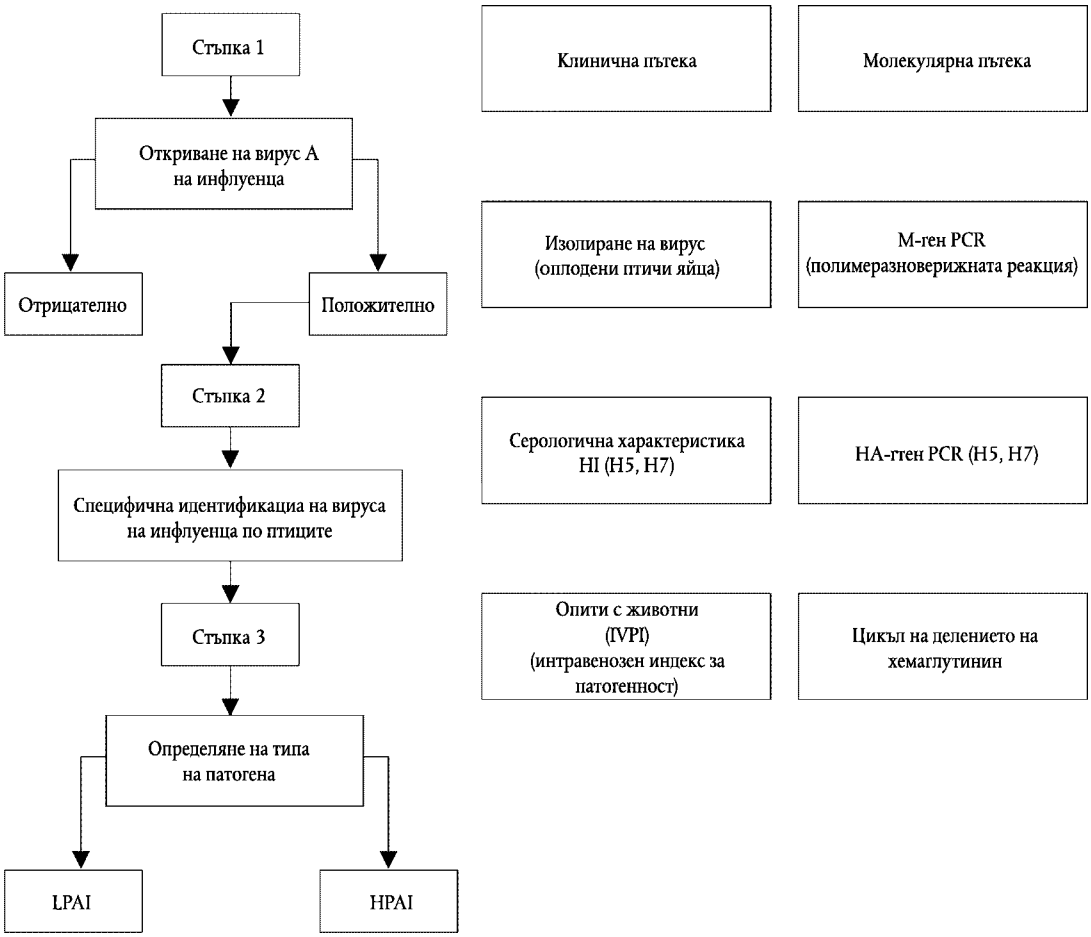
Насоки, които следва да бъдат взети под внимание в случай на съмнение за ИП в едно стопанство

Разнообразието от клинични симптоми както на HPAI, така и на LPAI означава, че ясни насоки за предполагаемо избухване са невъзможни. Внезапна висока смъртност при домашните птици, с или без наличието на съответните клинични симптоми, описани в глава II, трябва да бъде изследвана чрез предоставянето на проби за лабораторно изследване, но при отсъствието на висока смъртност е по-трудно да се предположи или да се изключи наличието на ИП.

Тъй като бързото диагностициране на HPAI или LPAI, причинени от подтипове H5 и H7 е от първостепенна важност за провеждане на ранен контрол върху тях и унищожението им, ИП трябва винаги да бъде вземана предвид при диференциалното диагностициране на респираторни проблеми, проблеми с продуктивността на яйца и нарастващата смъртност при домашни птици, както и подходящите проби, предоставени за лабораторно изследване.

Фигура

Схематичен преглед на стъпките за диагностициране с цел потвърждаване на ИП



ГЛАВА IV

Общи процедури за събиране и транспорт на проби

1. **Директива 2005/94/ЕО и наръчника по диагностика**

Когато в Директива 2005/94/ЕО са дадени препратки към наръчника по диагностика, изследването, вземането на проби и процедурите за наблюдение, включени в настоящата глава от наръчника по диагностика трябва да бъдат изпълнени.

2. **Процедури, които следва да бъдат спазвани при съмнение за избухвания на ИП**

Когато официалният ветеринарен лекар има съмнение за избухване на ИП от клиничните симптоми, или когато резултатите от което и да е лабораторно изследване за наличието на това заболяване не са отрицателни, компетентният орган трябва да гарантира, че е извършено изследване, както е определено в настоящата глава от наръчника по диагностика, в съответствие с член 7 от Директива 2005/94/ЕО, и е приключило задоволително преди наличието на болестта да бъде изключено.

3. **Интерпретиране на вирусологичните изследвания**

Компетентният орган може да приеме, че наличието на вирус на ИП може да бъде изключено, когато определен брой болни или мъртви птици и трахеален/оро-фарингеални или клоакален тампон са били предоставени, в съответствие с настоящата глава, за откриване на въпросния вирус или негов геном и са получени отрицателни резултати по време на изследването, като е използван един от определените методи за откриване на вируса, посочени в глави V или VI, или разрешени от компетентния орган в съответствие с точка 6, буква б) от глава I.

4. **Стандартен пакет от проби за вирусологично или серологично лабораторно изследване**

За изследването на стопанство, за което има съмнение, че е било заразено с вируса на ИП, стандартният пакет от проби за вирусологично или серологично лабораторно изследване, както е посочено в букви а) и б) (стандартните проби) трябва да бъде взет и предоставен директно за вирусологични и серологични лабораторни изследвания.

а) Стандартният пакет от проби за вирусологично изследване е:

i) най-малко пет болни/мъртви птици, ако има такива; и/или

ii) най-малко 20 трахеални/оро-фарингеални тампона и 20 клоакални тампона.

Трябва да бъде взето трупно месо от птици, които са умрели наскоро или които са тежко болни или умиращи и са били хуманно умъртвени.

Трябва да бъдат взети секрети от такъв брой птици, какъвто е определен в буква а) или от всички птици в стопанството под съмнение, ако там има по-малък брой птици. Птици, които показват симптоми на клинично заболяване, трябва да бъдат планирани за вземане на проби.

Секретите от клоака трябва да бъдат обвити във фекалии (оптимално количество от 1 грам). Ако по някаква причина вземането на секрет от клоаката на живи птици не може да се осъществи, като алтернатива могат да се използват внимателно събрани проби от пресни фекалии.

Често е най-практично да се вземат трахеални/оро-фарингеални секрети от устната кухина.

Веднага щом характеристиките на развитието на вируса станат известни, компетентният орган може да вземе решение да избере или трахеални/оро-фарингеални секрети, или секрети от клоаката, вместо да взема и двата вида секрет, в зависимост от това дали вирусът съответства по-добре на респираторния или на стомашно-чревния тракт, като същевременно вземе предвид засегнатите видове.

б) Стандартният пакет проби за серологично изследване е минимум 20 кръвни проби.

Трябва да бъдат взети проби от такъв брой птици, какъвто е определен в буква б) или от всички птици в стопанството, ако там има по-малък брой птици. Птиците, които са съмнителни за заболяване или които имат очевидно подобрение, трябва да бъдат планирани за вземане на проби.

Компетентният орган може да вземе решение, че е нужно да бъде взето цялото количество стандартни проби, но че вместо това може да бъде взет по-малък пакет стандартни проби.

5. **Транспортиране на пробите**

Трябва да се отдели специално внимание на складирането и транспортирането на пробите до лабораторията за изследване:

Секретите трябва да бъдат незабавно охладени в лед или в студени гел опаковки и доставени в лабораторията възможно най-бързо. Пробите не трябва да бъдат замразявани, освен ако не е абсолютно необходимо. Ако не бъде гарантирано бързо транспортиране до лабораторията в рамките на 24 часа, пробите трябва да бъдат незабавно замразени, складирани, а след това транспортирани в сух лед.

В допълнение, но не като алтернатива на охлаждането, секретите трябва да бъдат поставени в антибиотична или специална среда за транспортиране при 4 °C, така че да са напълно покрити. При липсата на такава среда, секретите трябва да бъдат върнати в тяхната опаковка и да бъдат доставени сухи в изпитвателната лаборатория.

Складирането и транспортирането на секрети може да бъде повлияно от множество фактори, така че подбраният за транспорт метод трябва да бъде подходящ за тази цел.

6. **Антибиотична среда**

Антибиотичната среда, посочена в буква 5, трябва да бъде на основата на фосфатно- буферен разтвор при pH от 7,0 до 7,4 (проверена след добавяне на антибиотиците).

Протеинова среда, като например мозъчно-тъканна инфузия или тройно буферен триптозен бульон, може да придаде допълнителна стабилност на вируса, особено по време на транспортиране. Използваните антибиотици и техните концентрации могат да бъдат променяни, за да отговарят на местните условия и възможности.

За фекалните проби могат да се окажат необходими много големи количества антибиотици, а подходящите нива са: 10 000 IU/ml пеницилин, 10 mg/ml стрептомицин, 0,25 mg/ml гентамицин, и 5000 IU/ml нистатин. Тези нива могат да бъдат намалени с до пет пъти за тъканните и трахейлните секрети.

Ако има изискване за контрол върху вируса на *Chlamydophila,* трябва да се включи от 0,05 до 0,1 mg/ml окситетрациклин.

7. **Среда от мозъчно-тъканна инфузия**

Разтворът трябва да бъде приготвен във вода и да съдържа 15 % w/v бульон на прах от мозъчно-тъканна инфузия преди стерилизацията (чрез автоклавиране при 121 °C за 15 минути).

След стерилизацията антибиотиците трябва да се добавят, както следва: 10 000 IU/ml пеницилин G, 20 µg амфотерицин B и 1000 µg/ml гентамицин. Средата може да бъде съхранявана при 4 °C за не повече от два месеца.

8. **Процедури, които трябва да бъдат изпълнени, съгласно съответните разпоредби на Директива 2005/94/ЕО.**

8.А. Съмнения за избухвания

8.1. *Член 7, параграф 1 — Мерки, приложими в стопанства, в които има съмнение за избухвания*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство, в което има съмнение за избухване, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) проверка на производството и здравните регистри на стопанството, ако такива регистри съществуват. В доклада за инспекцията официалният ветеринарен лекар вписва данните за дневната смъртност и данните за продуктивността на яйца и приемането на храна и/или вода за период, започващ една седмица преди датата на първоначалните клинични симптоми на ИП до датата на инспектиране на стопанството от официалния ветеринарен лекар;

б) клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на тези, които изглеждат болни;

в) докато компетентният орган не се увери, че въз основа на клиничния преглед, в съответствие с букви а) и б), може да се изключи съмнение за избухване, от всяко производствено звено трябва да бъдат вземани стандартните проби;

г) независимо от отрицателните резултати при изследването на стандартни проби и в зависимост от конкретните фактори, трябва да бъде извършен клиничен преглед на домашните птици във всяко производствено звено, преди официалният надзор да може да бъде снет.

8.2. *Член 10, параграф 3— Допълнителни мерки на базата на епидемиологично проучване*

Трябва да се вземат стандартни проби от домашните птици или други птици, отглеждани на закрито, които са убити, във всяка производствена единица.

8.Б. Високопатогенна инфлуенца по птиците (HPAI)

8.3. *Член 11, параграф 4 — Мерки, които следва да бъдат прилагани в случаи на домашни птици, излюпени от яйца, събрани от стопанства, където е потвърдено заболяване*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство, където има домашни птици, които вече са се излюпили от яйца, събрани по време на инкубационния период в стопанство, където е била потвърдена HPAI, следва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) проверка на производството и здравните регистри на стопанството. В доклада за инспекцията на фермата официалният ветеринарен лекар вписва данните за дневната смъртност и данните приемането на храна и/или вода, ако е възможно, за период, започващ една седмица преди датата на първоначалните клинични симптоми на HPAI до датата на инспектиране на фермата от официалния ветеринарен лекар;

б) клиничният преглед във всяко производствено звено и клиничен преглед на домашни птици, по-специално на тези, които изглеждат болни или не се развиват според очакванията;

в) стандартните проби трябва да бъдат вземани от домашните птици на възраст между две и три седмици;

г) официалният надзор върху стопанството може да бъде снет след клиничния преглед на домашни птици на възраст над 21 дни и отрицателни резултати при изследването на стандартни проби.

8.4. *Член 13, параграф 2, буква б) — дерогации по отношение на определени стопанства*

Когато официалният ветеринарен лекар инспектира стопанство, на което е била предоставена дерогация от първата алинея на член 11, параграф 2 от Директива 2005/94/ЕО, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) проверка на производството и здравните регистри на стопанството, ако такива регистри съществуват;

б) клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на тези, които са съмнителни за заболяване;

в) вместо стандартните проби, трябва да бъдат взети следните проби за лабораторното изследване 21 дни след датата на последните положителни данни за HPAI от всяко производствено звено и през интервали от 21 дни:

i) проби от всички умрели домашни птици или птици, отглеждани на закрито, които присъстват по време на вземането на проби;

ii) когато е целесъобразно, трахеен/ангинозно-жлезен секрет или секрет от клоаката най-малко от 60 домашни птици или други птици, отглеждани на закрито или от всички такива птици или други птици, отглеждани на закрито, когато в стопанството се намират по-малко от 60; или, ако птиците са малки, екзотични и не са предназначени за третиране или тяхното третиране би представлявало опасност за хората, трябва да бъдат събрани проби от пресни фекалии.

Въпреки това, компетентният орган може да предостави дерогации от размера на пробата, посочена в i) или ii), въз основа на резултата от оценяването на риска.

г) вземането на проби, посочено в буква в) и лабораторното изследване на такива проби трябва да продължи до получаването на два последователни отрицателни лабораторни резултата, които трябва да бъдат през период най-малко от 21 дни.

8.5. *Член 15, параграфи 1 и 3 — Мерки, приложими в контактни стопанства*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира контактно стопанство, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството, ако такива регистри съществуват. В доклада за инспекцията на фермата официалният ветеринарен лекар е длъжен да впише данните за дневната смъртност и данните за дневното приемане на храна и/или вода, ако е възможно, за период, започващ една седмица преди датата на контакта със стадо, за което има съмнение, че е заразено с ИП до датата на инспектиране на стопанството от официалния ветеринарен лекар.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на тези, които изглеждат болни.

в) Ако са налице клинични симптоми при домашни или други птици, отглеждани на закрито или признаци за повишаване на дневната смъртност (> 3 пъти от нивото на нормална смъртност в стадото) или понижаване на дневната продуктивност на яйца (> 5 %) или намаляване на дневния прием на храна и/или вода (> 5 %), незабавно трябва да бъдат взети стандартните проби от всяко производствено звено.

г) Ако не се наблюдават симптомите, посочени в букви б) и в), стандартните проби трябва да бъдат взети 21 дни след датата на последния предполагаем контакт със заразено стопанство, или когато домашните птици или други птици, отглеждани на закрито са умъртвени.

8.6. *Член 18, букви б) и в) — Преброяване и инспекции от официалния ветеринарен лекар и надзор на стопанства в защитните зони*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство с търговска цел, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството. Ако са налице признаци за повишаване на дневната смъртност (> 3 пъти от нивото на нормална смъртност в стадото) или понижаване на дневната продуктивност на яйца (> 5 %) или намаляване на дневния прием на храна и/или вода (> 5 %), трябва да бъдат взети стандартните проби от всяко производствено звено.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на тези, които изглеждат болни.

в) Ако не се очаква породите домашни птици или другите птици, отглеждани на закрито да покажат ясни клинични симптоми на заболяването, или ако птиците са били ваксинирани, компетентният орган може да вземе решение, въз основа на резултата от оценяването на риска, че трябва да бъдат взети стандартни проби от всяко производствено звено.

г) Въз основа на резултата от оценяването на риска, компетентният орган трябва да вземе решение относно допълнителен официален надзор чрез клинични инспекции и вземане на проби за лабораторни изследвания в контролни стопанства, помещения или типове продукти.

8.7. *Член 19, буква е) – Мерки, приложими за стопанства в защитни зони*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство, в което е докладвано за повишена заболеваемост, смъртност или промяна в данните за продуктивността, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството. Ако са налице признаци за повишаване на дневната смъртност (> 3 пъти от нивото на нормална смъртност в стадото) или понижаване на дневната продуктивност на яйца (> 5 %) или намаляване на дневния прием на храна и/или вода (> 5 %), трябва да бъдат взети стандартните проби от всяко производствено звено.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на тези, които изглеждат болни.

8.8. *Член 23, буква б) – Дерогации за директно транспортиране на домашни птици за незабавно клане*

Когато официалният ветеринарен лекар инспектира стопанство, на което е била предоставена дерогация от член 22 от Директива 2005/94/ЕО, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на всички домашни птици, по-специално на тези, които изглеждат болни по-малко от 24 часа преди времето за заминаване на домашните птици.

в) Въз основа на резултатите от оценяването на риска от страна на компетентния орган и вместо стандартните проби, от домашните птици от всяко производствено звено, предназначени за клане, трябва да бъдат взети най-малко 60 трахеални/орофарингеални и/или 60 клоакални секрета от по-малко от 48 часа преди времето за заминаване на домашните птици.

8.9. *Член 25, буква б) — Дерогации за директен транспорт на домашни птици, готови за снасяне*

Когато официалният ветеринарен лекар инспектира стопанство, на което е била предоставена дерогация от член 22, преди директното транспортиране на домашни птици, готови за снасяне, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството.

б) Клиничен преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашните птици, по-специално на тези, които изглеждат болни по-малко от 24 часа преди времето за заминаване на домашните птици.

в) Въз основа на резултатите от оценяването на риска от страна на компетентния орган и вместо стандартните проби, от домашните птици от всяко производствено звено, предназначени за транспортиране, трябва да бъдат взети 60 трахеални/орофарингеални и/или 60 клоакални секрета по-малко от 48 часа преди времето за заминаване на домашните птици.

8.10. *Член 26, параграф 1, буква а) – Дерогация за директно транспортиране на яйца за люпене и яйца за консумация*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство с родителско стадо, на което е предоставена дерогация от член 22, преди директното транспортиране на яйца за люпене трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството.

б) Клиничен преглед във всяко производствено звено на всеки 15 дни.

в) От всяко производствено звено трябва да бъдат взети стандартните проби.

8.11. *Член 29, параграф 1 – Продължителност на мерките*

Мерките, прилагани в защитната зона в съответствие с раздел 3 на глава IV от Директива 2005/94/ЕО могат да бъдат снети не по-рано от 21 дни след датата на предварителното почистване и дезинфекциране на заразените стопанства, при условие че:

а) Всички стопанства с търговска цел, разположени в защитната зона са били инспектирани от официален ветеринарен лекар и всички проверки и клинични прегледи и лабораторни изследвания, определени в точка 8.6, букви а), б) и в) и точка 8.7 са дали отрицателни резултати.

б) Всички определени стопанства с нетърговска цел в защитната зона са инспектирани от официален ветеринарен лекар и нито клиничното изследване, нито резултатите от което и да е проведено лабораторно изследване не са предизвикали съмнение за заразяване с ИП.

в) Всеки проведен допълнителен официален надзор, определен в точка 8.6, буква г) е дал отрицателни резултати.

8.12. *Член 30, буква ж) – Мерки, приложими в защитните зони*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство, в което е докладвано за повишена заболеваемост, смъртност или промяна в данните за продуктивността, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на тези, които изглеждат болни.

в) От всяко производствено звено трябва да бъдат взети стандартните проби.

8.13. *Член 35 - Изследване на съмнение за наличие на HPAI в кланици и в транспортни средства*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство на произход в кланици или в транспортни средства, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на производството и здравните регистри на стопанството, ако такива регистри съществуват.

б) Клиничният преглед във всяко производствени звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, като се отчитат консултациите с официалния ветеринарен лекар в кланицата, който трябва да представи подробности от данните за всяка предишна инспекция и резултати от изследванията преди и след настъпването на смъртта.

в) Докато компетентният орган не бъде убеден, че съмнението за наличие на HPAI може да бъде изключено въз основа на ветеринарно изследване в съответствие с букви а) и б), от всяко производствено звено трябва да бъдат вземани стандартните проби.

г) В допълнение към стандартните проби за допълнителни лабораторни изследвания трябва да бъдат предоставени проби от най-малко пет болни, мъртви или заклани птици в кланицата с данни за патология.

8.14. *Член 36, параграф 1 – Мерки, приложими в кланици*

След приключване на изследванията, посочени в точка 8.13 и при условие че резултатите от лабораторните изследвания са отрицателни и че няма никакво клинично съмнение за наличието на HPAI в стопанството на произход и в кланицата, официалният надзор може да бъде отменен.

8.15. *Член 37, параграфи 1 и 2 – Мерки, приложими при граничните инспекционни пунктове или при транспортни средства*

8.15.1. Когато официален ветеринарен лекар изследва домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, държани в изолация, които са били придвижени от граничен инспекционен пункт или транспортни средства, за които има съмнение или е потвърдено наличието на HPAI, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на съответните документи и регистри, ако такива документи или регистри съществуват.

б) Клиничен преглед на домашни птици и други птици, отглеждани на закрито, които са държани в изолация, както и клинична инспекция на всички други домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на тези, които изглеждат болни.

в) Стандартните проби трябва да бъдат взети от домашни птици и други птици, отглеждани на закрито, подбрани от различни кафези и клетки за транспортиране.

8.15.2. Когато официален ветеринарен лекар инспектира определено стопанство на произход в случай, когато домашните птици или други птици, отглеждани на закрито са заклани, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на продукцията и здравните регистри на стопанството, ако такива регистри съществуват.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на нейната клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, като се отчита консултацията с официалния ветеринарен лекар към кланицата, който трябва да представи подробности за данните от всяка предишна инспекция и резултати от изследванията преди и след настъпването на смъртта.

в) Докато компетентният орган не бъде убеден, че съмнението за наличие на HPAI може да бъде изключено въз основа на ветеринарно изследване в съответствие с букви а) и б), от всяко производствено звено трябва да бъдат вземани стандартните проби.

г) В допълнение към стандартните проби, посочени в буква в), за лабораторни изследвания трябва да бъдат предоставени проби от най-малко пет болни, мъртви или заклани птици в кланицата с данни за патология.

д) При условие, че резултатите от лабораторните изследвания на пробите, посочени в букви в) и е) са отрицателни и че няма никакви клинични съмнения за HPAI в стопанството на произход и в кланицата, официалният надзор може да бъде снет.

8.B. Нископатогенна инфлуенца по птиците ((LPAI)

8.16. *Член 39, параграф 6, букви б) и з) – Мерки, приложими в стопанства, където е потвърдено избухването на LPAI*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство, преди транспортирането на домашните птици до кланицата, или стопанство, където има домашни птици, които вече са излюпени от яйца, събрани по време на инкубационния период, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на продукцията и здравните регистри на стопанството.

б) Клинична инспекция във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашните птици или другите птици, отглеждани на закрито.

в) Стандартните проби трябва да бъдат взети от птици от всяко производствено звено, предназначени за клане, по-малко от 48 часа преди времето за заминаване на домашните птици.

г) Стандартните проби трябва да бъдат взети от всяко производствено звено от домашни птици, които вече са се излюпили от яйца, събрани по време на инкубационния период.

8.17. *Член 40, параграф 2, буква б) – Дерогация за някои стопанства от мерки, приложими там, където са потвърдени избухвания*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство, на което е била предоставена дерогация от член 39, параграф 2 и буква б) от член 39, параграф 5 от Директива 2005/94/ЕО, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на продукцията и здравните регистри на стопанството, ако такива регистри съществуват.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено на постоянни интервали, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на онези, които изглеждат болни.

в) Вместо стандартните проби, трябва да бъдат взети следните проби за лабораторно изследване 21 дни след датата на последните положителни данни за LPAI от всяко производствено звено и през интервали от 21 дни:

i) проби от всички мъртви домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, присъстващи по време на вземане на пробите;

ii) трахеални/оро-фарингеални или 60 клоакални секрети от домашни и други птици, отглеждани на закрито или от всички домашни и други птици, отглеждани на закрито, ако в стопанството те са по-малко от 60; или ако домашните или другите птици, отглеждани на закрито са малки, екзотични и не са предназначени за третиране или тяхното третиране би представлявало опасност за хората, трябва да бъдат събрани проби от пресни фекалии.

Въпреки това, компетентният орган може да предостави дерогация от размера на пробите, посочени в i) и ii) въз основа на резултатите от оценяването на риска.

г) Вземането на проби, посочено в буква б) и лабораторното изследване на такива проби трябва да продължи до получаването на два последователни отрицателни лабораторни резултата, които трябва да бъдат през период най-малко от 21 дни.

8.18. *Член 42, параграфи 1 и 3 – Мерки, приложими в контактни стопанства*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира контактно стопанство, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на продукцията и здравните регистри на контактното стопанство, ако такива регистри съществуват.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на онези, които са съмнителни за заболяване.

в) Стандартните проби трябва да бъдат взети от всяко производствено звено или когато домашни птици или други птици, отглеждани на закрито са умъртвени.

8.19. *Член 44, параграф 1, буква б) – Мерки, приложими в защитните зони*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство с търговска цел в защитна зона, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на продукцията и здравните регистри на стопанството.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, по-специално на онези, които са съмнителни за заболяване.

в) Стандартните проби трябва да бъдат взети от всяко производствено звено.

г) Въз основа на резултатите от оценяването на риска, компетентният орган трябва да вземе решение относно допълнителен официален надзор чрез клинични инспекции и вземане на проби за лабораторни изследвания в контролни стопанства, помещения или типове продукция.

8.20. *Член 45, букви а) и б) – Продължителност на мерките*

Мерките, които се прилагат в ограничените зони, в съответствие с раздел 3 на глава V от Директива 2005/94/ЕО могат да бъдат снети не по-рано от 21 дни след датата на предварителното почистване и дезинфекциране на заразени стопанства след обезлюдяването на стопанството или не по-рано от 42 дни след датата на потвърждаване на LPAI, при условие че:

а) всички стопанства с търговска цел в ограничената зона са били инспектирани от официален ветеринарен лекар и всички лабораторни изследвания на пробите, посочени в букви б) и г) от точка 8.13 са били проведени и са били възможни;

б) резултатите от всички допълнителни клинични инспекции и лабораторни изследвания, които могат да включват стопанства с нетърговска цел, за определяне на риска от разпространение на LPAI, са възможни;

в) компетентният орган е убеден, въз основа на резултатите от оценяването на риска, вземайки предвид епидемиологичната ситуация и резултатите от лабораторните изследвания, посочени в букви а) и б), че рискът от разпространение на LPAI е незначителен; такова оценяване може да доведе до заключение, че в случай на позитивни серологични данни и отрицателни вирусологични данни ограниченията могат да бъдат снети.

8.Г. Мерки, целящи избухването на разпространението на вирусите на инфлуенца с произход от птици при други видове

8.21. *Член 47, параграфи 1 и 6 – Лабораторни изследвания и други мерки по отношение на прасета и други видове*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство, в което се отглеждат прасета, след потвърждение на ИП трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на продукцията и здравните регистри на стопанството, ако такива регистри съществуват.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на прасетата, по-специално на онези, които са съмнителни за заболяване.

в) Трябва да се вземе секрет от носа) оро-фарингеален секрет от най-малко 60 прасета от всяко производствено звено или от всички прасета, когато в производственото звено има по-малко от 60 прасета, преди или в деня, когато са отделени заразените домашни птици или други птици, отглеждани на закрито. От прасетата трябва да бъдат взети най-малко 60 кръвни проби, две до четири седмици от датата на отделянето. Пробите трябва да бъдат взети по такъв начин, че от групи прасета, които са в пряк контакт едно с друго да е получена най-малко една проба.

г) движението на прасета към други стопанства може да бъде разрешено, ако най-малко 60 проби са дали отрицателни резултати- от секрета от носа) оро-фарингелани и 60 кръвни проби от прасета от всяко производствено звено, 14 дни след датата на откриването на положителни данни за наличието на ИП.

Движението на прасета към кланици може да бъде разрешено, ако най-малко 60 проби от носа/оро-фарингеални секрета от всяко производствено звено, 14 дни след датата на откриването на положителни данни за наличието на ИП са дали отрицателни резултати.

В случай на неубедителни или положителни лабораторни резултати, всякакви по-нататъшни изследвания, които са необходими, за да се изключи заразяването или разпространението на ИП сред прасетата.

д) Ако официалният ветеринарен лекар има съмнение, че други домашни бозайници в стопанството, по-специално тези с установена податливост към заразяване с вируси на ИП от подтип H5 и H7, може да са били в контакт със заразените домашни птици или други птици, отглеждани на закрито, трябва да бъдат взети проби за лабораторни изследвания.

8.Д. Възстановяване на популацията

8.22. *Член 49, параграф 3, букви б) и в) – Възстановяване на популацията в стопанства*

Когато официален ветеринарен лекар инспектира стопанство с търговска цел, в което е била възстановена популацията, трябва да бъдат изпълнени следните мерки:

а) Проверка на продукцията и здравните регистри на стопанството.

б) Клиничният преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашните птици или другите птици, отглеждани на закрито, по-специално на онези, които са съмнителни за заболяване.

в) Вместо стандартните проби, от всяко производствено звено трябва да бъдат взети следните проби:

i) най-малко 20 кръвни проби, веднага щом домашните птици се внесат в стопанството, с изключение на еднодневни пилета, ако е подходящо, такова вземане на проби може да бъде извършено в стопанството на произход на домашните птици преди придвижването им до стопанството за възстановяване на популацията;

ii) проби от мъртви домашни птици или секрет, взет от трупното им месо от максимум 10 мъртви птици на седмица по време на 21 дневен период от датата на възстановяване на популацията.

г) Когато стопанството преди това е било заразено с HPAI, трябва да бъдат взети също и 20 трахеални/оро-фарингеални и 20 клоакални секрета от водоплаващи птици (патици/гъски) от всяко производствено звено, ако е подходящо, в рамките на последната седмица от 21 дневния период от датата на възстановяване на популацията.

д) Когато стопанството преди това е било заразено с LPAI, трябва да бъдат взети 20 трахеални/оро-фарингеални и 20 клоакални секрета и 20 кръвни проби от всяко производствено звено.

8.Е. Ваксинация

8.23. *Член 56, параграф 2, буква и) – Превантивно ваксиниране на домашни или други птици, отглеждани на закрито*

Лабораторни изследвания, както е предвидено в глава IX от Директива 2005/94/ЕО, трябва да се извършват върху ваксинирани домашни или други птици, отглеждани на закрито чрез използване на изследвания DIVA (разграничаване на инфектирани от ваксинирани животни), при които полевият вирус е известен.

Когато се използват сентинелни птици, те трябва да присъстват във всяко ваксинирано стадо, клинично инспектирано и подложено на изследване чрез използване на реакция за възпиране на хемаглутинацията (HI). За тази цел трябва да бъдат вземани 20 кръвни проби от неваксинирани сентинели във всяко ваксинирано стопанство най-малко на всеки 60 дни.

8.24. *Приложение IX – Изисквания за движение на домашни птици или други птици, отглеждани на закрито и продукти от домашни птици, приложими във връзка със спешно ваксиниране*

Трябва да се прилагат строги мониторингови мерки относно движението на живи домашни птици и други птици, отглеждани на закрито и техните яйца с цел минимизиране на риска от допълнително разпространение на заразата с ИП.

Поради тази причина в началото на кампанията за спешно ваксиниране трябва да бъдат прилагани същите мониторингови мерки във връзка с движението на живи домашни птици и други птици, отглеждани на закрито и техните яйца с цел минимизиране на риска от допълнително разпространение на заразата с ИП в рамките на и извън областта на ваксиниране.

а) Преди първото движение в рамките на и извън областта на ваксиниране на яйца за люпене и яйца за консумация, а след това в продължение най-малко на 30 дни официалният ветеринарен лекар трябва да изпълни следните мерки:

i) клиничен преглед на неваксинирани родители или кокошки носачки във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашните птици, по-специално на онези, които изглеждат болни; трябва да бъдат взети стандартните проби от домашни птици от всяко производствено звено; или

ii) клиничен преглед на ваксинирани родители или кокошки носачки във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на сентинелните птици в това стадо; трябва да бъдат взети стандартните проби от тези сентинелни птици.

б) За движението на живи ваксинирани домашни птици или други птици, отглеждани на закрито към други стопанства или движението на живи ваксинирани домашни птици в рамките на и извън областта на ваксиниране официалният ветеринарен лекар трябва да изпълни следните мерки:

i) проверка на продукцията и здравните регистри на стопанството.

ii) клиничен преглед във всяко производствено звено, включително оценяване на неговата клинична история и клинични изследвания на домашните птици или други птици, отглеждани на закрито в рамките на 72 часа преди времето за заминаване с особено внимание върху сентинелните птици;

iii) ако резултатите от проверките и клиничните прегледи и изследвания в (i) и (ii) не са задоволителни, трябва да бъдат взети стандартните проби от сентинелите; въпреки това, ако тези резултати са задоволителни, трябва да бъдат взети следните проби от:

— ваксинираните домашни птици или други птици, отглеждани на закрито: най-малко 20 трахеални/оро-фарингеални и 20 клоакални секрета и 20 кръвни проби за прилагане на подходящи DIVA изследвания в рамките на 72 часа преди времето за заминаване, и

— сентинелни птици: 20 трахеални/оро-фарингеални и 20 клоакални секрета и 20 кръвни проби за серологично използване на тест HI преди времето за заминаване.

ГЛАВА V

Диагностични вирусологични изследвания и оценка на резултатите

1. До разработването и развитието на молекулярните тестове, изолирането на вируса чрез инокулация на ембрионите на яйцата на водоплаващи птици се считаше за най-прецизния диагностичен тест за ИП, единствен по рода си и основен при допълнителна идентификация и характеризиране на заразния вирус. Основните етапи са определени в настоящата глава.

2. **Обработка на пробите**

Секретите, ако са доставени „сухи“, трябва да бъдат поставени в достатъчно количество антибиотична среда, за да се гарантира пълното им покриване. Пробите могат да бъдат събрани в групи от по пет, при условие че те са получени от същите видове, по същото време и от едно и също епидемиологично звено.

Трупните меса, доставени в лабораторията, трябва да бъдат подложени на постмортално изследване и трябва да бъдат взети проби от следните органи: фекалии или чревно съдържание, мозъчна тъкан, бели дробове, черен дроб, далак и други видимо засегнати органи. Тези органи и тъкани могат да бъдат събрани, но е необходимо фекалните материали да бъдат обработвани отделно.

Фекалните проби и органи трябва да бъдат хомогенизирани (в затворен смесител или чрез използване на пестик и хаван и стерилен пясък) в антибиотична среда и приготвяне на 10 до 20 % w/v суспензии в средата.

Напоените тампони и суспензии трябва да бъдат оставени за около два часа при стайна температура (или за по-дълго време при 4 °C), а след това пречистени чрез центрофугиране (например, 800 до 1000 x g за 10 минути).

3. **Изолиране на вирус в ембрионите на яйца на водоплаващи птици**

Пречистената суспензия (супернатантът) се инокулира алантоисно в обем 0,1 до 0,2 ml при всеки от поне четири ембриона на яйцата на водоплаващи птици, които са престояли в инкубатор за девет до единадесет дни. В идеалния случай, тези яйца трябва да бъдат получени от свободно от определен патоген (SPF) стадо, но когато това не е целесъобразно, може да се използват яйца, получени от стадо, посочено като свободно от антитела на ИП (отрицателен серум за антитела – SAN).

Инокулираните яйца трябва да престоят при 37 °C и се овоскопират ежедневно. Яйца с умрели или умиращи ембриони, както и всички останали яйца шест дни след инокулацията трябва да бъдат охладени до 4 °C, а аланто-амнионовите течности – изследвани за хемаглутинационна активност. Ако не се установи хемаглутинация, тази процедура трябва да се повтори чрез използване на неразредена аланто-амнионова течност като инокулум. Ако се установи хемаглутинация, трябва да се изключи присъствието в културата на бактерията. При наличие на бактерии течността се пропуска през филтърна мембрана с размер на порите 450 nm, след това се добавят антибиотици и с нея се инокулират ембрионите, посочени по-горе.

С цел ускоряване на диагнозата някои лаборатории използват две 3-дневни вливания или 2-дневни и 4-дневни вливания и отчитат сравними резултати спрямо две 6-дневни вливания, но за това все още не е налице окончателна оценка.

Нужно е течностите, определени като позитивни, да бъдат подложени на изследване дали са свободни от бактерии. Ако бъдат открити бактерии, течността може да се пропусне през филтърна мембрана с размер на порите 450 nm или да се подложи на центрофугиране, за да се отстранят бактериите и да се инокулира повторно в яйца след добавяне на още антибиотици.

4. **Диференциална диагностика**

а) Предварително диференциране

Тъй като е важно мерките за контрол, чиято цел е ограничаване разпространението на вируса на ИП да бъдат приложени възможно най-бързо, всяка национална референтна лаборатория, която е изолирала хемаглутиниращ вирус, трябва да има възможност да определи дали това е вирус тип А на инфлуенца или H5 или H7 подтипове, или вирус на Нюкасълска болест. За идентифициране на хемаглутина трябва да се проведе реакция за възпиране на хемаглутинацията, както е описано в глава IX. Положителни резултати при възпиране, като титри в границите на 2 до 3 $\log_2$ под силен контрол, с поликлонен антисерум, характерен за подпитове H5 или H7 на инфлуенца А може да служи като предварителна идентификация, позволяваща налагането на временни мерки за контрол.

б) Потвърждаваща идентификация

Тъй като има 16 хемаглутининови подтипа и 9 подтипа на невраминидаза на вирусите на инфлуенца, а се срещат и разновидности на всеки от тях, не е целесъобразно, нито финансово ефективно всяка национална референтна лаборатория да притежава антисерум, който може да позволи пълна идентификация на подтиповете на изолатите на инфлуенца, Въпреки това, всяка национална референтна лаборатория трябва като минимум:

i) да потвърди, че изолатът е вирус А на инфлуенца, чрез използване на тест за двойна имунодифузия за определянето на групови антигени;

ii) да определи дали изолатът е или не е от подтипове H5 или H7, като положителната идентификация изисква прилагането на мерки за контрол на подтипове H5 и H7 на LPAI;

iii) незабавно да предостави всички изолати на HPAI и на H5 и H7 на референтната лаборатория на Общността за потвърждение и пълна характеристика, освен ако не е предоставена дерогация в съответствие с буква г).

В допълнение е желателно в лаборатории с подходящо оборудване:

iv) да се проведе интравенозен тест за показателите на патогенност при шестседмични пилета, както е определено в глава VII. Показателите за патогенност при венозно заразяване, които надхвърлят 1,2 показват наличието на вирус, който изисква пълно прилагане на мерките за контрол на HPAI.

Националните референтни лаборатории трябва също да предвидят въвеждането на експертиза и оборудване, позволяващи нуклеотидна последователност на хемаглутининовия ген, за да се определи наличието или отсъствието на повтарящи се аминокиселинни бази на мястото на разцепване на хемаглутининовия прекурсорен протеин за вирус H5 или H7 на LPAI H5. Въпреки че референтната лаборатория на Общността ще третира определянето на патогенност като главен приоритет, като част от задълженията посочени в приложение VII, точка 2, буква б) от Директива 2005/94/ЕО, такова характеризиране на вируса на национално равнище ще увеличи значително времето, необходимо за диагностициране и, при положителен резултат, за пълното прилагане на мерките за контрол върху HPAI.

в) Допълнително типизиране и характеризиране на изолати

Референтната лаборатория на Общността трябва да получи всички хемаглутининови вируси от националните референтни лаборатории за допълнителни антигенни и генетични проучвания, за да осигури по-добро разбиране на епизоотологията на болестта (болестите) на територията на Общността в съответствие с функциите и задълженията на референтната лаборатория на Общността, определена в приложение VII към Директива 2005/94/ЕО.

В допълнение към тези функции и задължения, референтната лаборатория на Общността трябва да извърши пълно типизиране на всички получени вируси на инфлуенца. За вируси H5 и H7, които не са с интравенозни патогенни показатели, по-големи от 1,2 нуклеотидната последователност на хемаглутининовия ген, чрез която се определя наличието или отсъствието на повтарящи се аминокиселинни бази на мястото на разцепване на хемаглутининовия прекурсорен протеин трябва да бъде незабавно отчетена и националната референтна лаборатория и компетентният орган на страната на произход трябва да бъдат информирани възможно най-бързо, след като резултатите са налице, така че мерките за контрол върху HPAI да могат да се прилагат изцяло.

г) С оглед променящата се епидемиологична ситуация във връзка с HPAI/LPAI, може да стане възможно, чрез споразумение между Комисията и референтната лаборатория на Общността относно дерогация, която да бъде предоставена на лабораториите с пълни възможности за бърза характеристика на вируса, да бъде предоставен пакет от тези вируси след проучване на данните и за референтната лаборатория на Общността, която да извърши съответната селекция. Тази дерогация трябва да бъде предоставяна, само когато данните могат да бъдат получени бързо от националната референтна лаборатория и референтната лаборатория на Общността бъде уведомена за тях.

ГЛАВА VI

Молекулярни изследвания и оценка на резултатите

Настоящото определение на HPAI позволява молекулярната идентификация на вирулентните фактори и потвърждава използването на молекулярни техники при диагностицирането на ИП. В последно време се наблюдава развитие в тяхното прилагане за откриване и характеризиране на вируса на ИП пряко чрез клинични образци от заразени птици. Конвенционалните RT-PCR техники (полимеразно-верижна реакция след обратна транскрибция), приложени върху клинични образци могат, при точно определяне на параметрите, да постигнат бързо откриване и идентификация на подтипа (най-малко H5 и H7), заедно с увеличения продукт, които могат да бъдат използвани при нуклеотидната последователност и са доказали, че имат важно приложение поради бързото идентифициране на последователни избухвания, след като веднъж са открити първоначално заразените помещения и вирусът е характеризиран. Само еднократно прилагане на RT-PCR в „реално време“ чрез използване на системи за начално/флуорогенетично проучване (rRT-PCR) позволяват дори по-бързо и прецизно диагностициране при откриването на вируси на ИП и определяне на подтип H5 или H7 на клиничните проби.

Важен проблем със системите RT-PCR и rRT-PCR е, че към настоящия момент различните лаборатории са разработили различни системи, които, въпреки че са напълно приети, не са били потвърдени или подложени на тестове с голям брой проби в различни лаборатории. Референтната лаборатория на Общността и отделните национални референтни лаборатории търсят решение на този проблем като част от финансиран от Общността проект (EU AVIFLU), за да се достигне до подписване на протоколи за конвенционални RT-PCR и rRT-PCR, които могат да бъдат приети от други национални референтни лаборатории. Ако тестовите параметри, клинично време и време за развитие се различават от тези, препоръчани в съответните протоколи, трябва да се докаже, че те са подходящи за целта, преди да бъдат използвани в съответствие с точка 6 от глава I от настоящия наръчник по диагностика.

Стандартните протоколи за цитираните молекулярни тестове и тяхното оценяване, така както се прилага в референтната лаборатория на Общността могат да бъдат намерени на следната Интернет страница:

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

ГЛАВА VII

Тест за патогенност in vivo и оценка на резултатите

Вирулентността на вируси тип А на инфлуенцата при пилета, изолирана от птици, трябва да бъде оценена чрез използване на тест за определяне на показателя за интравенозна патогенност (IVPI), който трябва да се проведе, както следва:

а) чист заразен алантофлуид с HA титри > 1/16 (> 2^4 или >$\log_2$ 4, когато е изразен с реципрочна стойност) от най-ниското възможно ниво на вливане, за предпочитане от първоначалния изолат, без да е извършено какво и да е разреждане с 1/10 в стерилен изотоничен разтвор.

б) 0,1 ml разреден вирус е инжектиран интаревозно на всичките десет шестседмични SPF или SAN пилета.

в) Птиците се изследват на 24-часови интервали в продължение на 10 дни. При всяко наблюдение всяка птица се оценява с 0 при нормално състояние, с 1 – ако е болна, с 2, ако е тежко болна, с 3, ако е мъртва. Преценката за болни и тежко болни птици е следствие на субективно клинично оценяване.

Обикновено „болните“ птици показват един от следните симптоми, а „тежко болните“ – повече от един от следните симптоми: респираторно затруднение, депресия, диария, цианоза на откритата кожа или менгушите, отоци по лицето и/или главата, нервност. Мъртвите птици трябва да бъдат оценявани с 3 при всяко от останалите ежедневни наблюдения след смъртта.

С оглед на благосъстоянието им, когато птиците са твърде болни, за да ядат или пият, те трябва бъдат хуманно убивани и оценяване като мъртви при следващото наблюдение, тъй като те ще умрат в рамките на 24 часа без лечение. Този подход е приемлив за акредитиращите органи.

г) Тестът IVPI е основната мярка за птица при наблюдение, продължаващо за период, по-дълъг от 10 дни. Показател 3,00 означава, че всички птици са умрели в рамките на 24 часа, а показател 0,00 означава, че нито една птица не е показала клинични симптоми по време на 10-дневния период на наблюдение.

В следващия пример е показан прост метод за регистриране на резултатите и изчисляването на показателите:

Клинични симптоми	Ден след инокулацията										Обща оценка
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Нормални	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 x 0 = 0
Болни	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 x 1 = 6
Тежко болни	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 2 = 12
Мъртви	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 x 3 = 228
											Общо = 246

Забележки:

10 птици, наблюдавани в продължение на 10 дни = 100 наблюдения

Показател = означава оценка за птица за наблюдение = 246/100 = 2,46

Всеки вирус А на инфлуенца, независимо от подтипа, показващ стойност по-голяма от 1,2 при тест IVPI се счита за HPAI вирус.

ГЛАВА VIII

Серологични тестове и оценяване на резултатите

Предпочитаният метод, използван за установяване наличието на вирус А на инфлуенца следва да докаже присъствието на нуклеопротеинни или междуклетъчни антигени, които се срещат във всички вируси А на инфлуенцата.

Това може да се постигне чрез тест за двойна имунодифузия, включващ или концентрирани вирусни препарати, или екстракти от заразени хориоалантоисни мембрани.

Предпочитаните методи, използвани за провеждане на серологични тестови за антитела на вируса на ИП са хемаглутинационния (HA) и хемаглутинационно-инхибиращия (HI) тестове

Глава 2.7.12 от Наръчника по диагностика Тестове и ваксини за сухоземни животни към Световната организация за здравето на животните съдържа подробна информация относно лабораторните техники и оценяването на резултатите.

Стандартните протоколи за серологични тестове и оценяването на резултатите от тях, така както се прилага в референтната лаборатория на Общността могат да бъдат намерени на следната Интернет страница:

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

ГЛАВА IX

Системи за мониторинг, свързани с ваксинирането

1. **Директива 2005/94/ЕО и наръчника по диагностика**

Раздели 2 и 3 от глава IX от Директива 2005/94/ЕО позволяват използването на спешно и превантивно ваксиниране при определени условия. Едно от тези условия е да бъде използвана стратегия DIVA (разграничаване на инфектирани от ваксинирани животни).

Ваксинирането трябва да има за цел предотвратяване на заразяването и по-нататъшно разпространение на вируса сред стадата. Налице е неоспоримо доказателство, от което е видно, че ваксинирането повишава количеството на вируси, необходими за заразяването на птици и намалява количеството на отделените вируси. Въпреки това, макар че ваксинирани птици не проявяват вече клинични симптоми, те все още могат да разпространят вируса при стимулиране. По този начин вирусите HPAI или подтипове H5 и H7 могат да се разпространяват незабелязано известно време в стадо с нива на имунитет под оптималните по същия начин, по който вирусите LPAI могат да направят това в неваксинирано стадо. Следователно, налице е необходимост да има възможност да се определят позитивните по отношение на вируса ваксинирани стада, които са заразени с полевия вирус, така че да могат да се прилагат други мерки за контрол, като неговото ликвидиране.

2. **Използване на сентинели за мониторингово заразяване**

На ниво стадо се използва прост метод за упражняване на редовен мониторинг върху сентинелни птици, които не са ваксинирани във всяко ваксинирано стадо, но този подход е свързан с някои проблеми на управление, по-специално и определяне на сентинелите, особено в големи стада. Контактът между сентинелите и ваксинираните птици трябва да бъде гарантиран.

3. **Лабораторен тест DIVA за мониторингово заразяване**

Като алтернатива или в допълнение, изследването за откриване на огнище може да бъде извършено върху ваксинирани птици чрез използване на лабораторни тестове DIVA. Разработени са няколко системи за изследване през последните години, които също позволяват откриването на огнище при ваксинирани птици. Един метод, доказал своята приложимост е използването на ваксина, съдържаща вирус от същия подтип хемаглутин (H), но различна невраминидаза (N) от преобладаващия полеви вирус. Антитела на N от полевия вирус играят ролята на естествени белези на заразата.

Тази система се използваше в Италия след повторното появяване на вирус LPAI H7N1 през 2000 г. С цел прилагането на директни мерки за контрол, беше въведена стратегия DIVA, използваща ваксина, съдържаща H7N3 за борба с огнищата на зараза с H7N1 Ваксинираните и изложените на заразата птици бяха разграничени чрез използване на серологичен тест за определени антитела anti-N1. Същата стратегия беше използвана за контрол на LPAI, причинена от H7N3 в Италия през 2002 г. до 2003 г. при случая с ваксина H7N1 и серологичен тест за откриване конкретно на антитела срещу N3. И в двата случая при ваксиниране и ликвидиране чрез използване на въпросната стратегия DIVA постигна унищожаване на огнището на полевия вирус.

С тази система възниква проблем, ако се окаже, че полевият вирус притежава същия N антиген, както и съществуващият полеви вирус, но са от различен H подтип, в сравнение с H5 или H7, или ако подтипове със същите N антигени вече са разпространени в полето. По-специално, известно е, че патиците са носители на повече от един подтип. Беше налице и нуждата да се разработи подходящ тест, който би позволил рутинен мониторинг на стада за антитела на анти-невраминидаза. В Италия беше разработен и използван „ad hoc“ серологичен тест, базиран на непряк флуоресцентен тест за антитела, използван като антиген N протеини, изразени чрез рекомбинанти на *baculovirus*. Той може да има по-широко и лесно приложение, когато се разработи тест ELISA.

Използването на ваксини, съдържащи само HA, като рекомбинантни векторни ваксини, позволява класически тестове AGID или тестове ELISA, основани на нуклеопротеини, неструктурни протеини или протеини от междуклетъчно вещество да бъдат използвани за откриване на зараза при ваксинирани птици.

За неактивни ваксини, е описан тест, с който се откриват антитела на вирус на неструктурен протеин, който се произвежда само при естествено заразяване. Такава система все още следва да бъде потвърдена в областта, но има ограничение естественото заразяване на стадо с който и да е вирус на инфлуенца, независимо от подтиповете, влияещи на произвеждането на антитела да е насочено срещу неструктурните протеини.

Разработването на бързи и прецизни методи за откриване на вируси, особено тези, които могат да бъдат автоматизирани, като RT-PCR в реално време, означава, че те могат да бъдат използвани за лесно разпространение и редовно изследване на ваксинирани птици за наличието на полеви вирус. Въпреки това, откриването на агенти ще бъде ограничено само до острата фаза на заразата и не може да бъдат използвани, за да се направят заключения, че стадото не е било изложено на вируса в миналото. Този подход е най-подходящ при изследване на ваксинирани птици преди придвижване, за да се докаже свобода от активна зараза.

Броят на пробите, които следва да бъдат изпитвани чрез системите по избор трябва да дава възможност за изключване на разпространението на зараза с вируса на ИП в стадо с повече от 15 % с ниво на сигурност от 95 %.

ГЛАВА X

Стратегии при диагностицирането на ИП

Както е посочено в приложение IV към Директива 2005/94/ЕО, решенията за прилагане на мерки в специфични области или контактни стопанства и строгостта на тези мерки могат значително да варират според степента на риска. Също така, задължителното потвърждение на диагнозата на заболяването е възможно да бъде пропорционално на съществуващата ситуация, размера на опасността и степента на риска. Необходимо е ветеринарните органи да вземат решения относно диагностичните доказателства, които балансират между бързия контрол и унищожаването на болестта и потенциалното въздействие на погрешното диагностициране. Такава преценка трябва да бъде извършена въз основа на много фактори и времето, но някои ситуации могат да бъдат предвидени.

Ситуация на заболяването	Потенциален проблем	Критерии за диагностициране
Неопределени симптоми, неофициални съмнения	Изолирано стопанство	Извършване на бързо отриване въз основа на M ген RT-PCR. Диференциално диагностициране, съгласно изискванията
Първоначално стопанство под съмнение	Изолирано стопанство	Извършване на пълно изследване за диагностициране, изолиране на вируса и характеризиране
Първоначално стопанство под съмнение	Стопанство в гъсто населена с домашни птици област	Извършване на пълно изследване за диагностициране, изолиране на вируса и характеризиране, но съсредоточаване върху методите за бързо откриване и характеризиране, особено на онези, основани на RT-PCR и подобните им [1]
Второ и последващи съмнения за избухвания	Изолирани стопанства, епидемиологично свързани с първоначалното стопанство под съмнение	Съсредоточаване върху методите за бързо откриване и характеризиране, особено на онези, основани на RT-PCR и подобните им [1]
Второ и последващи съмнения за избухвания	Стопанства в гъсто населена с домашни птици област или с много епидемиологични връзки	Разчита се на методите за бързо откриване, които дават най-ранните доказателства за наличието на какъвто и да е вирус на ИП [1]
Многократни съмнения за избухвания или бързо разпространение на заболяването, включително наблюдение	Разпространението ще стане неконтролируемо без бърза интервенция	Разчита се на методите за бързо откриване, които дават най-ранните доказателства за наличието на какъвто и да е вирус на ИП или се разчита на клинични симптоми [1]

[1] За целта се извършва цялостно събиране на проби и пробите се съхраняват за по-късно оценяване.

ГЛАВА XI

Диагностициране на заразяване с вируси на инфлуенца при прасета и други бозайници

1. **ИП при прасета**

Вирусите на ИП лесно заразяват прасета и въпреки че реакцията в повечето случаи е относително ограничена, налице е възможност заразените прасета да пренесат болестта при домашни птици и други податливи животни. Към момента няма доказателства в тази област, че заразени прасета пренасят вируси на ИП от подтипове H5 и H7.

Опитът, натрупан по време на избухването в Нидерландия през 2003 г. показа, че прасета, заразени с H7N7 не показват клинични симптоми, че биха могли да носят заразата с H7N7. Още повече, видно е, че не е докладвано за заболели прасета до момента по време на избухването на H5N1 в Азия и на други места.

Следователно, не може да се разчита на клиничните симптоми, за да се установи дали прасетата са заразени, въпреки че клиничната картина, характерна за заразени прасета с други вируси на инфлуенца с птичи произход може да се появи, след като вирусът се адаптира към гостоприемника. Диагностицирането на заразяване на прасета с вируса на ИП по същество е подобно на диагностицирането на видовете птици, свързано с изолирането на вируса, молекулярните техники и откриването на специфични антитела чрез използване на тестове за възпиране на хемаглутинацията Въпреки това са налице някои различия и нито един от тестовете не е изцяло утвърден за употреба при необходимост от потвърждаване на вируси на ИП при прасета.

2. **Проби за изолиране на вирус**

Заразите с вирус на ИП при прасета обикновено са ограничени до респираторния тракт и пробите трябва да бъдат тъкани от респираторния тракт, ако е подходящо, ангинозно-жлезни секрети или секрети от носа, които за предпочитане се вземат от прасета, показали симптоми на това заболяване. Тези проби и секрети могат да бъдат обработени с оглед изолиране на вирус или молекулярно откриване на вирус, като се използват същите техники, описани по-горе за проби от птици. Въпреки това, при използване на техники PCR, трябва да се упражнява съответен контрол, за да се гарантира, че разпространяването не се възпрепятства от вещества, които се съдържат в пробите от прасета.

3. **Инокулация и излюпване на яйца**

За да се изолират вируси на инфлуенца по бозайници при 9 до 11-дневни ембриона на яйца от водоплаващи птици, обикновено се извършва алантоисно или физиологично инокулиране на всяко яйце. Въпреки това, при изследване на прасета в контакт с вируси на ИП, когато вирусът е имал малка възможност да се адаптира, алантоисното инокулиране вероятно е достатъчно

По същия начин обикновено се препоръчва инкубационната температура за изолиране на вируси А на инфлуенцата по бозайниците да бъде 35 °C, но отново за вируси, които не са се адаптирали добре към прасетата температура от 37 °C няма да се окаже вредна при изолирането на вируса.

4. **Тест за специфични антитела при тестове HI.**

Изолирането на вируса или молекулярното определяне са може би най-прецизни при определяне на вирусната зараза при прасета. Въпреки това, серологичните реакции при прасета се определят при липсата на изолиране или откриване на вирус. Тестовете HI, за които се използват серуми от прасета, изискват някои в промени в теста, употребяван при птичите серуми, посочени в глава VIII.

Серумите от прасета са известни със свойството си за неспецифично задържане при тестовете HI и, следователно, всяка серумна проба трябва да се обработва с рецептор, унищожаващ ензими (RDE), за да се предотврати тази възможност. Трябва да бъде използван следният метод:

а) Към 100 µl антисерум от прасета добавете 400 µl RDE (предварително приготвен работен разтвор) и разбъркайте много добре.

б) Поставете в инкубатор при 37 °C за един час.

в) След това поставете в инкубатор за 30 минути при 56 °C.

г) Охлаждайте пробите при 4 °C в продължение най-малко на 15 минути.

д) Добавете 10 µl 30 % (v/v слети клетки) птичи червени кръвни клетки и разбъркайте силно.

е) Поставете в инкубатор при 4 °C за една нощ. Друга възможност, ако е от съществено значение пробите да се използват същия ден, е поставянето в инкубатор при 37 °C за един час и центрофугиране при 300 × g в продължение на пет минути.

Обработеният серум след това се използва при тестове HI, както е описано по отношение на птичия серум в параграф (…), първоначалният разтвор е 1:10. Трябва да се използва комплект серум от прасета с известен серонегативен статус по отношение на ИП, за да се оцени спецификата на теста HI, който ще се използва за вирусния щам (виж използване на вирусен щам за серологично извличане от избухването, глава VIII). По време на избухването в Нидерландия през 2003 г. бяха открити неопределени фактори до 2,6 % при теста HI, при който се използва серум от прасета, събран независимо от избухването.

5. **Вземане на проби от прасета**

Особено при ферми, в които се отглеждат и прасета, и домашни птици, независимо дали заедно или в отделни сгради, прасетата са подложени на риск от заразяване с ИП, пряко или непряко, чрез контакт с домашни птици или продукти от домашни птици. За да се изключи такова заразяване трябва да бъдат събрани оро- фарингеални секрети или секрети от носа, както и кръвни проби в съответствие с процедурите, описани в точка 8.21 от глава IV. Пробите трябва да бъдат получени от прасета, при които се наблюдават клинични симптоми на заболяването. Въпреки това, когато те не показват никакви клинични симптоми, пробите могат да бъдат събрани на случаен принцип от всички помещения в стопанството. Ако това е възможно в лабораторията, секретите трябва да бъдат изследвани чрез бързи молекулярни тестове и/или изолиране на вируса. RT-PCR трябва да бъде съответно утвърден и да бъде с прецизност, най-малко еквивалентна на изолирането на вирус при яйца по отношение на вируси тип А на инфлеунца.

Две до четири седмици след отделянето на заразените с ИП домашни птици, трябва да бъдат събрани най-малко 60 кръвни проби от прасета по такъв начин, че поне няколко проби да са получени от групи прасета, които са в директен контакт едно с друго. Пробите трябва да бъдат изпитвани с тест HI, при който се използва вирус, получен при избухване при домашни птици.. Пробите както от интензивната фаза, така и от фазата на възстановяване трябва да бъдат изпитвани със същия тест. Положителни проби могат да бъдат потвърдени чрез използване на неутрализиране на вируса и/или анализите от Западното натриване (Western blot analyses).

Ако някоя от тези проби се окаже положителна, трябва да се извърши епидемиологично проучване във всички ферми за прасета, разположени в защитната зона, независимо дали те са от смесен тип или не.

6. **Вируси на ИП при други бозайници, различни от прасета**

Трябва да бъдат предприети изследвания на други бозайници, различни от прасета, за които има съмнение за ИП, включително на котки. При изследването на котки във връзка с HPAI H5N1 трябва да се извърши следното:

При откриване на макропатологични изменения, свързани с вирусната реакция, концентрирани в белите дробове и в черния дроб, трябва преди всичко да бъдат взети проби за вирусологични изследвания от вътрешните органи на мъртви животни. При живи животни трябва преди всичко да бъдат взети трахеални/оро-фарингелани секрети с цел откриване на вируса. Освен това отделно могат да бъдат взети фекални секрети.

За кръвните проби, които се изследват при HI анализи се изисква топлинна обработка при 56 °C в продължение на 30 минути и обработката с RDE може да бъде пропусната.

ГЛАВА XII

Минимални изисквания за безопасност при транспортирането на проби

1. Транспортирането на проби, за които е известно наличието на патогени или на такива, за които има съмнение за наличието им са предмет на строга национална и международна нормативна уредба, която трябва да бъде спазвана през цялото време. Вирусните изолати не са класифицирани като проби за диагностициране, но трябва да бъдат опаковани в съответствие с международните стандарти.

Инструкциите, посочени в настоящата глава се отнасят до транспортиране по въздуха, но подобен начин на опаковане трябва да бъде използван при транспортирането на проби по суша и море.

2. **Опаковане на образци за диагностициране с цел транспортиране**

Образците за диагностициране, транспортирани съгласно регламентите на Международната асоциация за въздушен транспорт (МАВТ) получават UN идентификационен номер съответно 2814, 2900, или 3373.

Спедиторът, а не транспортната компания, носи отговорност за пратката до момента, в който пакетът достигне до получателя.

3. **Основно опаковане**

а) Основният контейнер(и) трябва да бъде непромокаем, например краищата на винтовете трябва да бъдат запечатани с парафин или залепваща лента или да бъде осигурена друга защита.

б) Отделните части на многокомпонентните основни контейнери трябва да бъдат опаковани поотделно, за да се предотврати счупване.

в) При определяне на обема на превозваните образци за диагностициране, трябва да бъде взета под внимание транспортната среда по отношение на вируси.

г) Основният контейнер(и) не трябва да съдържа повече от 500 ml или 500 g.

Образецът за диагностициране представлява цялото съдържание на основния контейнер.

4. **Вторично опаковане**

а) Трябва да се използва достатъчно количество абсорбиращо вещество във втория контейнер, което да абсорбира цялото съдържание на всички основни контейнери в случай, че има изтичане или бъдат повредени.

б) Вторичното опаковане трябва да отговаря на изискванията за опаковане на МАВТ на образци за диагностициране, включително процедурата за изследване при падане от 1,2 метра (3,9 стъпки). Докато опаковането на заразни вещества напълно задоволява изискванията за опаковане на образци за диагностициране от Инструкция за опаковане 602 на МАВТ, то може да бъде извършвано.

в) Опакованите заразни вещества трябва да носят задължителна подробна маркировка относно опаковането (UN ще обхваща тази област), например:

„UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450“

г) Вторичното опаковане трябва да бъде херметическо. Инструкциите по отношение на опаковането, дадени от производителя на опаковката или от друга упълномощена страна, включена във вторичното опаковане, трябва да бъдат спазени.

д) Общият външен размер на вторичната опаковка в най-малката си част трябва да бъде поне 100 mm (четири инча).

е) Вторичната опаковка трябва да бъде достатъчно голяма за целите на транспортните документи, такива като въздушната товарителница.

5. **Външна опаковка**

а) Външната опаковка не може да съдържа повече от 4 l или 4 kg.

б) При необходимост около втората опаковка трябва да се постави или сух лед или лед на кубчета. Ако се използва сух лед, опаковката трябва да позволява освобождаването на въглеродния диоксид и да не позволява повишаване на налягането, което би могло да наруши целостта на опаковката. Ако се използва лед на кубчета, опаковката трябва да бъде проверена за утечки.

Всяка опаковка, както и въздушната товарителница трябва да бъдат маркирани точно със следния текст:

„UN 3373 ОБРАЗЦИ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ,
ОПАКОВАНИ ПРИ СПАЗВАНЕ НА
ИНСТРУКЦИЯТА ЗА ОПАКОВАНЕ 650 НА МАВТ“

в) Списък с подробно описание на съдържанието трябва да бъде приложен между втората опаковка и външната опаковка.

г) Външната опаковка трябва да бъде поставена в пломбирана найлонова торба, за да бъде защитена от влагата.

д) Не се изисква декларация от спедитора за опасни стоки.

ГЛАВА XIII

Изпращане на вируси и проби в референтната лаборатория на Общността

1. Необходимо е пробите, които се изпращат в референтната лаборатория на Общността да отговарят на препоръките за транспортиране на опасни патогени в рамките на Общността, както и на нормативната уредба и на действащото законодателство в Обединеното кралство.

Трябва да бъдат спазвани инструкциите, определени в настоящата глава.

2. **Изпращане на вируси или други материали в референтната лаборатория на Общността**

а) Всички материали трябва да бъдат опаковани в съответствие с инструкциите, определени в настоящата глава.

б) Външната опаковка трябва да бъде маркирана, както следва:

„ЖИВОТИНСКИ ПАТОГЕН – ОПАКОВКАТА ДА СЕ ОТВАРЯ САМО В СЕКЦИЯТА ПО ВИРУСОЛОГИЯ НА ПТИЦИТЕ, VLA, WEYBRIDGE. ВНОС, РАЗРЕШЕН С НОМЕР НА ЛИЦЕНЗА. ……* …… ИЗДАДЕН СЪГЛАСНО ЗАПОВЕДТА ЗА ВНОС НА ЖИВОТИНСКИ ПАТОГЕНИ.“

в) Трябва да бъде поставен един от следните номера на лицензите:

i) за вируси на ИП: **„AHZ/2232/2002/5*“**

ii) за тъкани и други материали: **„AHZ/2074C/2004/3*“**

Тъй като упоменатите номера на лицензите от време на време се променят, лабораториите, които изпращат проби, трябва да са сигурни, че използват номерата на лицензите, които са в употреба в този момент, преди да изпратят пакетите.

г) Пакетът трябва да бъде адресиран до:

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

д) Пратката трябва да се придружава от писмо с възможно най-подробна част от историята на изолатите, такава като видовете и възрастта, областта/страната, от която произхожда излотатът, всякаква клинична история.

е) Пакетите трябва да бъдат изпратени чрез въздушна поща или с въздушен транспорт.

Ако пакетите се изпращат с въздушен транспорт, номерът на въздушната товарителница трябва да бъде изпратен на референтната лаборатория на общността по факс:, чрез телефон или по електронната поща преди заминаването на материалите.

Пакетите, изпратени с въздушен транспорт трябва да бъдат ясно маркирани, както следва:

„**ТОВАР С МЕЖДУНАРОДНО ЗНАЧЕНИЕ“,** за да се гарантира бързото обработване на аерогарата.

За контакти в референтната лаборатория на Общността:

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

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

ГЛАВА XIV

Минимални изисквания за безопасност в лабораториите за диагностициране на ИП

1. Изискванията за безопасност в лабораториите за диагностициране, работещи с вируси на ИП трябва да обхващат както въздействието на вирусите като заплаха за здравето на животните, така и защитата на онези, които работят в лабораторията (както и тези извън нея) от какъвто и да е зоонозен риск.

Минималните изисквания за безопасност за лабораториите в Общността са определени в няколко директиви. Освен това, аспектите на работата са описани и определени в основни Европейски норми (EN). За работата на лабораториите, чиято цел е диагностициране съществува допълнителна нормативна уредба (EN), като например добрата лабораторна практика.

2. **Директиви на Общността относно лабораториите**

Директива 89/391/ЕИО на Съвета от 12 юни 1989 г. за въвеждане на мерки за насърчаване подобряването на безопасността и здравето на работниците на работното място (ОВ L 183, 29.6.1989 г., стр. 1).

Директива 90/679/ЕИО на Съвета от 26 ноември 1990 г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на биологични агенти при работа (седма индивидуална директива по смисъла на член 16, параграф 1 от Директива 89/391/ЕИО) (ОВ L 374, 31.12.1990 г., стр. 1).

Ако е налице диагноза, поставена чрез полимеразно-верижна реакция (PCR) и клониране на продукти от PCR в бактериален плазмид за размножаване, например, за целите на последователността на ДНК, към тези две директиви в допълнение се прилагат следната директива и Европейски норми (EN):

Директива 90/219/ЕИО на Съвета от 23 април 1990 г. относно работа с генетично модифицирани микроорганизми в контролирани условия (ОВ L 117, 8.5.1990 г., стр. 1).

3. В допълнение към директивите на Общността трябва да бъдат приети и Европейски норми (EN):

EN 12128 Биотехнология. Лаборатории за научни изследвания, развитие и анализи. Контролирани нива в микробиологичните лаборатории, рискови области, местоположение и изисквания за физическа безопасност

EN 12738 Биотехнология. Лаборатории за научни изследвания, развитие и анализи. Наръчник за контролиране на животни, инокулирани с микроорганизми при експерименти

EN 12740 Биотехнология. Лаборатории за научни изследвания, развитие и анализи. Наръчник за работа, деактивиране и изследване на отпадъци

EN 12741 Биотехнология. Лаборатории за научни изследвания, развитие и анализи. Наръчник за биотехнологични лабораторни дейности

При работа/управление на лаборатория се прилагат следните условия:

4. **Изисквания за лабораториите (контролирани нива от 1 до 4)**

В съответствие с **Директива 2000/54/ЕО** на Европейския парламент и на Съвета от 18 септември 2000 г. 2000 относно защита на работниците от рисковете, свързани с експозицията на биологични агенти при работа (седма специална директива по смисъла на член 16, параграф 1 на Директива 89/391/ЕИО) (ОВ L 262, 17.10.2000 г., стр. 21), Директива 90/219/ЕИО и Европейските норми: EN 12128; EN 12740; EN 12741.

Мерки за контрол	Контролирано ниво			
	1	2	3	4
Лабораторно оборудване: изолация	не	да	да	да
Лаборатории, отделени с врати	не	да	да	да
Трябва да има витрина за наблюдение или друга алтернатива, за да могат служителите да бъдат наблюдавани	по избор	по избор	по избор	да
За персонала трябва да бъдат осигурени средства за миене на ръце	да	да	да	да
Трябва да бъдат осигурени средства за дезинфекция (ръце)	по избор	да	да	да
Ограничен достъп	не	да	да	да
Специфични мерки за регулиране на аерозол	не	Да намаляване	Да предпазване	Да предотвратяване
Знак за биологичен риск на вратата	не	да	да	да
Душ	не	не	по избор	да
Промивка на очите	да	да	да	да
Лаборатория: може да се запечата с цел дезинфекция	не	не	да	да
Повърхности, устойчиви на вода, киселини, основи, разтворители, дезинфектанти, химически вещества за обеззаразяване и лесни за почистване	Да (работна маса)	Да (работна маса)	Да (работна маса, под)	Да (работна маса, под)
Влизане в лабораторията през въздушен люк	не	не	по избор	да
Отрицателно налягане в сравнение с налягането от непосредствената околна среда	не	не	по избор	да
Изходящият и входящият въздух трябва да се филтрира чрез системата HEPA	не	не	да (изходящия въздух)	да
Автоклав	На място	В сградата	комплект	В лабораторията, с двоен накрайник

Мерки за контрол	Контролирано ниво			
	1	2	3	4
Предпазно облекло	Подходящо защитно облекло	Подходящо защитно облекло	Подходящо защитно облекло (по избор обувки)	Пълна смяна на облеклото
Ръкавици	не	по избор	да	да
Ефективен контрол върху векторите (включително за гризачи и насекоми)	по избор	да	да	да
Безопасен склад за биологични агенти	да	да	да	да
Лабораториите да разполагат със собствена екипировка	не	не	Препоръчва се	да

Съществуват и допълнителни европейски норми, свързани с управлението и организацията на лабораториите.

Съществуват и други национални и международни нормативни актове и препоръки, които трябва да бъдат спазвани. Изданието WHO публикува своя Наръчник за биологична безопасност на лабораториите, трето издание (Laboratory Biosafety Manual 3rd Edition) на своята страница в Интернет:

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

5. **Ограничения, свързани със здравето на животните**

Регламенти, свързани с ограничаването на вируси на ИП, особено на HPAI, но също включващи всички вируси на ИП от подтипове H5 и H7 трябва да бъдат въведени от ветеринарните органи в държавите-членки. Световната организация а здравето на животните (OIE) предвижда някои насоки в глава 1.4.5 от Кодекса по здравето на земноводните животни от 2005 г. и HPNAI е разгледана като контролирана от OIE патогенна група 4.

Въпреки това регламентите, ръководещи работата с вируси на ИП ще бъдат въведени от ветеринарните власти на държавите-членки.

Минималните изисквания за безопасност, прилагани от референтната лаборатория на Общността, които са вътрешни разпоредби за Обединеното кралство, могат да бъдат разгледани на следната страница в Интернет:

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

6. **Ограничения, свързани със здравето на човека**

Лаборатории, работещи с вируси на ИП трябва да са запознати през цялото време, че те са най-малко потенциални човешки патогени и да управляват работата на лабораториите, като избегнат заразяването на онези, които работят в лабораторията, както и всяко изпускане на вирус към тези, които са извън лабораторията.

Насоки за работа с образци, за които има съмнение, че съдържат вирус А на ИП могат да бъдат намерени на страницата в Интернет на Световната здравна организация (СЗО):

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