ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 4ης Ιουλίου 2000

για τη θέσπιση διαγνωστικών διαδικασιών, μεθόδων δειγματοληψίας και κριτηρίων για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων εργαστηριακών δοκιμών για την επιβεβαίωση και τη διαφορική διάγνωση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό Ε(2000) 1805]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2000/428/ΕΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 92/119/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 17ης Δεκεμβρίου 1992, για τη θέσπιση γενικών κοινοτικών μέτρων καταπολέμησης ορισμένων ασθενειών των ζώων καθώς και ειδικών μέτρων για τη φυσαλιδώδη νόσο των χοίρων [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την πράξη προσχώρησης της Αυστρίας, της Φινλανδίας και της Σουηδίας, και ιδίως το παράρτημα ΙΙ παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Είναι αναγκαίο να θεσπιστούν σε κοινοτικό επίπεδο διαγνωστικές διαδικασίες, μέθοδοι δειγματοληψίας και κριτήρια για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων εργαστηριακών δοκιμών για την επιβεβαίωση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και την ταχεία διαφοροποίηση από τον αφθώδη πυρετό, ώστε να μπορέσει να εξασφαλιστεί βελτιωμένος έλεγχος και των δύο ασθενειών.

(2) Το παράρτημα ΙΙΙ της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ προβλέπει τις αρμοδιότητες και τα καθήκοντα του κοινοτικού εργαστηρίου αναφοράς για τη φυσαλιδώδη νόσο των χοίρων για το συντονισμό, σε συνεργασία με την Επιτροπή, των μεθόδων που χρησιμοποιούνται στα κράτη μέλη για τη διάγνωση της ασθένειας. Στις αρμοδιότητες αυτές και καθήκοντα περιλαμβάνεται η οργάνωση περιοδικών συγκριτικών δοκιμών και η προμήθεια πρότυπων αντιδραστηρίων σε κοινοτικό επίπεδο.

(3) Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν εργαστηριακές δοκιμές που διασφαλίζουν την ταχεία διάγνωση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και τη διάκρισή της από τον αφθώδη πυρετό.

(4) Από τα αποτελέσματα των πλέον πρόσφατων συγκριτικών δοκιμών που εκτελέστηκαν σε κοινοτικό επίπεδο διαφαίνεται, ιδιαίτερα, ότι έχουν αναπτυχθεί αξιόπιστες δοκιμές για την ανίχνευση του αντιγόνου ή του γονιδιώματος του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και ότι αυτές οι δοκιμές μπορούν να συμπληρώσουν με επιτυχία τη δοκιμή απομόνωσης του ιού για την ιολογική διάγνωση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων.

(5) Οι εμπειρίες που αποκτήθηκαν τα τελευταία χρόνια στον έλεγχο της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων απέληξαν στην ταυτοποίηση των καταλληλότερων δειγματοληπτικών διαδικασιών και κριτηρίων για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των εργαστηριακών δοκιμών για τη σωστότερη διάγνωση της εν λόγω νόσου σε διάφορες περιπτώσεις.

(6) Ελήφθησαν υπόψη η γνώμη και οι προτάσεις της επιστημονικής επιτροπής για την υγεία και την ευζωία των ζώων σχετικά με τη φυσαλιδώδη ασθένεια των χοίρων.

(7) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης κτηνιατρικής επιτροπής,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

1. Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε η επιβεβαίωση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και η διαφορική της διάγνωση από τον αφθώδη πυρετό να βασίζονται:

α) στην ανίχνευση κλινικών συμπτωμάτων της νόσου·

[1] ΕΕ L 62 της 15.3.1993, σ. 69.

β) στην ανίχνευση του ιού, του αντιγόνου ή του γονιδιώματος σε δείγματα επιθηλιακού ιστού, φλυκταινικού υγρού ή κοπράνων·

γ) στον εντοπισμό χαρακτηριστικής αντισωματικής απόκρισης σε δείγματα ορρού,

σύμφωνα με τις διαδικασίες, τις μεθόδους δειγματοληψίας και τα κριτήρια για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων εργαστηριακών δοκιμών που θεσπίζονται στο εγχειρίδιο που προσαρτάται στην παρούσα απόφαση.

2. Ωστόσο, τα εθνικά διαγνωστικά εργαστήρια που αναφέρονται στο παράρτημα II σημείο 5 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ μπορούν να εφαρμόζουν τροποποιήσεις στις εργαστηριακές δοκιμές που αναφέρονται στο εγχειρίδιο που προσαρτάται στην παρούσα απόφαση ή να χρησιμοποιούν διαφορετικές δοκιμές, υπό την προϋπόθεση ότι μπορούν να καταδείξουν ότι υπάρχει η ίδια ευαισθησία και εξειδίκευση.

Η ευαισθησία και εξειδίκευση των τροποποιημένων ή διαφορετικών αυτών δοκιμών πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια των περιοδικών συγκριτικών δοκιμών που οργανώνονται από το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς για τη φυσαλιδώδη ασθένεια των χοίρων.

Άρθρο 2

Η παρούσα απόφαση εφαρμόζεται από την 1η Οκτωβρίου 2000.

Άρθρο 3

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 4 Ιουλίου 2000.

Για την Επιτροπή

David BYRNE

Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ, ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΑΛΙΔΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ ΤΩΝ ΧΟΙΡΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I

Εισαγωγή, στόχοι και ορισμοί

1. Το παρόν εγχειρίδιο:

   α) περιλαμβάνει κατευθυντήριες γραμμές και ελάχιστες απαιτήσεις για διαγνωστικές διαδικασίες, μεθόδους δειγματοληψίας και κριτήρια για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων εργαστηριακών δοκιμών για τη σωστή διάγνωση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων. Εντούτοις, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται επίσης και στη διαφορική διάγνωση του αφθώδους πυρετού·

   β) ενσωματώνει τις διατάξεις του παραρτήματος II της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ και ιδίως των σημείων 4, 7 και 8 του εν λόγω παραρτήματος·

   γ) απευθύνεται, κυρίως, στις αρχές που είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων. Συνεπώς, δίνεται έμφαση στις αρχές και τις εφαρμογές των εργαστηριακών δοκιμών και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους και όχι σε λεπτομερείς εργαστηριακές τεχνικές.

2. Για τους σκοπούς του παρόντος εγχειριδίου, ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

   α) ως «ορροθετικός χοίρος» νοείται κάθε χοίρος του οποίου ο ορρός εμφανίζει αντισωματικό τίτλο ίσο ή μεγαλύτερο από εκείνον του ορρού αναφοράς 4 της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων που αναφέρεται στο κεφάλαιο X στη δοκιμή εξουδετέρωσης ιών που χρησιμοποιείται από το εθνικό εργαστήριο·

   β) ως «μεμονωμένος (singleton) φορέας αντίδρασης» νοείται κάθε μεμονωμένος ορροθετικός χοίρος σε μια εκμετάλλευση που παρέχει θετικό αποτέλεσμα σε ορρολογικές δοκιμές για φυσαλιδώδη ασθένεια των χοίρων, ο οποίος όμως δεν έχει ιστορικό επαφής με τον ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και για τον οποίο δεν υπάρχουν αποχρώσες ενδείξεις μετάδοσης της μόλυνσης σε χοίρους σε επαφή. Ορροθετικός χοίρος επιβεβαιώνεται ως μεμονωμένος φορέας αντίδρασης εφόσον πληρούνται οι όροι που αναφέρονται στο κεφάλαιο VIII σημείο γ)·

   γ) ως «χοίροι σε επαφή» νοούνται χοίροι που έχουν ή είχαν άμεση επαφή τις τελευταίες 28 ημέρες, με έναν ή περισσότερους ορροθετικούς χοίρους ή με έναν ή περισσότερους χοίρους για τους οποίους υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι προσβεβλημένοι από τον ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων. Οι χοίροι σε επαφή μπορεί να βρίσκονται, ή όχι, στο ίδιο κλουβί ή σε προσκείμενα εφόσον υπάρχει η δυνατότητα επαφής μεταξύ χοίρων από διαφορετικά κλουβιά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Κατευθυντήριες γραμμές για ελέγχους σε χοίρους που εμφανίζουν συμπτώματα της φυσαλιδώδους ασθένειας των χοίρων

1. Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε, όταν υπάρχει υπόνοια για παρουσία του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων σε μια εκμετάλλευση, ο επίσημος κτηνίατρος να προβαίνει, το ταχύτερο δυνατό, σε έλεγχο ενός στατιστικώς σημαντικού αριθμού χοίρων για τον εντοπισμό των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου που αναφέρονται στο κεφάλαιο IX.

2. Τα κράτη μέλη, όταν οι χοίροι εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα που παρέχουν την εικόνα φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων ή αφθώδους πυρετού, προβαίνουν στη διενέργεια διαφορικής διάγνωσης μέσω κατάλληλων δειγματοληπτικών και εργαστηριακών ερευνών το ταχύτερο δυνατό, σύμφωνα με τις διατάξεις των κεφαλαίων IV, VII και VIII του παρόντος εγχειριδίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

Γενικές διαδικασίες για τη λήψη και τη μεταφορά δειγμάτων

1. Κάθε πρόσωπο που εισέρχεται ή εξέρχεται από χοιροστάσια όπου υπάρχουν υπόνοιες για εμφάνιση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων πρέπει να τηρεί τα αυστηρότερα αναγκαία υγειονολογικά μέτρα για μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης ή εξάπλωσης του ιού.

2. Κάθε χοίρος από τον οποίο λαμβάνεται δείγμα πρέπει να σημαίνεται με ένα αποκλειστικό σημάδι έτσι ώστε να μπορεί να εντοπίζεται για ενδεχόμενη επανάληψη της δειγματοληψίας. Συνιστάται, παράλληλα με την επίθεση του αποκλειστικού σημαδιού εντοπισμού, να καταγράφεται και ο χώρος σταυλισμού κάθε δειγματοληφθέντος χοίρου μέσα στην εκμετάλλευση, ιδιαίτερα στην περίπτωση όπου η δειγματοληψία αφορά ύποπτους χοίρους.

3. Τα δείγματα πρέπει να στέλνονται στο εργαστήριο συνοδευόμενα από κατάλληλα έντυπα με λεπτομερή στοιχεία για το ιστορικό των χοίρων στους οποίους έγινε δειγματοληψία και τα ενδεχομένως παρατηρηθέντα κλινικά σημεία.

4. Δεδομένου ότι κάθε φλυκταινώδης κατάσταση σε χοίρους μπορεί να είναι αφθώδης πυρετός, πρέπει να λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις για την ασφαλή συσκευασία των ύποπτων δειγμάτων. Οι προφυλάξεις αυτές πρέπει, κυρίως, να αποβλέπουν στην πρόληψη οποιασδήποτε ρήξης ή διαρροής υγρού από τους περιέκτες και κινδύνου μόλυνσης, έχουν όμως ιδιαίτερη σημασία και για λόγους παράδοσης των δειγμάτων σε ικανοποιητική κατάσταση. Εφόσον μέσα στη συσκευασία τοποθετηθεί υγρός πάγος, πρέπει να προλαμβάνεται τυχόν διαφυγή νερού. Περιέκτες με δείγματα ύποπτα για ύπαρξη ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων δεν πρέπει κατά κανέναν τρόπο να ανοίγονται μετά την απομάκρυνση από τις μολυσμένες εγκαταστάσεις, και μέχρι την άφιξη στο εργαστήριο.

5. Δείγματα ύποπτα για ύπαρξη ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων πρέπει να αναλύονται μόνο σε εργαστήρια εξουσιοδοτημένα για το χειρισμό του ιού του αφθώδους πυρετού για διαγνωστικούς σκοπούς, σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία για τον έλεγχο του αφθώδους πυρετού, εκτός αν έχει ήδη εξαλειφθεί κάθε κίνδυνος αφθώδους πυρετού.

6. Τα δείγματα μπορούν να μεταφέρονται σε θερμοκρασία 4 °C εφόσον ο προβλεπόμενος χρόνος μεταφοράς στο εργαστήριο υποδοχής είναι μικρότερος των 48 ωρών, άλλως πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους – 20 °C.

7. Στην περίπτωση δειγμάτων που προορίζονται για το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς από κράτη μέλη εκτός του Ηνωμένο Βασίλειο, ο μόνος επιτρεπόμενος τρόπος μεταφοράς είναι αεροπορικώς προς τα αεροδρόμια Χήθροου ή Γκάτγουϊκ του Λονδίνου. Πριν από την αποστολή, το εργαστήριο πρέπει να ενημερώνεται με φαξ [(+44) 1483 232621] ή με e-mail για τα στοιχεία της πτήσης, την ημερομηνία, τον προβλεπόμενο χρόνο αφίξεως και τον αριθμό της φορτωτικής έτσι ώστε το δέμα να μπορεί να εντοπίζεται κατά την άφιξη. Το δέμα πρέπει να απευθύνεται στο:

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory
Community Reference Laboratory for swine vesicular disease
Ash Road, Pirbright, Woking
Surrey GU24 ONF
England, UK

Στην ετικέτα πρέπει επίσης να αναγράφονται και οι ακόλουθες ενδείξεις: «Animal Pathological Material of no commercial value. Perishable Fragile To be collected at airport by addressee. Not to be opened outside the laboratory».

Η παραλαβή των δεμάτων στο αεροδρόμιο γίνεται από εξουσιοδοτημένο προσωπικό του κοινοτικού εργαστηρίου αναφοράς, με ειδική γενικής ισχύος άδεια εισαγωγής που εκδίδεται για τον σκοπό αυτό από το Υπουργείο Γεωργίας, Τροφίμων και Αλιείας του Ηνωμένου Βασιλείου. Η ρύθμιση αυτή είναι μόνιμη και δεν απαιτείται ξεχωριστή άδεια για κάθε εισαγωγή. Η διά χειρών μεταφορά ύποπτου φυσαλιδώδους υλικού στο Ηνωμένο Βασίλειο από μη εξουσιοδοτημένο προσωπικό δεν επιτρέπεται. Για την αποστολή, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται εταιρείες ταχυμεταφοράς (κούριερ).

8. Η μεταφορά δειγμάτων στα εθνικά εργαστήρια πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες της αρμόδιας αρχής κάθε κράτους μέλους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Διαδικασίες δειγματοληψίας εκμετάλλευση με κλινικώς ύποπτους χοίρους

1. Όταν υπάρχουν υπόνοιες για παρουσία του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων σε μια εκμετάλλευση λόγω εντοπισμού κλινικών συμπτωμάτων της νόσου, τότε πρέπει να λαμβάνονται κατάλληλα δείγματα από αντιπροσωπευτικές ομάδες χοίρων που εμφανίζουν αυτά τα συμπτώματα για επιβεβαίωση και διαφορική διάγνωση από τον αφθώδη πυρετό.

2. Στις εκμεταλλεύσεις αυτές, για τη διάγνωση προτιμάται η λήψη δειγμάτων επιθηλίου και φλυκταινικού υγρού προερχόμενων από άρρηκτες ή πρόσφατα διαρραγείσες φλύκταινες χοίρων που εμφανίζουν τα τυπικά συμπτώματα της νόσου, όπου μπορεί να ανιχνευθεί ο ιός της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, τα αντιγόνα του ή το γονιδίωμά του. Συνιστάται να λαμβάνονται δείγματα από πέντε έως έξι από αυτούς του χοίρους.

3. Έστω κι αν η διαθέσιμη ποσότητα φρέσκου επιθηλιακού ιστού και φλυκταινικού υγρού είναι επαρκής (1 g ή περισσότερο), πρέπει επίσης να λαμβάνονται και τα ακόλουθα δείγματα:

α) δείγματα αίματος από τους ύποπτους και τους σε επαφή χοίρους για ορρολογική δοκιμή και

β) δείγματα κοπράνων από ύποπτους χοίρους και από το δάπεδο του κλουβιού τους και προσκείμενων κλουβιών για ιολογική δοκιμή.

4. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται και να μεταφέρονται με τις ακόλουθες διαδικασίες:

α) Για δείγματα επιθηλίου και φλυκταινικού υγρού:

— αν είναι δυνατό, πρέπει να λαμβάνεται τουλάχιστον 1 g επιθηλιακού ιστού από άρρηκτη ή προσφάτως διαρραγείσα φλύκταινα. Πριν από τη λήψη των δειγμάτων, συνιστάται να χορηγείται στους χοίρους ηρεμιστικό για την αποφυγή τόσο ενδεχόμενου τραυματισμού του προσωπικού όσο και για λόγους ευζωίας των ζώων,

— εάν η μεταφορά στο εθνικό εργαστήριο πραγματοποιηθεί αμέσως (σε λιγότερο από 3 ώρες), τότε τα επιθηλιακά δείγματα μπορούν να μεταφερθούν ξηρά υπό ψύξη. Αν όμως ο χρόνος μεταφοράς είναι ενδεχόμενο να ξεπεράσει τις 3 ώρες, τότε τα δείγματα πρέπει να τοποθετούνται σε μικρό όγκο υγρού μεταφοράς συνιστάμενου από ίσες ποσότητες γλυκερίνης και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,04 M ή άλλου ισοδύναμου ρυθμιστικού (hepes), έτσι ώστε το pH να διατηρείται στα άριστα συνιστώμενα επίπεδα για την επιβίωση του ιού του αφθώδους πυρετού (pH από 7,2 έως 7,6). Το υγρό μέσο μεταφοράς πρέπει να περιέχει αντιβιοτικά για πρόσθετη αντιμικροβιακή δράση. Κατάλληλα αντιβιοτικά και τελικές συγκεντρώσεις ανά ml είναι:

i) πενικιλλίνη 1 000 IU·

ii) θειική νεομυκίνη 100 IU·

iii) θειική B πολυμυξίνη 50 LU·

iv) μυκοστατίνη 100 LU,

— εάν μπορεί να συλλεγεί φλυκταινικό υγρό από αδιάρρηκτη φλύκταινα, αυτό πρέπει να διατηρείται χωρίς αραίωση σε ξεχωριστό περιέκτη.

β) Για δείγματα αίματος:

— δείγματα αίματος μπορούν να συλλεγούν για ορρολογικές ή ιολογικές δοκιμές. Εντούτοις, αυτά εν γένει λαμβάνονται μόνον από χοίρους για τους οποίους υπάρχουν υπόνοιες ότι έχουν ανανήψει από κλινική ή υποκλινική μόλυνση για την ανίχνευση αντισωμάτων, καθώς τα δείγματα επιθηλίου, φλυκταινικού υγρού και κοπράνων από χοίρους με κλινικά συμπτώματα της ασθένειας είναι καταλληλότερα για την ανίχνευση του ιού από τα δείγματα αίματος. Συνιστάται να λαμβάνονται δείγματα πλήρους θρομβωμένου αίματος, χρησιμοποιώντας φιαλίδια κενού χωρίς αντιπηκτικό και τα φιαλίδια να μεταφέρονται σφραγισμένα.

γ) Για δείγματα κοπράνων:

— δείγματα κοπράνων από το δάπεδο εγκαταστάσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι φιλοξενούν, ή φιλοξενούσαν, χοίρους προσβεβλημένους από τη φυσαλιδώδη ασθένεια των χοίρων ή πρωκτικά εκκρίματα και δείγματα κοπράνων από ύποπτα ζώντα ζώα πρέπει να τοποθετούνται σε γερούς, στεγανούς περιέκτες.

Περιέκτες με ύποπτα δείγματα πρέπει να απολυμαίνονται εξωτερικά πριν μεταφερθούν στο εργαστήριο. Κατάλληλα απολυμαντικά είναι:

— το υδροξείδιο του νατρίου (αραίωση 1:100),

— η φορμαλίνη (διάλυμα φορμαλίνης περιέχου 34 % τουλάχιστον φορμαλδεΰδη με αραίωση 1:9) και

— το υποχλωριώδες νάτριο (2 % ενεργό χλώριο).

Ο χειρισμός των εν λόγω απολυμαντικών πρέπει να γίνεται με προσοχή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

Διαδικασίες δειγματοληψίας ορροεπαγρύπνηση για φυσαλιδώδη ασθένεια των χοίρων

1. Όταν πραγματοποιείται ορροεπαγρύπνηση για τους ακόλουθους λόγους:

α) ως επαγρύπνηση σε εκμεταλλεύσεις όπου δεν υπάρχουν ενδείξεις ή υπόνοιες ότι μπορεί να υπάρχει η ασθένεια·

β) ως επαγρύπνηση στα σφαγεία, την αγορά, το κέντρο συλλογής ή άλλο παρόμοιο χώρο με ορρολογική δειγματοληψία ρουτίνας·

γ) ως επαγρύπνηση αποφυγής διακρίσεων σε χοίρους που παραλαμβάνονται από άλλα κράτη μέλη σε εκμεταλλεύσεις εισαγωγής,

πρέπει να λαμβάνονται από τους χοίρους δείγματα αίματος για ορρολογική εξέταση σύμφωνα είτε με τις διατάξεις που έχουν θεσπιστεί στα προγράμματα ή σχέδια παρακολούθησης ή εκρίζωσης που έχουν εγκριθεί στα πλαίσια της απόφασης 90/424/ΕΟΚ του Συμβουλίου [1], ή της οδηγίας 90/425/ΕΟΚ του Συμβουλίου [2], είτε, ελλείψει παρόμοιων διατάξεων, σύμφωνα με τις διαδικασίες που έχουν καθιερωθεί από την αρμόδια αρχή των κρατών μελών.

2. Όταν εκτελείται ορροεπαγρύπνηση για τους ακόλουθους λόγους:

α) για επαγρύπνηση σε εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται σε ζώνες προστασίας ή επίβλεψης, που έχουν επιβληθεί έπειτα από επιβεβαίωση εμφάνισης της ασθένειας σύμφωνα με το παράρτημα ΙΙ σημεία 7 και 8 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ του Συμβουλίου, ή

β) για επαγρύπνηση σε εκμεταλλεύσεις που αναφέρονται στο άρθρο 9 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ του Συμβουλίου,

πρέπει να λαμβάνονται από τους χοίρους δείγματα αίματος για ορρολογική εξέταση σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:

— στην περίπτωση εκμεταλλεύσεων εκτροφής, πρέπει να εφαρμόζονται διαδικασίες τυχαίας δειγματοληψίας έτσι ώστε να ανιχνεύεται 5 % ορρομετατροπής με στάθμη εμπιστοσύνης 95 %,

— στην περίπτωση εκμεταλλεύσεων που φιλοξενούν μόνον χοίρους πάχυνσης, η διαδικασία δειγματοληψίας πρέπει να διασφαλίζει ότι ο συνολικός αριθμός των συλλεγομένων δειγμάτων είναι τουλάχιστον ίσος με τον αριθμό που απαιτείται για την ανίχνευση επιπέδου 5 % με στάθμη εμπιστοσύνης 95 %. Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται από όσο το δυνατόν περισσότερα στην τύχη επιλεγμένα κλουβιά,

— στην περίπτωση μεικτών εκμεταλλεύσεων εκτροφής και πάχυνσης, σε κάθε ομάδα χοίρων που διαβιούν σε ξεχωριστές εγκαταστάσεις πρέπει να πραγματοποιείται δειγματοληψία έτσι ώστε να ανιχνεύεται επίπεδο ορρομετατροπής 5 % με στάθμη εμπιστοσύνης 95 %.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

Περαιτέρω δράσεις και διαδικασίες επανάληψης δειγματοληψίας στην περίπτωση ανεύρεσης ορροθετικών χοίρων

1. Σε περίπτωση εντοπισμού ενός και μόνον ορροθετικού χοίρου σε μια εκμετάλλευση μετά τη διαδικασία επαγρύπνησης που αναφέρεται στο κεφάλαιο V σημείο 1 στοιχείο α), ή σημείο 2, η αρμόδια αρχή μεριμνά ώστε:

α) εάν δεν έχουν ήδη εφαρμοστεί, να εφαρμοστούν στην εκμετάλλευση αυτή τα μέτρα που αναφέρονται στο άρθρο 4 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ·

β) να διενεργηθεί έλεγχος στην εκμετάλλευση σύμφωνα με τις διατάξεις του κεφαλαίου ΙΙ σημείο 1·

[1] ΕΕ L 224 της 18.8.1990, σ. 19.
[2] ΕΕ L 224 της 18.8.1990, σ. 29.

γ) να ληφθούν δείγματα αίματος για ορρολογική εξέταση από:

— τον ύποπτο χοίρο,

— από χοίρους σε επαφή που διαβιούν στο ίδιο ή σε προσκείμενα κλουβιά με τον ύποπτο χοίρο τα δείγματα από τους χοίρους αυτούς πρέπει να λαμβάνονται έτσι ώστε να ανιχνεύεται επίπεδο ορρομετατροπής 5 % με στάθμη εμπιστοσύνης 95 % στο κλουβί.

2. Εντούτοις, η αρμόδια αρχή μπορεί να αποφασίσει για την άρση των μέτρων που αναφέρονται στο σημείο 1 στοιχείο α) εάν:

α) η επιδημιολογική έρευνα που διενεργείται σύμφωνα με το άρθρο 8 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ δείξει ότι δεν έχει εισαχθεί στην εκμετάλλευση η φυσαλιδώδης νόσος των χοίρων·

β) δεν έχουν εντοπιστεί στην εκμετάλλευση κλινικά συμπτώματα της φυσαλιδώδους ασθένειας των χοίρων και

γ) η εκμετάλλευση δεν βρίσκεται σε ζώνη επίβλεψης ή περιορισμού που έχει επιβληθεί έπειτα από επιβεβαιωμένη εμφάνιση της ασθένειας ή υπόκειται σε άλλους περιορισμούς που έχουν επιβληθεί για λόγους που σχετίζονται με επιβεβαιωμένη εμφάνιση της νόσου,

και υπό την προϋπόθεση ότι:

— δεν διακινούνται από την εκμετάλλευση χοίροι για ενδοκοινοτικό εμπόριο και

— από την υπόψη εκμετάλλευση χοίροι μετακινούνται μόνον σε σφαγείο για άμεση σφαγή ή σε άλλη εκμετάλλευση από την οποία δεν διακινούνται χοίροι για ενδοκοινοτικό εμπόριο,

μέχρις ότου τα αποτελέσματα περαιτέρω ελέγχων και ορρολογικών δοκιμών δείξουν ότι μπορεί να αποκλειστεί οριστικά η φυσαλιδώδης νόσος των χοίρων.

3. Εάν οι έλεγχοι και οι ορρολογικές δοκιμές που πραγματοποιούνται σύμφωνα με το σημείο 1 στοιχεία β) και γ) ανωτέρω:

α) δώσουν αρνητικά αποτελέσματα ή ως θετικός επιβεβαιωθεί μόνον ο προηγουμένως αναφερθείς θετικός χοίρος (μεμονωμένος φορέας αντίδρασης), η φυσαλιδώδης νόσος των χοίρων μπορεί να αποκλειστεί. Τα μέτρα που αναφέρονται στο σημείο 1 στοιχείο α) αίρονται, εκτός αν η εκμετάλλευση βρίσκεται σε ζώνη προστασίας ή επίβλεψης επιβληθείσα γύρω από εστία εκδήλωσης της νόσου όπου πρέπει να παραμείνουν σε ισχύ μέτρα εκρίζωσης σύμφωνα με το παράρτημα ΙΙ σημεία 7 ή 8 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ·

β) δείξουν ότι στην εκμετάλλευση υπάρχουν περισσότεροι από έναν ορροθετικοί χοίροι, τότε ή πρέπει να επιβεβαιωθεί η φυσαλιδώδης νόσος των χοίρων ή, εφόσον δεν πληρούνται οι όροι που θεσπίζονται στο παράρτημα ΙΙ σημείο 4 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ για επιβεβαίωση της παρουσίας της εν λόγω ασθένειας, πρέπει να ληφθούν από την εκμετάλλευση περαιτέρω δείγματα σύμφωνα με τις διαδικασίες δειγματοληψίας που αναφέρονται στο σημείο 4.

4. Στην περίπτωση όπου σε μια εκμετάλλευση εντοπιστούν περισσότεροι του ενός ορροθετικοί χοίροι, έπειτα από τη δειγματοληψία και την ορρολογική εξέταση που αναφέρεται στο κεφάλαιο V σημείο 1 στοιχεία α) και γ) ή σημείο 2 αλλά δεν πληρούνται οι όροι του παραρτήματος ΙΙ σημείο 4 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ για την επιβεβαίωση της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, η αρμόδια αρχή πρέπει να μεριμνά ώστε:

α) να εφαρμοστούν ή να συνεχίζουν να εφαρμόζονται οι διατάξεις που αναφέρονται στο άρθρο 4 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ·

β) να διενεργηθεί έλεγχος στην εκμετάλλευση σύμφωνα με τις διατάξεις του κεφαλαίου ΙΙ σημείο 1·

γ) να ληφθούν περαιτέρω δείγματα αίματος για ορρολογική εξέταση από τους ορροθετικούς χοίρους και τους σε επαφή χοίρους σύμφωνα με το σημείο 1 στοιχείο γ)·

δ) να ληφθούν δείγματα αίματος για ορρολογική εξέταση και από χοίρους σε άλλα κτίρια της εκμετάλλευσης σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στο κεφάλαιο V σημείο 2·

ε) να ληθεί επαρκής αριθμός δειγμάτων κοπράνων για ιολογικές δοκιμές από:

— τους ορροθετικούς χοίρους,

— το δάπεδο των κλουβιών που φιλοξενούν ορροθετικούς χοίρους καθώς και των προσκείμενων κλουβιών,

— τυχαίως επιλεγμένα κλουβιά από άλλα κτίρια στην εκμετάλλευση.

Τα δείγματα κοπράνων που συλλέγονται σύμφωνα με την πρώτη και δεύτερη περίπτωση ανωτέρω, πρέπει να εξετάζονται όσο το δυνατόν συντομότερα. Στην περίπτωση όπου τα δείγματα αυτά είναι αρνητικά αλλά τα αποτελέσματα των ορρολογικών δοκιμών δείχνουν ότι ο ιός της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων μπορεί να έχει εξαπλωθεί και σε άλλα κτίρια, πρέπει να εξετάζονται και τα δείγματα κοπράνων που ελήφθησαν σύμφωνα με την τρίτη περίπτωση.

Εάν μετά τους εν λόγω ελέγχους και δοκιμές, δεν πληρούνται οι όροι του παραρτήματος ΙΙ σημείο 4 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ για την επιβεβαίωση της παρουσίας της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, οι ορροθετικοί χοίροι πρέπει να θανατώνονται ή να σφάζονται σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος ΙΙ σημείο 4 στοιχείο δ) της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ. Εάν όμως, εκτός από τους χοίρους που έχουν βρεθεί ήδη ορροθετικοί μετά την προηγούμενη δειγματοληψία, βρεθούν ορροθετικοί και άλλοι χοίροι, τότε πρέπει να εφαρμόζονται περαιτέρω mutatis mutandis οι διατάξεις και οι διαδικασίες που προβλέπονται στα στοιχεία α), β), γ), δ) και ε) ανωτέρω.

5. Υπό την επιφύλαξη των μέτρων του άρθρου 9 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ, στην περίπτωση κατά την οποία, μετά τις ενέργειες επαγρύπνησης που αναφέρονται στο κεφάλαιο V σημείο 1 στοιχεία β) ή γ) εντοπιστούν ένας ή περισσότεροι ορροθετικοί χοίροι, η αρμόδια αρχή μεριμνά ώστε:

   α) όπου είναι αναγκαίο και εφικτό, να διενεργηθούν κατάλληλοι περαιτέρω έλεγχοι, συμπεριλαμβανομένης και της λήψης δειγμάτων, για την επιβεβαίωση ή αποκλεισμό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων στο χώρο όπου εντοπίστηκαν οι χοίροι αυτοί, λαμβάνοντας υπόψη την τοπική κατάσταση,

   β) να εφαρμοστούν στην εκμετάλλευση καταγωγής των εν λόγω χοίρων, τα μέτρα του άρθρου 4 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ·

   γ) να διενεργηθεί στην εκμετάλλευση καταγωγής των εν λόγω χοίρων έλεγχος σύμφωνα με τις διατάξεις του κεφαλαίου II σημείο 1·

   δ) να ληφθούν δείγματα αίματος για ορρολογική εξέταση από τους χοίρους στην εκμετάλλευση καταγωγής των ορροθετικών χοίρων, σύμφωνα με τις διατάξεις του κεφαλαίου V σημείο 2.

6. Εντούτοις, η αρμόδια αρχή μπορεί να αποφασίσει να άρει τα μέτρα που αναφέρονται στο σημείο 5 στοιχείο β), εάν:

   α) η επιδημιολογική έρευνα που διενεργείται σύμφωνα με τα άρθρα 4 και 8 της οδηγίας 92/119/ΕΟΚ δείξει ότι δεν έχει εισαχθεί στην εκμετάλλευση φυσαλιδώδης νόσος των χοίρων·

   β) δεν έχουν εντοπιστεί στην εκμετάλλευση κλινικά συμπτώματα της φυσαλιδώδους ασθένειας των χοίρων και

   γ) η εκμετάλλευση δεν βρίσκεται σε ζώνη επίβλεψης ή περιορισμού που έχει επιβληθεί έπειτα από επιβεβαιωμένη εμφάνιση της ασθένειας ή υπόκειται σε άλλους περιορισμούς που έχουν επιβληθεί για λόγους που σχετίζονται με επιβεβαιωμένη εμφάνιση της νόσου,

   και υπό την προϋπόθεση ότι:.

   — δεν διακινούνται από την εκμετάλλευση χοίροι για ενδοκοινοτικό εμπόριο και

   — από την υπόψη εκμετάλλευση χοίροι μετακινούνται μόνον σε σφαγείο για άμεση σφαγή ή σε άλλη εκμετάλλευση από την οποία δεν διακινούνται χοίροι για ενδοκοινοτικό εμπόριο,

   μέχρις ότου τα αποτελέσματα περαιτέρω ελέγχων και ορρολογικών δοκιμών στον τόπο όπου εντοπίστηκαν οι ορροθετικοί χοίροι και στην εκμετάλλευση καταγωγής τους δείξουν ότι μπορεί να αποκλειστεί οριστικά η φυσαλιδώδης νόσος των χοίρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

Αρχές και εφαρμογές των ιολογικών δοκιμών και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους

Α. **Ανίχνευση ιικού αντιγόνου**

1. Η έμμεση δοκιμή sandwich ELISA έχει αντικαταστήσει τη δοκιμή στερέωσης συμπληρώματος ως επιλεγμένη μέθοδος για την ανίχνευση ιικού αντιγόνου της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων. Η δοκιμή είναι ίδια με εκείνη που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του αφθώδους πυρετού. Οι δοκιμές για τις δύο ασθένειες πρέπει να εκτελούνται ταυτόχρονα, εκτός κι αν έχει ήδη αποκλειστεί η περίπτωση του αφθώδους πυρετού. Συνιστάται ιδιαίτερα για δείγματα επιθηλίου ή υγρού από φλύκταινες όπου, σε περιπτώσεις χοίρων με οξείας μορφής προσβολή, μπορεί να συνυπάρχουν σε υψηλούς τίτλους οι ιοί της φυσαλιδώδους νόσου και του αφθώδους πυρετού και να ανιχνευθούν σε λίγες ώρες [3].

   Διπλές σειρές σε πλάκες ELISA πολλαπλών βοθρίων επικαλύπτονται με αντιορρό κονίκλου προς τον ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και καθένα από τους επτά ορροτύπους του ιού του αφθώδους πυρετού. Αυτοί είναι οι ορροί παγιδεύσεως. Αιωρήματα δειγμάτων δοκιμής προστίθενται σε κάθε σειρά. Περιλαμβάνονται επίσης και κατάλληλοι μάρτυρες. Στο επόμενο στάδιο, προστίθεται στις αντίστοιχες σειρές ομόλογος ορρός ανίχνευσης από ινδικά χοιρίδια και ακολουθεί προσθήκη αντιορρού ινδικών χοιριδίων από κονίκλους συζευγμένου με κάποιο ένζυμο όπως π.χ. υπεροξειδάση αρμορακίας. Μεταξύ κάθε σταδίου παρεμβάλλεται επισταμένο πλύσιμο για την απομάκρυνση τυχόν μη συνδεδεμένων αντιδραστηρίων. Εφόσον υπάρξει χρωματική αντίδραση στην προσθήκη χρωμογόνου και υποστρώματος, η αντίδραση χαρακτηρίζεται θετική. Στην περίπτωση ισχυρά θετικών αντιδράσεων, αυτό γίνεται αντιληπτό και με γυμνό οφθαλμό, τα αποτελέσματα όμως μπορούν να ληφθούν και φασματοφωτομετρικά οπότε, στην περίπτωση αυτή, ως θετική χαρακτηρίζεται αντίδραση στην οποία η καταγραφόμενη απορρόφηση είναι πάνω από 0,1 από τη βασική τιμή.

2. Για την ανίχνευση αντιγόνου της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και διαφορική διάγνωση από τον αφθώδη πυρετό σε δείγματα επιθηλίου, φλυκταινικού υγρού ή καλλιέργειας μολυσμένου ιστού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και εναλλακτικά συστήματα ELISA που βασίζονται σε μονόκλωνα αντισώματα και που χρησιμοποιούν επιλεγμένα μονόκλωνα αντισώματα ως αντίσωμα παγίδευσης και συζευγμένα με υπεροξειδάση μονόκλωνα αντισώματα ως αντισώματα ανίχνευσης.

3. Για τη μελέτη της αντιγονικής διακύμανσης μεταξύ στελεχών του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ELISA με βάση μονόκλωνα αντισώματα. Ικά αντιγόνα αναπτυχθέντα σε καλλιέργεια ιστού παγιδεύονται από υπεράνοσο αντιορρό κονίκλου προς τον ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων προσροφημένο στη στερεά φάση. Κατόπιν φέρονται σε αντίδραση κατάλληλες ομάδες μονόκλωνων αντισωμάτων και η σύνδεση των μονόκλωνων αντισωμάτων στα παρατηρούμενα στελέχη συγκρίνεται με τη σύνδεση των μονόκλωνων αντισωμάτων στα γονικά στελέχη. Εάν η σύνδεση είναι παρόμοια, αυτό δείχνει την παρουσία επιτόπων κοινών μεταξύ των γονικών και των παρατηρούμενων στελεχών.

[3] Τα θετικά αποτελέσματα ELISA συνδέονται με την παρουσία τουλάχιστον 10^5 $TCID_{50}$ (Tissue Culture Infectious Doses) ιού στο δείγμα.

Β. **Απομόνωση και ανάπτυξη του ιού**

1. Συνήθως, διαυγασθέντα αιωρήματα δειγμάτων επιθηλίου, φλυκταινικού υγρού ή κοπράνων που παρέχουν υπόνοιες ότι περιέχουν ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, ενοφθαλμίζονται σε καλλιέργειες ευαίσθητων κυττάρων. Εάν η ποσότητα και η ποιότητα των δειγμάτων από τις φλυκταινώδεις αλλοιώσεις που υποβάλλονται σε εξέταση είναι ανεπαρκής για άμεση εξέταση με ELISA, είναι αναγκαία η ανάπτυξη του ιού στην ιστοκαλλιέργεια για την ενίσχυση του ιικού αντιγόνου.

2. Για την απομόνωση και την ανάπτυξη του ιού, διαυγασθέν επιθηλιακό αιώρημα ενοφθαλμίζεται σε μονοστιβαδικές καλλιέργειες κυττάρων IB-RS-2. Για την αποφυγή παρέμβασης στην ανάπτυξη του ιού από ιντερφερόνη, η οποία απελευθερούμενη παρεμβαίνει στην ανάπτυξη του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο αραιώσεις επιθηλιακού αιωρήματος, μια υψηλή (1/500) και μία χαμηλή (1/10). Για την απομόνωση του ιού, στο μέσο συντήρησης προστίθενται μόνον αντιβιοτικά. Για τη διαφορική διάγνωση του ιού του αφθώδους πυρετού, πρέπει επίσης να ενοφθαλμίζονται αρχέγονα βόεια θυρεοειδικά κύτταρα ή νεφρικά κύτταρα νεαρών κρικητών (BHK-21).

3. Σε περίπτωση ανάπτυξης κυτταροπαθογόνου δράσης, το υπερκείμενο υγρό πρέπει να συλλέγεται από τις θετικές καλλιέργειες όταν έχει ολοκληρωθεί το αποτέλεσμα και να χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση του ιού με ELISA. Οι αρνητικές καλλιέργειες πρέπει να ενοφθαλμίζονται σε νωπές ιστοκαλλιέργειες σε 48 ή 72 ώρες και η τυφλή αυτή διέλευση να εξετάζεται μέχρι 72 ώρες αργότερα. Εφόσον, μετά την περαιτέρω τυφλή διέλευση, δεν εμφανιστεί κυτταροπαθογόνος δράση, το δείγμα μπορεί να χαρακτηριστεί αρνητικό ως προς την παρουσία ζώντων ιών.

4. Αιωρήματα δειγμάτων κοπράνων μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία όπως περιγράφεται στο σημείο 1. Δεδομένου ότι, εν γένει, στα κόπρανα υπάρχουν λιγότεροι ιοί απ' ό,τι στο επιθήλιο, είναι ουσιαστικό να διενεργείται και μια τρίτη τυφλή διέλευση στην περίπτωση που δεν διαπιστωθεί κυτταροπαθογόνος δράση στις πρώτες δύο διελεύσεις.

5. Ο ταυτόχρονος ενοφθαλμισμός χοίρειας κυτταρικής σειράς και ενός εκ των ανωτέρω αναφερθέντων συστημάτων ιστοκαλλιεργειών (κατά προτίμηση των αρχέγονων βόειων θυρεοειδικών κυττάρων) αποτελεί χρήσιμο οδηγό ως προς το εάν τα φλυκταινικά δείγματα περιέχουν ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων ή του αφθώδους πυρετού, καθώς σε κύτταρα χοίρειας προέλευσης αναπτύσσεται μόνον ο πρώτος. Εντούτοις, απομονώματα ιού του αφθώδους πυρετού με μακρό ιστορικό μετάδοσης μεταξύ χοίρων μπορούν να αναπτυχθούν κατά προτίμηση και σε συστήματα χοίρειων κυτταρικών καλλιεργειών.

Γ. **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση γονιδιώματος**

1. Μέθοδοι αναγνώρισης νουκλεϊκών οξέων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ιικού γονιδιώματος της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων με χρησιμοποίηση της PCR, και για τον προσδιορισμό σχέσεων μεταξύ απομονωμάτων του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέρους του γονιδιώματος. Για βελτίωση της ευαισθησίας της διάγνωσης έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που χρησιμοποιούν την PCR. Έχουν περιγραφεί και ελαφρά διαφορετικές διαδικασίες ανάστροφης τρανσκριπτάσης-PCR (RT-PCR) όπου χρησιμοποιούνται πρωταρχητές που αντιστοιχούν σε υψηλής διατήρησης περιοχές στα γονίδια IC και ID.

2. Η τεχνική PCR είναι ταχεία (τα αποτελέσματα βγαίνουν συνήθως μέσα σε 24 ώρες), ανιχνεύει όλους τους γενοτύπους του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων και είναι επαρκώς ευαίσθητη για χρήση σε δείγματα που λαμβάνονται από περιπτώσεις με ύποπτα κλινικά συμπτώματα.

3. Όπου υπάρχουν υπόνοιες για υποκλινική μόλυνση ή όταν τα δείγματα συλλέγονται μετά τη διάλυση της κλινικής νόσου ή όταν επεξεργαζόμαστε δείγματα κοπράνων, ενισχυμένες τεχνικές RT-PCR, όπως επάλληλη RT-PCR, ανοσο-PCR, ELISA-PCR και πιο εξεζητημένες μέθοδοι εξαγωγής RNA, προσφέρουν σύστημα ανίχνευσης το ίδιο, τουλάχιστον, ευαίσθητο αλλά σημαντικά ταχύτερο από την πολλαπλή διέλευση σε ιστοκαλλιέργεια.

4. Αναλύοντας την αλληλουχία 200 περίπου νουκλεοτιδίων στο γονίδιο ID που κωδικοποιεί τη μείζονα δομική πρωτεΐνη VP1, είναι δυνατή η ομαδοποίηση στελεχών του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων ανάλογα με την ομολογία της ακολουθίας τους, καθώς και ο επιδημιολογικός συσχετισμός στελεχών που προκαλούν νόσο σε διάφορες περιοχές ή σε διάφορες χρονικές στιγμές.

Δ. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ιολογικών δοκιμών**

Η ανίχνευση αντιγόνων ή γονιδιώματος του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων με τη δοκιμή ELISA και PCR έχει την ίδια διαγνωστική αξία με εκείνη της απομόνωσης του ιού.

Εντούτοις, ως δοκιμή αναφοράς πρέπει να θεωρείται η απομόνωση του ιού, δοκιμή η οποία και πρέπει να χρησιμοποιείται ως επιβεβαιωτική δοκιμή όταν είναι αναγκαίο, ιδιαίτερα εάν τυχόν θετικό αποτέλεσμα ELISA ή PCR δεν συνυπάρχει με:

α) τον εντοπισμό κλινικών συμπτωμάτων της νόσου·

β) τον εντοπισμό ορροθετικών χοίρων ή

γ) κάποια άμεση επιδημιολογική σύνδεση με επιβεβαιωμένη εκδήλωση της νόσου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII

Αρχές και εφαρμογές ορρολογικών δοκιμών και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

A. **Δοκιμή εξουδετέρωσης ιού (VN)**

1. Η ποσοτική VN μικρο-δοκιμή για την ανίχνευση του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων εκτελείται με κύτταρα IB-RS-2 ή ισοδύναμο κυτταρικό σύστημα σε μικρότιτλες, επίπεδου πυθμένα, πλάκες ιστοκαλλιεργειών.

2. Ο ιός αναπτύσσεται σε κυτταρικές μονοστιβάδες IB-RS-2 και αποθηκεύεται είτε στους – 20 °C μετά από προσθήκη 50 % γλυκερίνης ή στους – 70 °C χωρίς γλυκερίνη. Οι ορροί, πριν από τη δοκιμή, αδρανοποιούνται στους 56 °C για 30 λεπτά.

B. **ELISA**

1. Η ELISA για ανίχνευση αντισωμάτων είναι μια ανταγωνιστική ELISA με βάση μονόκλωνα αντισώματα. Εάν το δείγμα ορρού περιέχει αντισώματα του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, η σύνδεση των επιλεγμένων, συζευγμένων με υπεροξειδάση, μονόκλωνων αντισωμάτων με το ιικό αντιγόνο παρεμποδίζεται.

   Στην ELISA αυτή, το ιικό αντιγόνο της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων παγιδεύεται στη στερεά φάση χρησιμοποιώντας μονόκλωνα αντισώματα, στη συνέχεια τα δείγματα των ορρών επωάζονται σε κατάλληλη αραίωση και ακολουθεί προσθήκη των συζευγμένων με υπεροξειδάση μονόκλωνων αντισωμάτων. Κατόπιν, η παρεμπόδιση της σύνδεσης των μονόκλωνων αντισωμάτων μετριέται με τη βοήθεια υποστρώματος και χρωμογόνου.

2. Η ELISA έμμεσης παγίδευσης με τη χρήση ισοτυπικώς εξειδικευμένων μονόκλωνων αντισωμάτων για την ανίχνευση χοίρειας IgG ή IgM χαρακτηριστικής του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, βοηθάει στην εκτίμηση του χρόνου μόλυνσης στο χοίρο ή στη μολυσμένη εγκατάσταση.

   Στην ισοτυπικώς εξειδικευμένη ELISA, το ιικό αντιγόνο παγιδεύεται στη στερεά φάση χρησιμοποιώντας αντίσωμα σύλληψης του αντιγόνου. Εάν το δείγμα ορρού περιέχει αντισώματα του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων, αυτά ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας αντιχοίρεια IgG ή αντιχοίρεια IgM μονόκλωνα αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση. Κατόπιν, ο βαθμός σύνδεσης μετριέται με τη βοήθεια υποστρώματος και χρωμογόνου.

   Η ισοτυπικώς εξειδικευμένη ELISA μπορεί επίσης να βοηθήσει στη διάκριση μεμονωμένων φορέων αντίδρασης από πραγματικά θετικούς χοίρους, όπως αναφέρεται στο μέρος Γ.

Γ. **Εφαρμογή ορρολογικών δοκιμών και αξιολόγηση αποτελεσμάτων**

1. Η δοκιμή VN και η ELISA αποτελούν τις συνιστώμενες ορρολογικές δοκιμές. Στο κεφάλαιο X παρατίθενται οι ορροί αναφοράς, οι οποίοι διατίθενται από το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς για τη διενέργεια τυποποιημένων ορρολογικών δοκιμών στην Κοινότητα.

   Ως δοκιμή αναφοράς πρέπει να θεωρείται η δοκιμή VN, η οποία όμως έχει το μειονέκτημα ότι χρειάζεται για να ολοκληρωθεί 2-3 ημέρες και απαιτεί τη χρήση ιστοκαλλιεργειών.

   Η ELISA είναι ταχύτερη και μπορεί να τυποποιηθεί ευκολώτερα. Η ανταγωνιστική, με βάση μονόκλωνα αντισώματα, ELISA είναι η πλέον αξιόπιστη για τη φυσαλιδώδη νόσο των χοίρων αντισωματική ELISA που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα. Συνιστάται ως δοκιμή προσανατολισμού για μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

   Εντούτοις, ως επιβεβαιωτική δοκιμή όταν είναι αναγκαίο, ιδιαίτερα μετά την πρώτη ανίχνευση θετικών δειγμάτων σε μια εκμετάλλευση, πρέπει να χρησιμοποιείται η δοκιμή VN. Χοίροι θετικοί βάσει ELISA, αλλά αρνητικοί βάσει δοκιμής VN, μπορούν να μη λαμβάνονται υπόψη.

2. Μια περίπτωση μπορεί να θεωρηθεί ως παρέχουσα ενδείξεις για παρουσία μεμονωμένου φορέα αντίδρασης [4] όταν εντοπιστεί ένας και μοναδικός ορροθετικός χοίρος και εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

   α) δεν υπάρχουν κλινικά συμπτώματα της ασθένειας στην εκμετάλλευση·

   β) δεν υπάρχει σχετικό ιστορικό κλινικής νόσου στην εκμετάλλευση·

   γ) δεν υπάρχει ιστορικό επαφής με γνωστή εκδήλωση της ασθένειας.

3. Χοίρος επιβεβαιώνεται ως μεμονωμένος φορέας αντίδρασης όταν:

   α) σε εν συνεχεία δοκιμές, δεν ταυτοποιούνται άλλοι ορροθετικοί χοίροι·

   β) δειγματοληψία που εκτελείται σε χοίρους σε επαφή μετά την πρώτη ανίχνευση του μεμονωμένου φορέα αντίδρασης, δεν φέρνει στο φως ορρομετατροπή·

   γ) ο αντισωματικός τίτλος σε επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία παραμένει σταθερός ή πέφτει.

[4] Μικρό ποσοστό φορέων αντίδρασης μπορεί να εντοπιστεί με οποιαδήποτε από τις τρέχουσες ορρολογικές δοκιμές για τη φυσαλιδώδη νόσο των χοίρων. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τους μεμονωμένους φορείς αντίδρασης είναι άγνωστοι. Ορρολογική αλληλοδραστικότητα με τον ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων μπορεί να προκύψει λόγω μόλυνσης από άλλον, μη ταυτοποιημένο εισέτι, picornavirus ή μπορεί να οφείλεται και σε άλλους μη συγκεκριμένους παράγοντες που είναι παρόντες στον ορρό.

4. Εντούτοις, για την επιβεβαίωση μεμονωμένου φορέα αντίδρασης, πρέπει να λαμβάνονται επίσης υπόψη και τα ακόλουθα πρόσθετα κριτήρια και αρχές:

   α) μεμονωμένοι φορείς αντίδρασης απαντώνται σε επίπεδα περίπου 1 ανά 1 000 χοίρους·

   β) ορροί από μεμονωμένους φορείς αντίδρασης παρουσιάζουν, εν γένει, την ακόλουθη εικόνα:

   — χαμηλό τίτλο αντισωμάτων στη δοκιμή VN,

   — θετική οριακή γραμμή σε ανταγωνιστική ELISA με μονόκλωνα αντισώματα,

   — αποκλειστικά IgM και καθόλου IgG στην ισοτυπικώς εξειδικευμένη για τη φυσαλιδώδη νόσο των χοίρων ELISA [5].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IX

Κλινικά συμπτώματα και χαρακτηριστικά της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων

Η φυσαλιδώδης νόσος των χοίρων είναι μια λοιμώδης νόσος των χοίρων που προκαλείται από εντεροϊό της οικογένειας Picornaviridae και μπορεί να εκδηλωθεί ως μια υποκλινική, ήπιας ή σοβαράς μορφής φλυκταϊνώδης κατάσταση ανάλογα με το ενεχόμενο στέλεχος του ιού, την οδό και το βαθμό της μόλυνσης, και τις συνθήκες εκμετάλλευσης υπό τις οποίες διαβιούν οι χοίροι. Πρόσθετοι επιβαρυντικοί παράγοντες όπως η μεταφορά, η ανάμειξη με άλλους χοίρους και θερμοκρασιακές ακραίες συνθήκες μπορούν επίσης να αποτελέσουν παράγοντες προδιάθεσης για την ανάπτυξη κλινικών συμπτωμάτων.

Η νόσος χαρακτηρίζεται από ελαφρύ πυρετό και φλύκταινες στη στεφανιαία ζώνη, στους βολβούς της στέρνας, στο δέρμα των άκρων και, λιγότερο συχνά, στο ρύγχος, τα χείλη, τη γλώσσα και τις θηλές. Ο δείκτης νοσηρότητας μπορεί να φθάσει και το 100 %, η θνησιμότητα όμως είναι πολύ χαμηλή ή μηδενική.

Η μόλυνση μπορεί να αναπτυχθεί σε αφανή ή ελαφρά μορφή με μια προσωρινή μόνο φθίση της εμφάνισης των χοίρων, αλλά με ανάπτυξη αντισωμάτων εξουδετέρωσης του ιού μέσα σε λίγες μέρες [6].

Λόγω της υποκλινικής ή ελαφράς μορφής της ασθένειας, οι πρώτες υποψίες γεννώνται συχνά έπειτα από ορρολογικές δοκιμές για νοσοεπαγρύπνηση ή για την έκδοση πιστοποιητικών εξαγωγής. Πρόσφατες εκδηλώσεις της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων στην Ευρώπη χαρακτηρίστηκαν από όχι ιδιαιτέρως σοβαρά ή μηδενικά κλινικά συμπτώματα και διάγνωση εξαρτήθηκε συχνά από τη διενέργεια ορρολογικών εξετάσεων.

Τα κλινικά όμως συμπτώματα της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων δεν μπορούν διακριθούν από εκείνα του αφθώδους πυρετού. Κάθε φλυκταινώδης κατάσταση πρέπει αρχικά να αντιμετωπίζεται ως ενδεχόμενη περίπτωση αφθώδους πυρετού και να γίνεται ταχύτερο δυνατό διαφορική διάγνωση.

Η περίοδος επώασης της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων στους μεμονωμένους χοίρους είναι συνήθως από 2 έως 7 ημέρες, περίοδος μετά την οποία μπορεί να εμφανιστεί προσωρινός πυρετός μέχρι 41 °C, κλινικά όμως συμπτώματα μπορεί να εκδηλωθούν εμφανώς στην εκμετάλλευση έπειτα από μακρύτερο χρονικό διάστημα. Αναπτύσσονται τότε στη στεφανιαία ζώνη φλύκταινες, συνήθως στην άρθρωση με την στέρνα. Οι φλύκταινες μπορεί να προσβάλουν όλη τη στεφανιαία ζώνη οδηγώντας σε απώλεια της χηλής. Σπανιότερα φλύκταινες μπορεί να εμφανιστούν και στο ρύγχος, ιδιαίτερα στη ραχιαία επιφάνεια, στα χείλη, στη γλώσσα και στις θηλές, ενώ στα γόνατα μπορεί να εμφανιστούν ρηχές διαβρώσεις. Οι προσβεβλημένοι χοίροι μπορεί να χωλαίνουν και να απέχουν της τροφής για μερικές ημέρες.

Οι νεότεροι χοίροι προσβάλλονται σοβαρώτερα, αν και ο θάνατος λόγω της φυσαλιδώδους νόσου είναι πολύ σπάνιος, σε αντίθεση με τον αφθώδη πυρετό στα νεαρά ζώα.

Νευρικά συμπτώματα έχουν αναφερθεί, δεν είναι όμως κάτι το σύνηθες. Η αποβολή δεν αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων. Η καρδιακή ανεπάρκεια λόγω πολυεστιακής μυοκαρδίτιδας μπορεί να είναι ένα γνώρισμα του αφθώδους πυρετού και της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας, ειδικά σε νεαρά χοιρίδια, δεν απαντάται όμως στην φυσαλιδώδη νόσο των χοίρων.

Σε 2-3 εβδομάδες, επέρχεται συνήθως πλήρης ανάρρωση, με μόνο σημάδι της μόλυνσης μια σκούρα, οριζόντια γραμμή στη χηλή όπου διακόπτεται προσωρινά η ανάπτυξη.

Οι προσβεβλημένοι χοίροι μπορεί να εκκρίνουν ιό από τη μύτη και το στόμα και στα κόπρανα μέχρι 48 ώρες πριν από την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων. Το μεγαλύτερο μέρος του ιού παράγεται τις πρώτες 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ η έκκριση ιού από μύτη και το στόμα σταματάει κανονικά μέσα σε δύο εβδομάδες. Ο ιός μπορεί να απομονωθεί από τα κόπρανα για χρονικό διάστημα μέχρι 20 ημέρες μετά τη μόλυνση, αν και έχει αναφερθεί η παρουσία του και για διάστημα μέχρι τρεις μήνες. Μπορεί να αντέξει για σημαντικό χρονικό διάστημα στο νεκρωτικό ιστό σε συνδυασμό με διαρραγείσες φλύκταινες και στα κόπρανα.

---

[5] Σε δείγματα ορρών από χοίρους μολυσμένους από τον ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων ανιχνεύονται συνήθως χαρακτηριστική IgG μόνη της ή IgG και IgM μαζί, ενώ σε ορρούς από μεμονωμένους φορείς αντίδρασης ανευρίσκεται γενικά μόνον IgM. Χαρακτηριστική IgG δεν ανιχνεύεται σε δείγματα ορρών από χοίρους μολυσμένους από τον ιό της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 10-14 ημερών, αν και σε ένα δεύτερο δείγμα αίματος θα πρέπει να ανιχνευτεί χαρακτηριστική IgG. Εντούτοις, προσφάτως μολυσμένοι χοίροι δεν μπορούν να διακριθούν αξιόπιστα από μεμονωμένους φορείς αντίδρασης προτού η ανοσοαπόκρισή τους μεταβληθεί από παραγωγή IgM σε παραγωγή IgG. Βλέπε επίσης κεφάλαιο IX και υποσημείωση 6.

[6] Χαρακτηριστική IgM μπορεί να ανιχνευτεί συνήθως στο αίμα 2 με 3 ημέρες μετά τη μόλυνση και εξαφανίζεται μετά από 30 ως 50 ημέρες περίπου. Χαρακτηριστική lgG μπορεί συνήθως να ανιχνευτεί στο αίμα 10 με 14 μέρες μετά τη μόλυνση και να διατηρηθεί για αρκετά χρόνια. Ο ισότυπος lg μπορεί να προσδιοριστεί με την ELISA που περιγράφεται στο κεφάλαιο VIII μέρος B σημείο 2.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Χ

Ορροί αναφοράς της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων

Ορρός αναφοράς	Προέλευση	Σχόλια (7)
1	Κανονικός χοίρειος ορρός (NPS)	Ορρός — αρνητικός μάρτυρας
2	Ορρός συλλεγείς 21 ημέρες μετά τη μόλυνση από χοίρο μολυσμένο από το στέλεχος UKG 27/72 (καθαρό) του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων	Ορρός — ισχυρός θετικός μάρτυρας
3	Αραίωση 1:10 σε NPS ορρού συλλεγέντος πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση από χοίρο μολυσμένο από στέλεχος Italy 8/94 της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων	Χαμηλού επιπέδου θετικός ορρός από χοίρο σύντομα μετά τη μόλυνση με πρόσφατο ευρωπαϊκό απομόνωμα ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων. Ο ορρός χοίρων αραιώνεται ώστε να δίνει χαμηλού βαθμού θετικό αποτέλεσμα με ELISA και VNT
4	Αραίωση 1:40 ορρού συλλεγέντος 21 ημέρες μετά τη μόλυνση από χοίρο μολυσμένο από το στέλεχος UKG 27/72 ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων	Χαμηλού επιπέδου θετικός ορρός που καθορίζει το κατώτατο επίπεδο αντισωμάτων που πρέπει να χαρακτηρίζεται σταθερά θετικό από το εθνικά εργαστήρια αναφοράς ΕΕ με τη μέθοδο ELISA και εξουδετέρωσης του ιού Ισοδυναμεί με ορρό RS 01-04-94 (8)
5	Ορρός συλλεγείς τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση από χοίρο μολυσμένο από το στέλεχος UKG 27/72 (καθαρό) του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων	Χαμηλού επιπέδου θετικός ορρός από χοίρο σύντομα μετά τη μόλυνση
6	Ορρός συλλεγείς πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση από χοίρο μολυσμένο από το στέλεχος UKG 27/72 (καθαρό) του ιού της φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων	Χαμηλού επιπέδου θετικός ορρός από χοίρο σύντομα μετά τη μόλυνση

(7) Τα σχόλια αυτά αφορούν την υποβολή σε δοκιμή μεμονωμένων χοίρων. Για ορροεπαγρύπνηση, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης δοκιμής.

(8) Δηλαδή ορρός με τίτλο αρκετά μεγαλύτερο από το όριο που θα πρέπει να χαρακτηρίζεται πάντοτε θετικό με τη δοκιμή ELISA και VN σε επαναλαμβανόμενες δοκιμές.