32000D0428

ROZHODNUTIE KOMISIE

zo 4. júla 2000,

ktorým sa stanovujú diagnostické postupy, metódy odberu vzoriek a kritériá vyhodnocovania výsledkov laboratórnych testov pre potvrdenie a diferenciálnu diagnózu vezikulárnej choroby ošípaných

(oznámené pod číslom dokumentu C(2000) 1805)

(Text s významom pre EHP)

(2000/428/ES)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 92/119/EHS zo 17. decembra 1992, ktorou sa zavádzajú všeobecné opatrenia spoločenstva na kontrolu niektorých chorôb zvierat a zvláštne opatrenia týkajúce sa vezikulárnej choroby ošípaných [1], naposledy zmenená a doplnená Aktom o pristúpení Rakúska, Fínska a Švédska, a najmä na jej prílohu II, ods. 3,

keďže:

(1) Je potrebné na úrovni spoločenstva stanoviť diagnostické postupy, metódy vzorkovania a kritériá vyhodnocovania výsledkov laboratórnych skúšok pre potvrdenie vezikulárnej choroby ošípaných a jej rýchle odlíšenie od slintačky a krívačky, aby bolo možné zaistiť zlepšenú kontrolu obidvoch ochorení.

(2) Príloha III smernice Rady 92/119/EHS stanovuje úlohy a povinnosti referenčného laboratória spoločenstva pre vezikulárnu chorobu ošípaných tak, aby sa koordinovali, po konzultácii s Komisiou, metódy používané v členských štátoch pre diagnostiku nákazy. Tieto úlohy a povinnosti zahŕňajú organizovanie periodických porovnávacích testov a poskytovanie štandardných reagencií na úrovni spoločenstva.

(3) Nedávno boli vyvinuté laboratórne testy, ktoré zaisťujú, že vezikulárna choroba ošípaných bude rýchlo diagnostikovaná a odlíšená od slintačky a krívačky.

(4) Výsledky úplne posledných porovnávacích testov vykonaných na úrovni spoločenstva naznačujú najmä, že boli vyvinuté spoľahlivé testy na zistenie antigénu alebo genómu vírusu vezikulárnej choroby ošípaných, a že tieto testy môžu úspešne doplniť test izolácie vírusu pre virologickú diagnózu vezikulárnej choroby ošípaných.

(5) Výsledkom skúseností získaných pri kontrolevezikulárnej choroby ošípaných v posledných rokoch bolo vykryštalizovanie najvhodnejších vzorkovacích postupov a kritérií vyhodnocovania výsledkov laboratórnych testov pre správnu diagnózu tejto nákazy v rôznych situáciách.

(6) Stanovisko a odporúčania Vedeckého výboru pre zdravie a ochranu zvierat o vezikulárnej chorobe ošípaných boli vzaté do úvahy.

(7) Opatrenia stanovené v tomto rozhodnutí sú v súlade so stanoviskom Stáleho veterinárneho výboru,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

Článok 1

1. Členské štáty zaistia, aby sa potvrdenie vezikulárnej choroby ošípaných a diferenciálna diagnóza slintačky a krívačky zakladali na:

a) zistení klinických príznakov choroby;

[1] Ú. v. ES L 62, 15.3.1993, s. 69.

b) zistení vírusu, antigénu alebo genómu vo vzorkách epiteliálnych tkanív, vezikulárnej tekutiny a výkalov;

c) dôkaze špecifickej reakcie protilátky vo vzorkách séra,

v súlade s postupmi, metódami vzorkovania a kritériami vyhodnocovania výsledkov laboratórnych testov stanovených v príručke, ktorá je prílohou k tomuto rozhodnutiu.

2. Národné diagnostické laboratóriá uvádzané v prílohe II ods. 5 k smernici 92/119/EHS však môžu uplatňovať úpravy laboratórnych testov uvádzaných v príručke v prílohe k tomuto rozhodnutiu alebo používať odlišné testy za predpokladu, že je možné demonštrovať rovnakú citlivosť a špecifickosť.

Citlivosť a špecifickosť týchto upravených alebo odlišných testov musia byť vyhodnotené v rámci periodických porovnávacích testov organizovaných Referenčným laboratóriom spoločenstva pre vezikulárnu chorobu ošípaných.

Článok 2

Toto rozhodnutie sa bude uplatňovať od 1. októbra 2000.

Článok 3

Toto rozhodnutie je adresované členským štátom.

V Bruseli 4. júla 2000

Za Komisiu

David BYRNE

člen Komisie

PRÍLOHA

PRÍRUČKA DIAGNOSTICKÝCH POSTUPOV, VZORKOVACÍCH METÓD A KRITÉRIÍ VYHODNOCOVANIA VÝSLEDKOV LABORATÓRNYCH TESTOV PRE POTVRDENIE A DIFERENCIÁLNU DIAGNÓZU VEZIKULÁRNEJ CHOROBY OŠÍPANÝCH

KAPITOLA I

Úvod, ciele a definície

1. Táto príručka:
   a) stanovuje usmernenia a minimálne požiadavky na diagnostické postupy, metódy vzorkovania a kritériá vyhodnocovania výsledkov laboratórnych testov pre správnu diagnózu vezikulárnej choroby ošípaných. Zvláštny dôraz je však tiež kladený na diferenciálnu diagnózu na účel odlíšenia od slintačky a krívačky;
   b) integruje ustanovenia prílohy II k smernici 92/119/EHS, a najmä odsekov 4, 7 a 8 uvedenej prílohy;
   c) je zásadne určená pre orgány zodpovedné za kontrolu vezikulárnej choroby ošípaných. Preto je dôraz kladený na zásady a uplatňovanie laboratórnych testov a vyhodnocovanie ich výsledkov, a nie na podrobné laboratórne techniky.
2. Na účel tejto príručky platia nasledujúce definície:
   a) „séropozitívna ošípaná“ znamená ktorúkoľvek ošípanú, ktorej sérum obsahuje títer protilátky, ktoré sa pri vírus neutralizačnom teste používanom národným laboratóriom rovná alebo je väčšie ako je referenčné sérum 4 vezikulárnej choroby ošípaných uvedené v kapitole X;
   b) „ojedinelý reaktor“ znamená ktorúkoľvek jednu séropozitívnu ošípanú v hospodárstve, ktorá poskytuje pozitívny výsledok sérologických testov na vezikulárnu chorobu ošípaných, ktorá však nebola v minulosti v kontakte s vírusom vezikulárnej choroby ošípaných a u ktorej nie sú dôkazy o rozšírení infekcie na ošípané, s ktorými bola v kontakte. Séropozitívna ošípaná je preukázateľne ojedinelým reaktorom, ak sú splnené podmienky uvedené v kapitole VIII C);
   c) „ošípané v kontakte“ znamená ošípané, ktoré majú, alebo mali priamy kontakt počas posledných 28-ich dní s jednou alebo viacerými séropozitívnymi ošípanými alebo s jednou alebo viacerými ošípanými, ktoré sú podozrivé, že boli infikované vírusom vezikulárnej choroby ošípaných. Ošípané v kontakte môžu byť alebo mohli byť v tej istej ohrade alebo v susedných ohradách, ak existuje možnosť kontaktu ošípaných medzi ohradami.

KAPITOLA II

Usmernenia pre kontrolu ošípaných, ktoré vykazujú klinické príznaky vezikulárnej choroby ošípaných

1. Členské štáty zaistia, aby v prípade, že je v hospodárstve podozrenie na prítomnosť vírusu vezikulárnej choroby ošípaných, úradný veterinárny lekár čo možno najrýchlejšie skontroloval štatisticky významný počet ošípaných, aby sa zistili klinické znaky choroby uvedené v kapitole IX.
2. Členské štáty zaistia, aby v prípade, keď ošípané vykazujú klinické príznaky pripomínajúce vezikulárnu chorobu ošípaných alebo slintačku a krívačku, sa čo možno najrýchlejšie vykonala diferenciálna diagnóza pomocou príslušného vzorkovania a laboratórnych vyšetrení podľa ustanovení uvedených v kapitolách IV, VII a VIII tejto príručky.

KAPITOLA III

Všeobecné postupy pre vzorkovanie a dopravu vzoriek

1. Každá osoba, ktorá vstupuje do chovov ošípaných alebo opúšťa chovy ošípaných, v ktorých je podozrenie na vezikulárnu chorobu ošípaných, musí dodržiavať najprísnejšie hygienické opatrenia, ktoré sú nevyhnutné na zníženie rizika kontaminácie alebo rozšírenia vírusu.
2. Všetky vzorkované ošípané musia byť jednoznačne označené takým spôsobom, aby mohli byť identifikované pre prípadné nové vzorkovanie. Odporúča sa zapísať umiestnenie každej vzorkovanej ošípanej v hospodárstve spoločne s jej jednoznačnou identifikačnou značkou, najmä vtedy, ak sa vzorkujú podozrivé ošípané.
3. Vzorky sa musia zasielať do laboratória spolu s príslušnými formulármi, ktoré budú zahŕňať podrobnosti o vzorkovaných ošípaných a eventuálnych pozorovaných klinických príznakoch.
4. Pretože každý vezikulárny stav u ošípaných môže byť slintačkou a krívačkou, musia byť prijaté zvláštne preventívne opatrenia pre bezpečné balenie podozrivých vzoriek. Tieto preventívne opatrenia musia byť určené hlavne na to, aby sa zabránilo rozbitiu alebo vytekaniu z kontajnerov a riziku kontaminácie, ale tiež je dôležité zaistiť, aby vzorky dorazili v uspokojivom stave. Ak sa dovnútra vkladá ľad, musí sa zabrániť úniku vody z obalu. Žiadne nádobky so vzorkami podozrivými, že obsahujú vírus vezikulárnej choroby ošípaných, sa nemôžu otvoriť, akonáhle opustia zamorené priestory, a to až do doby, kým dorazia do laboratória.

5. Ak ešte nebola vylúčená slintačka a krívačka, vzorky, ktoré sú podozrivé, že obsahujú vírus vezikulárnej choroby ošípaných, môžu byť analyzované len v laboratóriu, ktoré je oprávnené k manipulácii s vírusom slintačky a krívačky pre diagnostické účely, podľa právnych predpisov spoločenstva týkajúcich sa kontroly slintačky a krívačky.

6. Ak predpokladaná doba prepravy do prijímajúceho laboratória nie je dlhšia ako 48 hodín, môžu byť všetky vzorky prepravované pri teplote 4 °C, inak sa musia uchovávať pri teplote nie vyššej ako mínus 20 °C.

7. Pre vzorky, ktoré sú určené pre referenčné laboratórium spoločenstva a pochádzajú z iných členských štátov ako zo Spojeného kráľovstva, je jedinou povolenou metódou dopravy letecká doprava na letisko Londýn (Heathrow) alebo Londýn (Gatwick). Pred zásielkou musí byť laboratórium informované faxom (44-1483) 23 26 21) alebo e-mailom o lete, dátume, predpokladanom čase príletu a čísle leteckého nákladného listu tak, aby sa po príchode mohol balíček nájsť. Balíček sa musí adresovať:

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

   Na nálepke musí byť tiež táto informácia: „Zvierací patologický materiál bez obchodnej hodnoty. Podlieha skaze. Krehké. Na letisku vyzdvihne adresát. Neotvárať mimo laboratória."

   Oprávnené vyzdvihnutie zásielok na letisku vykonáva personál referenčného laboratória spoločenstva podľa zvláštneho všeobecného dovozného povolenia vystavovaného na tento účel ministerstvom poľnohospodárstva, výživy a rybolovu Spojeného kráľovstva. Ide o trvalé ujednanie, pre každý prípad dovozu sa nevyžaduje zvláštne povolenie. Prevážanie podozrivého vezikulárneho materiálu do Spojeného kráľovstva osobou, ktorá na to nie je osobne oprávnená, sa nepovoľuje. Nesmú sa používať kuriérske spoločnosti.

8. Doprava vzoriek do národných laboratórií musí byť v súlade s pokynmi stanovenými príslušným orgánom členských štátov.

KAPITOLA IV

Vzorkovacie postupy v chove s klinicky podozrivými ošípanými

1. Ak je v chove podozrenie na prítomnosť vírusu vezikulárnej choroby ošípaných, pretože boli pozorované klinické príznaky choroby, musia sa pre potvrdenie choroby a diferenciálnu diagnózu slintačky a krívačky odobrať príslušné vzorky reprezentatívnych skupín ošípaných, ktoré vykazujú uvedené príznaky.

2. V uvedených chovoch sú najlepšími vzorkami pre diagnózu epitela vezikulárna tekutina z neporušených alebo čerstvo prasknutých pľuzgierov odobraté od ošípaných vykazujúcich typické príznaky choroby, z ktorých je možné zistiť vírus vezikulárnej choroby ošípaných, jeho antigény alebo genóm. Odporúča sa, aby sa odobrali vzorky asi od piatich alebo šiestich takýchto ošípaných.

3. Aj v prípade, ak sú epiteliálne tkanivo a vezikulárna tekutina k dispozícii v dostatočnom množstve (1 g alebo viac), musia sa tiež odobrať tieto vzorky:

   a) vzorky krvi podozrivých ošípaných a ošípaných v kontakte pre sérologické testovanie a

   b) vzorky výkalov podozrivých ošípaných a z podlahy ich ohrady a susedných ohrád pre virologické testovanie.

4. Vzorky sa musia odoberať a dopravovať podľa týchto postupov:

   a) pre vzorky epitelu a vezikulárnej tekutiny:
      — ak je to možné, musí sa odobrať minimálne 1 g epiteliálneho tkaniva z neprasknutého alebo práve prasknutého pľuzgiera. Odporúča sa, aby boli ošípané pred odberom vzoriek ukľudnené sedatívami, aby sa zabránilo poraneniu personálu ako aj s cieľom pohody ošípaných,
      — ak sa preprava vzoriek do národného laboratória vykonáva okamžite (v dobe kratšej ako tri hodiny), epiteliálne vzorky sa môžu prepravovať suché a udržovať chladené. Ak však potrebná doba pravdepodobne prekročí tri hodiny, musia sa vzorky uložiť do malého objemu transportného média obsahujúceho rovnaké množstvo glycerolu a 0,04 M fosfátového pufru alebo iného rovnocenného pufru (hepes), takže sa pH udrží v optimálnom rozsahu pre prežitie vírusu slintačky a krívačky (pH od 7,2 do 7,6). Transportné médium musí obsahovať antibiotiká pre ďalšiu antimikrobiálnu aktivitu. Vhodné antibiotiká a ich koncentrácie v mililitri konečného objemu sú:
         i) penicilín 1 000 IU,
         ii) neomycín sulfát 100 IU,
         iii) polymyxín B sulfát 50 IU,
         iv) mykostatín 100 IU,
      — ak je možné odobrať vezikulárnu kvapalinu z neporušeného pľuzgiera, táto sa musí ukladať neriedená v zvláštnom kontajneri;

b) pre vzorky krvi:

— pre sérologické alebo virologické testy sa môžu odoberať vzorky krvi. Všeobecne však platí, že sa odoberajú len od ošípaných, ktoré sú podozrivé, že sa zotavili z klinickej alebo subklinickej infekcie, s cieľom zistenia protilátky, pretože epitel, vezikulárna tekutina a vzorky výkalov od ošípaných vykazujúcich klinické príznaky choroby, sú pre zistenie vírusu vhodnejšie ako vzorky krvi. Odporúča sa, aby sa všetky vzorky krvi odoberali za použitia vakutejnerov bez antikoagulantu a aby sa vakutejneri prepravovali neotvorené;

c) pre vzorky výkalov:

— vzorky výkalov z podlahy priestorov, ktoré sú podozrivé, že obsahujú, alebo obsahovali, ošípané infikované vezikulárnou chorobou ošípaných, alebo fekálne výtery a fekálne vzorky od podozrivých živých ošípaných, sa musia umiestňovať do pevných, tesných kontajnerov.

Kontajnery s podozrivými vzorkami sa musia pred dopravou do laboratória zvonku dezinfikovať. Vhodné dezinfekčné látky sú:

— hydroxid sodný (riedenie 1:100),

— formalín (riedenie 1:9 roztoku formalínu s obsahom minimálne 34 % formaldehydu), a

— chlornan sodný (2 % disponibilného chlóru).

S týmito dezinfekčnými prostriedkami sa musí zaobchádzať opatrne.

KAPITOLA V

Vzorkovacie postupy pre sérologický dozor nad vezikulárnou chorobou ošípaných

1. Keď sa vykonáva sérologický dozor na tieto účely:

a) pre dozor v chovoch, kde nie sú dôkazy ani podozrenie, že by mohla byť choroba prítomná;

b) pre dozor na bitúnkoch, na trhu, zberných strediskách alebo podobných miestach rutinným sérologickým vzorkovaním;

c) ako nediskriminačný dozor u ošípaných obdržaných z iných členských štátov v dovoznom chove,

vzorky krvi pre sérologické testy sa musia odoberať od ošípaných buď podľa ustanovenia určeného v programoch monitoringu, alebo eradikácie alebo v plánoch schválených v rámci rozhodnutia 90/424/EHS ([1]) alebo smernice 90/425/EHS ([2]) alebo pri neexistencii týchto ustanovení, postupmi stanovenými príslušným orgánom členského štátu.

2. Keď sa vykonáva sérologická kontrola na tieto účely:

a) pre dozor v chovoch ležiacich v pásmach dozoru a ochrany, ktoré boli vytvorené potom, ako sa potvrdilo ohnisko nákazy podľa prílohy II ods. 7 a ods. 8 smernice 92/119/EHS, alebo

b) pre dozor nad chovmi uvedenými v článku 9 smernice 92/119/EHS,

sa musia vzorky krvi odoberať pre sérologické testovanie od ošípaných podľa tohto systému:

— v prípade chovných chovov sa postup náhodného odberu vzoriek musí vykonávať takým spôsobom, aby sa odhalila 5 % prevalencia sérokonverzie so spoľahlivosťou 95 %,

— v prípade chovov iba s výkrmovými ošípanými, vzorkovacie postupy musia zaistiť, že celkový počet odobratých vzoriek je minimálne rovný počtu potrebnému pre odhalenie prevalencie 5 % so spoľahlivosťou 95 %. V každom prípade sa vzorky musia odobrať z toľkých náhodne vybratých ohrád, z koľkých je to možné,

— v prípade zmiešaných chovných a výkrmových chovov sa musí ovzorkovať každá skupina ošípaných žijúca v oddelených priestoroch takým spôsobom, aby sa odhalila 5 % prevalencia sérokonverzie so spoľahlivosťou 95 %.

KAPITOLA VI

Ďalšie kroky a postupy nového odberu vzoriek v prípade zistenia séropozitívnych ošípaných

1. V prípade, že je v chove po kontrole uvedenej v kapitole V ods. 1 písm. a) alebo V ods. 2 zistená jedna séropozitívna ošípaná, príslušný orgán zaistí, že:

a) na tento chov platia opatrenia uvedené v článku 4 smernice 92/119/EHS, ak už neboli uplatnené;

b) sa v chove vykoná kontrola podľa ustanovenia uvedeného v kapitole II ods. 1;

([1]) Ú. v. ES L 224, 18.8.1990, s. 19.
([2]) Ú. v. ES L 224, 18.8.1990, s. 29.

c) sa odoberajú vzorky krvi pre sérologické skúšky od:

— podozrivej ošípanej,

— ošípaných v kontakte, ktoré žijú v tej istej ohrade a v susedných ohradách ako podozrivá ošípaná; u uvedených ošípaných sa musia odobrať vzorky takým spôsobom, aby sa v chlieve odhalila 50 % prevalencia sérokonverzie so spoľahlivosťou 95 %.

2. Príslušný orgán však môže zrušiť opatrenia uvedené v ods. 1 písm. a), ak:

a) epidemiologický prieskum vykonaný podľa článku 8 smernice 92/119/EHS naznačuje, že do chovu nebola zavlečená vezikulárna choroba ošípaných;

b) v chove neboli zistené žiadne klinické príznaky vezikulárnej choroby ošípaných a

c) chov sa nenachádza v pásme dozoru alebo pásme obmedzeného pohybu, vytvorenom po potvrdenom vypuknutí choroby alebo nepodliehajúcom iným obmedzeniam uplatňovaným vo vzťahu k potvrdenému ohnisku nákazy,

a za predpokladu, že:

— žiadne ošípané neboli odvezené z chovu pre obchod vnútri spoločenstva a

— ošípané z príslušného chovu boli prevezené iba na bitúnok na okamžité zabitie alebo do iného chovu, z ktorého sa žiadne ošípané neodvážajú pre obchod vnútri spoločenstva,

a to až do doby, keď výsledky ďalších kontrol a sérologických testov ukážu, že vezikulárna choroba ošípaných môže byť definitívne vylúčená.

3. Ak kontroly a sérologické skúšky vykonané podľa ods. 1 písm. b) a písm. c):

a) udávajú negatívne výsledky, alebo sa ako pozitívna potvrdí len predtým pozitívna ošípaná (ojedinelý reaktor), je možné vezikulárnu chorobu ošípaných vylúčiť. Opatrenia uvedené v ods. 1 písm. a) sa zrušia, ak sa chov nenachádza v ochrannom pásme alebo v pásme dozoru vytvorenom okolo ohniska nákazy, kde opatrenia na zdolanie nákazy musia zostať v účinnosti podľa prílohy II ods. 7 alebo ods. 8 smernice 92/119/EHS;

b) naznačujú, že v chove je prítomná viac ako jedna séropozitívna ošípaná, vezikulárna choroba ošípaných sa buď musí potvrdiť, alebo, ak nie sú splnené podmienky stanovené v prílohe II ods. 4 smernice 92/119/EHS, by sa museli pre potvrdenie prítomnosti nákazy odobrať z chovu ďalšie vzorky podľa postupov odberu vzoriek uvedených v odseku 4.

4. V prípade, že v chove je zistená viac ako jedna séropozitívna ošípaná po vzorkovaní a sérologickom testovaní uvedenom v kapitole V ods. 1 písm. a), ods. 1 písm. c) alebo ods. 2, ale podmienky stanovené v prílohe II ods. 4 k smernici 92/119/EHS nie sú splnené, aby sa potvrdila vezikulárna choroba ošípaných, príslušný orgán zaistí, aby:

a) sa ustanovenia uvedené v článku 4 smernice 92/119/EHS uplatňovali a alebo sa pokračovalo v ich uplatňovaní;

b) sa kontrola v hospodárstve vykonávala podľa ustanovení uvedených v kapitole II ods. 1;

c) sa od séropozitívnych ošípaných a ošípaných v kontakte ďalej odoberali vzorky krvi pre sérologické testovanie podľa ods. 1 písm. c);

d) sa od ošípaných v iných budovách chovu odoberali vzorky krvi pre sérologické skúšky podľa postupu uvedeného v kapitole V ods. 2;

e) sa pre virologické testy odoberal dostatočný počet fekálnych vzoriek:

— od séropozitívnych ošípaných,

— z podláh ohrád obsahujúcich séropozitívne ošípané a susedných ohrád,

— z náhodne vybratých ohrád z iných budov chovu.

Fekálne vzorky odobraté podľa vyššie uvedenej prvej a druhej zarážky sa musia vyšetriť čo možno najskôr. V prípade, že sú tieto vzorky negatívne, ale výsledky sérologických skúšok naznačujú, že vírus vezikulárnej choroby ošípaných sa mohol rozšíriť do iných budov, musia sa tiež vyšetriť fekálne vzorky odobraté podľa tretej zarážky.

Ak sa po týchto ďalších skúškach a skúškach stanovených v prílohe II ods. 4 smernice 92/119/EHS prítomnosť vezikulárnej choroby ošípaných nepotvrdí, séropozitívne ošípané sa usmrtia alebo zabijú podľa ustanovení uvedených v prílohe II ods. 4 písm. d) smernice 92/119/EHS. Ak však boli zistené ďalšie séropozitívne ošípané okrem tých, ktoré už boli zistené ako séropozitívne po predchádzajúcom vzorkovaní, ustanovenia a postupy stanovené v písm. a), písm. b), písm. c), písm. d) a písm. e) sa i naďalej aplikujú obdobne.

5. Bez toho, aby boli dotknuté opatrenia uvedené v článku 9 smernice 92/119/EHS, v prípade, že po kontrolných aktivitách uvedených v kapitole V ods. 1 písm. b) alebo v tej iste kapitole V ods. 1 písm. c) je zistená jedna alebo viacero séropozitívnych ošípaných, príslušný orgán zaistí, že sa:

   a) tam, kde je to potrebné a únosné, vykonávajú ďalšie vhodné kontroly vrátane odberu vzoriek, aby sa potvrdila alebo vylúčila vezikulárna choroba ošípaných na mieste, kde boli tieto ošípané zistené, pričom sa berie do úvahy miestna situácia;

   b) v chove, z ktorého tieto ošípané pochádzajú, uplatňujú opatrenia uvedené v článku 4 smernice 92/119/EHS;

   c) v chove, z ktorého tieto ošípané pochádzajú, vykonáva kontrola v súlade s ustanovením uvedených v kapitole II ods. 1 a

   d) pre sérologické skúšky odoberajú od ošípaných v chove, z ktorého pochádzajú séropozitívne ošípané, vzorky krvi podľa ustanovení uvedených v kapitole V ods. 2.

6. Príslušný orgán však môže rozhodnúť, že zruší opatrenia uvedené v ods. 5 písm. b), ak:

   a) epidemiologické skúmanie vykonané v súlade s článkami 4 a 8 smernice Rady 92/119/EHS naznačuje, že do chovu nebola zavlečená vezikulárna choroba ošípaných;

   b) v chove neboli zistené klinické príznaky vezikulárnej choroby ošípaných;

   c) chov sa nenachádza v pásme dozoru alebo v pásme obmedzeného pohybu vytvorenom po potvrdenom ohnisku choroby, alebo podľa iných obmedzení uplatňovaných s ohľadom na potvrdené ohnisko choroby,

   a za predpokladu, že:

   — žiadne ošípané neboli z chovu prevezené pre obchod vnútri spoločenstva a

   — ošípané sa prevážajú z chovu len na bitúnok na okamžité zabitie alebo do iného chovu, z ktorého sa žiadna ošípaná nepreváža pre obchod vnútri spoločenstva,

až do doby, kým výsledky ďalších kontrol a sérologických testov vykonávaných na mieste, kde bola zistená séropozitívna ošípaná a v chove, z ktorého pochádza, neukazujú, že vezikulárnu chorobu ošípaných je možné s konečnou platnosťou vylúčiť.

KAPITOLA VII

Zásady a použitie virologických testov a vyhodnocovanie ich výsledkov

A. **Zistenie antigénu vírusu**

1. Komplement fixačný test nahradil nepriamy sendvičový ELISA test, ako metóda výberu pre zisťovanie antigénu vírusu vezikulárnej choroby ošípaných. Skúška je rovnaká ako skúška, ktorá sa používa pre diagnózu slintačky a krívačky. Ak už nebola slintačka a krívačka vylúčená, musia sa vykonať skúšky pre obe choroby súčasne. Odporúča sa najmä na vzorkách epitelu alebo tekutiny z vezikulárnych lézií, v ktorých môžu byť u akútne infikovaných ošípaných vírusy vezikulárnej choroby ošípaných aj slintačky a krívačky vo vysokých títroch a zistené za niekoľko málo hodín ([1]).

   Duplicitné rady na mnohojamkových ELISA platniach sú pokryté králičím antisérom pre vírus vezikulárnej choroby ošípaných a pre každý zo siedmych sérotypov vírusu slintačky a krívačky. Ku každému radu sa pridajú suspenzie skúšobnej vzorky. Zahŕňajú sa tiež príslušné kontroly. Do príslušných radov sa v ďalšom štádiu pridáva homologické detekčné sérum morčiat a po ňom králičie sérum morčiat konjugované na enzým ako je chrenová peroxidáza. Medzi každým štádiom sa vykonáva dôkladné premývanie pre odstránenie nenaviazaných reakčných činidiel. Pozitívna reakcia je indikovaná, ak pri pripojení chromogénu a substrátu dôjde k farebnej reakcii. Silné pozitívne reakcie takto budú zrejmé voľným okom, avšak výsledky je možné tiež odčítať spektrofotometricky a v takom prípade absorbancia v hodnote 0,1 nad pozadím naznačuje pozitívnu reakciu.

2. Na zistenie antigénu vezikulárnej choroby ošípaných a na diferenciálnu diagnózu slintačky a krívačky vo vzorkách epitelu, vezikulárnej tekutiny alebo infikovanej tkanivovej kultúre, sa môže používať alternatívny monoklonálny systém ELISA na báze protilátky, používajúci vybrané monoklonálne protilátky ako vychytávacie protilátky a s peroxidázou konjugované monoklonálne protilátky ako zisťovacie protilátky.

3. Monoklonálny systém ELISA na báze protilátky sa môže používať na štúdium antigénových variácií medzi kmeňmi vírusu vezikulárnej choroby ošípaných. Vírusové antigény vypestované na tkanivovej kultúre sa vychytávajú králičím hyperimúnnym antisérom pre vezikulárnu chorobu adsorbovaným na pevnú fázu. Vhodné panely monoklonálnych protilátok sú potom reagované a viažuce monoklonálne protilátky k terénnym kmeňom sa porovnávajú s viažucimi monoklonálnymi protilátkami parentálnych kmeňov. Podobné väzby naznačujú prítomnosť epitopov zdieľaných medzi parentálnymi a terénnymi kmeňmi.

([1]) Pozitívne výsledky testu ELISA sú spojené s prítomnosťou minimálne 10^5 $TCID_{50}$ (infekčné dávky tkanivovej kultúry) vírusu vo vzorkách.

B. **Izolácia a kultivácia vírusu**

1. Ako bežný postup sa vyčistené suspenzie vzorky epitélia, vezikulárnej tekutiny alebo výkalov, ktoré sú podozrivé, že obsahujú vírus vezikulárnej choroby ošípaných, musia inokulovať do senzitívnych bunkových kultúr. Ak množstvo a kvalita vzoriek z vezikulárnych lézií predložených na vyšetrenie je nedostačujúce pre okamžité vyšetrenie testom ELISA, bude potrebné kultivovať vírus na tkanivovej kultúre, aby sa rozmnožil antigén vírusu.

2. Pre izoláciu a pomnoženie vírusu sa vyčistená epiteliálna suspenzia inokuluje na jednovrstvové kultúry buniek IB-RS-2. Aby sa zabránilo interferencii rastu vírusu interferónom, ktorého uvoľnenie by zasahovalo do rastu vírusu vezikulárnej choroby ošípaných, malo by sa používať dvojité riedenie epiteliálnej suspenzie, jedno vysoké (1/500) a jedno nízke (1/10). Pre izoláciu vírusu sa pre udržovanie média pridávajú len antibiotiká. Pre diferenciálnu diagnózu od vírusu slintačky a krívačky sa musia tiež inokulovať primárne tyreoidné hovädzie bunky, alebo bunky obličiek malých škrečkov (BHK-21).

3. Ak sa dostaví cytopatický efekt (CPE), musí sa, ak je účinok kompletný, stiahnuť z pozitívnych kultúr supernatant a použije sa v teste ELISA pre identifikáciu vírusu. Negatívne kultúry sa musia inokulovať na čerstvé tkanivové kultúry pri 48 alebo 72 hodinách a slepé pasáže sa skúmajú najneskôr po 72 hodinách. Ak sa cytopatický účinok po ďalšej slepej pasáži nedostaví, je možné vzorku z hľadiska prítomnosti živého vírusu prehlásiť za negatívnu.

4. Suspenzia výkalových vzoriek sa môže spracovať ako je opísané v bode 1. Pretože vo výkaloch je všeobecne menej vírusu ako v epiteli, je kľúčové, aby sa za neprítomnosti cytopatického účinku v prvých dvoch pasážach ešte použila tretia slepá pasáž.

5. Súčasné inokulovanie línie buniek ošípaných a jedného vyššie uvedeného systému tkanivovej kultúry (najlepšie primárnej tyreoidnej hovädzej bunky) je užitočnou pomôckou na zistenie, či vezikulárne vzorky obsahujú vírus vezikulárnej choroby ošípaných alebo vírus slintačky a krívačky, pretože ten prvý sa bude množiť len v bunkách prasačieho pôvodu. Avšak, v bunkových systémoch prasačích kultúr môžu tiež prednostne rásť izoláty vírusu slintačky a krívačky s predĺženou históriou prenosu medzi ošípanými.

C. **Polymerázová reťazová reakcia (PCR) na zistenie genómu**

1. Metódy rozpoznávania nukleovej kyseliny za použitia PCR sa hodia pri klinickom materiály na zistenie vírusového genómu vezikulárnej choroby ošípaných a na určenie vzťahov medzi izolátmi vírusu vezikulárnej choroby ošípaných, určením nukleotidovej sekvencie časti genómu. Techniky používajúce PCR boli vypracované s cieľom zvýšenia citlivosti diagnózy. Boli opísané mierne odlišné postupy reverznej transkriptázy-PCR za použitia primérov korešpondujúcich so silne konzervovanými regiónmi v génoch 1C a 1D.

2. Technika PCR je rýchla (výsledky sú obvykle k dispozícii behom 24 hodín), stanoví všetky genotypy vírusu vezikulárnej choroby ošípaných a je dostatočne citlivá, aby sa mohla použiť na vzorkách odobratých z prípadov podozrenia na klinickú chorobu.

3. Pri podozrení na subklinickú infekciu, alebo keď sa vzorky odoberajú v okamihu, keď sa už nevyskytujú klinické symptómy choroby, alebo pri príprave výkalových vzoriek, sa ukazujú vyspelé techniky RT-PCR, ako je hniezdová RT-PCR, imúnna-PCR, ELISA-PCR a oveľa pracnejšie metódy extrakcie RNA, ako detekčný systém, ktorý je minimálne rovnako citlivý, avšak oveľa rýchlejší ako násobné pasáže na tkanivovej kultúre.

4. Sekvennovaním približne 200 nukleotidov v géne 1D, ktorý kóduje hlavný štrukturálny proteín VP1, je možné zoskupiť kmene vírusu vezikulárnej choroby ošípaných podľa ich sekvenčnej homológie a epidemiologicky zistiť vzájomnú súvislosť kmeňov spôsobujúcich chorobu v rôznych regiónoch alebo v rôznej dobe.

D. **Vyhodnocovanie výsledkov virologických testov**

Zistenie antigénov alebo genómu vírusu vezikulárnej choroby ošípaných pomocou testov ELISA a PCR má rovnakú diagnostickú hodnotu ako izolácia vírusu.

Izolácia vírusu však musí byť považovaná za referenčný test a musí sa používať ako konfirmačný test tam, kde je to potrebné, najmä ak pozitívne výsledky ELISA alebo PCR nie sú spojené so:

a) zistením klinických príznakov choroby,

b) zistením séropozitívnych ošípaných alebo

c) priamou epidemiologickou väzbou na potvrdené ohnisko choroby v stáde.

KAPITOLA VIII

Zásady a použitie sérologických testov a vyhodnocovanie ich výsledkov

A. **Vírus neutralizačný test (VN)**

1. Kvantitatívny VN mikrotest pre zistenie protilátky vírusu vezikulárnej choroby ošípaných sa vykonáva s bunkami IB-RS-2 alebo s ekvivalentným bunkovým systémom na doskách s plochým dnom tkanivovej kultúry mikrotitrového stupňa.

2. Vírus sa kultivuje v monovrstvách buniek IB-RS-2 a skladuje sa buď pri – 20 °C po pridaní 50 % glycerolu alebo pri – 70 °C bez glycerolu. Séra sú pred testovaním inaktivované na dobu 30 minút pri teplote 56 °C.

B. **Testy ELISA**

1. ELISA pre zistenie protilátok je monoklonálny kompetetívny ELISA na báze protilátky. Ak sérová vzorka obsahuje protilátky vírusu vezikulárnej choroby ošípaných, väzba vybranej, peroxidázou konjugovanej monoklonálnej protilátky na antigén vírusu sa bude inhibovať.

   V tomto teste ELISA je antigén vírusu vezikulárnej choroby ošípaných zachytený na pevnej fáze za použitia monoklonálnych protilátok; v ďalšej fáze sa sérové vzorky inkubujú pri príslušnom zriedení, nasledovanom pridaním peroxidázou konjugovanej monoklonálnej protilátky. Potom sa meria inhibícia viazania monoklonálnej protilátky pomocou substrátu a chromogénu.

2. Nepriamy zachycovací test ELISA používajúci izotypovo-špecifické monoklonálne protilátky na stanovenie prasačieho IgG alebo IgM špecifického pre vírus vezikulárnej choroby ošípaných je užitočný pri stanovení doby infekcie ošípanej a alebo infikovaného zariadenia.

   U izotypovo špecifického testu ELISA sa antigén vírusu zachytáva na pevnej fáze za použitia protilátky zachytajúcej antigén. Ak sérová vzorka obsahuje protilátky vírusu vezikulárnej choroby ošípaných, sú zisťované za použitia antiprasačích IgG alebo antiprasačích IgM monoklonálnej protilátky konjugovanej s peroxidázou. Potom sa táto väzba meria pomocou substrátu a chromogénu.

   Izotypovo špecifický test ELISA môže rovnako pomôcť pri odlíšení ojedinelých reaktorov od skutočne pozitívnych ošípaných, ako sa uvádza v bode C.

C. **Použitie sérologických testov a vyhodnocovanie výsledkov**

1. Prednostne odporučené sérologické testy sú test VN a ELISA. V kapitole X sú uvádzané referenčné séra, ktorá sú k dispozícii z referenčného laboratória spoločenstva pre vykonávanie uvedených štandardizovaných sérologických testov v spoločenstve.

   Test VN sa musí považovať za referenčný test, má však nevýhody v tom, že vykonanie trvá dva až tri dni a vyžaduje tkanivové kultúry.

   ELISA je oveľa rýchlejší a môže sa oveľa ľahšie štandardizovať. Monoklonálne protilátková kompetitívna ELISA je najspoľahlivejšou ELISO-u na protilátky vezikulárnej choroby ošípaných, aká bola až doteraz opísaná. Odporúča sa ako vyšetrovací test na veľkom počte vzoriek.

   Ak je to potrebné, musí sa však ako potvrdenie použiť test VN, najmä po prvom zistení pozitívnych vzoriek z chovu. Pozitívne ošípané podľa ELISA, ale negatívne pri skúške VN, sa nemusia brať do úvahy.

2. Prítomnosť ojedinelého reaktoru ([1]) môže byť podozrivá tam, kde sa zistí jedna séropozitívna ošípaná a kde sú splnené tieto kritériá:

   a) v chove neexistujú klinické príznaky choroby;

   b) v chove sa v minulosti nevyskytli významnejšie prípady klinickej choroby;

   c) v minulosti nedošlo nikdy ku kontaktu so známym nakazeným stádom.

3. Ošípaná je potvrdeným ojedinelým reaktorom, ak:

   a) ďalšie testovanie nezistí iné séropozitívne ošípané;

   b) vzorkovanie vykonané na ošípaných v kontakte po prvom zistení ojedinelého reaktoru neobjaví sérokonverziu;

   c) títer protilátky u opakovaných vzoriek zostáva konštantný alebo klesá.

([1]) Malá časť ojedinelých reaktorov sa môže zistiť ktorýmkoľvek z bežných sérologických testov na vezikulárnu chorobu ošípaných. Faktory, ktoré spôsobujú ojedinelé reaktory, nie sú známe. Sérologická krížová reaktívita s vírusom vezikulárnej choroby ošípaných môže vznikať v dôsledku infekcie iným, doteraz neidentifikovaným pikornavírusom alebo môže byť dôsledkom iných nešpecifických faktorov prítomných v sére.

4. Pre potvrdenie ojedinelého reaktoru sa však musia uvážiť tiež nasledujúce dodatočné kritériá a zásady:

   a) ojedinelý reaktor sa objavuje v množstve približne 1 na 1 000 ošípaných;

   b) séra z ojedinelých reaktorov majú všeobecne tento profil:

      — nízky títer protilátky testu VN,

      — pozitívna hraničná čiara v monoklonálnom konkurenčnom teste ELISA na báze protilátky,

      — u izotypovo-špecifického testu ELISA pre vezikulárnu chorobu ošípaných ([1]) je výlučne IgM a žiadny IgG.

KAPITOLA IX

Klinické príznaky a charakteristiky vezikulárnej choroby ošípaných

Vezikulárna choroba ošípaných je nákazlivá choroba ošípaných spôsobovaná enterovírusom rodu *picornaviridae*, a môže byť v subklinickom, miernom alebo vážnom vezikulárnom stave v závislosti na pôsobiacom kmeni vírusu, ceste a dávke infekcie a chovateľských podmienkach, v ktorých sú ošípané držané. Ďalšie stresové faktory ako doprava, zmiešanie s inými ošípanými a extrémne teploty môžu tiež vytvoriť predispozíciu na rozvoj klinických príznakov.

Charakterizuje ju mierna horúčka a pľuzgieriky na koronárnom páse, bulby na päte, koži údov a menej často rypáku, pyskoch, jazyku a strukoch. Miera ochorenia môže dosahovať až 100 %, avšak úmrtnosť je veľmi nízka alebo nulová.

Infekcia sa môže rozvíjať v neviditeľnej alebo miernej forme s prejavmi len postupného zhoršenia zdravotného stavu ošípaných, avšak počas niekoľko málo dní ([2]) vedie k vývoju protilátok neutralizujúcich vírus.

V dôsledku subklinickej a alebo miernej povahy choroby sa prvé podozrenie objaví po sérologických testoch pri kontrole ochorení alebo osvedčení pre vývoz. Nedávne vzplanutia vezikulárnej choroby ošípaných v Európe boli charakterizované menej závažnými alebo úplne neklinickými príznakmi, diagnóza často závisela na sérologii.

Klinické príznaky vezikulárnej choroby ošípaných sú však neodlíšiteľné od príznakov slintačky a krívačky. Každý vezikulárny stav sa musí najskôr považovať za podozrenie na slintačku a krívačku a čo možno najrýchlejšie je potrebné získať diferenciálnu diagnózu.

Inkubačná doba vezikulárnej choroby ošípaných je obvykle dva až sedem dní, po ktorých sa môže objaviť prechodná horúčka až 41 °C, avšak klinické príznaky môžu začať byť v chove zrejmé až po dlhšom období. Pľuzgieriky sa potom vyvíjajú na koronárnom páse, obvykle na spoji s pätou. Tie môžu ovplyvňovať celkový koronárny pás majúci za následok stratu paznechtu. Oveľa zriedkavejšie sa môžu pľuzgiere objaviť tiež na rypáku, najmä na dorzálnom povrchu, na pyskoch, jazyku a strukoch a na kolenách je možné vidieť plytké erózie. Postihnuté ošípané môžu krívať a niekoľko dní nežrať.

Mladšie ošípané sú postihované oveľa vážnejšie, i keď úmrtnosť na vezikulárnu chorobu ošípaných je, na rozdiel od slintačky a krívačky, u mladých zvierat veľmi nízka.

Boli hlásené poruchy nervového systému, ale nie sú obvyklé. Zastavenie rastu nie je obvyklým charakteristickým rysom vezikulárnej choroby ošípaných. Zlyhanie srdca v dôsledku multifokálnej myokarditídy môže byť charakteristickým znakom slintačky a krívačky a encefalomyokarditídy, najmä u malých prasiatok, pri vezikulárnej chorobe ošípaných sa však neobjavuje.

Zotavenie je obvykle úplné behom dvoch až troch týždňov s jediným znakom infekcie, ktorým sú tmavé, horizontálne čiary na paznechtoch, kde bol rast dočasne prerušený.

Postihnuté ošípané môžu vylučovať vírus z nozdier a tlamy a vo výkaloch už 48 hodín pred začiatkom výskytu klinických príznakov. Väčšina vírusu je produkovaná v prvých siedmich dňoch po infekcii a vylučovanie vírusu z rypáku sa obvykle zastavuje behom dvoch týždňov. Vírus je možné izolovať z výkalov až 20 dní po infekcii, i keď existujú správy o tom, že sa vyskytoval ešte po troch mesiacoch. Značnú dobu môže pretrvávať v nekrotických tkanivách spojených s prasknutými pľuzgierikmi a vo výkaloch.

([1]) V sérových vzorkách ošípaných infikovaných vírusom vezikulárnej choroby ošípaných sa obvykle zisťuje len špecifický IgG a alebo IgG a IgM, kým séra ojedinelých reaktorov všeobecne obsahujú len IgM. Špecifický IgG sa nezistí v sérových vzorkách ošípaných infikovaných vírusom vezikulárnej choroby ošípaných počas predchádzajúcich 10 až 14 dní, i keď špecifický IgG by mal byť zistený v druhom vzorku krvi. Avšak, nedávno infikované ošípané sa nedajú spoľahlivo odlíšiť od ojedinelých reaktorov pred tým, ako ich imunitná reakcia prejde z produkcie IgM na IgG. Pozri tiež kapitolu IX a poznámku pod čiarou 7.

([2]) V krvi odobratej dva až tri dni po infekcii môže byť obvykle zistený špecifický IgM, ktorý zmizne asi po 30 až 50 dňoch; špecifický IgG sa môže obvykle zistiť v krvi v dobe od 10 do 14 dní po infekcii a zotrváva niekoľko rokov. Izotyp IgG sa môže stanoviť pomocou ELISA popisovanej v kapitole VIII písm. B ods. 2

KAPITOLA X

Referenčné séra vezikulárnej choroby ošípaných

Referenčné sérum	Pôvod	Poznámka ([1])
1	bežné prasačie sérum (NPS)	negatívne kontrolné sérum
2	sérum odobraté 21 dní po infekcii (dpi) z ošípanej infikovanej vírusom vezikulárnej choroby ošípaných kmeňa UKG 27/72 (neriedené)	silné pozitívne kontrolné sérum.
3	roztok 1:10 v NPS séra odobratého päť dpi z ošípanej nakazenej kmeňom vezikulárnej choroby ošípaných Italy 8/94	nízkopozitívne sérum z ošípanej krátko po infekcii s nedávnym európskym izolátom vírusu vezikulárnej choroby ošípaných. Sérum bolo zriedené tak, aby poskytovalo nízky pozitívny výsledok v testoch ELISA a VNT.
4	riedenie 1:40 séra odobratého 21 dpi z ošípanej infikovanej vírusovým kmeňom vezikulárnej choroby ošípaných UKG 27/72	nízkopozitívne sérum definujúce najnižšiu úroveň protilátok, ktoré by mali národné referenčné laboratóriá EÚ považovať trvalo za pozitívne podľa testu ELISA avírus neutralizačného testu. Ekvivalentná séru RS 01-04-94 ([2])
5	sérum odobraté 4 dpi od ošípanej infikovanej vírusovým kmeňom vezikulárnej choroby ošípaných UKG 27/72 (neriedené)	nízkopozitívne sérum z ošípanej krátko po infekcii.
6	sérum odobraté 5 dpi z ošípanej infikovanej vírusovým kmeňom vezikulárnej choroby ošípaných UKG 27/72 (neriedené)	nízkopozitívne sérum z ošípanej krátko po infekcii.

([1]) Tieto poznámky sa vzťahujú na testovanie jednotlivých ošípaných. Pre sérologickú kontrolu by sa mala brať do úvahy citlivosť použitého testu.

([2]) Toto je sérum s títrom dostatočne vyšším ako je hraničná hodnota, ktorá by vždy znamenala pozitívny nález podľa testu ELISA a VN pri opakovanom testovaní.