32000D0428

ODLOČBA KOMISIJE

z dne 4. julija 2000

o določitvi diagnostičnih postopkov, metod vzorčenja in meril vrednotenja rezultatov laboratorijskih testov za potrditev in diferencialno diagnostiko vezikularne bolezni prašičev

(notificirano pod dokumentarno številko K(2000) 1805)

(Besedilo velja za EGP)

(2000/428/ES)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 92/119/EGS z dne 17. decembra 1992 o splošnih ukrepih Skupnosti za nadzor nad določenimi živalskimi boleznimi in o posebnih ukrepih v primeru vezikularne bolezni prašičev ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Aktom o pristopu Avstrije, Finske in Švedske, in zlasti odstavka 3 Priloge II Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Na ravni Skupnosti je treba določiti diagnostične postopke, metode vzorčenja in merila vrednotenja rezultatov laboratorijskih testov za potrditev vezikularne bolezni prašičev in hitro razlikovanje od slinavke in parkljevke, zato da se zagotovi izboljšan nadzor nad obema boleznima.

(2) Priloga III k Direktivi Sveta 92/119/EGS določa naloge in dolžnosti referenčnega laboratorija Skupnosti za vezikularno bolezen prašičev, namenjene temu, da ob posvetovanju s Komisijo usklajuje metode, ki se v državah članicah uporabljajo za diagnosticiranje bolezni; te naloge in dolžnosti vključujejo organiziranje občasnih primerjalnih testov in dobavljanje standardnih reagentov na ravni Skupnosti.

(3) Nedavno so bili razviti laboratorijski testi, s katerimi je mogoče vezikularno bolezen prašičev hitro diagnosticirati in razlikovati od slinavke in parkljevke.

([1]) UL L 62, 15.3.1993, str. 69.

(4) Rezultati najnovejših primerjalnih testov, opravljenih na ravni Skupnosti, nakazujejo predvsem, da so bili razviti zanesljivi testi za ugotavljanje antigena ali genoma virusa vezikularne bolezni prašičev in da ti testi lahko uspešno dopolnijo test izolacije virusa za virološko diagnostiko vezikularne bolezni prašičev.

(5) Izkušnje, pridobljene pri nadzoru vezikularne bolezni prašičev v zadnjih letih, so omogočile izbrati metode vzorčenja in kriterije vrednotenja rezultatov laboratorijskih testov, ki so najustreznejši za pravilno diagnozo te bolezni v različnih situacijah.

(6) Upoštevano je bilo mnenje in priporočila Znanstvenega odbora za zdravje in dobro počutje živali glede vezikularne bolezni prašičev.

(7) Ukrepi, predvideni s to odločbo, so v skladu z mnenjem Stalnega veterinarskega odbora –

SPREJELA NASLEDNJO ODLOČBO:

Člen 1

1. Države članice zagotovijo, da potrditev vezikularne bolezni prašičev in diferencialna diagnostika v zvezi s slinavko in parkljevko temeljita na:

(a) ugotovitvi kliničnih znakov bolezni;

(b) dokazu virusa, antigena ali genoma v vzorcih epitelijskega tkiva, vezikularne tekočine ali fecesa;

(c) dokazu specifičnih protiteles v vzorcih seruma,

v skladu s postopki, metodami vzorčenja in merili vrednotenja rezultatov laboratorijskih testov, določenimi v Priročniku, priloženemu k tej odločbi.

2. Vendar pa lahko nacionalni diagnostični laboratoriji iz Priloge II(5) k Direktivi 92/119/EGS v laboratorijskih testih uporabijo spremembe, navedene v Priročniku, priloženemu k tej odločbi, ali pa uporabijo drugačne teste, v kolikor je možno dokazati enakovredno občutljivost in specifičnost.

Občutljivost in specifičnost spremenjenih ali drugačnih testov je treba ovrednotiti v okviru občasnih primerjalnih testov, ki jih organizira referenčni laboratorij Skupnosti za vezikularno bolezen prašičev.

Člen 2

Ta odločba se uporablja od 1. oktobra 2000.

Člen 3

Ta odločba je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 4. julija 2000

Za Komisijo

David BYRNE

Član Komisije

PRILOGA

PRIROČNIK O DIAGNOSTIČNIH POSTOPKIH, METODAH VZORČENJA IN MERILIH VREDNOTENJA REZULTATOV LABORATORIJSKIH TESTOV ZA POTRDITEV IN DIFERENCIALNO DIAGNOSTIKO VEZIKULARNE BOLEZNI PRAŠIČEV

POGLAVJE I

Uvod, cilji in opredelitev pojmov

1. Ta priročnik:
   (a) določa smernice in minimalne zahteve v zvezi z diagnostičnimi postopki, metodami vzorčenja in merili vrednotenja rezultatov laboratorijskih testov za pravilno diagnozo vezikularne bolezni prašičev. Vendar je poudarek predvsem na diferencialni diagnostiki v zvezi s slinavko in parkljevko;
   (b) vključuje določbe Priloge II k Direktivi 92/119/EGS in zlasti odstavkov 4, 7 in 8 navedene priloge;
   (c) je namenjen predvsem organom, odgovornim za nadzor vezikularne bolezni prašičev. Zato je poudarek na načelih in načinih uporabe laboratorijskih testov ter vrednotenju njihovih rezultatov in ne na podrobnih laboratorijskih tehnikah.
2. V tem priročniku se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:
   (a) „serološko pozitiven prašič“ je katerikoli prašič, katerega serum vsebuje pri testu nevtralizacije virusa, ki ga uporablja nacionalni laboratorij, enak ali višji titer protiteles kot referenčni serum za vezikularno bolezen prašičev št. 4 iz poglavja X;
   (b) „posamezni reaktor“ je katerikoli serološko pozitiven prašič, ki je kot edini na tistem gospodarstvu pozitivno reagiral pri serološkem testu na vezikularno bolezen prašičev, vendar v preteklosti ni prišel v stik z virusom vezikularne bolezni prašičev in ni dokazov, da bi širil okužbo na prašiče, s katerimi je v stiku. Da je serološko pozitivni prašič osamljena pozitivna žival, je potrjeno, če so izpolnjeni pogoji iz poglavja VIII(C);
   (c) „prašiči v stiku“ so prašiči, ki so v neposrednem stiku, ali so bili v preteklih 28 dneh v neposrednem stiku z enim ali več serološko pozitivnimi prašiči ali z enim ali več prašiči, pri katerih obstaja sum, da so okuženi z virusom vezikularne bolezni prašičev. Prašiči v stiku so lahko ali so lahko bili v istem boksu ali v sosednjih boksih, če obstaja možnost stikov med prašiči v različnih boksih.

POGLAVJE II

Smernice za preiskave prašičev, ki kažejo klinične znake vezikularne bolezni prašičev

1. Države članice zagotovijo, da uradni veterinar, kadar obstaja sum, da je na gospodarstvu prisotna vezikularna bolezen prašičev, čimprej pregleda statistično potrebno število prašičev, da bi ugotovil klinične znake bolezni iz poglavja IX.
2. Države članice zagotovijo, da se, kadar imajo prašiči klinične znake, ki kažejo na vezikularno bolezen prašičev ali na slinavko in parkljevko, z ustreznim vzorčenjem in laboratorijskimi preiskavami čimprej opravi diferencialna diagnostika v skladu z določbami iz poglavij IV, VII in VIII tega priročnika.

POGLAVJE III

Splošni postopki za vzorčenje in prevoz vzorcev

1. Vse osebe, ki vstopajo ali zapuščajo gospodarstvo s prašiči, za katerega obstaja sum, da je tam prisotna vezikularna bolezen prašičev, se morajo držati najstrožjih higienskih ukrepov, potrebnih za zmanjšanje nevarnosti okužbe ali širjenja virusa.
2. Vsi prašiči, izbrani za vzorčenje, morajo biti označeni tako, da jih je glede na morebitno ponovno vzorčenje kadarkoli mogoče identificirati. Priporočljivo je, da se skupaj z nezamenljivo identifikacijsko oznako zabeležit prostor, kjer se nahaja vsak prašič, izbran za vzorčenje na gospodarstvu, zlasti če so izbrani sumljivi prašiči.
3. Vzorce je treba poslati v laboratorij skupaj z ustreznimi obrazci, v katerih so vključeni podatki o preteklosti prašičev, od katerih so bili vzorci odvzeti, in morebitni klinični znaki, ki so bili ugotovljeni.
4. Glede na to, da je lahko katerokoli vezikularno bolezensko stanje pri prašičih slinavka in parkljevka, je treba sprejeti posebne varnostne ukrepe za varno pakiranje sumljivih vzorcev. Te varnostne ukrepe je treba oblikovati predvsem zato, da se preprečijo poškodbe ali puščanje paketa in nevarnost za širjenje okužbe, pomembno pa je tudi zagotoviti, da vzorci prispejo v primernem stanju. Če je v paketu vodni led, je treba preprečiti odtekanje vode. Noben paket z vzorci, za katere obstaja sum, da vsebujejo virus vezikularne bolezni prašičev, se ne sme odpreti od takrat, ko zapusti okužene prostore, dokler ne prispe v laboratorij.

5. Vzorci, za katere obstaja sum, da vsebujejo virus vezikularne bolezni prašičev, se lahko analizirajo samo v laboratoriju, ki je pooblaščen, da v diagnostične namene dela z virusom vezikularne bolezni prašičev, v skladu z zakonodajo Skupnosti o nadzoru slinavke in parkljevke, razen če slinavka in parkljevka ni bila že prej izključena.

6. Vsi vzorci se lahko prevažajo pri 4 °C, če je predvideni čas za prevoz do ciljnega laboratorija manj kot 48 ur, sicer jih je treba hraniti na temperaturi, ki ni višja od – 20 °C.

7. Za vzorce, namenjene v referenčni laboratorij Skupnosti iz držav članic, razen iz Združenega kraljestva, je edini dovoljeni način prevoza z letalom do letališč London-Heathrow ali London-Gatwick. Pred oddajo pošiljke je treba prek telefaksa ((44-1483) 23 26 21) ali prek elektronske pošte obvestiti laboratorij o podatkih glede leta, datumu, pričakovanem času prihoda in številki letalske pošiljke, tako da je ob prihodu mogoče najti paket. Paket mora biti naslovljen na:

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

   Na oznaki morajo biti tudi naslednje informacije: „Živalski patološki material brez trgovinske vrednosti. Pokvarljivo. Lomljivo. Na letališču prevzame naslovnik. Ne odpirajte izven laboratorija. (Animal pathological material of no commercial value. Perishable. Fragile. To be collected at airport by addressee. Not to be opened outside the laboratory.)“.

   Osebje referenčnega laboratorija Skupnosti izvede pooblaščen dvig pošiljk na letališču, s pomočjo posebnega splošnega uvoznega dovoljenja, ki ga je za ta namen izdalo Ministrstvo Združenega kraljestva za kmetijstvo, prehrano in ribolov. Gre za stalen ukrep, zato ni potrebno ločeno dovoljenje za vsak uvoz. Ročen vnos sumljivega vezikularnega materiala v Združeno kraljestvo s strani nepooblaščenega osebja je prepovedan. Uporaba kurirskih podjetij ni dovoljena.

8. Prevoz vzorcev do nacionalnih laboratorijev mora biti v skladu z navodili, ki jih določijo pristojni organi držav članic.

POGLAVJE IV

Postopki vzorčenja na gospodarstvu s klinično sumljivimi prašiči

1. Kadar obstaja sum, da je na gospodarstvu prisoten virus vezikularne bolezni prašičev, ker so bili ugotovljeni klinični znaki bolezni, je treba odvzeti ustrezne vzorce od reprezentativnih skupin prašičev, ki kažejo takšne znake, za potrditev bolezni in diferencialno diagnostiko v zvezi s slinavko in parkljevko.

2. Na teh gospodarstvih so najprimernejši vzorci za diagnostiko epitelij in vezikularna tekočina iz veziklov, ki še niso počili, ali so počili pred kratkim, odvzeti prašičem, ki kažejo značilne znake bolezni, v katerih je mogoče dokazati virus vezikularne bolezni prašičev, njegov antigen ali genom. Priporočljivo je odvzeti vzorce petim ali šestim prašičem.

3. Tudi če sta sveže epitelijsko tkivo in vezikularna tekočina na razpolago v dovolj veliki količini (1 g ali več), je treba odvzeti tudi naslednje vzorce:

   (a) vzorce krvi sumljivih prašičev in prašičev v stiku za serološko testiranje; in

   (b) vzorce fecesa s sumljivih prašičev in s tal njihovega boksa ali sosednjih boksov za virološko testiranje.

4. Vzorce je treba odvzeti in prepeljati v skladu z naslednjimi postopki:

   (a) za vzorce epitelija in vezikularne tekočine:

   — če je mogoče, vsaj 1 g epitelijskega tkiva iz vezikla, ki še ni počil, ali je počil pred kratkim. Pred odvzemom vzorcev je prašičem priporočljivo dati pomirjevalo, da se izognemo poškodbam osebja, pa tudi zaradi dobrobiti prašičev,

   — če se prevoz v nacionalni laboratorij opravi takoj (manj kot v treh urah), se lahko vzorci epitelija prepeljejo suhi in ohlajeni. Vendar pa je treba vzorce, če obstaja možnost, da bo čas prevoza daljši kot tri ure, položiti v manjšo količino prevoznega medija, sestavljenega iz enakih delov glicerola in 0,04 M fosfatnega pufra ali drugega enakovrednega pufra (npr. Hepes), tako da se pH ohrani v najugodnejšem območju za preživetje virusa slinavke in parkljevke (pH od 7,2 do 7,6). Prevozni medij mora vsebovati antibiotike za dodatno protimikrobno delovanje. Antibiotiki, ki so primerni in njihova končna koncentracija na ml, so:

     (i) penicilin 1 000 IE,

     (ii) neomicin sulfat 100 IE,

     (iii) polimiksin B sulfat 50 IE,

     (iv) mikostatin (nistatin) 100 IE,

   — če je mogoče odvzeti vezikularno tekočino iz vezikla, ki še ni počil, jo je treba hraniti nerazredčeno v ločeni embalaži;

(b) za vzorce krvi:

— vzorci krvi se lahko odvzamejo za serološke ali virološke teste. Vendar pa se za ugotavljanje protiteles ponavadi odvzamejo samo prašičem, pri katerih obstaja sum, da so preboleli klinično ali subklinično okužbo, ker so pri prašičih, ki kažejo klinične znake bolezni, vzorci epitelija, vezikularne tekočine in fecesa, bolj primerni za dokaz virusa kot krvni vzorci. Priporočljivo je, da se za odvzem vzorcev krvi v celoti uporabijo vakuumske epruvete brez antikoagulantov in da se med prevozom ne odpirajo;

(c) za vzorce fecesa:

— vzorce fecesa s tal prostorov, za katere obstaja sum, da se v njih zadržujejo ali so se zadrževali prašiči, okuženi z vezikularno boleznijo prašičev, ali brise fecesa in vzorce fecesa, odvzete sumljivim živim prašičem, je treba hraniti v odpornih in nepropustnih embalažah.

Zunanjo površino embalaž s sumljivimi vzorci je treba pred prevozom v laboratorij razkužiti. Primerna razkužila so:

— natrijev hidroksid (razredčen v razmerju 1:100),

— formalin (raztopina formalina z vsebnostjo najmanj 34 % formaldehida, razredčena v razmerju 1:9) in

— natrijev hipoklorit (2 % prostega klora).

S temi razkužili je treba ravnati previdno.

POGLAVJE V

Postopki vzorčenja za nadzor nad vezikularno boleznijo prašičev

1. Kadar se serološki nadzor opravlja za naslednje namene:

(a) za nadzor na gospodarstvih, kjer ni nobenega dokaza ali suma, da bi bolezen lahko bila prisotna;

(b) za redni serološki nadzor z vzorčenjem v klavnicah, na trgih, v zbirnih centrih ali na podobnih mestih;

(c) za nadzor brez razlikovanja nad prašiči s poreklom iz drugih držav članic na gospodarstvu, na katero so bili uvoženi,

je treba vzorce krvi za serološko testiranje odvzeti prašičem v skladu z določbami, opredeljenimi v programih ali načrtih nadzora ali izkoreninjenja v okviru Odločbe 90/424/EGS ([1]) ali Direktive 90/425/EGS ([2]) ali, če teh določb ni, v skladu s postopki, ki so jih določili pristojni organi držav članic.

2. Kadar se serološki nadzor opravlja za naslednje namene:

(a) za nadzor nad gospodarstvi, ki se nahajajo na okuženih ali ogroženih območjih, ki so bila določena po potrditvi izbruhov bolezni v skladu s Prilogo II(7) in (8) k Direktivi 92/119/EGS; ali

(b) za nadzor nad gospodarstvi iz člena 9 Direktive 92/119/EGS,

je treba vzorce krvi za serološko testiranje odvzeti prašičem v skladu z naslednjim sistemom:

— v primeru gospodarstev, ki se ukvarjajo z vzrejo plemenskih prašičev, je treba opraviti postopek naključnega vzorčenja, tako da se lahko ugotovi 5 % serološka prevalenca s 95 % zanesljivostjo;

— v primeru gospodarstev, ki redijo samo prašiče pitance, mora postopek vzorčenja zagotoviti, da je celotno število odvzetih vzorcev vsaj enako številu, potrebnemu, da se lahko ugotovi 5 % serološka prevalenca s 95 % zanesljivostjo. V vsakem primeru je treba odvzeti vzorce čimveč naključno izbranim prašičem;

— v primeru gospodarstev, ki se ukvarjajo z vzrejo in pitanjem, je treba odvzeti vzorce vsaki skupini prašičev, ki živijo v ločenih prostorih, tako da se lahko ugotovi 5 % serološka prevalenca s 95 % zanesljivostjo.

POGLAVJE VI

Nadaljnje ukrepanje in postopki ponovnega vzorčenja v primeru ugotovitve serološko pozitivnih prašičev

1. V primeru, ko je na gospodarstvu ugotovljen en sam serološko pozitivni prašič v okviru nadzora iz poglavja V(1)(a) ali V(2), odgovorni organ zagotovi, da:

(a) se na tem gospodarstvu, če še niso bili uporabljeni, uporabijo ukrepi iz člena 4 Direktive 92/119/EGS;

(b) se na gospodarstvu opravi pregled v skladu z določbami iz poglavja II(1);

([1]) UL L 224, 18.8.1990, str. 19.
([2]) UL L 224. 18.8.1990, str. 29.

(c) se odvzamejo vzorci krvi za serološko testiranje:

— sumljivim prašičem,

— prašičem v stiku, ki živijo v istem boksu ali sosednjih boksih s sumljivim prašičem; tem prašičem je treba odvzeti vzorce tako, da se v boksu lahko ugotovi 50 % serološka prevalenca s 95 % zanesljivostjo.

2. Vendar pa se lahko pristojni organ odloči za preklic ukrepov iz 1(a):

(a) če epidemiološko poizvedovanje, opravljeno v skladu s členom 8 Direktive 92/119/EGS, kaže na to, da vezikularna bolezen prašičev ni bila vnesena na gospodarstvo;

(b) če na gospodarstvu niso bili ugotovljeni nobeni klinični znaki vezikularne bolezni prašičev; in

(c) če se gospodarstvo ne nahaja na okuženem ali ogroženem območju, ki je bilo določeno po potrditvi izbruha bolezni, in če za gospodarstvo ne veljajo druge omejitve, ki se uporabljajo po potrditvi izbruha bolezni,

in pod pogojem:

— da noben prašič ne zapusti gospodarstva z namenom, da bi z njim trgovali znotraj Skupnosti; in

— da lahko prašiči zadevno gospodarstvo zapustijo samo, če gredo v klavnico na takojšen zakol ali na drugo gospodarstvo, katerega noben prašič ne zapusti z namenom, da bi z njim trgovali znotraj Skupnosti,

dokler rezultati nadaljnjih pregledov in seroloških testov ne pokažejo, da je vezikularna bolezen prašičev dokončno izključena.

3. Če pregledi in serološki testi, opravljeni v skladu z 1(b) in (c):

(a) dajo negativne rezultate ali če se potrdi, da je pozitiven samo prašič, ki je bil pozitiven že prej (posamezni reaktor), se lahko izključi vezikularna bolezen prašičev. Ukrepi iz 1(a) se prekličejo, razen če se gospodarstvo ne nahaja na okuženem ali ogroženem območju, ki je bilo določeno okrog izbruha bolezni, kjer morajo ukrepi za izkoreninjenje bolezni ostati veljavni v skladu s Prilogo II(7) k Direktivi 92/119/EGS;

(b) kažejo na to, da je na gospodarstvu prisotnih več serološko pozitivnih prašičev, je treba potrditi prisotnost vezikularne bolezni prašičev ali pa v skladu s postopki vzorčenja iz (4) z gospodarstva odvzeti dodatne vzorce, če niso izpolnjeni pogoji za potrditev te bolezni, določeni v Prilogi II(4).

4. V primeru, da po vzorčenju in serološkem testiranju iz poglavja V(1)(a), (1)(c) ali (2) ugotovljenih več serološko pozitivnih prašičev, vendar pri tem niso izpolnjeni pogoji za potrditev vezikularne bolezni prašičev, določeni v Prilogi II(4) k Direktivi 92/119/EGS, pristojni organ zagotovi:

(a) da se uporabljajo ali se naprej uporabljajo določbe iz člena 4 Direktive 92/119/EGS;

(b) da se opravi pregled posestva v skladu z določbami iz poglavja II(1);

(c) da se za serološko testiranje odvzamejo dodatni vzorci krvi serološko pozitivnim prašičem in prašičem v stiku v skladu z 1(c);

(d) da se za serološko testiranje odvzamejo vzorci krvi prašičem iz drugih zgradb na gospodarstvu v skladu s postopkom iz poglavja V(2);

(e) da se odvzame zadostno število vzorcev fecesa za virološke teste:

— serološko pozitivnim prašičem

— s tal boksov, v katerih se nahajajo serološko pozitivni prašiči, in sosednjih boksov,

— iz naključno izbranih boksov iz drugih zgradb na gospodarstvu.

Vzorce fecesa, odvzete v skladu s prvo in drugo alineo zgoraj, je treba čimprej preiskati. V primeru, da so ti vzorci negativni, rezultati seroloških testov pa kažejo na to, da obstaja možnost, da se je virus vezikularne bolezni prašičev razširil na druge zgradbe, je treba preiskati tudi vzorce fecesa, odvzete v skladu s tretjo alineo zgoraj;

Če po teh nadaljnjih pregledih in testih niso izpolnjeni pogoji, določeni v Prilogi II(4) k Direktivi 92/119/EGS, za potrditev prisotnosti vezikularne bolezni prašičev, se serološko pozitivni prašiči ubijejo ali zakoljejo v skladu s določbami iz Priloge II(4)(d) k Direktivi 92/119/EGS. Vendar se, če se izkaže, da so serološko pozitivni tudi drugi prašiči poleg tistih, ki so bili serološko pozitivni pri prejšnjem vzorčenju, nadalje smiselno uporabijo določbe in postopki, določeni v (a), (b), (c), (d) in (e).

5. Brez poseganja v ukrepe iz člena 9 Direktive 92/119/EGS v primeru, da so po opravljenem nadzoru iz poglavja V(1)(b) ugotovljeni eden ali več serološko pozitivnih prašičev, pristojni organ zagotovi:

   (a) da se izvedejo, kadar je to potrebno in izvedljivo, ustrezne nadaljnje preiskave, ki vključujejo odvzem vzorcev, da se potrdi ali ovrže prisotnost vezikularne bolezni prašičev v prostoru, kjer so bili ugotovljeni ti prašiči, ob upoštevanju lokalnih razmer;

   (b) da se na gospodarstvu, s katerega izvirajo ti prašiči, uporabijo ukrepi iz člena 4 Direktive 92/119/EGS;

   (c) da se na gospodarstvu, s katerega izvirajo ti prašiči, opravi pregled v skladu z določbami iz poglavja II(1); in

   (d) da se prašičem z gospodarstva, s katerega izvirajo serološko pozitivni prašiči, odvzamejo krvni vzorci za serološko testiranje v skladu z določbami iz poglavja V(2).

6. Vendar se pristojni organ lahko odloči za preklic ukrepov iz 5(b), če:

   (a) epidemiološko poizvedovanje, opravljeno v skladu s členoma 4 in 8 Direktive Sveta 92/119/EGS, kaže na to, da vezikularna bolezen prašičev ni bila vnesena na gospodarstvo,

   (b) na gospodarstvu niso bili ugotovljeni nobeni klinični znaki vezikularne bolezni prašičev;

   (c) se gospodarstvo ne nahaja na okuženem ali ogroženem območju, ki je bilo določeno po potrditvi izbruha bolezni, in če za gospodarstvo ne veljajo druge omejitve, ki veljajo po potrditvi izbruha bolezni,

   in pod pogojem:

   — da noben prašič ne zapusti gospodarstva z namenom, da bi z njim trgovali znotraj Skupnosti; in

   — da lahko prašiči zadevno gospodarstvo zapustijo samo, če gredo v klavnico na takojšen zakol ali na drugo gospodarstvo, katerega noben prašič ne zapusti z namenom, da bi z njim trgovali znotraj Skupnosti,

dokler rezultati nadaljnjih pregledov in seroloških testov ne pokažejo, da je vezikularna bolezen prašičev dokončno izključena.

POGLAVJE VII

Načela in načini uporabe virusoloških testov ter vrednotenje njihovih rezultatov

A. **Dokaz virusnega antigena**

1. Indirektni test „sendvič“ ELISA je nadomestil test vezanja komplementa kot priporočeno metodo za ugotavljanje virusnega antigena vezikularne bolezni prašičev. Test je enak tistemu, ki se uporablja za diagnozo slinavke in parkljevke. Testa za obe bolezni je treba opraviti istočasno, razen če je bila slinavka in parkljevka že prej izključena. Priporočljivo je preiskati zlasti vzorce epitelija ali tekočine iz vezikularnih sprememb, v katerih sta lahko pri akutno obolelih prašičih v visokem titru prisotna virusa tako vezikularne bolezni prašičev kot tudi slinavke in parkljevke in ju je mogoče dokazati v nekaj urah ([1]).

   Jamice mikrotitrskih plošč testnega kompleta ELISA so prevlečene s kunčjimi protitelesi proti virusu vezikularne bolezni prašičev in proti vsakemu od sedmih serotipov virusa slinavke in parkljevke. To so protitelesa, na katere se veže virusni antigen, če je prisoten v vzorcu. V jamice se doda suspenzije preiskovanih vzorcev. Vključene so tudi ustrezne kontrole. V naslednji fazi se v ustrezne jamice doda homologni budrin serum za detekcijo, nato pa še kunčja anti-budrina protitelesa, konjugirana z encimom, kot je hrenova peroksidaza. Po vsaki fazi se opravi temeljito izpiranje, da se odstranijo nevezani reagenti. Reakcija je pozitivna če se pojavi barvna reakcija potem, ko smo dodali kromogen in substrat. Če je pozitivna reakcija močna, jo je mogoče opaziti s prostim očesom, rezultate pa lahko beremo spektrofotometrično, pri čemer absorbanca nad 0,1 (brez absorbance ozadja) pomeni pozitivno reakcijo.

2. Alternativni testni kompleti ELISA, narejeni na osnovi monoklonskih protiteles, ki vežejo antigen, in s perioksidazo konjugiranih monoklonskih protiteles za detekcijo, se lahko uporabljajo za dokazovanje antigena vezikularne bolezni prašičev in za razločevanje le-te od slinavke in parkljevke v vzorcih epitelija, vezikularni tekočini ali okuženih tkivnih kulturah.

3. Test ELISA, narejen na osnovi monoklonskih protiteles, se lahko uporablja za proučevanje antigenskih variacij med sevi virusa vezikularne bolezni prašičev. Virusne antigene, pridobljene iz tkivne kulture, vežejo kunčja protitelesa proti virusu vezikularne bolezni prašičev, adsorbirana na podlago. Po dodatku različnih serij monoklonskih protiteles, primerjamo njihovo vezavo na seve s terena z vezavo na izvorne seve. Podobna vezava kaže na prisotnost epitopov, ki so skupni izvornim sevom in sevom s terena.

([1]) Pozitivni rezultati testa ELISA se povezujejo s prisotnostjo najmanj 10^5 $TCID_{50}$ (tissue culture infection dosis) virusa v vzorcu.

B. **Izolacija in gojenje virusa**

1. Po rutinskem postopku je treba bistro suspenzijo vzorcev epitela, vezikularne tekočine ali fecesa,za katere se sumi, da vsebujejo virus vezikularne bolezni prašičev, nanesti na občutljive celične kulture. Če sta količina in kakovost vzorcev iz vezikularnih sprememb premajhni za takojšen test ELISA, je treba z gojenjem virusa na tkivni kulturi virusni antigen najprej namnožiti.

2. Za izolacijo in gojenje virusa se bistra suspenzija epitela nanese na enoslojne kulture celic IB-RS-2. Uporabiti je treba dve razredčini suspenzije epitela, eno močno razredčeno (1/500) in eno šibko razredčeno (1/10), da se prepreči zaviranje rasti virusa z interferonom, ki se sprošča. Za izolacijo virusa se gojišču dodajo samo antibiotiki. Za razločevanje od virusa slinavke in parkljevke, je treba preiskovani vzorec nanesti tudi na primarne ščitnične celice goveda ali ledvične celice mladiča hrčka.

3. Če pride do citopatskega efekta, je treba supernatantno tekočino homogeniziranih pozitivnih kultur, ko se efekt konča, preiskati s testom ELISA za identifikacijo virusa. Negativne kulture je treba 48 ali 72 ur po nasajanju nanesti na sveže tkivne kulture in te (t.i. slepe pasaže) preiskati po 72 urah. Če pri nadaljnji slepi pasaži ne pride do citopatskega efekta, se vzorec lahko proglasi kot negativen na prisotnost živega virusa.

4. Suspenzije vzorcev fecesa se lahko preiskujejo kakor je opisano v točki 1. Ker je v fecesu običajno manj virusa kot v epitelu, je bistvenega pomena, da se pri odsotnosti citopatskega efekta po prvih dveh slepih pasažah vključi še tretja slepa pasaža.

5. Hkratna nasaditev materiala na prašičje celične linije in eno od prej navedenih tkivnih kultur (najbolj priporočljivo na primarne ščitnične celice goveda) je uporabna pri določanju, ali vzorci vsebujejo virus vezikularne bolezni prašičev ali virus slinavke in parkljevke, ker virus vezikularne bolezni prašičev raste le v celicah prašičev. Vendar lahko izolati virusa slinavke in parkljevke, ki so dolgo časa krožili med prašiči, tudi raje rastejo v prašičjih celičnih kulturah.

C. **Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za dokaz genoma**

1. Metode prepoznavanja nukleinskih kislin se lahko uporabijo za ugotavljanje prisotnosti genoma vezikularne bolezni prašičev v vzorcih z metodo PCR in za določanje razmerja med izolati virusa vezikularne bolezni prašičev z določanjem nukleotidne sekvence dela genoma. PCR je bila razvita za zvečanje občutljivosti diagnostičnih testov. Opisane so tudi metode PCR z uporabo reverzne transkriptaze (RT-PCR) in začetnih oligonukleotidov, ustrezajočih visoko konzerviranim regijam genov 1C in 1D.

2. Tehnika PCR je hitra (rezultati so običajno na voljo v 24 urah), dokaže vse genotipe virusa vezikularne bolezni prašičev in je dovolj občutljiva za testiranje vzorcev, odvzetih prašičem, pri katerih obstaja sum na klinično obliko bolezni.

3. Če obstaja sum na subklinično okužbo, ali če so vzorci odvzeti potem, ko ni več kliničnih znakov bolezni ali pri preiskovanju vzorcev fecesa, izboljšane RT-PCR tehnike, kot so ugnezdena RT-PCR, imunska-PCR, ELISA-PCR in bolj izdelane metode ekstrakcije RNA nudijo sistem za dokaz antigena, ki je najmanj tako občutljiv, vendar bistveno hitrejši kot je večkratni nanos na tkivno kulturo.

4. Sekveniranje približno 200-ih nukleotidov znotraj gena 1D, ki kodira glavni strukturni protein VP1, je omogoča grupiranje sevov virusa vezikularne bolezni prašičev glede na njihovo homologijo v sekvenci in epidemiološko sorodnost sevov, ki povzročajo bolezni na različnih območjih ali ob različnem času.

D. **Vrednotenje rezultatov virooloških testov**

Dokaz antigena ali genoma virusa vezikularne bolezni prašičev s testoma ELISA in PCR ima enako diagnostično vrednost kot izolacija virusa.

Vendar mora izolacija virusa veljati za referenčni test in jo je treba uporabiti kot potrditveni test, kadar je to potrebno, zlasti če pozitivnega rezultata testa ELISA ali PCR ni mogoče povezati z:

(a) ugotovitvijo kliničnih znakov bolezni,

(b) dokazom serološko pozitivnih prašičev, ali

(c) neposredno epidemiološko povezavo s potrjenim izbruhom.

POGLAVJE VIII

Načela in uporabe seroloških testov ter vrednotenje njihovih rezultatov

A. **Test nevtralizacije virusa (VN)**

1. Za kvantitativni mikrotitrski test VN za ugotavljanje protiteles proti virusu vezikularne bolezni prašičev se uporabljajo celice IB-RS-2 ali enakovredni celični sistem in mikrotitrske plošče za tkivne kulture, katerih jamice imajo ravno dno.

2. Virus gojimo v enoslojnih kulturah celic IB-RS-2 in skladiščimo pri - 20 °C po dodajanju 50 % glicerola ali pri - 70 °C brez glicerola. Pred testiranjem serume inaktiviramo 30 minut pri 56 °C.

B. **Testi ELISA**

1. Test ELISA za dokazovanje protiteles je kompetitivna ELISA na osnovi monoklonskih protiteles. Če vzorec seruma vsebuje protitelesa proti virusu vezikularne bolezni prašičev, je vezava izbranih, s peroksidazo konjugiranih, monoklonskih protiteles na virusni antigen inhibirana.

   Pri tem testu ELISA se antigen virusa vezikularne bolezni prašičev veže na podlago s pomočjo monoklonskih protiteles; sledi inkubacija po dodatku ustrezno razredčenih vzorcev serumov in dodatek s peroksidazo konjugiranih monoklonskih protiteles. Inhibicija vezave monoklonskih protiteles se določa s pomočjo substrata in kromogena.

2. Indirektna ELISA z izotipsko specifičnimi monoklonskimi protitelesi za dokazovanje prašičjih IgG ali IgM, specifičnih za virus vezikularne bolezni prašičev, je v pomoč pri določanju časa okužbe prašiča ali kontaminacije prostora.

   Pri tem testu ELISA je virusni antigen vezan na podlago s pomočjo specifičnih protiteles,. Če vzorec seruma vsebuje protitelesa proti virusu vezikularne bolezni prašičev, se jih dokazuje s pomočjo proti prašičjih monoklonskih protiteles razredov G ali M, konjugiranih s peroksidazo. Ta vezava se določa s pomočjo substrata in kromogena.

   Ta test ELISA je lahko v pomoč pri razločevanju posameznih reaktorjev od resnično okuženih prašičev, kot je navedeno v (C).

C. **Uporaba seroloških testov in vrednotenje rezultatov**

1. Testi VN in ELISA so priporočeni serološki testi. Poglavje X navaja seznam referenčnih serumov, ki so na voljo iz referenčnih laboratorijev Skupnosti, da se znotraj Skupnosti izvajajo standardizirani serološki testi.

   Test VN je treba upoštevati kot referenčne test, vendar ima pomanjkljivosti, in sicer da do njegovega zaključka traja 2 do 3 dni, in da je potrebna ustrezna oprema za tkivne kulture.

   Test ELISA je hitrejši in ga je lažje standardizirati. Monoklonski kompetitivni test ELISA za ugotavljanje protiteles je do sedaj najzanesljivejši test ELISA za dokazovanje protiteles proti virusu vezikularne bolezni prašičev. Priporočen je kot izločitveni test pri velikem številu vzorcev.

   Vendar je treba test VN uporabiti kot potrditveni test, kadar je to potrebno, zlasti po prvi ugotovitvi pozitivnih vzorcev na gospodarstvu. Prašičev, pozitivnih s testom ELISA, vendar negativnih s testom VN, ni treba upoštevati.

2. Lahko se posumi na možnost posameznega reaktorja ([1]), če se ugotovi enega samega serološko pozitivnega prašiča in če so izpolnjeni naslednji pogoji:

   (a) na gospodarstvu ni kliničnih znakov bolezni;

   (b) na gospodarstvu v preteklosti niso bili ugotovljeni klinični znaki bolezni;

   (c) v preteklosti ti prašiči niso prišli v kontakt s prašiči z gospodarstva, poznanega po izbruhu bolezni.

3. Prašič je potrjen posamezni reaktor če:

   (a) nadaljnje testiranje ne ugotovi drugih serološko pozitivnih prašičev;

   (b) vzorčenje pri prašičih v stiku po prvi ugotovitvi singleton reaktor-ja ne ugotovi serološke konverzije;

   (c) pri ponovljenem vzorčenju ostane titer protiteles konstanten ali upada.

([1]) Majhen delež posameznih reaktorjev se lahko ugotovi s katerim koli veljavnim serološkim testom na vezikularno bolezen praičev. Dejavniki, odgovorni za posamezne reaktorje, so neznani. Serološka navzkrižna reaktivnost z virusom vezikularne bolezni prašičev je lahko posledica okužbe z drugim, do sedaj še neznanim picornavirusom, ali drugih, nespecifičnih dejavnikov, prisotnih v serumu.

4. Vendar morajo biti za potrditev posameznega reaktorja proučena še naslednja dodatna merila in načela:

(a) pojavnost posameznih reaktorjev je približno 1 na 1 000 prašičev;

(b) serumi posameznih reaktorjev imajo na splošno naslednji profil:

— nizek titer protiteles pri testu VN,

— mejno pozitivni pri monoklonskem kompetitivnem testu ELISA za dokazovanje protiteles,

— Pri izotipsko pecifičnem testu ELISA ([1]) ugotovimo izključno IgM, ne pa tudi IgG

POGLAVJE IX

Klinični znaki in značilnosti vezikularne bolezni prašičev

Vezikularna bolezen prašičev je nalezljiva bolezen prašičev, ki jo povzroča enterovirus iz družine picornaviridae, in lahko poteka v subklinični, blagi ali hudi obliki, odvisno od seva virusa, ki jo povzroča, od mesta okužbe in količine virusa ter pogojev, v katerih se živali nahajajo. Dodatni dejavniki stresa, kot so transport, mešanje z drugimi prašiči in temperaturni ekstremi lahko vodijo k nastanku kliničnih znakov.

Zanjo je značilna nekoliko povečana telesna temperatura in vezikule na koronarnem robu parkljev, koži nog in manj pogosto na rilcu, ustnicah, jeziku in seskih. Obolevnost je lahko do 100 %, vendar je smrtnost zelo nizka ali je ni.

Okužba lahko poteka v nejasni ali blagi obliki, ki se kaže le v prehodnem poslabšanju splošnega stanja prašičev, vendar v nekaj dneh pride do nastanka nevtralizirajočih protiteles ([2]).

Zaradi subklinične ali blage narave, se na bolezen pogosto najprej posumi pri seroloških testih za nadzor bolezni ali izdajo izvoznih dovoljenj. Za nedavni evropski izbruh vezikularne bolezni prašičev so bili značilni blagi klinični znaki ali pa teh sploh ni bilo, diagnoza pogosto temelji na seroloških preiskavah.

Klinični znaki vezikularne bolezni prašičev se ne razlikujejo od kliničnih znakov parkljevke in slinavke. Vsako vezikularno stanje je treba v začetku obravnavati kot sum na slinavko in parkljevko, diferencialno diagnozo je treba postaviti čimprej.

Pri posameznih prašičih je inkubacijska doba vezikularne bolezni prašičev od dveh do sedem dni, nato se lahko pojavi prehodno povečana telesna temperatura do 41 °C, vendar na gospodarstvu lahko postanejo klinični znaki opazni šele po daljšem obdobju. Zatem se pojavijo vezikli na koronarnem pasu, običajno na koronarnem robu parklja. Vezikli lahko prizadenejo celoten koronarni pas, kar povzroči sezuvanje parklja. Redkeje se vezikli pojavijo tudi na rilcu, zlasti na hrbtni površini, na ustnicah, jeziku ter seskih, na kolenih je mogoče opaziti plitve razjede. Prizadeti prašiči so lahko šepavi in nekaj dni neječi

Mlajši prašiči so huje prizadeti, vendar je smrtnost pri prašičih zaradi vezikularne bolezni v nasprotju s slinavko in parkljevko zelo nizka.

Opisani so bili tudi živčni znaki, vendar ti niso običajni. Zvrgavanje za vezikularno bolezen prašičev ni značilno. Odpoved srca zaradi multifokalnega miokarditisa se lahko pojavi pri slinavki in parkljevki ter encefalomiokarditisu, zlasti pri mladih pujskih, vendar se pri vezikularni bolezni prašičev ne pojavlja.

Prizadete živali običajno popolnoma ozdravijo v dveh ali treh tednih, edina posledica okužbe je temna, vodoravna črta na parklju, ki kaže na mesto, kjer je bila rast roževine začasno prekinjena.

Okuženi prašiči lahko izločajo virus iz nosu ali ust in s fecesom do 48 ur pred pojavom kliničnih znakov. Virus se najhitreje razmnožuje v prvih sedmih dneh po okužbi, izločanje virusa iz nosu in ust se običajno konča v dveh tednih. Iz fecesa je možno izolirati virus do 20 dni po okužbi, čeprav je bilo opisano, da to lahko traja do tri mesece. Precej dolgo časa se lahko obdrži v nekrotičnem tkivu počenih veziklov ter v fecesu.

([1]) Specifične IgG same ali skupaj z IgM se običajno ugotovi v vzorcih serumov prašičev, okuženih z virusom vezikularne bolezni prašičev, medtem ko serum posameznega reaktorja običajno vsebuje samo IgM. Specifičnih IgG se ne ugotovi v vzorcih serumov prašičev, ki so bili okuženi z virusom vezikularne bolezni prašičev v predhodnih 10 do 14 dneh, vendar bi specifični IgG morali biti ugotovljeni v serumih po drugem vzorčenju. Vendar pa nedavno okuženih prašičev ni mogoče zanesljivo razločiti od posameznih reaktorjev, dokler med imunskim odzivom ne pride do preklopa imunoglobulinskega razreda od IgM k IgG. Glej tudi Poglavje IX in opombo pod črto t. 7.

([2]) Specifične IgM se običajno lahko dokaže v krvi dva do tri dni po okužbi in izginejo po približno 30 do 50 dneh; specifične IgG se običajno lahko dokaže v krvi 10 do 14 dni po okužbi in se obdržijo nekaj let. Izotip imunoglobulinov se lahko določi s pomočjo testa ELISA, opisanega v Poglavju VIII(B)(2).

POGLAVJE X

Referenčni serumi za diagnostiko vezikularne bolezni prašičev

Referenčni serum	Izvor	Opomba (1)
1	Normalni prašičji serum (NPS)	Negativni kontrolni serum
2	Serum, odvzet prašiču 21 dni po okužbi (dpu) s sevom UKG 27/72 (čistim) virusa vezikularne bolezni prašičev	Močno pozitivni kontrolni serum
3	Razredčitev 1:10 seruma v NPS, odvzetega prašiču pet dpu, s sevom Italy 8/94 virusa vezikularne bolezni prašičev	Šibko pozitivni serum prašiča kmalu po infekciji z izolatom nedavne evropske vezikularne bolezni prašičev. Serum je razredčen, zato da daje šibke pozitivne rezultate pri testu ELISA in VN.
4	Razredčitev 1:10 seruma, odvzetega prašiču 21 dpu, s sevom UKG 27/72 virusa vezikularne bolezni prašičev	Šibko pozitivni serum, ki določa najnižji titer protiteles, ki naj bi ga EU Nacionalni referenčni laboratoriji s testoma ELISA in VN dosledno šteli za pozitivnega. Ekvivalenten serumu RS 01-04-94 (2)
5	Serum, odvzet prašiču štiri dpu s sevom UKG 27/72 (čistim) virusa vezikularne bolezni prašičev	Šibko pozitivni serum prašiča kmalu po okužbi.
6	Serum, odvzet prašiču pet dpu s sevom UKG 27/72 (čistim) virusa vezikularne bolezni prašičev	Šibko pozitivni serum prašiča kmalu po okužbi.

(1) Te opombe se nanašajo na testiranje posameznih prašičev. Za nadzor serumov je treba upoštevati občutljivost testa.
(2) t.j. serum s titrom protiteles, dovolj večjim od mejne vrednosti, ki naj bi vedno dala pozitiven rezultat pri ponovljenem testiranju s testom ELISA ali VN.