

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

3019

Na temelju članka 17. stavka 3. Zakona o veterinarstvu (»Narodne novine«, broj 41/07)
ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

PRAVILNIK

O UTVRĐIVANJU DIJAGNOSTIČKOG POSTUPKA, METODA UZIMANJA UZORAKA I KRITERIJA ZA VREDNOVANJE REZULTATA LABORATORIJSKIH TESTOVA ZA POTVRĐIVANJE I DIFERENCIJALNO DIJAGNOSTICIRANJE VEZIKULARNE ENTEROVIRUSNE BOLESTI SVINJA¹

Područje primjene

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom utvrđuje dijagnostički postupak, metode uzimanja uzoraka i kriteriji za vrednovanje rezultata laboratorijskih testova za potvrđivanje i diferencijalno dijagnosticiranje vezikularne enterovirusne bolesti svinja.

Članak 2.

1) Otkrivanje vezikularne enterovirusne bolesti svinja i diferencijalno dijagnosticiranje slinavke i šapa temelji se na:

- (a) utvrđivanju kliničkih znakova bolesti;
- (b) dokazivanju virusa, antigena ili genoma u uzorcima epitelnoga tkiva, tekućine iz vezikula ili fecesa;
- (c) utvrđivanju reakcije specifičnih protutijela u uzorcima seruma, u skladu s postupcima, metodama uzimanja uzoraka i kriterijima za procjenu rezultata laboratorijskih testova utvrđenim u Priručniku o dijagnostičkim postupcima, metoda uzimanja uzoraka i kriterijima za procjenu rezultata laboratorijskih testova za dokazivanje i diferencijalno dijagnosticiranje vezikularne enterovirusne bolesti svinja (u daljnjem tekstu: Priručnik) iz Dodatka ovoga Pravilnika.

2) Osim odredbi iz stavka 1. ovoga članka Nacionalni dijagnostički laboratorij naveden u Dodatku II. Dijelu 5. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)² mogu primijeniti i prilagođene laboratorijske testove navedene u Priručniku iz Dodatka ovoga Pravilnika ili koristiti druge testove pod uvjetom da oni osiguravaju jednaku osjetljivost i specifičnost.

3) Osjetljivost i specifičnost prilagođenih ili drugih testova navedenih u stavku 2. ovoga članka mora se procijeniti u okviru redovitih usporednih testova koje organizira referentni laboratorij Europske zajednice za vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

Prijelazne i završene odredbe

Članak 3.

Dodatak je tiskan u prilogu ovoga Pravilnika i njegov je sastavni dio.

Članak 4.

Posebni propis iz Dodatka Poglavlja V. točke 1. podtočke (c) bit će donesen do 30. prosinca 2008. godine.

Stupanje na snagu

Članak 5.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u »Narodnim novinama«.

Klasa: 011-02/08-01/13
Urbroj: 525-6-08-1
Zagreb, 22. srpnja 2008.

Ministar
mr. sc. Božidar Pankreć, v. r.

¹ Pravilnikom se preuzimaju odredbe Odluke Komisije br. 2000/428/EZ od 4. srpnja 2000. godine kojom se utvrđuje dijagnostički postupak, metode uzimanja uzoraka i kriteriji za procjenu rezultata laboratorijskih ispitivanja za dokazivanje i diferencijalno dijagnosticiranje vezikularne enterovirusne bolesti svinja.

² Dodatkom II. Dijelom 5. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe Dodatka II. Dijela 5. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

DODATAK

**PRIRUČNIK O DIJAGNOSTIČKIM POSTUPCIMA, METODA UZIMANJA
UZORAKA I KRITERIJIMA ZA PROCJENU REZULTATA
LABORATORIJSKIH TESTOVA ZA DOKAZIVANJE I DIFERENCIJALNO
DIJAGNOSTICIRANJE VEZIKULARNE ENTEROVIRUSNE BOLESTI
SVINJA**

POGLAVLJE I.

Uvod, ciljevi i značenje pojmova

1. Ovaj Priručnik:

(a) utvrđuje smjernice i minimalne zahtjeve dijagnostičkoga postupka, metode uzimanja uzoraka i kriterije procjene rezultata laboratorijskih testova za točno dijagnosticiranje vezikularne enterovirusne bolesti svinja, pri čemu se posebna važnost posvećuje diferencijalnom dijagnosticiranju slinavke i šapa;

(b) obuhvaća odredbe Dodatka II. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim

mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)³, a posebno Dijelova 4., 7. i 8. navedenog Dodatka;

(c) namijenjen je uglavnom nadležnim tijelima odgovornim za kontrolu vezikularne enterovirusne bolesti svinja. Stoga je naglasak na načelima i primjenama laboratorijskih testova i procjeni njihovih rezultata, a ne na pojedinim laboratorijskim tehnikama.

2. Za potrebe ovoga Priručnika primjenjuju se sljedeći pojmovi:

(a) »serološki pozitivna svinja« je svinja u čijem serumu je virus neutralizacijskim testom, koji se primjenjuje u nacionalnom laboratoriju, utvrđen titar specifičnih protutijela jednak ili viši od titra specifičnih protutijela referentnog seruma 4 vezikularne enterovirusne bolesti svinja navedenog u Poglavlju X. ovoga Dodatka;

(b) »nespecifični reaktor« (engl. singleton reactor) je bilo koja pojedinačna serološki pozitivna svinja na gospodarstvu, u koje je serološki test za vezikularnu enterovirusnu bolest svinja polučio pozitivan rezultat, a za koju se zna da nije bila u dodiru s virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja, niti ima dokaza da je s nje zaraza prenesena na druge svinje s kojima je bila u kontaktu. Serološki pozitivna svinja potvrđuje se kao nespecifični reaktor, ako su ispunjeni uvjeti navedeni u Poglavlju VIII. Dijelu C ovoga Dodatka;

(c) »svinje u kontaktu« su svinje koje su izravno u kontaktu, ili su bile u izravnom kontaktu tijekom posljednjih 28 dana, s jednom ili više serološki pozitivnih svinja ili s jednom ili više svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja. Svinje u kontaktu mogu biti, ili su mogle biti u istom boksu ili u susjednim boksovima, ukoliko postoji mogućnost izravnog kontakta svinja između boksova.

(d) »nadležno tijelo« je Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.

³ Dodatkom II. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe Dodatka II. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu bolest svinja.

POGLAVLJE II.

Smjernice za pretragu svinja koje pokazuju kliničke znakove vezikularne enterovirusne bolesti svinja

1. Službeni veterinar pri sumnji na prisutnost vezikularne enterovirusne bolesti svinja mora na gospodarstvu što prije pretražiti statistički značajan broj svinja, kako bi se otkrili klinički simptomi bolesti navedeni u Poglavlju IX. ovoga Dodatka.

2. U slučaju kad svinje pokazuju kliničke znakove koji ukazuju na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja ili slinavku i šap, mora se provesti, što je prije moguće, odgovarajuće uzorkovanje i laboratorijsko testiranje u svrhu diferencijalnog dijagnosticiranja, u skladu s odredbama navedenim u Poglavljima IV., VII. i VIII. ovoga Dodatka.

POGLAVLJE III.

Opći postupci uzorkovanja i prijevoza uzoraka

1. Bilo koja osoba koja ulazi ili izlazi s gospodarstva na kojem je postavljena sumnja na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja, mora se pridržavati najstrožih higijenskih mjera potrebnih da se smanji opasnost od kontaminacije ili širenje virusa.

2. Sve svinje od kojih se uzimaju uzorci moraju biti označene na propisani način tako da se uvijek mogu identificirati u slučaju ponovnoga uzimanja uzoraka. Preporuča se da se zabilježi lokacija svake svinje na gospodarstvu od koje je uzet uzorak, kao i identifikacijska oznaka, osobito ako je uzet uzorak od svinje sumnjive na bolest.

3. Uzorci se moraju dostaviti u laboratorij uz odgovarajuće popratne obrasce, koji uključuju

pojediniosti o povijesti bolesti svinja od kojih su uzeti uzorci kao i uočeni klinički znakovi, ako postoje.

4. Budući da svaka pojava vezikula kod svinja može biti i slinavka i šap, moraju se poduzeti posebne mjere sigurnosti pri pakiranju uzoraka za koje postoji sumnja na zarazu, a u svrhu sprječavanja loma ili prolijevanje posuda zbog opasnosti od zaraze, te se također mora osigurati da uzorci stignu u odgovarajućem stanju. Ako se za pakiranje koristi led, mora se spriječiti prolijevanje vode. Posude s uzorcima za koje se sumnja da sadrže virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja ne smiju se otvarati nakon napuštanja zaraženih prostora i dok ne stignu u laboratorij.

5. Uzorci za koje se sumnja da sadrže virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja moraju biti analizirani samo u laboratoriju ovlaštenom za izdvajanje virusa slinavke i šapa u dijagnostičke svrhe, u skladu s propisima o kontroli bolesti slinavke i šapa, osim ako slinavka i šap već nije isključena.

6. Svi se uzorci mogu prenositi pri temperaturi od 4 °C ako je očekivano vrijeme prijevoza do laboratorija kraće od 48 sati, u protivnom se moraju pohraniti pri temperaturi ne višoj od -20 °C.

7. Za uzorke koji se upućuju u referentni laboratorij Zajednice jedina dopuštena metoda prijevoza je zrakoplovom do zračnih luka London (Heathrow) ili London (Gatwick). Prije slanja pošiljke laboratorij se mora obavijestiti faksom ((44-1483) 23 26 21) ili elektronskom poštom o pojedinostima leta, datumu, očekivanom vremenu dolaska i broju tovarnog lista u zračnom prometu, tako da se pošiljka može pronaći po dolasku.

Pošiljka se mora adresirati na:

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory,
Community Reference Laboratory for swine vesicular disease
Ash Road, Pirbright, Woking,
Surrey GU24 0NF
United Kingdom, UK

Sljedeće informacije moraju se navesti na etiketi: »Patološki materijal životinjskoga podrijetla bez komercijalne vrijednosti. Pokvarljivo. Lomljivo. Primatelj preuzima u zrakoplovnoj luci. Ne smije se otvarati izvan laboratorija.«

Osoblje Referentnog laboratorija Zajednice ovlašteno je za preuzimanje pošiljke u zrakoplovnoj luci prema posebnoj općoj uveznoj dozvoli koju u tu svrhu izdaje Ministarstvo poljoprivrede, hrane i ribarstva Ujedinjene Kraljevine. To je ustaljeni postupak i posebna dozvola nije potrebna za svaki pojedini slučaj uvoza. Zabranjen je prijenos u Ujedinjenu Kraljevinu uzoraka za koje se sumnja da sadrže vezikularni materijal u ručnoj prtljazi od strane neovlaštenog osoblja. Ne smiju se koristiti dostavne kurirske službe.

8. Prijevoz uzoraka u nacionalne laboratorije mora se provesti u skladu s uputama nadležnog tijela.

POGLAVLJE IV.

Postupci uzorkovanja na gospodarstvu s klinički sumnjivim svinjama

1. Kad se na temelju uočenih kliničkih znakova bolesti posumnja na prisutnost virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja na gospodarstvu, moraju se prikupiti odgovarajući uzorci od reprezentativne skupine svinja koja pokazuje te znakove, kako bi se potvrdila bolest i diferencijalnim dijagnosticiranjem isključila slinavka i šap.

2. Na tim gospodarstvima za postavljanje dijagnoze najprimjereniji uzorci su epitelno tkivo i vezikularna tekućina iz neprobušenih ili netom probušenih vezikula uzetih od svinja koje pokazuju tipične znakove bolesti, u kojima se može utvrditi virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja, njegovi antigeni ili genom. Preporuča se uzimanje uzoraka od pet ili šest takvih

svinja.

3. Čak kad su svježe epitelno tkivo i vezikularna tekućina na raspolaganju u dovoljnoj količini (1 g ili više), moraju se također uzeti i sljedeći uzorci:

(a) krv svinja za koje se sumnja da su zaražene, kao i svinja koje su bile u kontaktu, za serološko testiranje; i

(b) feces svinja za koje se sumnja da su zaražene, kao i uzorci s poda iz njihovih boksova i susjednih boksova za virološko testiranje.

4. Uzorci se moraju prikupljati i prevoziti u skladu sa sljedećim postupcima:

4.1. za uzorke epitelnog tkiva i vezikularne tekućine:

a) ako je moguće, mora se uzeti najmanje 1 g epitelnoga tkiva iz neprobušene ili netom probušene vezikule. Preporuča se da se radi zaštite životinja i izbjegavanja povreda osoblja, prije uzimanja uzoraka svinjama da umirujuće sredstvo.

b) ako se uzorci odmah prevoze u nacionalni laboratorij (manje od tri sata), uzorci epitelnoga tkiva mogu se prevoziti suhi i u hladnjaku. Međutim, ako je vjerojatno da će prijevoz trajati više od tri sata, uzorci se moraju staviti u malu količinu transportnog medija koji sadrži jednake dijelove glicerola i 0,04 M fosfatnog pufera ili drugog odgovarajućeg pufera (npr. HEPES), kako bi se pH vrijednost održala na optimalnoj razini za preživljavanje virusa svinjke i šapa (pH od 7,2 do 7,6). Transportni medij mora sadržavati antibiotike za antimikrobno djelovanje. Pogodni antibiotici i njihova krajnja koncentracija po ml su:

– penicilin 1000 IJ,

– neomicin sulfat 100 IJ,

– polimiksin B sulfat 50 IJ,

– mikostatin 100 IJ,

c) ako je moguće vezikularnu tekućinu uzeti iz neprobušene vezikule, ona se mora pohraniti nerazrijeđena u posebnim spremnicima za slanje;

4.2. za uzorke krvi: uzorci krvi se mogu uzeti za serološka ili virološka testiranja. Za dokazivanje protutijela u pravilu se prikupljaju uzorci samo od svinja za koje se sumnja da su preboljele kliničku ili subkliničku infekciju, jer su epitelno tkivo, vezikularna tekućina i uzorci fecesa svinja koje pokazuju kliničke znakove bolesti pogodnije za otkrivanje virusa od uzoraka krvi. Preporučuje se da se uzimaju uzorci pune krvi uz uporabu vakuumskih epruveta bez antikoagulansa, te da se vakuumske epruvete ne otvaraju za vrijeme prijevoza;

4.3. za uzorke fecesa:

– uzorci fecesa s poda prostorija u kojima borave ili su boravile svinje zaražene virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja, ili obrisci fecesa i uzorci fecesa živih svinja za koje se sumnja da su zaražene, moraju se staviti u čvrste, nepropusne spremnike.

Spremnici s uzorcima za koje se sumnja da su zaraženi virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja, moraju se prije prijevoza u laboratorij izvana dezinficirati. Odgovarajući dezinficijensi su:

– natrijev hidroksid (razrijeđen u omjeru 1:100),

– formalin (u omjeru 1:9 razrijeđena otopina formalina koja sadrži najmanje 34 % formaldehida), i

– natrijev hipoklorit (2 % raspoloživog klora).

Navedenim dezinfekcijskim sredstvima mora se oprezno rukovati.

POGLAVLJE V.

Postupci uzorkovanja za serološko nadziranje vezikularne enterovirusne bolesti svinja

1. Kad se serološko nadziranje provodi u sljedeće svrhe:

(a) za nadziranje na gospodarstvima na kojima nema dokaza ili sumnje da bi bolest mogla biti prisutna;

(b) za nadziranje u klaonicama, stočnim sajmovima, sabirnim centrima ili sličnim mjestima rutinskim uzimanjem uzoraka za serološko pretraživanje;

(c) nediskriminirajućeg nadziranja svinja podrijetlom iz država članica Europske unije (u daljnjem tekstu: države članice) na gospodarstvu na koje su uvezene, uzorci krvi za serološko testiranje moraju se uzimati od svinja u skladu s odredbama utvrđenim u programima ili planovima za praćenje ili iskorjenjivanje odobrenih u skladu s odredbama Zakona o veterinarstvu (»Narodne novine«, broj 41/07)⁴ ili posebnog propisa o veterinarskim i zootehničkim kontrolama određenih živih životinja i proizvoda⁵, ili u skladu s postupkom koje je utvrdilo nadležno tijelo.

2. Kad se serološko nadziranje provodi u sljedeće svrhe:

(a) za nadziranje gospodarstava smještenih unutar zaraženih i ugroženih zona, koje su određene nakon potvrde izbijanja bolesti u skladu s Dodatkom II. Dijelovima 7. i 8.

Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)⁶; ili

(b) za nadziranje gospodarstava navedenih u članku 9. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)⁷,

2.1. Uzorci krvi za serološko testiranje moraju se uzimati od svinja u skladu sa sljedećim:

– u slučaju gospodarstava koja se bave uzgojem za rasplod, postupak nasumičnog uzimanja uzoraka mora se provoditi na način koji osigurava otkrivanje 5% prevalencije serokonverzije s 95%-tnom sigurnošću;

– u slučaju gospodarstava koja drže svinje samo za tov, postupak uzimanja uzoraka mora osigurati da je ukupan broj uzetih uzoraka barem jednak broju koji je potreban da se otkrije prevalencija od 5% s 95%-tnom sigurnošću. U svakom slučaju uzorci se moraju uzeti iz što je više moguće nasumce odabranih boksova;

– u slučaju miješanih gospodarstava koja se bave uzgojem za rasplod i tovom, od svake skupine svinja mora se uzeti toliko uzoraka koliko je potrebno da se otkrije 5%-tna prevalencija serokonverzije s 95%-tnom sigurnošću.

⁴ Odredbe Odluke Vijeća 90/424/EEZ o troškovima na području veterinarstva, izravno će se primijeniti danom pristupanja Republike Hrvatske Europskoj uniji

⁵ Posebnim će se propisom preuzeti odredbe Direktive Vijeća 90/425/EEZ od 26. lipnja 1990. o veterinarskim i zootehničkim kontrolama koje se primjenjuju u trgovini određenim živim životinjama i proizvodima unutar Zajednice u cilju uspostave unutrašnjeg tržišta

⁶ Dodatkom II. Dijelovima 7. i 8. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe Dodatka II. Dijelova 7. i 8. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

⁷ Člankom 9. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe članka 9. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

POGLAVLJE VI.

Daljnje aktivnosti i postupci ponovnog uzimanja uzoraka u slučaju otkrivanja seropozitivnih svinja

1. Ako se na gospodarstvu provodeći nadziranje u skladu s Poglavljem V. točkom 1. podtočkom (a) ili Poglavljem V. točkom 2 ovoga Dodatka otkrije samo jedna seropozitivna

svinja, nadležno tijelo mora osigurati da se:

(a) ukoliko već nisu primijenjene, na gospodarstvu provedu mjere navedene u članku 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)⁸;

(b) na gospodarstvu provede pregled u skladu s odredbama navedenim u Poglavlju II. točki 1. ovoga Dodatka;

(c) uzmu uzorci krvi za serološko testiranje od:

– sumnjive svinje,

– svinja koje su bile u kontaktu, a koje žive u istom ili susjednim boksovima; od tih svinja uzorci se uzimaju na način da se u boksu može otkriti 50%-tna prevalencija serokonverzije s 95%-tnom sigurnošću.

2. Iznimno, nadležno tijelo može donijeti odluku o ukidanju mjera navedenih u točki 1.

podtočki (a) ovoga Poglavlja, ukoliko:

(a) iz epidemiološkog istraživanja provedenog u skladu s člankom 8. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)⁹, proizlazi da vezikularna enterovirusna bolest svinja nije unesena na gospodarstvo;

(b) na gospodarstvu nisu utvrđeni klinički znakovi vezikularne enterovirusne bolesti svinja; i

(c) se gospodarstvo ne nalazi u ugroženoj zoni ili zoni pod ograničenjem, koja je uspostavljena nakon potvrde o izbijanju bolesti, ili nije predmet drugih ograničenja koja se primjenjuju u odnosu na potvrđeno izbijanje bolesti,

i pod uvjetom da:

– nijedna svinja ne napusti gospodarstvo u svrhu stavljanja u promet na područje država članica; i

– se svinje s odnosnog gospodarstva premještaju samo u klaonicu na neodgodivo klanje ili na neko drugo gospodarstvo s kojega svinje isto tako neće biti stavljene u promet na području država članica, sve dok se na osnovi rezultata daljnjih provjera i seroloških testiranja ne dokaže da se u potpunosti može isključiti sumnja na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

3. Ako provjere i serološka testiranja provedena u skladu s točkom 1. podtočkama (b) i (c) ovoga Poglavlja:

(a) daju negativne rezultate ili se pozitivan nalaz potvrdi samo kod jedne, prethodno pozitivne svinje (»nespecifični reaktor«), vezikularna enterovirusna bolest svinja može se isključiti.

Mjere navedene u točki 1. podtočki (a) ovoga Poglavlja se ukidaju, osim ako se gospodarstvo nalazi u zaraženoj ili ugroženoj zoni određenoj oko mjesta izbijanja bolesti u kojoj mjere za iskorjenjivanje bolesti u skladu s Dodatkom II. Dijelom 7. ili 8. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹⁰ moraju ostati na snazi.

(b) pokažu da je na gospodarstvu prisutno više od jedne serološki pozitivne svinje, ili vezikularna enterovirusna bolest svinja mora biti potvrđena, ili ako nisu ispunjeni uvjeti iz Dodataka II. Dijela 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹¹, kojima se potvrđuje prisutnost bolesti, na gospodarstvu se moraju uzeti daljnji uzorci u skladu s postupkom uzimanja uzoraka navedenom u točki 4. ovoga Poglavlja.

4. Ukoliko se na gospodarstvu otkrije više od jedne seropozitivne svinje nakon uzimanja uzoraka i seroloških testiranja navedenih u Poglavlju V. točki 1. podtočkama (a) i (c) ili Poglavlju V. točki 2. ovoga Dodatka, a nisu ispunjeni uvjeti predviđeni u Dodatku II. Dijelu 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹², kojima se potvrđuje vezikularna enterovirusna bolest svinja, nadležno tijelo mora osigurati da se:

(a) primjene, ili se nastave primjenjivati, odredbe navedene u članku 4. Pravilnika o kontroli

određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹³;

(b) na gospodarstvu provede kontrola u skladu s odredbama navedenim u Poglavlju II. točki 1. ovoga Dodatka;

(c) za serološka testiranja uzmu dodatni uzorci krvi od seropozitivnih svinja i svinja koje su bile u kontaktu, u skladu s točkom 1. podtočkom (c) ovoga Poglavlja;

(d) za serološka testiranja uzmu uzorci krvi od svinja iz drugih objekata na gospodarstvu, u skladu s postupkom navedenim u Poglavlju V. točki 2. ovoga Dodatka;

(e) uzme dovoljan broj uzoraka fecesa za virološka testiranja:

– od seropozitivnih svinja,

– s podova boksova u kojima su seropozitivne svinje i iz susjednih boksova,

– iz nasumično odabranih boksova iz drugih objekata na gospodarstvu.

Uzorci fecesa prikupljeni u skladu s alinejom prvom i drugom ove podtočke moraju se pretražiti što je prije moguće. Ukoliko su ti uzorci negativni, ali se na temelju rezultata seroloških testiranja sumnja da se vezikularna enterovirusna bolest svinja možda proširila i na druge objekte, također se moraju testirati uzorci fecesa prikupljeni u skladu s alinejom trećom ove podtočke;

Ako na temelju dodatnih provjera i testiranja još uvijek nisu zadovoljeni uvjeti iz Dodataka II. Dijela 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹⁴, kojima se potvrđuje prisutnost vezikularne enterovirusne bolesti svinja, seropozitivne svinje moraju biti usmrćene ili zaklane, u skladu s odredbama iz Dodataka II. Dijela 4. točke (d) Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹⁵. Međutim, ako se utvrdi da su i druge svinje seropozitivne, dodatno onima za koje se već dokazalo da su seropozitivne u prethodnom uzimanju uzoraka, odredbe i postupci predviđeni u podtočkama (a), (b), (c) (d) i (e) ove točke primjenjuju se i dalje mutatis mutandis.

5. Ne dovodeći u pitanje mjere predviđene u članku 9. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹⁶, u slučaju da se utvrdi da je jedna ili više svinja seropozitivna nakon provedbe aktivnosti nadziranja navedenih u Poglavlju V. točki 1. podtočkama (b) ili (c) ovoga Dodatka, nadležno tijelo mora osigurati da se:

(a) provedu, kad je to potrebno i moguće, daljnje odgovarajuće kontrole uključujući uzimanje uzoraka, kako bi se potvrdila ili isključila sumnja na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja na mjestima na kojima su te svinje otkrivene, uzimajući u obzir stanje u lokalnom okruženju;

(b) na gospodarstvu s kojeg potječu svinje provedu mjere navedene u članku 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹⁷;

(c) na gospodarstvu s kojeg potječu svinje provedu kontrole u skladu s odredbama navedenim u Poglavlju II. točki 1. ovoga Dodatka; i

(d) se od svinja na gospodarstvu, s kojega potječu seropozitivne svinje, prikupe uzorci krvi za serološko testiranje u skladu s odredbama navedenim u Poglavlju V. točki 2. ovoga Dodatka;

6. Nadležno tijelo može donijeti odluku o ukidanju mjera iz točke 5. podtočke (b) ovoga Poglavlja, ako:

(a) se na temelju epidemiološkog istraživanja provedenog u skladu s člancima 4. i 8.

Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07)¹⁸ može zaključiti da vezikularna enterovirusna bolest svinja nije unesena na gospodarstvo;

(b) na gospodarstvu nisu otkriveni klinički znakovi vezikularne enterovirusne bolesti svinja;

(c) se gospodarstvo ne nalazi u ugroženoj ili zoni pod ograničenjem određenoj nakon što je

potvrđeno izbijanje bolesti ili ako za njega ne vrijede druga ograničenja koja se primjenjuju radi potvrđenog izbijanja bolesti,

i pod uvjetom da:

– nijedna svinja ne napusti gospodarstvo u svrhu stavljanja u promet na područje država članica; i

– se svinje s odnosnog gospodarstva premještaju samo u klaonicu na neodgodivo klanje ili na neko drugo gospodarstvo s kojega svinje isto tako neće biti stavljene u promet na području država članica, sve dok se na osnovi rezultata daljnjih kontrola i seroloških testiranja provedenih na mjestu gdje su otkrivene seropozitivne svinje i na gospodarstvu s kojega potječu ne potvrdi da se u potpunosti može isključiti vezikularna enterovirusna bolest svinja.

⁸ Člankom 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe članka 4. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

⁹ Člankom 8. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe članka 8. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

¹⁰ Dodatkom II. Dijelovima 7. i 8. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe Dodatka II. Dijelova 7. i 8. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

^{11, 12} Dodatkom II. Dijelom 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe Dodatka II. Dijela 4. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

¹³ Člankom 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe članka 4. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

¹⁴ Dodatkom II. Dijelom 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe Dodatka II. Dijela 4. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

¹⁵ Dodatkom II. Dijelom 4. točkom (d) Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe iz Dodatka II. Dijela 4. točke (d) Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

¹⁶ Člankom 9. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine«, broj 115/07) preuzete su odredbe članka 9. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na

vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

¹⁷ Člankom 4. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine« broj 115/07) preuzete su odredbe članka 4. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

¹⁸ Člancima 4. i 8. Pravilnika o kontroli određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja (»Narodne novine« broj 115/07) preuzete su odredbe članaka 4. i 8. Direktive Vijeća 92/119/EEC od 17. prosinca 1992. o općim mjerama Zajednice za kontrolu određenih bolesti životinja i posebnim mjerama koje se odnose na vezikularnu enterovirusnu bolest svinja.

POGLAVLJE VII.

Načela i primjena viroloških testiranja i procjena njihovih rezultata

A. Dokazivanje virusnoga antigena

1. Neizravna ELISA (engl. Indirect sandwich ELISA) zamijenila je reakciju vezanja komplementa kao metoda izbora za dokazivanje virusnog antigena vezikularne enterovirusne bolesti svinja. Test je isti kao onaj koji se koristi za dijagnosticiranje slinavke i šapa. Testiranje na obje bolesti mora se provoditi istodobno, osim ako slinavka i šap već nije isključena. Osobito se preporučuje koristiti uzorke epitelnoga tkiva ili tekućine iz vezikularnih lezija, u kojima su već za nekoliko sati u akutno oboljelih svinja prisutni i dokazivi u visokom titru virusi vezikularne enterovirusne bolesti svinja i slinavke i šapa¹⁹.

Po dva reda na mikrotitracijskim pločama nasloje se zečjim protutijelima za virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja i za svaki od sedam serotipova virusa slinavke i šapa. To su serumi na koje se veže virusni antigen. Svakom od tih redova dodaje se testna suspenzija uzoraka. Uključene su i odgovarajuće kontrole. U sljedećoj se fazi u odgovarajuće redove dodaje homologni serum zamorčića za dokazivanje, a potom anti-zamorčićev serum kunića konjugiran enzimom peroksidazom (konjugat). Između svake faze poduzima se temeljito ispiranje kako bi se odstranili nevezani reagensi. Nakon dodavanja kromogena i supstrata promjena boje ukazuje na pozitivnu reakciju. Kod jake pozitivne reakcije to se vidi prostim okom, ali se rezultati mogu očitati i spektrofotometrijski, pri čemu apsorpcija svjetla od 0,1 iznad pozadine upućuje na pozitivnu reakciju.

2. Za dokazivanje vezikularne enterovirusne bolesti svinja i za diferencijalno dijagnosticiranje slinavke i šapa u uzorcima epitelnog tkiva, vezikularnoj tekućini ili kulturi zaraženoga tkiva, može se, alternativno, koristiti i ELISA uz uporabu monoklonskih protutijela, uz primjenu odabranih monoklonskih protutijela kao protutijela za vezivanje, i s monoklonskim protutijelima konjugiranim peroksidazom kao protutijelima za otkrivanje.

3. ELISA uz uporabu monoklonskih protutijela može se koristiti za pretraživanje antigenih varijanti među sojevima virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja. Virusni antigeni uzgojeni na kulturama tkiva vezuju se na hiperimuni serum kunića za virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja koji je naslojen na čvrstu fazu. Odgovarajući paneli monoklonskih protutijela reagiraju i vezivanje monoklonskih protutijela na terenske sojeve uspoređuje se s vezivanjem monoklonskih protutijela na roditeljske sojeve. Slično vezivanje upućuje na prisutnost epitopa koji su zajednički roditeljskim sojevima i terenskim sojevima.

B. Izdvajanje i uzgoj virusa

1. Pročišćene suspenzije uzoraka epitelnoga tkiva, vezikularne tekućine ili fecesa za koje se sumnja da sadrže virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja rutinski se naciepljuju na odgovarajuće stanične kulture. Ukoliko količina i kakvoća uzoraka iz vezikularnih lezija dostavljenih na pretraživanje nije dovoljna za trenutno testiranje ELISA-om, potrebno je virus uzgojiti u kulturi tkiva, kako bi se povećala količina virusnog antigena.
2. Za izdvajanje i uzgoj virusa pročišćenom suspenzijom epitelnoga tkiva naciepljuju se jednoslojne kulture IB-RS-2 stanica. Treba primijeniti suspenzije epitelnoga tkiva dvije razrijeđenosti, jedna visoko razrijeđena (1:500) i jedna nisko (1:10), kako bi se izbjeglo ometanje rasta virusa interferonom, čije oslobađanje ometa rast virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja. Za izdvajanje virusa, mediju za održavanje dodaju se samo antibiotici. Za diferencijalno dijagnosticiranje virusa slinavke i šapa, kulture treba također naciepiti i na primarne kulture stanica goveđe štitnjače ili na bubrežne stanice hrčka (BHK-2).
3. Ako se razvije citopatski učinak, nadtalog se mora prikupiti iz pozitivnih kultura po završetku citopatskog učinka i kao takav koristiti za identifikaciju virusa ELISA-om. Negativne kulture se moraju naciepiti na svježe kulture tkiva za 48 ili 72 sata i ta slijepa pasaža se pretražuje unutar 72 sata. Ako ne nastupi citopatski učinak nakon ponovljene slijepa pasaže, uzorak se može proglasiti negativnim na prisutnost živoga virusa.
4. Suspenzije uzoraka fecesa mogu se preraditi kako je opisano u točki 1. ovoga Dijela Budući da je u pravilu u fecesu prisutno manje virusa nego u epitelnom tkivu, važno je, ako ne nastane citopatski učinak u prvoj i drugoj pasaži, provodi se i treća slijepa pasaža.
5. Simultano naciepljivanje linijske kulture stanica svinja i jedne od gore spomenutih kultura tkiva (daje se prednost primarnim kulturama stanica štitnjače goveda) korisna je smjernica za određivanje sadrže li uzorci vezikula virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja ili slinavke i šapa, jer virus vezikularne enterovirusne bolesti raste samo u stanicama podrijetla goveda. Međutim, izolati virusa slinavke i šapa, koji su više puta pasirani među svinjama, mogu također rasti u staničnim kulturama svinja.

C. Lančana reakcija polimerazom (PCR) za dokazivanje genoma

1. Metoda prepoznavanja nukleinske kiseline može se koristiti za dokazivanje virusnog genoma vezikularne enterovirusne bolesti svinja u kliničkom materijalu pomoću PCR-a i za utvrđivanje odnosa između izolata virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja određivanjem nukleotidnog niza dijela genoma. PCR je razvijen kako bi se poboljšala osjetljivost dijagnosticiranja. Opisane su male razlike u RT-PCR postupcima kod kojih se primjenjuju početnice (primeri) koje ciljaju jako konzervirane regije u 1C i 1D gena.
2. PCR je brza metoda (rezultati su dostupni obično u roku od 24 sata), dokazuje sve genotipove virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja i dovoljno je osjetljiva da se može koristiti i na uzorcima prikupljenim od klinički sumnjivih slučajeva.
3. Kad se sumnja na subkliničku infekciju, ili kad se prikupljaju uzorci nakon što je klinička slika bolesti jasna, ili kad se pripremaju uzorci fecesa, poboljšane RT-PCR metode, kao što su ugniježđena RT-PCR, imunosna PCR, ELISA-PCR i bolje razrađene metode ekstrakcije RNA, pokazale su se kao barem jednako osjetljivi, no mnogo brži sustavi dokazivanja u odnosu na višestruke pasaže na kulturi tkiva.
4. Sekvencioniranjem približno 200 nukleotida unutar gena 1D, koji kodira sintezu glavnog strukturnog proteina VP1, moguće je grupirati sojeve virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja prema njihovoj homolognosti sekvence, te epidemiološki razvrstati sojeve koji uzrokuju bolest u različitim regijama ili u različito vrijeme.

D. Procjena rezultata viroloških testova

Dokazivanje antigena ili genoma virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja ELISA-om ili PCR-om ima istu dijagnostičku vrijednost kao i izdvajanje virusa.

Ipak, izdvajanje virusa mora se uzimati kao referentni test i mora se koristiti kao potvrđni test, kad je to potrebno, a posebno ako pozitivni rezultat ELISA-e ili PCR-a nije potkrijepljen sa:

- (a) otkrivanjem kliničkih simptoma bolesti,
- (b) otkrivanjem seropozitivnih svinja, ili
- (c) izravnom epidemiološkom povezanošću s potvrđenom pojavom bolesti.

¹⁹ Pozitivni rezultati metode ELISA povezuju se s prisutnosti od najmanje 105 TCID₅₀ (Tissue culture infectious doses – zarazne doze kulture tkiva) virusa u uzorku.

POGLAVLJE VIII.

Načela i primjene seroloških testiranja i procjena njihovih rezultata

A. Virus neutralizacijski test (VN-test)

1. Kvantitativni VN mikro-test za otkrivanje protutijela za virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja provodi se na stanicama IB-RS-2 ili jednakovrijednim sustavom stanica u mikrotitracijskim pločama za kulturu tkiva s ravnim dnom.
2. Virus se uzgaja u jednoslojnim staničnim kulturama IB-RS-2 i pohranjuje ili pri -20° C nakon dodavanja 50% glicerola ili pri -70° C bez glicerola. Serumi se prije testiranja inaktiviraju 30 minuta pri 56° C.

B. ELISA testovi

1. ELISA za otkrivanje protutijela je kompetitivna ELISA na osnovi monoklonskih protutijela. Ako uzorak seruma sadrži protutijela za virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja, vezivanje monoklonskog protutijela konjugiranog peroksidazom na antigen virusa bit će spriječeno.

U navedenoj ELISA metodi antigen virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja veže se na čvrstu fazu pomoću monoklonskih protutijela; nakon čega se odgovarajuće razrijeđeni uzorci seruma inkubiraju, te se zatim dodaju peroksidazom konjugirana monoklonska protutijela. Potom se pomoću supstrata i kromogena mjeri inhibicija vezivanja monoklonskih protutijela.

2. Neizravna ELISA »trapping« metoda, uz primjenu izotip-specifičnih monoklonskih protutijela za otkrivanje IgG ili IgM, specifičnih za virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja pomaže pri dokazivanju vremena zaražavanja svinja ili kontaminacije prostora.

Kod izotipski specifične ELISE virusni antigen vezikularne enterovirusne bolesti svinja veže se na čvrstu fazu uz primjenu protutijela za vezivanje antigena. Ako uzorak seruma sadrži protutijela za virus vezikularne enterovirusne bolesti svinja, ona se otkrivaju uz primjenu anti-svinjskih IgG ili IgM monoklonskih protutijela, konjugiranih peroksidazom. Potom se pomoću supstrata i kromogena mjeri vezivanje.

Izotipski specifična ELISA može također pomoći pri razlikovanju »nespecifičnih reaktora« od stvarno pozitivnih svinja, kako je navedeno u Dijelu C ovoga Poglavlja.

C. Primjena seroloških testova i procjena rezultata

1. VN-test i ELISA preporučuju se kao serološki testovi. U Poglavlju X. ovoga Dodatka navedena je lista referentnih seruma, koji se mogu dobiti od referentnog laboratorija Zajednice za primjenu standardiziranih seroloških testova koji se provode u Zajednici. VN-test smatra se referentnim testom, no njegova je loša strana što traje 2 do 3 dana i

zahtjeva prostore i opremu za uzgoj kulture tkiva.

ELISA je brža i lakše se standardizira. Kompetitivna ELISA monoklonskim protutijelima je najpouzdaniji test za otkrivanje protutijela za vezikularnu enterovirusnu bolesti svinja.

Preporučuje se za orijentacijsko (engl. »screening«) testiranje velikoga broja uzoraka.

VN-test mora se koristiti kao potvrdni test kad je to potrebno, posebno nakon prvog otkrivanja pozitivnoga uzorka na gospodarstvu. Svinje pozitivne uporabom ELISA testa, no negativne kod VN-testa, ne trebaju se uzimati u obzir.

2. Može se sumnjati na prisutnost »nespecifičnog reaktora«²⁰ kad se identificira samo jedna seropozitivna svinja i kad su ispunjeni sljedeći kriteriji:

- (a) na gospodarstvu nema kliničkih znakova bolesti;
- (b) na gospodarstvu ni u prošlosti nije bilo pojave kliničke zaraze;
- (c) ni u prošlosti nije bilo kontakta s poznatim izbijanjem bolesti.

3. Svinja je potvrđena kao »nespecifični reaktor« kad:

- (a) u daljnjim testiranjima nisu identificirane druge seropozitivne svinje;
- (b) uzorkovanjem provedenim na svinjama koje su bile u kontaktu, nakon prvog utvrđivanja »nespecifičnog reaktora« nije utvrđena serokonverzija;
- (c) titar specifičnih protutijela ostaje konstantan ili opada nakon ponovljenog uzimanja uzoraka.

4. Sljedeći dodatni kriteriji i načela moraju se također uzimati u obzir kod potvrđivanja »nespecifičnog reaktora«:

- (a) »nespecifični reaktori« se pojavljuju kod svinja u prevalenciji od oko 1 na 1000;
- (b) serumski od »nespecifičnog reaktora« imaju općenito sljedeća obilježja:
 - nizak titar specifičnih protutijela kod VN– testa,
 - kod kompetitivne ELISA monoklonskim protutijelima na granici su pozitivne reakcije,
 - nalaz isključivo IgM i bez IgG u vezikularnoj enterovirusnoj bolesti svinja kod izotipno specifičnog ELISA testa²¹.

²⁰ Mali udio »nespecifičnih reaktora« može se dokazati bilo kojim uobičajenim serološkim testom za vezikularnu enterovirusnu bolest svinja. Nepoznati su čimbenici za nastanak »nespecifičnog reaktora«. Možda dolazi do serološke unakrižne aktivnosti s virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja zbog infekcije nekim drugim, do sada neidentificiranim picornavirusom ili drugim nespecifičnim čimbenicima prisutnim u serumu.

²¹ Specifična IgG protutijela sama, ili zajedno IgG i IgM protutijela, obično se nalaze u uzorcima seruma svinja zaraženih virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja, dok serumski »nespecifičnog reaktora« obično sadrže samo IgM. Specifična IgG ne mogu se dokazati u uzorcima seruma svinja zaraženih virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja tijekom prethodnih 10 ili 14 dana, iako bi ih se trebalo dokazati u drugom uzorku krvi. Ipak, nedavno zaražene svinje ne mogu se pouzdano razlučiti od »nespecifičnog reaktora« prije nego njihova imunostna reakcija prijeđe od IgM na IgG proizvodnju protutijela. Vidi također Poglavlje IX. ovoga Dodatka i napomenu 23 ovoga Pravilnika.

POGLAVLJE IX.

Klinički znakovi i obilježja vezikularne enterovirusne bolesti svinja

Vezikularna enterovirusna bolest svinja je zarazna bolest svinja koju uzrokuje enterovirus iz porodice *Picornaviridae*, koja može imati subklinički, blag ili žestok tijek vezikularne bolesti, ovisno o soju virusa koji je uzrokuje, načinu prijenosa i dozi virusa, kao i stanju na gospodarstvu na kojem se svinje drže. Dodatni čimbenici stresa poput prijevoza, miješanje s drugim svinjama i ekstremne temperature mogu pogodovati razvoju kliničkih znakova.

Obilježja bolesti su blago povišena temperatura i stvaranje vezikula na koronarnim mišićnim tetivama, korijenu pete, koži udova i rjeđe na gubici, usnicama, jeziku i sisama. Pobol može biti do 100 %, no smrtnost je vrlo niska ili jednaka nuli.

Bolest se može razviti u inaparentnom ili blagom obliku uz neznatno pogoršanje općeg stanja svinja, no unutar nekoliko dana razvijaju se protutijela koja neutraliziraju virus²².

Zbog subkliničke ili blage prirode, na bolest se u pravilu najprije posumnja tek nakon seroloških testova koji se provode u okviru nadziranja bolesti ili za izdavanje izvoznih certifikata. Nedavna izbijanja vezikularne enterovirusne bolesti svinja u Europi bila su praćena relativno blagim kliničkim znakovima ili ih uopće nije bilo, pa dijagnoza često ovisi o serološkim testiranjima.

Međutim, klinički znakovi vezikularne enterovirusne bolesti svinja ne razlikuju se od kliničkih znakova slinavke i šapa. Svako vezikularno stanje mora se od početka tretirati kao sumnja na slinavku i šap, a diferencijalno dijagnosticiranje mora biti provedeno što je prije moguće.

Razdoblje inkubacije vezikularne enterovirusne bolesti kod pojedinih svinja je obično između dva do sedam dana, nakon čega se može pojaviti prolazna temperatura do 41° C, dok na gospodarstvu klinički znakovi mogu biti vidljivi tek nakon dužeg vremena. Vezikule se mogu razviti na koronarnom pojasu, obično na spoju s petom. One mogu zahvatiti cijelu koronarnu mišićnu tetivu i mogu uzrokovati gubitak papka. Rjeđe se vezikule pojavljuju na gubici, pogotovo na dorzalnoj površini, na usnama, jeziku i sisama, a površinske erozije mogu biti vidljive na koljenima. Oboljele svinje mogu šepati i zbog toga slabije uzimati hranu.

U mlađih kategorija svinja je to jače izraženo, iako je smrtnost od vezikularne enterovirusne bolesti svinja vrlo rijetka, za razliku od smrtnosti mlađih kategorija svinja kod slinavke i šapa. Zabilježeni su i neurološki znakovi, no oni nisu uobičajeni. Pobačaji nisu tipična pojava kod vezikularne enterovirusne bolesti svinja. Zatajenje rada srca zbog multifokalnog miokarditisa može ukazivati na slinavku i šap i encefalomiokaditis, pogotovo kod mlađe prasadi, ali se ne dovodi u vezu s vezikularnom enterovirusnom bolesti svinja.

Potpuno ozdravljenje nastupa u pravilu za dva do tri tjedna, a jedini znak bolesti ostaje tamna, vodoravna crta na rožini papka gdje je rast bio privremeno prekinut.

Zaražene svinje izlučuju virus iz nosa i gubice i fecesom do 48 sati prije početka kliničkih znakova. Virus je većinom umnožen u prvih sedam dana po infekciji, a izlučivanje virusa iz nosa i gubice obično prestaje unutar dva tjedna. Virus se iz fecesa može izdvojiti do 20 dana po infekciji, iako je zabilježena njegova prisutnost i do tri mjeseca po infekciji. Uzročnik može dugo vremena preživjeti u nekrotičnom tkivu nastalom na mjestu probušenih vezikula, kao i u fecesu.

²² Specifična IgM protutijela mogu se obično dokazati u krvi dva do tri dana nakon infekcije, koja nestaju poslije otprilike 30 do 50 dana; specifična IgG protutijela mogu se obično dokazati u krvi od 10 do 14 dana nakon infekcije i prisutna su nekoliko godina. Ig izotip može se odrediti pomoću metode ELISA opisane u Poglavlju VIII. Dijelu B točki 2. ovoga Dodatka

POGLAVLJE X.

Referentni serumi vezikularne enterovirusne bolesti svinja

Referentni serum	Podrijetlo	Napomena ²³
1	Serum zdrave svinje (SZS)	Negativni kontrolni serum
2	Serum prikupljen 21 dana po infekciji (dpi) od svinje zaražene virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja soj UKG 27/72 (čisti virus)	Pozitivan kontrolni serum u visokom titru.

3	SZS razrjeđuje se serumom bolesne svinje prikupljenim petog dpi virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja soj Italy 8/94 u omjeru 1 : 10	Slabo pozitivan serum od svinje netom po infekciji s nedavnim europskim izolatom virusa vezikularne enterovirusne bolesti svinja. Serum je razrjeđen kako bi se dobio slabo pozitivan rezultat ELISA-om i VN-testom.
4	Serum svinje prikupljen 21 dpi virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja soj UKG 27/72 razrijeđen u omjeru 1:40	Slabo pozitivan serum koji određuje najnižu razinu protutijela, kod koje bi nacionalni referentni laboratoriji trebali uvijek dati pozitivan rezultat ELISA-om i VN-testom. Ekvivalent serumu RS 01-04-94 ²⁴
5	Serum prikupljen četvrtog dpi od svinje zaražene virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja, soj UKG 27/72 (čisti virus)	Slabo pozitivan serum od svinje u ranoj fazi infekcije.
6	Serum prikupljen petog dpi od svinje zaražene virusom vezikularne enterovirusne bolesti svinja, soj UKG 27/72 (čisti virus)	Slabo pozitivan serum od svinje u ranoj fazi infekcije.

²³ Ove napomene se odnose na testiranje pojedinačnih svinja. Za serološko nadziranje potrebno je uzeti u obzir osjetljivost primijenjenih testova.

²⁴ Npr. serum s titrom specifičnih protutijela koji je dovoljno viši od granične vrijednosti kod koje se uvijek dobiva pozitivan rezultat pri ponovljenim ispitivanjima ELISA-om i VN-testom.