

20170340560

## АГЕНЦИЈА ЗА ХРАНА И ВЕТЕРИНАРСТВО

Врз основа на член 49 став (4) од Законот за ветеринарно здравство („Службен весник на Република Македонија” бр. 113/07, 24/11, 136/11, 123/12, 154/15 и 53/16), директорот на Агенцијата за храна и ветеринарство донесе

### **ПРАВИЛНИК ЗА ИЗМЕНУВАЊЕ НА ПРАВИЛНИКОТ ЗА МЕРКИ ЗА СУЗБИВАЊЕ И ИСКОРЕНУВАЊЕ НА ВЕЗИКУЛАРНА БОЛЕСТ КАЈ СВИЊИТЕ(\* )**

#### Член 1

Во Правилникот за мерки за сузбивање и искоренување на Везикуларна болест кај свињите („Службен весник на Република Македонија” бр. 154/11), Глава III од Прилогот се заменува со нова Глава III која е дадена во Прилог и е составен дел на овој правилник.

#### Член 2

Овој правилник влегува во сила наредниот ден од денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија“.

Бр. 02-405/3  
15 март 2017 година  
Скопје

Агенција за храна  
и ветеринарство  
Директор,  
м-р **Зоран Поповски**, с.р.

---

\* (\*) Со овој правилник се врши усогласување со Одлуката на Комисијата од 4 јули 2000 година за утврдување на дијагностички постапки, методи за земање мостри и критериуми за оценување на резултатите од лабораториските испитувања за потврда и диференцијална дијагноза на везикуларна болест кај свињите, CELEX бр. 32000D0428.

## Прилог

### Глава III. Дијагностички методи за потврда на присуство и диференцијална дијагноза на Везикуларна болест кај свињите

#### Дел 1 - Поими кои се употребени во оваа Глава

1. „Серопозитивна свиња“ е секоја свиња во чиј серум има титар на антитела еднаков или поголем од референтниот серум 4 на везикуларната болест кај свињите од Дел 10 од оваа Глава, што е утврдено со испитување со неутрализација на вирус;
2. „Лажно позитивна“ е било која серопозитивна свиња во одгледувалиштето која дава позитивен резултат при серолошки испитувања за везикуларна болест кај свињите, а за која е познато дека не била во контакт со вирусот на везикуларната болест кај свињите, ниту пак има доказ дека ја шири болеста на други свињи во контакт. Серопозитивна свиња се потврдува дека е лажно позитивна доколку се исполнети условите од Дел 8 точка В на оваа Глава;
3. „Свињи во контакт“ се свињи кои се во директен контакт, или кои дошле во директен контакт во последните 28 дена, со една или повеќе серопозитивни свињи или со една или повеќе свињи за кои се сомнева дека се заразени со вирусот на везикуларна болест кај свињите. Свињите во контакт може да се, или може да биле, во ист бокс или во соседни боксови, доколку има можност за директен контакт на свињите помеѓу боксовите.

#### Дел 2 - Насоки за преглед на свињи кои покажуваат клинички знаци на везикуларна болест кај свињите

1. Во случај на сомнеж на присуство на вирусот на везикуларна болест кај свињите во одгледувалиште, треба да се изврши преглед на статистички значаен број на свињи од страна на овластен ветеринар во најкраток можен рок со цел да се откријат клиничките знаци на болеста наведени во Дел 9 на оваа Глава.
2. Во случај кога свињите покажуваат клинички знаци кои упатуваат на везикуларна болест кај свињите или на шап и лигавка, треба да се направи диференцијална дијагноза со соодветно земање мостри и лабораториски испитувања во најкраток можен рок, во согласност со деловите 4, 7 и 8 од оваа Глава.

#### Дел 3 - Општи постапки за земање мостри и превоз на мостри

1. Лицата кои влегува или излегува од одгледувалиштата на свињи каде постои сомневање за везикуларна болест кај свињите треба да ги почитува најстрогите хигиенски мерки, потребни за да се намали ризикот од контаминација или ширење на вирусот.
2. Сите испитувани свињи треба да бидат посебно обележани на начин на кој може да се идентификуваат при можно повторно испитување. Се препорачува

локацијата на секоја испитувана свиња во одгледувалиштето да биде евидентирана заедно со нејзината идентификациона ознака, особено ако се испитуваат сомнителни свињи.

3. Мострите треба да се достават до лабораторијата заедно со соодветни формулари, во кои се вклучени детали од историјата на испитуваните свињи и забележаните клинички знаци, доколку постојат.

4. Бидејќи која било везикуларна состојба кај свињите може да биде шап и лигавка, треба да се преземат соодветни мерки за претпазливост за безбедно пакување на сомнителните мостри. Овие мерки за претпазливост треба главно да се однесуваат на делот на спречување на кршење или течење од контејнерите и ризикот од контаминација, но исто така, значајно е да се обезбеди примероците да пристигнат во задоволителна состојба. Доколку се става влажен мраз во пакетот, треба да се спречи истекување на водата. Контејнерите со мостри за кои постои сомневање дека го содржат вирусот на везикуларна болест кај свињите не треба да се отвораат откако ќе се изнесат од инфицираниот објект се додека не пристигнат во лабораторијата.

5. Мострите за кои постои сомневање дека го содржат вирусот на везикуларна болест кај свињите треба да се испитуваат само во лаборатории кои се овластени да ракуваат со вирусот на шап и лигавка за дијагностички цели, во согласност со националното законодавство за контрола на шап и лигавка, освен доколку шап и лигавка веќе не е исклучена.

6. Сите мостри може да се транспортираат на 4°C доколку очекуваното време за превоз до лабораторијата е помало од 48 часа, или во спротивно, истите треба да се одржуваат на температура не повисока од -20°C.

7. За мостри наменети за Референтната лабораторија на Заедницата, единствениот дозволен метод за превоз е со карго до аеродромите Лондон (Хитроу) или Лондон (Гетвик). Пред испораката, лабораторијата треба да биде известена по факс ((44-1483) 23 26 21) или електронска пошта за деталите на авионскиот лет, датумот, очекуваното време за пристигнување и бројот на авионскиот товарен лист за да биде лоцирана пратката која пристигнува. Пратката треба да биде адресирана до:

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

Следните информации треба да бидат наведени на етикетата:

„Патолошки материјал од животни без трговска вредност. Расипливо. Кршливо. Да биде земено од аеродром од лицето до кое е адресирано. Да не се отвора надвор од лабораторијата.

/Animal pathological material of no commercial value. Perishable. Fragile. To be collected at airport by addressee. Not to be opened outside the laboratory.“.

Овластеното подигнување пратки од аеродром го прави персоналот од Референтната лабораторија на Заедницата, според специјална дозвола за увоз издадена за оваа цел од Министерство за земјоделство, храна и риболов на

Обединетото кралство. Ова е утврдена процедура и не се бара посебна дозвола за секој увоз. Не е дозволен рачен пренос на сомнителен везикуларен материјал во Обединетото кралство од страна на неовластен персонал. Не треба да се користат компании за доставување.

8. Превозот на мостри до националните лаборатории треба да биде во согласност со пропишаните инструкции.

#### Дел 4 - Постапки на земање мостри во одгледувалиште со клинички сомнителни свињи

1. При сомневање дека има присуство на вирусот на везикуларна болест кај свињите во одгледувалиште каде се забележани клинички знаци на болеста, треба да се земат соодветни мостри од карактеристичните групи на свињи кои ги покажуваат овие знаци, заради потврда на болеста и диференцијална дијагноза со болеста шап и лигавка.

2. Примероци кои се земаат за дијагноза се епител и везикуларна течност од непукната или свежо пукната везикула од свињи кои покажуваат типични знаци на болест, каде вирусот на везикуларна болест кај свињите, неговите антигени или геноми може да бидат откриени. Се препорачува да бидат испитани околу пет или шест од овие свињи.

3. Дури и ако свежо епително ткиво и везикуларна течност се достапни во доволна количина (1 g или повеќе), следните мостри треба исто така да бидат земени:

(а) мостри од крв од свињите за кои постои сомневање и свињите во контакт, за серолошки испитувања; и

(б) мостри од фекалии од свињите за кои постои сомневање и од подот во нивните боксови како и од околните боксови, за вирусолошки испитувања.

4. Мострите треба да се земаат и превезуваат во согласност со следните постапки:

(а) за епителни мостри и везикуларна течност:

— доколку е можно, треба да се земе барем 1 g од епителното ткиво од непукната или тукушто пукната везикула. Се препорачува давање на седатив на свињите пред да се земат мостри од истите за да се одбегне повреда на персоналот како и за благосостојба на свињите,

— доколку превозот до националната лабораторија е непосредно извршен (за помалку од три часа), епителните мостри може да бидат превезени суви и да бидат чувани во фрижидер. Сепак, ако е веројатно дека потребното време ќе надмине три часа, мострите треба да бидат пренесени во посебен транспортен медиум кој содржи еднаква количина на глицерол и 0.04 M фосфатен пуфер или друг еквивалентен пуфер (хепес), на кој начин рН вредноста останува во оптимален опсег за да може да преживее вирусот на болеста шап и лигавка (рН вредност од 7,2 до 7,6). Транспортниот медиум треба да содржи антибиотици за дополнителна анти-микробска активност. Соодветни антибиотици и нивна крајна концентрација по милилитар се:

(i) пеницилин 1000 IU,

(ii) неомицин сулфат 100 IU,

(iii) полимиксин Б сулфат 50 IU,

(iv) микостатин 100 ПУ,

— доколку везикуларна течност може да биде земена од непукната везикула, треба да се чува неразредена во посебен сад;

(б) за мостри од крв:

— мостри од крв може да се земаат за серолошки или вирусолошки испитувања. Сепак, генерално, тие се земаат за откривање на антитела кај свињи за кои постои сомневање дека заздравице од клиничка или субклиничка инфекција, додека епител, везикуларна течност и мостри од фекалии од свињи кои покажуваат клинички знаци на болест се несоодветни за откривање на вирус, отколку мостри од крв. Се препорачува сите мостри од крв да се земаат со користење на епрувети без антикоагулант и епруветите да се превезуваат неотворени;

(в) за мостри од фекалии:

— мостри од фекалии од подот од просториите каде има сомневање дека престојуваат или престојувале заразени свињи со везикуларна болест кај свињите, или фекални брисови и мостри од фекалии од сомнителните живи свињи, треба да бидат сместени во цврсти, непропустливи садови.

Садовите со сомнителни примероци треба да бидат дезинфицирани однадвор пред да се превезуваат до лабораторијата. Соодветни средства за дезинфекција се:

— натриум хидроксид (1:100 раствор),

— формалин (1:9 раствор на солуција на формалин кој содржи минимум 34% формалдехид), и

— натриум хипохлорит (2% достапен хлорин).

Со овие средства за дезинфекција треба да се ракува претпазливо.

## Дел 5 - Постапки на земање мостри за серолошки надзор на везикуларна болест кај свињите

1. Доколку серолошкиот надзор е спроведен за следните цели:

(а) за надзор во одгледувалишта каде нема доказ или сомнеж за присутност на болеста,

(б) за надзор во кланицата, промет, собирни центри или слично место каде рутински се земаат серолошки мостри;

(в) заради надзор над свињи со потекло од други земји во одгледувалишта на кое се увезени,

мостри од крв треба да се земаат од свињите за серолошки испитувања во согласност со програмите за сузбивање и искоренување на болести донесени врз основа на Законот за ветеринарно здравство<sup>(\*)</sup>.

2. Кога серолошки надзор е спроведен со следните цели:

(а) за надзор на одгледувалишта лоцирани во зоните за заштита и надзор кои се утврдени според потврда за појава на болест во согласност со главите VI и VII од овој прилог; или

(б) за надзор на одгледувалишта за кои се смета дека болеста е внесена од друго одгледувалиште или од ова одгледувалиште се пренесува на друго

одгледувалиште како резултат на движење на луѓе, животни, превозни средства или на друг начин  
мостри од крв треба да се земат од свињите за серолошки испитувања, во согласност со следната шема:

- во случај на одгледувалишта за свињи за размножување се земаат мостри од животни по случаен избор на начин на кој би се открило 5% преваленца на сероконверзија со 95 % точност;
- во случај на одгледувалиштата со свињи за тов, со постапката на земање мостри треба да се обезбеди дека вкупниот број на собрани мостри е најмалку еднаков на бројот кој е потребен за да се открие преваленцата од 5 % со 95 % точност. Во секој случај, мострите треба да се земат од што е можно повеќе боксови избрани по случаен избор;
- во случај на мешани одгледувалишта со свињи за размножување и за тов, секоја група на свињи која живее во посебни простории треба да биде испитувана на начин на кој би се откриле 5% преваленца на сероконверзија со 95 % точност.

Дел 6 - Понатамошни активности и постапки за повторно земање мостри во случај на наоди за серопозитивни свињи

1. Во случај на откривање дури и на една серопозитивна свиња во одгледувалиштето според надзорот наведен во Дел 5 точка 1 подточка (а) или точка 2 треба да се обезбеди:

- (а) доколку веќе не се применети, да се применат мерките од членовите 51 и 53 став (1) од Законот за ветеринарно здравство<sup>(\*)</sup>;
- (б) се врши проверка во одгледувалиштето во согласност со одредбите наведени во Дел 2 точка 1;
- (в) се земаат мостри од крв за серолошки испитувања од:
  - свињата за која постои сомневање,
  - свињи во контакт кои живеат во истиот и во соседни боксови каде се наоѓа свињата за која постои сомневање; овие свињи треба да бидат испитани на начин на кој ќе се открие 50% преваленца на сероконверзија со 95 % точност во боксот.

2. Агенцијата може да ги повлече мерките наведени во точка 1 подточка (а) од овој дел, доколку:

- (а) епидемиолошкото испитување покажало дека везикуларната болест кај свињите не била внесено во одгледувалиштето;
- (б) во одгледувалиштето не биле откриени никакви клинички знаци на везикуларна болест кај свињите; и
- (в) одгледувалиштето не е лоцирано во зона за надзор или ограничување која е востановена поради потврдена појава на болест или е предмет на други ограничувања кои се применуваат како резултат на потврдена појава на болест, и, доколку:

— ниту една свиња не се изнесува од одгледувалиштето заради ставање во промет; и  
— свињите од одгледувалиште единствено се носат во кланица за неодложно колење или во друго одгледувалиште од каде ниту една свиња не се става во промет,  
сè додека резултатите од понатамошните проверки и серолошки испитувања не укажат дека везикуларната болест кај свињите може целосно да биде исклучена.

3. Доколку контролите и серолошките испитувања извршени во согласност со точка 1 подточка (б) и (в) од овој дел:

(а) дадат негативни резултати или само претходно утврдената позитивна свиња е потврдена позитивно (лажно позитивна), везикуларната болест кај свињите може да биде исклучена. Мерките наведени во точка 1 подточка (а) треба да се повлечат, освен доколку одгледувалиштето е лоцирано во зона за заштита или надзор која е воспоставена околу жариште на болеста каде мерките за искоренување и сузбивање на болеста треба да останат на сила во согласност со глава VI или VII од овој прилог;

(б) покажуваат дека повеќе од една серопозитивна свиња е присутна во одгледувалиштето, или се потврдува везикуларна болест кај свињите или, доколку барањата пропишани во Глава IV од овој прилог не се исполнети за да го потврдат присуството на оваа болеста, треба да се земат дополнителни мостри од одгледувалиштето во согласност со постапките на земање мостри наведени во точка 4 од овој дел.

4. Во случај кога, по земањето мостри и по серолошките испитувања наведени во дел 5 точка 1 подточка (а), подточка (в) или точка 2, откриено е дека има повеќе од една серопозитивна свиња во одгледувалиштето, но условите утврдени во Глава IV од овој прилог не се исполнети за да го потврдат присуството на везикуларната болест кај свињите треба да:

(а) се применуваат или продолжат да се применуваат одредбите наведени во членовите 51 и 53 став (1) од Законот за ветеринарно здравство<sup>(\*)</sup>;

(б) се врши контрола во одгледувалиштето во согласност со одредбите наведени во Дел 2 точка 1;

(в) понатаму да се земаат мостри од крв за серолошки испитувања од серопозитивните свињи и контактните свињи во согласност со точка 1 подточка (в) од овој дел;

(г) се земаат мостри од крв за серолошки испитувања од свињи од останатите простории во одгледувалиштето во согласност со постапката наведена во Дел 5 точка 2;

(д) се земаат доволен број на мостри од фекалии за вирусолошки тестови од:

— серопозитивните свињи,

— подот во боксовите во кои има серопозитивни свињи и соседните боксови,

— боксови одбрани по случаен избор од другите објекти во одгледувалиштето.

Мострите од фекалии земени во согласност со првата и втората алинеја од подточка (д) на оваа точка треба да се испитаат во најкраток можен рок. Во

случај кога овие мостри се негативни но резултатите од серолошките испитувања покажуваат дека вирусот на везикуларната болест кај свињите може да се проширил кон другите објекти, мострите од фекалии земени во согласност со третата алинеја од подточка (д) на оваа точка треба исто така да се испитаат;

Доколку, и по овие дополнителни контроли и испитувања, условите утврдени во Глава IV од овој прилог не се исполнети за да се потврди присуство на везикуларна болест кај свињите, серопозитивните свињи се убиваат или колат во согласност со одредбите наведени во Глава IV точка 4) од овој прилог. Сепак, доколку се откријат и други серопозитивни свињи освен оние кои веќе биле утврдени за серопозитивни според претходното земање мостри, одредбите и постапките утврдени во (а), (б), (в), (г) и (д) понатаму се применуваат *mutatis mutandis*.

5. Без да е во спротивност со одредбите од Законот за ветеринарно здравство, доколку се откријат една или повеќе серопозитивни свињи по активностите за надзор наведени во Дел 5 точка 1 подточки (б) или (в) од оваа Глава, треба:

(а) кога е неопходно и изводливо, да се вршат соодветни понатамошни контроли вклучувајќи и собирање на мостри за да се потврди или исклучи везикуларна болест кај свињите на местата каде овие свињи биле откриени, земајќи ја предвид локалната ситуација;

(б) да се применат мерките наведени во членовите 51 и 53 став (1) од Законот за ветеринарно здравство<sup>(\*)</sup> во одгледувалиштето од каде потекнуваат овие свињи;

(в) да направи проверка во одгледувалиштето од каде потекнуваат овие свињи во согласност со одредбите наведени во Дел 2 точка 1 од оваа Глава; и

(г) да се земат мостри од крв за серолошки испитувања од свињите од одгледувалиштето од каде потекнуваат серопозитивните свињи, во согласност со одредбите од Дел 5 точка 2.

6. Агенцијата може да ги повлече мерките од точка 5 подточка (б) од овој дел, доколку:

(а) епидемиолошкото испитување покаже дека везикуларната болест кај свињите не била внесено во одгледувалиштето;

(б) во одгледувалиштето не биле откриени никакви клинички знаци на везикуларна болест кај свињите;

(в) одгледувалиштето не е лоцирано во зона за надзор или ограничување која е востановена поради потврдена појава на болест или е предмет на други ограничувања кои се применуваат како резултат на потврдена појава на болест,

и доколку:

— ниту една свиња не се изнесува од одгледувалиштето заради ставање во промет, и

- свињите од одгледувалиште единствено се носат во кланица за неодожно колење или во друго одгледувалиште од каде ниту една свиња не се става во промет,

сè додека резултатите од понатамошните проверки и серолошки испитувања на местото каде се откриени серопозитивните свињи и во одгледувалиштето од каде

потекнуваат, укажат дека везикуларната болест кај свињите може целосно да биде исклучена.

## Дел 7 - Начела и примени на вирусолошки испитувања и оценување на резултатите

### А. Откривање на вирусниот антиген

1. Индиректна ЕЛИСА (Indirect sandwich ELISA) ја замени реакцијата на врзување на комплементот, како избран метод за откривање на вирусниот антиген на везикуларна болест кај свињите. Испитувањето е исто како она кое се користи за дијагностицирање на болеста шап и лигавка. Испитувањата на овие две болести треба да се извршуваат истовремено, освен ако болеста шап и лигавка веќе била исклучена. Се препорачува особено користење на мостри од епително ткиво или течност од везикуларни лезии, каде двата вируса на везикуларна болест кај свињите и на шап и лигавка може да бидат присутни во голема количина на титри кај акутно инфицираните свињи и откриени за неколку часа<sup>1</sup>.

По два реда на микротитражните плочки се премачкуваат со зајачки антисерум за вирусот на везикуларна болест кај свињите и за секој од седумте серотипови за вирусот на болеста шап и лигавка. Тоа се серуми за кои се врзува вирусниот антиген. Во секој од тие редови се додава суспензии за испитувањата од мострите. Исто така, вклучени се соодветни контроли. Во следната фаза во соодветните редови се додава хомологен серум од заморец за откривање, а потоа се додава зајачки анти-заморец серум конјугуран со ензимот пероксидаза (конјугат). Се врши темелно испирање помеѓу секоја фаза за да се отстранат неврзаните реагенси. Позитивната реакција се прикажува доколку има реакција со менување на бојата при додавање на хромоген и супстрат. При силно позитивни реакции тоа се забележува и со голо око, но резултатите може да се читаат и со спектрофотометар, при што апсорпција на светло од 0,1 над позадината претставува позитивна реакција.

2. Алтернативни ЕЛИСА на база на моноклонски антитела, со примена на избрани моноклонски антитела како антитела за врзување, а со моноклонски антитела конјугирани со пероксидаза како антитела за откривање, може да се користат за откривање на антиген на везикуларна болест кај свињите и за диференцијална дијагноза со болеста шап и лигавка од мостри од епител, везикуларна течност или култура од инфицирано ткиво.

3. ЕЛИСА со употреба на моноклонски антитела може да се користи за истражување на антигенски варијанти помеѓу соевите на вирусот на везикуларната болест кај свињите. Вирусните антигени од култура на ткиво се врзуваат за зајачки хиперимун серум за везикуларна болест кај свињите, кој се наоѓа на цврста фаза. Соодветни плочки на моноклонските антитела тогаш реагираат и врзувањето на моноклонските антитела на теренските соеви се споредува со врзувањето на моноклонски антитела на родителските соеви.

---

<sup>1</sup> Позитивните ЕЛИСА резултати се поврзани со присуството на најмалку  $10^5$  TCID<sub>50</sub> (инфицирана доза на ткивна култура) од вирусот во мострата.

Сличните врзувања упатува на присуство на епитопи кои се заеднички за родителските соеви и теренските соеви.

#### Б. Изолација и размножување на вирусот

1. Вообичаено, прочистени суспензии на мостри од епител, везикуларна течност или фецес за кои постои сомневање дека го содржат вирусот на везикуларна болест кај свињите треба да бидат вбригани во чувствителни клеточни култури. Доколку количината и квалитетот на мострите од везикуларни лезии донесени за испитување не се доволни за непосредно испитување со ЕЛИСА, потребно е вирусот да се размножи на ткивната култура за зголемување на количината на вирусниот антиген.

2. За да се изолира и размножи вирусот, прочистена суспензија од епително ткиво се инокулира во еднослојни култури од IB-RS-2 клетки. Треба да се користат два раствора од суспензија од епително ткиво, еден високо разреден (1/500) и еден ниско разреден (1/10), за да се одбегне застој во размножувањето на вирусот со интерферон, чие ослободување влијае врз размножувањето на вирусот на везикуларна болест кај свињите. За изолација на вирусот, се додаваат само антибиотици во медиумот за одржување. За диференцијално дијагностицирање на вирусот на болеста шап и лигавка, културите треба да се инокулираат и на основни култури од клетки од тироидна жлезда на говеда или на бубрежни клетки од млад хрчак (БХК-21).

3. Ако се развие цитопатско дејство, течноста од површината треба да се собере од позитивните култури кога ќе заврши дејството и да се употреби во ЕЛИСА за идентификација на вирусот. Негативните култури треба да се инокулираат на свежи ткивни култури за 48 или 72 часа и оваа слепа пасажа се испитува за најмногу 72 часа. Во отсуство на цитопатско дејство по повторената слепа пасажа, мострата се смета за негативна во однос на присуство на жив вирус.

4. Суспензии од мостри од фецес може да се преработат како што е опишано во точка 1. Поради тоа што присуството на вирус во фецесот генерално е помало отколку во епителот, важно е дека во отсуство на цитопатско дејство во првите две пасажи, се спроведува и трета слепа пасажа.

5. Истовременото инокулирање во линиски култура од клетки од свиња и во еден од гореспоменатите ткивни културни (пред сè, основни култури од клетки од тироидна жлезда на говеда) е корисен водич за тоа дали мострите од везикули содржат вирус на везикуларна болест кај свињите или вирус на болеста шап и лигавка, бидејќи вирусот на везикуларната болест кај свињите се размножува само во клетките од свинско потекло. Меѓутоа, изолатите од вирусот на болеста шап и лигавка кои повеќе пати се пренесувани помеѓу свињите, исто така, може да се размножуваат во клеточни култури од свински клетки.

#### В. Полимеразна верижна реакција (PCR) за откривање на геном

1. Метод на препознавање на нуклеинската киселина може да се користат за откривање на вирусниот геном на везикуларна болест кај свињите во клинички материјал користејќи PCR и за да се воспостави односот помеѓу изолатите од вирусот на везикуларна болест кај свињите преку утврдување на нуклеотидната низа

на дел од геномот. За да ја подобрат чувствителноста на дијагнозата развиени се техники со PCR. Опишани се мали разлики во RT-PCR постапките кај кои се применуваат примери на кои цел им се високо конзервативните региони во 1С и 1D гените.

2. Техниката на PCR е брза (резултатите обично се добиваат во рок од 24 часа), ги открива сите генотипови на вирусот на везикуларната болест кај свињите и е доволно чувствителна за да може да се употребува на мостри земени од клинички сомнителни случаи.

3. Кога постои сомнеж за субклиничка инфекција или кога мостри се земаат откако клиничката слика на болеста е јасна или, пак, кога се подготвуваат мостри од фецес, подобрени RT-PCR техники, како што се вгнезден RT-PCR, имун –PCR, ELISA-PCR и други подобро разработени методи на екстракција на RNA, обезбедуваат систем на откривање најмалку исто чувствителни, но значителен побрзи за разлика од повеќекратна пасажа на ткивна култура.

4. Со секвенционирање со приближно 200 нуклеотиди во 1D генот кој ја кодира синтезата на главниот структурен протеин VP1, можно е да се групираат соевите на вирусот на везикуларна болест кај свињите според нивната хомологност на секвенцата, и епидемиолошки да се направи разлика помеѓу соевите кои предизвикуваат болест во различни региони или во различен период.

#### Г. Оценување на резултатите од вирусолошки испитувања

Откривањето на антигени или геноми од вирусот на везикуларна болест кај свињите со помош на ЕЛИСА и полимеразната верижна реакција (PCR) има иста дијагностичка вредност како изолирање на вирусот.

Сепак, изолирањето вирус треба да се смета како референтно испитување и треба да се користи како потврдно испитување кога е неопходно, особено ако позитивниот резултат при третман со ЕЛИСА или полимеразна верижна реакција не е поврзан со:

- (а) откривање на клинички знаци на болест;
- (б) откривање на серопозитивни свињи, или
- (в) директна епидемиолошка врска со потврдена појава на болеста.

#### Дел 8 - Начела и примени на серолошки испитувања и оценување на нивните резултати

##### А. Испитување со неутрализација на вирус (VN)

1. Квантитативното микро-испитување со неутрализација на вирусот за откривање на антитела за вирусот на везикуларна болест кај свињите се врши на IB-RS-2 клетки или со еквивалентен систем на клетки во микротитрациски за ткивни култури со рамно дно.

2. Вирусот се размножува на еднослојни клетки IB-RS-2 и се чува или на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  по додавање на 50 % глицерол или на  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  без глицерол. Серумите пред испитувањето се инактивираат 30 минути на  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Б. ЕЛИСА тест

1. ЕЛИСА тестот за откривање на антитела е компетитивна ЕЛИСА врз основа на моноклонски антитела. Ако мострите со серум содржат антитела на вирусот на везикуларна болест кај свињите, сврзувањето помеѓу одбраното моноклонско антитело врзано со пероксидаза со антигенот на вирусот ќе биде спречено.

Во ова ЕЛИСА, вирусниот антиген на везикуларна болест кај свињите се врзува за цврстата фаза со помош на моноклонските антитела; потоа соодветно разредените мострите од серумите се инкубираат, по што следи додавање на моноклонско антитело врзано со пероксидаза. Потоа, со помош на супстрат и хромоген се мери инхибицијата на врзувањето на моноклонски антитела.

2. ЕЛИСА тестот со индиректна стапица што користи изотип-специфични моноклонски антитела за откривање на IgG или IgM кои се специфични за вирусот на везикуларна болест кај свињите, помага во проценка на времето на зараза на свињата или на контаминација на просторијата.

Кај изотопски специфичната ЕЛИСА, вирусниот антиген се врзува за цврстата фаза со примена на антитела за врзување на антигенот. Ако примерокот од серум содржи антитела на вирусот на везикуларна болест кај свињите, тие се откриваат со користење на анти-свински IgG или IgM моноклонски антитела врзани со пероксидаза. Потоа, ова сврзување се мери со помош на супстрат и хромоген.

Изотопски специфичната ЕЛИСА може исто така да помогне во разграничување на лажно позитивните од позитивните свињи, како што е наведено во точка В од овој дел.

## В. Примена на серолошки испитувања и оценување на резултати

1. Препорачани серолошки испитувања се испитувањето со неутрализација на вирусот и ЕЛИСА тестот. Во Делот 10 се наведени референтните серуми кои се достапни во Референтната лабораторија на Заедницата за да се извршуваат стандардизираните серолошки испитувања.

Испитувањето со неутрализација на вирусот треба да се разгледува како референтно испитување, но недостатокот е тоа што одзема 2 до 3 дена за да се исполни и налага посебни простории за ткивни култури.

ЕЛИСА тестот е побрз и полесно може да биде стандардизиран. Моноклонското конкурентно антитело ЕЛИСА е најсоодветно испитување на везикуларна болест кај свињите со антитело ЕЛИСА опишано до денес. Се препорачува како испитување за проверка на голем број на примероци.

Сепак, кога е неопходно, испитувањето со неутрализација на вирусот треба да биде користено како потврдно испитување, особено по првото откривање на позитивни мостри во одгледувалиштето. Свињите позитивни според ЕЛИСА, но негативни според испитувањето со неутрализација на вирусот може да се занемарат.

2. Присуството на лажно позитивна<sup>2</sup> може да е сомнително кога е откриена една серопозитивна свиња и кога се исполнети следните критериуми:

---

<sup>2</sup> Мал сооднос на лажно позитивна може да се открие со помош на секој од моменталните серолошки испитувања за везикуларна болест кај свињите. Факторите одговорни за лажно позитивна не се познати. Серолошки вкрстено-реагирање со вирусот на везикуларна болест кај свињите може да настане заради зараза од друг, како неидентификуван, пикорнавирус или може да биде како резултат на други неспецифични фактори содржани во серумот.

- (а) нема клинички знаци на болест во одгледувалиштето;
  - (б) нема значајни историски податоци за клиничка болест во одгледувалиштето;
  - (в) нема историски податоци за контакт со позната појава на болест.
3. Една свиња е потврдено дека е лажно позитивна во случај кога:
- (а) повторното испитување не утврдува други серопозитивни свињи;
  - (б) земањето мостри на свињи во контакт по првично откривање на лажно позитивна не открива серум конверзија;
  - (в) количината на титар на антитело на повторено земање на мостри останува иста или се намалува.
4. Сепак, следните дополнителни критериуми и начела треба исто да се земаат предвид при потврдата на лажно позитивна:
- (а) лажно позитивна се појавува на распространетост од приближно 1 на 1000 свињи;
  - (б) серумите од лажно позитивните главно го имаат следниот профил:
    - низок титар на антитело при испитување со неутрализација на вирус,
    - граничната позитивна вредност во компетитивна ЕЛИСА на база на моноклонско на антитело,
    - исклучиво присуство на IgM и отсуство на IgG при ЕЛИСА со специфичен изотоп на везикуларна болест кај свињи<sup>3</sup>.

#### Дел 9 - Клинички знаци и одлики на везикуларната болест кај свињите

Везикуларната болест кај свињите е заразна болест кај свињите предизвикана од ентеровирус од фамилијата *picornaviridae*, која може да биде субклиничка, блага или тешка везикуларна состојба во зависност од сојот на вирусот, патот и дозата на инфекцијата, како и состојбата во самите објекти каде се чуваат свињите. Дополнителни фактори на стрес, како превоз, мешање со други свињи и екстремни температури, може исто така да влијаат врз развојот на клинички знаци.

Се карактеризира со блага треска и везикули на коронарната круна, коренот на петата, кожата на екстремитетите и поретко на муцката, усните, јазикот и брадавиците. Стапката на заболување може да биде висока и до 100%, но стапката на смртност е многу мала или воопшто ја нема.

Заразата може да се развие незабележително или во блага форма покажувајќи единствено краткотрајно опаѓање на општата состојба на свињите, но водејќи кон развој на антителата за неутрализирање на вирусот за неколку дена<sup>4</sup>.

---

<sup>3</sup> Одреден IgG сам или двата IgG и IgM обично се открива во серум мострите од вирусот на везикуларна болест кај свињите кај заразени свињи, додека серуми од лажно позитивни главно содржат само IgM. Одреден IgG нема да биде откриен во серум мострите од заразените свињи со вирусот на везикуларна болест кај свињите за време на претходните 10 или 14 дена, иако одреден IgG треба да се открие со втората мостра од крв. Сепак, свињите заразени од неодамна не можат веродостојно да се разграничат од лажно позитивната пред нивната имуна реакција да се префрли со произведување од IgM на IgG. Да се види исто и Дел 9 и фуснота 7.

<sup>4</sup> Одреден IgM може најчесто да се открие во крвта од два до три дена по заразата и да исчезне по околу 30 до 50 дена; одреден IgG може најчесто да се открие во крвта од 10 до 14 дена по заразата и да трае неколку години. Ig изотипот може да се определи со помош на ЕЛИСА тестот опишано во Дел 8 точка Б подточка 2.

Поради субклиничка или блага природа на болеста, најчесто првично се поставува сомнеж за истата по вршење на серолошки тестови за надзор на болеста или при сертифицирање при извоз. Последните појави на везикуларната болест кај свињите во Европа се карактеризирале со послаби или без клинички знаци, а поставувањето дијагноза често зависела од серолошките испитувања.

Сепак, клиничките знаци кај везикуларната болест кај свињите се многу слични со оние кај болеста шап и лигавка. Секоја везикуларна состојба треба првенствено да се третира под сомнение дека е болеста шап и лигавка и во најкраток можен рок треба да се обезбеди диференцијална дијагноза.

Периодот на инкубација на везикуларната болест кај свињите кај поединечни свињи обично трае од два до седум дена, по кој може да се појави краткотрајна треска до 41°C, но клиничките знаци може да се забележат во одгледувалиштето по подолг временски период. Тогаш се оформуваат везикули на коронарната круна, обично на спојот со петицата. Овие може да влијаат на целата коронарна круна и да доведат до губење на папците. Поретко, везикулите може исто така да се појават и на муцката, особено на дорзалната површина, на усните, јазикот и брадавиците и површински ерозии може да се појават и на колената. Заразените свињи може да куцаат и да го изгубат апетитот за неколку дена.

Кај помладите свињи болеста е посилено изразена, иако смртноста заради везикуларна болест кај свињите е поретка, за разлика од болеста шап и лигавка кај младите животни.

Знаци на нервни симптоми се појавуваат, но не се вообичаени. Абортусот не е карактеристичен за везикуларната болест кај свињите. Откажување на срцето заради мултифокален миокардитис може да се јави кај болеста шап и лигавка и енцефаломиокардитис, особено кај младите прасиња, но не се јавува кај везикуларната болест кај свињите.

Потполно оздравување обично настанува за две или три недели, при што единствен доказ за заразата е темна хоризонтална линија на папците каде што растот бил спречен привремено.

Заразените свињи го излучуваат вирусот од носот и устата и со фецесот до 48 часа пред појавата на клинички знаци. Најчесто вирусот се размножува во првите седум дена по заразата, а излучувањето на вирусот од носот и устата обично престанува за две недели. Вирусот може да биде изолиран од фецесот и до 20 дена по заразата, иако е забележано присуство и до три месеци. Може да се задржи значителен временски период во некротичното ткиво кое настанало како резултат на пукање на везикулите и во фекалиите.

## Дел 10 - Референтните серуми за везикуларна болест кај свињите

Референтен серум	Потекло	Забелешки <sup>7</sup>
1	Серум за здрава свиња (NPS)	Негативен контролен серум
2	Серум земен 21 ден по заразата (dpi) од свиња заразена со сојот UKG 27/72 на вирусот на везикуларна болест кај свињите (чист)	Силна позитивен контролен серум.
3	1:10 раствор во NPS на серум земен пет дена по заразата од свиња заразена со сојот Италија 8/94 на вирусот на везикуларна болест кај свињите	Ниско позитивен серум од свиња набргу по заразата со неодамнешен европски изолат на вирусот на везикуларна болест кај свињите. Серумот е разреден за да даде ниско позитивен резултат со ЕЛИСА тестот и испитувањето со неутрализација на вирус.
4	1:40 раствор на серум земен 21 ден по заразата од свиња заразената со сојот UKG 27/72 на вирусот на везикуларна болест кај свињите	Ниско позитивен серум кој го определува најниското ниво на антитела, за кој Националните референтни лаборатории треба да добијат позитивен резултат со ЕЛИСА тестот и испитувањето со неутрализација на вирус. Еднакви на серумот RS 01-04-94 <sup>8</sup>
5	Серум земен 4 дена по заразата од заражена свиња со сојот UKG 27/72 на вирусот на везикуларна болест кај свињите (чист)	Ниско позитивен серум од свиња набргу по заразата.
6	Серум земен 5 дена по заразата од заражена свиња со сојот UKG 27/72 на вирусот на везикуларна болест кај свињите (чист)	Ниско позитивен серум од свиња набргу по заразата.

<sup>7</sup> Овие забелешки се однесуваат на испитувањето на поединечни свињи. За надзор со серум, чувствителноста на користеното испитување треба да биде земено предвид.

<sup>8</sup> т.е. серум со титар значително поголем од пресекот кој треба секогаш да постигнува позитивен резултат со ЕЛИСА тестот и испитувањето со неутрализација на вирус во повторени испитувања.

<sup>(\*)1</sup> Законот за ветеринарно здравство е усогласен со Одлуката 90/424/ЕЕЗ и Директивата 90/425/ЕЕЗ.

<sup>(\*)2</sup> Членовите 51 и 53 став (1) од Законот за ветеринарно здравство се усогласени со членот 4 од Директива 92/119/ЕЕЗ.