

DECIZIA COMISIEI
din 26 mai 2003
de aprobare a manualului de diagnostic al pestei porcine africane

[notificată cu numărul C(2003) 1696]

(Text cu relevanță pentru SEE)

(2003/422/CE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 2002/60/CE a Consiliului din 27 iunie 2002 de stabilire a dispozițiilor specifice de combatere a pestei porcine africane și de modificare a Directivei 92/119/CEE referitoare la boala Teschen și la pesta porcină africană ⁽¹⁾, în special articolul 18 alineatul (3),

întrucât:

- (1) Este necesar, în conformitate cu Directiva 2002/60/CE, să se stabilească procedurile de diagnostic, metodele de prelevare a probelor și criteriile uniforme pentru evaluarea rezultatelor testelor de laborator destinate să confirme pesta porcină africană.
- (2) În conformitate cu această directivă, laboratorul comunitar de referință pentru pesta porcină africană are sarcina să coordoneze, cu consultarea Comisiei, metodele utilizate în statele membre pentru diagnosticarea bolii, în special prin organizarea de teste comparative periodice și furnizarea de reactive tip la scară comunitară.
- (3) Virusul pestei porcine africane nu este considerat periculos pentru sănătatea umană.
- (4) Au fost elaborate teste de laborator pentru a asigura un diagnostic rapid al pestei porcine africane.
- (5) Experiența dobândită în ultimii ani în combaterea pestei porcine africane a condus la identificarea procedurilor și a criteriilor de prelevare a probelor celor mai potrivite pentru evaluarea rezultatelor testelor de laborator, în măsură să permită diagnosticarea corectă a bolii în diferite situații.
- (6) În consecință, este necesar să se aprobe manualul de stabilire a acestor proceduri și criterii.
- (7) Este necesar ca laboratoarele naționale de diagnostic să fie autorizate să modifice testele de laborator aprobate sau să utilizeze teste diferite, cu condiția să se demonstreze o sensibilitate și o specificitate echivalente.
- (8) Măsurile prevăzute de prezenta decizie sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală,

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

Articolul 1

(1) Se aprobă manualul de diagnostic al pestei porcine africane prevăzut de anexă.

(2) Statele membre se asigură ca pesta porcină africană să fie confirmată în conformitate cu procedurile, metodele de prelevare a probelor și criteriile de evaluare a rezultatelor testelor de laborator descrise în manual și care se bazează pe:

- (a) detectarea semnelor clinice și ale leziunilor *post-mortem* ale bolii;
- (b) detectarea virusului, a antigenului sau a genomului în probele de țesuturi, organe, sânge sau materii fecale ale porcilor;
- (c) demonstrarea unui răspuns de anticorpi specifici în probele de sânge.

(3) Prin derogare de la alineatul (2), laboratoarele naționale de diagnostic prevăzute de anexa IV la Directiva 2002/60/CE pot aduce modificări testelor de laborator menționate în manual sau să utilizeze teste diferite, cu condiția să se demonstreze o sensibilitate și o specificitate echivalente.

În caz de utilizare a testelor modificate sau diferite, sensibilitatea și specificitatea acestora trebuie evaluate în teste comparative periodice, organizate de laboratorul comunitar de referință pentru pesta porcină africană.

Articolul 2

Prezenta decizie se aplică de la data de 1 iulie 2003.

Articolul 3

Prezenta decizie se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 26 mai 2003.

Pentru Comisie

David BYRNE

Membru al Comisiei

⁽¹⁾ JO L 192, 20.7.2002, p. 27.

ANEXĂ

MANUAL DE DIAGNOSTIC AL PESTEI PORCINE AFRICANE

Capitolul I

Introducere, obiective și definiții

1. Pentru a garanta aplicarea procedurilor uniforme de diagnostic al pestei porcine africane, prezentul manual:
 - (a) enunță orientările și cerințele minime privind procedurile de diagnostic, metodele de prelevare a probelor și criteriile care trebuie aplicate la evaluarea rezultatelor examenelor clinice sau *post-mortem*, precum și a testelor de laborator, în vederea stabilirii unui diagnostic corect al pestei porcine africane ⁽¹⁾;
 - (b) stabilește cerințele minime privind siguranța biologică și standardele de calitate pe care trebuie să le respecte laboratoarele de diagnosticare a pestei porcine africane și pentru transportul probelor;
 - (c) definește testele de laborator care trebuie efectuate pentru diagnosticarea pestei porcine africane și tehnicile de laborator care trebuie utilizate pentru tipizarea genetică a izolatelor de viruși ai pestei porcine africane.
2. Prezentul manual se adresează, în principal, autorităților competente în combaterea pestei porcine africane. De aceea, se pune accentul pe principiile și aplicarea testelor de laborator și evaluarea rezultatelor acestora, mai degrabă decât pe detalierea tehnicilor de laborator.
3. În conformitate cu prezentul manual, cu excepția definițiilor prevăzute la articolul 2 din Directiva 2002/60/CE, se înțelege prin:
 - (a) „exploatație suspectă”: orice exploatație care numără unul sau mai mulți porci suspecți de a fi infectați cu virusul pestei porcine africane sau o exploatație care a avut contacte în înțelesul articolului 2 litera (k) din Directiva 2002/60/CE;
 - (b) „subunitate epidemiologică” sau „subunitate”: clădirea, locul sau terenul limitrof în care grupurile de porci dintr-o exploatație sunt deținute astfel încât să intre frecvent în contact direct sau indirect unii cu ceilalți, fiind în același timp separați de ceilalți porci deținuți în aceeași exploatație;
 - (c) „porci în contact”: porcii dintr-o exploatație, deținuți timp de 21 de zile, în contact direct sau cu unul sau mai mulți porci suspecți de a fi infectați cu virusul pestei porcine africane.

Capitolul II

Descrierea pestei porcine africane cu accent pe diagnosticul diferențial

A. INTRODUCERE

1. Pesta porcină africană este provocată de un virus ADN cu envelopă, aparținând genului *Asfivirus* din familia *Asfarviridae*. Virulența virusului pestei porcine africane variază în funcție de sușe, deși nu se pot identifica serotipuri diferite.
2. Virusul pestei porcine africane este foarte stabil în excrețiile porcilor infectați, în carcasele de porc, în carnea proaspătă de porc și în anumite produse din carne de porc. Trebuie folosiți dezinfectanți corespunzători pentru a asigura neutralizarea în mediu.
3. În Europa, principala cale naturală de infectare a porcilor este de tip oro-nazal, prin contact direct sau indirect cu porci infectați sau prin administrarea animalelor de alimente contaminate cu virus. Cu toate acestea, în regiunile în care există vectori ⁽²⁾, transmiterea prin aceștia din urmă are un rol foarte important în persistența și răspândirea virusului. Pesta porcină africană se poate răspândi, de asemenea, prin contact indirect cu materii contaminate și prin insecte înțepătoare, vectori ai virusului pestei porcine africane. Boala se poate transmite, de asemenea, prin material seminal provenind de la vieri infectați.
4. Perioada de incubație la indivizi este cuprinsă între 5 și 15 zile, dar în condiții reale simptomele clinice pot să nu apară într-o exploatație decât după mai multe săptămâni de la introducerea virusului și chiar mai mult, în cazul în care sușa virală este atenuată.

⁽¹⁾ La determinarea numărului de probe care trebuie prelevate pentru testele de laborator, este necesar se țină seama și de sensibilitatea testelor care vor fi efectuate. Numărul animalelor de la care sunt prelevate probele va fi mai ridicat decât cel indicat în prezentul manual, în cazul în care sensibilitatea testului ce urmează a fi efectuat este scăzută.

⁽²⁾ Definiți la articolul 2 litera (r) din Directiva 2002/60/CE.

5. Pesta porcină africană prezintă forme acute, subacute și cronice, diferența constând, în principal, în virulența virusului.
6. Viremia persistă între 40 și 60 de zile la porcii convalescenți după infecție, care devin vectori ai virusului. Virusul pestei porcine africane a fost izolat pe porci infectați până la șase luni după infectare.

B. FORMA ACUTĂ

1. Apariția febrei mari (peste 40 °C) este, în general, primul semn clinic al bolii, care este însoțită de următoarele simptome: depresie, inapetență, respirație rapidă și dificilă, scurgeri nazale și oculare. Porcii prezintă tulburări de coordonare a mișcărilor și se îngheșue unii într-alții. Scroafele prezintă risc de avort în orice stadiu de gestație. Unii porci suferă de vărsături sau constipație, iar alții de diaree cu sânge. În special la extremități și la urechi apar zone congestionate sau hemoragice subcutanate. Coma, care survine între una și șapte zile de la apariția semnelor clinice, poate preceda moartea animalului. Rata de morbiditate și de mortalitate într-o exploatare poate atinge 100 %.

Examele *post-mortem* indică un sindrom hemoragic tipic, cu congestie generalizată a carcanei, lichide sângerânde în torax și cavitățile abdominale, splină neagră și dilatată, hemoragie în ganglionii limfatici (în special în ganglionii limfatici renali și gastrohepatici) care seamănă cu cheagurile de sânge, hemoragii eruptive în rinichi (cortex, substanță medulară și bazinet), pe membranele seroase abdominale, pe mucoasele gastrice și intestinale, în inimă (epicard și endocard), precum și hidrotorax și hemoragii eruptive ale pleurei.

2. În general, forma acută a pestei porcine clasice prezintă un tablou clinic și patologic foarte apropiat de cel al pestei porcine africane. Atunci când se manifestă, hemoragiile pielii și urechilor sunt ușor de depistat și anunță pesta porcină clasică sau africană acută. Puține alte boli cauzează leziuni similare.

Prezența pestei porcine africane acute trebuie luată, de asemenea, în considerare în caz de suspiciune de erizipel, de sindrom disgenetic și respirator porcin (SDRP), de otrăvire cu cumarină, de erupție hemoragică, de sindrom cașectic multisistemic după sevră, de sindrom dermic și nefropatic, de infecție cu *Salmonella* sau *Pasteurella* sau de orice alt sindrom enteric sau respirator însoțit de febră, care nu reacționează la tratamentul cu antibiotice.

C. FORME SUBACUTE

Formele subacute ale bolii se întâlnesc mai des în regiunile în care aceasta este endemică. Infecția subacută se caracterizează prin următoarele simptome: acces de febră variabilă, depresie și pneumonie. Insuficiența cardiacă poate conduce la moartea animalului. În forma subacută a bolii, leziunile sunt similare cu cele care se observă în forma acută, dar sunt atenuate. Este vorba, în principal, de hemoragii importante în ganglionii limfatici, rinichi și splină, de congestie pulmonară și de edem pulmonar și, în anumite cazuri, de pneumonie interstițială.

D. FORME CRONICE

Formele cronice ale bolii sunt rare. În cazul în care apar, se pot observa infecții bacteriene secundare. Deoarece semnele clinice ale pestei porcine africane cronice nu sunt specifice, pot fi luate în calcul multe alte boli pentru stabilirea diagnosticului diferențial. Nu toate animalele prezintă în mod necesar creșterea temperaturii corporale, dar cel puțin o parte dintre porcii unei exploatare contaminate au febră.

Simptomele clinice ale pestei porcine africane pot include probleme respiratorii, avorturi, artrită, ulcere dermice sau necroze cronice, care nu seamănă cu simptomele clinice tipice ale infecțiilor cauzate de virusul pestei porcine africane. Leziunile pot fi minime, chiar absente. Observațiile histopatologice se caracterizează prin dilatarea ganglionilor limfatici și a splinei, pleurită și pericardită fibrinoasă, precum și prin infiltrație pneumonică. Se menționează, de asemenea, necroza cavernoasă focală și mineralizarea plămânilor.

Capitolul III

Orientări privind principalele criterii care trebuie reținute pentru a considera o exploatare suspectă de a fi atinsă de pesta porcină africană

1. O exploatare este considerată suspectă pe baza următoarelor constatări, criterii și motive:
 - (a) indici clinici și patologici la porci. Principalii indici clinici și patologici care trebuie reținuți sunt următorii:
 - febră, însoțită de morbiditate și mortalitate la porcii de toate vârstele;
 - febră însoțită de sindrom hemoragic; peteșii și hemoragii echimotice, în special în ganglionii limfatici, rinichi și splină (care este dilatată și neagră, în special în forma acută a bolii), precum și în vezică, și ulceratii ale vezicii biliare;

- (b) indici epidemiologici. Principalii indici epidemiologici care trebuie reținuți sunt următorii:
- porci care au avut contacte directe sau indirecte cu o exploatație de creștere a porcilor în care s-a demonstrat contaminarea cu pesta porcină africană;
 - exploatație care a livrat porcine, ce s-au dovedit apoi contaminate cu virusul pestei porcine africane;
 - scoafe care au fost inseminate artificial cu material seminal de proveniență suspectă;
 - porci care au avut contacte indirecte sau directe cu porci sălbatici dintr-o populație în care s-au semnalat cazuri de pestă porcină africană;
 - porci deținuți în aer liber într-o zonă în care porcii sălbatici sunt contaminați cu pesta porcină africană;
 - porci hrăniți cu ape murdare despre care se poate presupune că nu au fost tratate astfel încât să neutralizeze virusul pestei porcine africane;
 - eventuala expunere datorată, în special, intrării în exploatație sau în mijlocul de transport a unor persoane venind din exploatații suspecte de a fi infectate sau infectate cu virusul pestei porcine africane;
 - vectori prezenți pe teritoriul exploatației.
2. În orice caz, o exploatație trebuie să fie considerată suspectă în cazul în care există suspiciunea pestei porcine clasice în exploatație, datorită rezultatelor clinice sau patologice, dar unde nici o investigație clinică, epidemiologică sau de laborator nu a condus la confirmarea bolii sau la identificarea altor surse sau agenți ai bolii în exploatația respectivă.

Capitolul IV

Proceduri de control și prelevare a probelor

A. ORIENTĂRI ȘI PROCEDURI PRIVIND EXAMENUL CLINIC ȘI PRELEVAREA PROBELOR DE LA PORCI ÎNTR-O EXPLOATAȚIE SUSPECTĂ

1. Statele membre se asigură că se va efectua un examen clinic, o prelevare a probelor și investigații de laborator corespunzătoare în exploatațiile suspecte, pentru a confirma sau a înlătura prezența pestei porcine africane, în conformitate cu orientările și procedurile prevăzute la punctele 2-6.

Independent de adoptarea măsurilor prevăzute la articolul 4 alineatul (2) din Directiva 2002/60/CE în exploatația respectivă, aceste orientări și proceduri se aplică, de asemenea, la toate patologiile pentru care diagnosticul diferențial ia în considerare eventualitatea pestei porcine africane. Acestea se referă, de asemenea, la cazurile în care semnele clinice și tabloul epidemiologic al bolii observate la porci sugerează o foarte mică probabilitate a prezenței pestei porcine.

În toate celelalte cazuri de suspiciune de contaminare cu virusul pestei porcine africane la unul sau mai mulți porci, măsurile prevăzute la articolul 4 alineatul (2) din Directiva 2002/60/CE vor fi adoptate în exploatația suspectă respectivă.

În cazul în care se suspectează prezența pestei porcine africane la porcii din abator sau din mijloacele de transport, orientările și procedurile prevăzute la punctele 2-6 se aplică *mutatis mutandis*.

2. În cazul în care un medic veterinar oficial vizitează o exploatație suspectă pentru a confirma sau exclude prezența pestei porcine africane, el procedează:

- la verificarea registrelor de producție și a situației sanitare a exploatației, în cazul în care sunt disponibile, la inspectarea fiecărei subunități a exploatației pentru a selecționa porcii care urmează a fi supuși examenului clinic.

Examenul clinic cuprinde măsurarea temperaturii corporale și se referă, în primul rând, la porcii sau următoarele categorii de porci:

- porci bolnavi sau anorexici;
- porci introduși de curând și provenind din focare confirmate sau din alte surse suspecte;
- porci deținuți în subunități recent vizitate de vizitatori externi, care au intrat de curând în contact strâns cu porci suspecti sau infectați cu pestă porcină africană sau care au fost recunoscuți că au avut contacte deosebit de riscante cu o sursă potențială de virus de pestă africană;
- porci deja supuși prelevării de probe și testelor serologice de depistare a pestei porcine africane, în cazul în care rezultatele testelor nu permit excluderea prezenței pestei porcine africane, precum și porcii în contact;
- porci care s-au vindecat de curând.

În cazul în care inspectarea exploatației suspecte nu a dovedit prezența nici unui porc sau a nici unei categorii de porci enumerate anterior, autoritatea competentă procedează astfel încât, fără să aducă atingere altor măsuri care pot fi aplicate în exploatația în cauză, în conformitate cu Directiva 2002/60/CE și ținând seama de situația epidemiologică:

- să se efectueze alte investigații în exploatația respectivă, în conformitate cu punctul 3, sau
- să fie prelevate probe de sânge de la porcii din exploatație, în vederea testelor de laborator. În acest caz, procedurile de prelevare a probelor prevăzute la punctul 5 și la punctul 2 din partea F se aplică orientativ, sau
- să se adopte ori să se mențină măsurile prevăzute la articolul 4 alineatul (2) din Directiva 2002/60/CE, în așteptarea investigațiilor suplimentare care urmează a fi efectuate în exploatația respectivă, sau
- să fie înlăturată suspiciunea de pestă porcină africană.

3. Atunci când se face trimitere la prezentul punct, examenul clinic care urmează să fie efectuat în exploatația respectivă trebuie să vizeze porci aleși la întâmplare în subunitățile în care riscul de introducere a virusului pestei porcine africane a fost constatat sau în cele în care se suspectează prezența virusului.

Numărul minim de porci care urmează a fi examinați trebuie să permită detectarea, în subunități, a unei prevalențe a bolii de 10 % și, după caz, cu un nivel al încrederii de 95 %.

4. În cazul în care într-o exploatație suspectă se constată că sunt porci morți sau muribunzi, se procedează la examene *post-mortem*, de preferință la cel puțin cinci porci și în special la porcii care:
- prezentau semne foarte clare ale bolii înainte de moarte;
 - aveau temperatură foarte ridicată;
 - au murit de curând.

În cazul în care aceste examene nu au pus în evidență leziuni care să sugereze apariția pestei porcine africane, dar datorită situației epidemiologice se consideră că este necesară efectuarea de investigații suplimentare, se procedează:

- în subunitatea în care erau deținuți porcii morți sau muribunzi, la un examen clinic, în conformitate cu prevederile punctului 3 și la prelevarea de probe de sânge, în conformitate cu prevederile punctului 5 și
- la un examen *post-mortem* a trei sau patru porci în contact, în special în cazul în care porcii prezintă semne clinice.

Independent de prezența sau absența leziunilor care sugerează apariția pestei porcine africane, trebuie prelevate probe de organe sau de țesuturi de la porcii care au făcut obiectul examenului *post-mortem*, pentru a le supune testelor virologice, în conformitate cu capitolul V partea B punctul 1. De preferință, probele se prelevează de la porci morți de curând.

În cursul examenelor *post-mortem*, autoritatea competentă trebuie să procedeze astfel încât:

- să se ia precauțiile și măsurile de igienă necesare pentru a evita răspândirea bolii și
- în cazul porcilor muribunzi sacrificarea să se facă în mod uman, în conformitate cu Directiva 93/119/CE a Consiliului din 22 decembrie 1993 privind protecția animalelor în momentul sacrificării sau uciderii ⁽¹⁾, astfel cum a fost modificată prin Regulamentul (CE) nr. 806/2003 ⁽²⁾.

5. În cazul în care, într-o exploatație suspectă, se constată alte semne clinice sau leziuni care ar putea să sugereze apariția pestei porcine africane, dar pe care autoritatea competentă le consideră insuficiente pentru a confirma existența unui focar de pestă porcină africană și, în consecință, sunt necesare teste de laborator, probele de sânge destinate acestor teste trebuie să fie prelevate de la porci suspecti sau de la alți porci, în fiecare dintre subunitățile în care sunt deținuți porcii suspecti, în conformitate cu procedurile următoare:

- (a) numărul minim de probe care urmează să fie prelevate în vederea testelor serologice trebuie să permită detectarea, în subunitățile respective, a unei seroprevenențe de 10 % cu un nivel al încrederii de 95 %;
- (b) numărul de probe care urmează să fie prelevate în vederea testelor virologice va fi conform cu instrucțiunile autorității competente, care vor ține seama de gama de teste ce pot fi efectuate, de sensibilitatea testelor de laborator utilizate și de situația epidemiologică.

⁽¹⁾ JO L 340, 31.12.1993, p. 21.

⁽²⁾ JO L 122, 16.5.2003, p. 1.

6. În cazul în care, după examenele efectuate într-o exploatație suspectă, nu se depistează nici semne clinice, nici leziuni de natură să sugereze apariția pestei porcine africane, dar autoritatea competentă consideră că este necesară efectuarea unor teste de laborator suplimentare pentru a înlătura orice probabilitate de pestă porcină africană, procedurile de prelevare a probelor stabilite anterior la punctul 5 se vor aplica orientativ.
- B. PROCEDURI DE PRELEVARE A PROBELOR ÎN EXPLOATAȚII, ÎN CAZUL SACRIFICĂRII PORCILOR, CA URMARE A CONFIRMĂRII BOLII
1. În vederea stabilirii împrejurărilor în care a fost introdus virusul pestei porcine africane într-o exploatație infectată și a perioadei care a trecut de la introducerea, la sacrificarea porcilor într-o exploatație, după confirmarea focarului, în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) din Directiva 2002/60/CE, probele de sânge destinate testelor serologice se prelevează, în mod aleatoriu, de la porci în momentul sacrificării.
 2. Numărul minim de porci supuși prelevării de probe trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 10 % cu un nivel al încrederii de 95 % pentru porcii din fiecare subunitate a exploatației ⁽¹⁾.
- De asemenea, se vor preleva probe în vederea testelor virologice, în conformitate cu instrucțiunile autorității competente, care vor ține seama de gama de teste care pot fi efectuate, de sensibilitatea testelor de laborator utilizate și de situația epidemiologică.
- În cazurile în care prezența vectorilor infectați cu virusul pestei porcine africane a fost demonstrată anterior, trebuie prelevate, de asemenea, probele adecvate de argaside, în vederea testelor virologice, în conformitate cu instrucțiunile autorității competente și cu anexa III la Directiva 2002/60/CE.
3. Cu toate acestea, în cazul apariției de focare secundare, autoritatea competentă poate să decidă derogarea de la dispozițiile punctelor 1 și 2 și să stabilească alte proceduri de prelevare a probelor, ținând seama de informația epidemiologică deja disponibilă referitoare la sursă și la căile de introducere a virusului în exploatație și de răspândirea potențială a bolii pornind din exploatație.

C. PROCEDURI DE PRELEVARE A PROBELOR LA SACRIFICAREA PORCILOR CA MĂSURĂ PREVENTIVĂ ÎNTR-O EXPLOATAȚIE SUSPECTĂ

1. Pentru a confirma sau a înlătura posibilitatea prezenței pestei porcine africane și pentru a obține informații epidemiologice suplimentare, la sacrificarea porcilor dintr-o exploatație suspectă, ca măsură preventivă, în conformitate cu dispozițiile articolului 4 alineatul (3) litera (a) sau ale articolului 7 alineatul (2) din Directiva 2002/60/CE, probele de sânge destinate testelor serologice și virologice trebuie prelevate în conformitate cu procedura stabilită la punctul 2.
2. Prelevarea probelor se referă cu prioritate la:
 - porcii care prezintă semne sau leziuni *post-mortem*, care sugerează apariția pestei porcine africane, precum și porcii în contact;
 - alți porci care ar fi putut avea contacte de risc cu porci infectați sau suspecți sau porci suspecți de a fi fost contaminați de virusul pestei porcine africane. Prelevarea probelor de la porci trebuie efectuată în conformitate cu instrucțiunile autorității competente, care vor ține seama de situația epidemiologică.

De asemenea, porcii provenind din fiecare subunitate a exploatației trebuie să facă obiectul unei prelevări aleatorii a probelor ⁽²⁾. În acest caz, numărul minim de probe care urmează a fi prelevate în vederea testelor serologice trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 10 % cu un nivel al încrederii de 95 % în subunitatea respectivă.

Tipul de probe care urmează a fi prelevate în vederea testelor virologice și testele care urmează a fi utilizate vor fi în conformitate cu instrucțiunile autorității competente care va ține seama de gama de teste care pot fi efectuate, de sensibilitatea testelor și de situația epidemiologică.

⁽¹⁾ Cu toate acestea, în cazul în care se recurge la derogarea prevăzută la articolul 6 alineatul (1) din Directiva 2002/60/CE, prelevarea de probe trebuie să se refere la subunitățile exploatației ai cărei porci au fost sacrificați, fără a se aduce atingere celorlalte examene și prelevări de probe care urmează a fi practicate la ceilalți porci din exploatație, care vor fi efectuate în conformitate cu instrucțiunile autorității competente.

⁽²⁾ Cu toate acestea, în cazul în care autoritatea competentă a limitat operațiunea de sacrificare preventivă numai la partea de exploatație în care erau deținuți porcii suspecți de a fi fost infectați sau contaminați cu virusul pestei porcine africane, în conformitate cu articolul 4 alineatul (3) litera (a) din Directiva 2002/60/CE, prelevarea de probe trebuie să se refere la subunitățile din exploatație în care măsura a fost aplicată, fără a aduce atingere examenelor și eșantionărilor suplimentare ce urmează a fi practicate la porcii rămași în exploatație, care vor fi efectuate în conformitate cu instrucțiunile autorității competente.

D. PROCEDURI DE CONTROL ȘI DE PRELEVARE A PROBELOR CARE TREBUIE PUSE ÎN APLICARE ÎNAINTE DE ELIBERAREA AUTORIZAȚIEI DE DEPLASARE A PORCILOR DIN EXPLOATAȚIILE SITUATE ÎN ZONELE DE PROTECȚIE SAU DE SUPRAVEGHERE ȘI ÎN CAZUL SACRIFICĂRII SAU UCIDERII ACESTOR PORCI (ARTICOLELE 10 ȘI 11 DIN DIRECTIVA 2002/60/CE)

1. Fără a aduce atingere dispozițiilor articolului 11 alineatul (1) litera (f) paragraful al doilea din Directiva 2002/60/CE, pentru a permite eliberarea autorizației de deplasare a porcilor dintr-o exploatație situată într-o zonă de protecție sau de supraveghere, în conformitate cu articolul 10 alineatul (3) din directiva respectivă, examenul clinic care urmează a fi efectuat de un veterinar oficial trebuie:
 - să fie efectuat în cele 24 de ore care preced deplasarea porcilor;
 - să fie conform cu dispozițiile stabilite de partea A punctul 2.

2. În cazul în care porcii se transportă spre o altă exploatație, în afară de investigațiile necesare, în conformitate cu dispozițiile de la punctul 1, trebuie să se efectueze un examen clinic al porcilor, inclusiv măsurarea temperaturii unui anumit număr dintre aceștia, în fiecare subunitate de exploatație în care sunt deținuți porcii care urmează a fi transportați.

Numărul minim de porci care urmează a fi controlați trebuie să permită detectarea unei prevalențe a bolii de 10 %, după caz, cu un nivel al încrederii de 95 % în subunitățile respective.

3. În cazul în care porcii se transportă la un abator, la o unitate de transformare sau în alte locuri pentru a fi sacrificați sau uciși, în afară de investigațiile necesare, în conformitate cu dispozițiile punctului 1, trebuie să se efectueze un examen clinic al porcilor din fiecare subunitate în care sunt deținuți porcii care urmează a fi transportați. În cazul în care porcii au depășit vârsta de trei sau patru luni, examenul trebuie să cuprindă măsurarea temperaturii unui anumit număr de porci.

Numărul minim de porci care urmează a fi controlați trebuie să permită detectarea, în subunitatea respectivă, a unei prevalențe a bolii de 20 %, după caz, cu un nivel al încrederii de 95 %.

4. La sacrificarea sau uciderea porcilor menționați la punctul 3, trebuie să se preleveze, de la porcii provenind din fiecare subunitate din care au fost transportați porcii, probe de sânge, în vederea testelor serologice, sau probe de sânge sau organe, cum ar fi amigdalele, splina sau ganglionii limfatici, în vederea testelor virologice.

Numărul minim de probe care urmează a fi prelevate trebuie să permită detectarea unei seroprevenențe sau unei prevalențe a virusului de 10 % cu un nivel al încrederii de 95 % în fiecare subunitate.

Tipul de probe care urmează a fi prelevate și testele care urmează a fi utilizate sunt conforme cu instrucțiunile autorității competente, care vor ține seama de gama de teste ce pot fi efectuate, de sensibilitatea testelor și de situația epidemiologică.

5. Cu toate acestea, în cazul în care în momentul sacrificării sau uciderii porcilor se detectează semne clinice sau leziuni *post-mortem* care sugerează prezența pestei porcine africane, prin derogare de la dispozițiile punctului 4, se aplică dispozițiile referitoare la prelevarea probelor, stabilite la partea C.
6. Derogarea prevăzută la articolul 10 alineatul (5) și la articolul 11 alineatul (4) din Directiva 2002/60/CE se poate acorda, cu condiția ca autoritățile competente să se asigure ca un program intensiv de prelevări de probe și de teste să se aplice și la categoriile de porci menționate anterior la punctele 2, 3 și 4, care trebuie să facă obiectul controalelor sau de la care trebuie prelevate probe. În cadrul acestui program, numărul minim de probe de sânge care urmează a fi prelevate trebuie să permită detectarea unei seroprevenențe de 5 % cu un nivel al încrederii de 95 % din grupul respectiv de porci.

E. PROCEDURI DE CONTROL ȘI DE PRELEVARE A PROBELOR ÎNTR-O EXPLOATAȚIE, ÎN CADRUL REPOPULĂRII

1. În cazul reintroducerii porcilor într-o exploatație în conformitate cu articolul 13 alineatul (3) din Directiva 2002/60/CE, trebuie să se aplice următoarea procedură de prelevare a probelor:
 - probele de sânge trebuie să fie prelevate cel mai devreme la 45 de zile după reintroducerea porcilor;
 - în cazul reintroducerii porcilor santinele, probele de sânge destinate testelor serologice trebuie să fie prelevate în mod aleatoriu, de la un număr de porci care să permită detectarea unei seroprevenențe de 10 % cu un nivel al încrederii de 95 % în fiecare subunitate a exploatației;
 - în cazul repopulării complete, probele de sânge destinate testelor serologice trebuie să fie prelevate în mod aleatoriu, de la un număr de porci care să permită detectarea unei seroprevenențe de 20 % cu un nivel al încrederii de 95 % în fiecare subunitate a exploatației.

2. În cazul reintroducerii porcilor într-o exploatație în conformitate cu articolul 13 alineatul (4) din Directiva 2002/60/CE, se aplică următoarea procedură de prelevare a probelor:
 - probele de sânge trebuie să fie prelevate cel mai devreme la 45 de zile de la reintroducerea porcilor;
 - în cazul reintroducerii porcilor santinele, probele de sânge destinate testelor serologice trebuie să fie prelevate în mod aleatoriu, de la un număr de porci care să permită detectarea unei seroprevalențe de 5 % cu un nivel al încrederii de 95 % în fiecare subunitate a exploatației;
 - în cazul repopulării complete, probele de sânge destinate testelor serologice trebuie să fie prelevate în mod aleatoriu, de la un număr de porci care să permită detectarea unei seroprevalențe de 10 % cu un nivel al încrederii de 95 % în fiecare subunitate a exploatației.

Procedura prevăzută la liniuța a treia se repetă, apoi, cel mai devreme la 60 de zile de la repopularea completă.

3. După reintroducerea porcilor, autoritatea competentă procedează astfel încât, în cazul apariției unei boli sau al decesului din cauză necunoscută a porcilor din exploatație, porcii respectivi să facă de îndată obiectul depistării pestei porcine africane.

Aceste dispoziții se aplică atât timp cât restricțiile prevăzute la articolul 13 alineatul (3) literele (a) și (b) și la articolul 13 alineatul (4) din Directiva 2002/60/CE nu sunt ridicate în exploatația în cauză.

F. PROCEDURI DE PRELEVARE A PROBELOR ÎN EXPLOATAȚIILE SITUATE ÎN ZONA DE PROTECȚIE ÎNAINTE DE RIDICAREA RESTRICȚIILOR

1. Pentru a permite ridicarea măsurilor prevăzute la articolul 10 din Directiva 2002/60/CE într-o zonă de protecție se efectuează în toate exploatațiile din zonă:
 - un examen clinic, în conformitate cu procedurile definite la partea A punctele 2 și 3;
 - prelevarea de probe de sânge destinate testelor serologice, în conformitate cu punctul 2 de mai jos.
2. Numărul minim de probe de sânge care urmează a fi prelevate trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 10 % cu un nivel al încrederii de 95 % la porcii din fiecare subunitate a exploatației.

Cu toate acestea, derogarea prevăzută la articolul 10 alineatul (5) și la articolul 11 alineatul (4) din Directiva 2002/60/CE nu se acordă decât în cazul în care autoritatea competentă se asigură ca numărul de probe prelevate să permită detectarea unei seroprevalențe de 5 % cu un nivel al încrederii de 95 % în subunitatea respectivă.

G. PROCEDURI DE PRELEVARE A PROBELOR ÎN EXPLOATAȚIILE SITUATE ÎN ZONA DE PROTECȚIE ÎNAINTE DE RIDICAREA RESTRICȚIILOR

1. Pentru a permite ridicarea restricțiilor prevăzute la articolul 11 din Directiva 2002/60/CE, într-o zonă de supraveghere, se efectuează în toate exploatațiile din zonă un examen clinic, în conformitate cu procedurile prevăzute la partea A punctul 2.

De asemenea, se prelevează de la porci probe de sânge destinate testelor serologice:

- în orice altă exploatație în care prelevarea probelor este considerată necesară de autoritatea competentă;
 - în toate centrele de colectare a materialului seminal.
2. În toate situațiile în care prelevările de probe de sânge destinate testelor serologice se efectuează în exploatații situate în zona de supraveghere, numărul de probe care urmează a fi prelevate trebuie să fie conform cu dispozițiile părții F punctul 2 prima teză.

Cu toate acestea, derogarea prevăzută la articolul 10 alineatul (5) și la articolul 11 alineatul (4) din Directiva 2002/60/CE nu se poate acorda decât în cazul în care autoritatea competentă se asigură ca probele de sânge să fie prelevate în vederea testelor serologice, în fiecare exploatație situată în zona respectivă. Numărul minim de probe de sânge care urmează a fi prelevate trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 5 % cu un nivel al încrederii de 95 % la porcii din fiecare subunitate a exploatației.

H. PROCEDURI DE SEROSUPRAVEGHERE ȘI DE PRELEVARE A PROBELOR ÎN ZONELE ÎN CARE SE SUSPECTEAZĂ SAU A FOST CONFIRMATĂ PREZENȚA PESTEI PORCINE AFRICANE LA PORCII SĂLBATICI

1. În cazul serosupravegherii porcilor sălbatici dintr-o zonă în care prezența pestei porcine africane este suspectată sau a fost confirmată, dimensiunea și aria geografică a populației țintă care urmează a fi supusă prelevării de probe trebuie stabilite dinainte, pentru a determina numărul de probe care urmează a fi prelevate. Dimensiunea eșantionului se stabilește în funcție de numărul estimat de animale vii, și nu în funcție de numărul de animale omorâte la vânătoare.
2. În cazul în care datele privind densitatea și dimensiunea populației nu sunt disponibile, aria geografică ce urmează să facă obiectul prelevării de probe trebuie să fie delimitată ținând seama de prezența constantă a porcilor sălbatici și de existența barierelor naturale sau artificiale eficiente pentru a împiedica mari mișcări continue de animale. În cazul în care situația nu se prezintă în acest fel sau în cazul în care suprafețele sunt întinse, se recomandă delimitarea unor arii de prelevare a probelor de circa 200 km², în măsură să adăpostească, în general, o populație de aproximativ 400 până la 1 000 de porci sălbatici.
3. Fără a aduce atingere dispozițiilor articolului 15 alineatul (2) litera (c) din Directiva 2002/60/CE, numărul minim de porci care urmează a fi supus prelevării de probe în interiorul ariei de prelevare a probelor delimitate trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 5 % cu un nivel al încrederii de 95 %. În acest scop, se supun prelevării de probe cel puțin 56 de animale în fiecare suprafață delimitată.
4. Prelevarea probelor destinate testelor virologice de la porcii sălbatici uciși la vânătoare sau găsiți morți se efectuează în conformitate cu dispozițiile capitolului V partea B punctul 1.

În cazul în care se consideră necesară supravegherea virusologică a porcilor sălbatici uciși la vânătoare, aceasta se efectuează cu prioritate la animalele în vârstă de sub un an.

5. Toate probele care urmează a fi trimise la laborator trebuie să fie însoțite de chestionarul menționat la articolul 16 alineatul (3) litera (h) din Directiva 2002/60/CE.

Capitolul V

Proceduri și criterii generale privind prelevarea și transportul probelor

A. PROCEDURI ȘI CRITERII GENERALE

1. Înainte de a efectua prelevarea de probe într-o exploatație suspectă, este necesar să se stabilească o hartă a exploatației și să se delimiteze subunitățile epidemiologice.
2. În orice situație în care se consideră necesară o a doua prelevare de probe, toți porcii supuși prelevării de probe trebuie să fie marcați cu un semn specific, astfel încât să poată fi supuși cu ușurință unei noi prelevări.
3. Toate probele trimise laboratorului trebuie să fie însoțite de formulare corespunzătoare, în conformitate cu prevederile stabilite de autoritatea competentă. Formularele vor menționa detaliile referitoare la antecedentele porcilor supuși prelevării de probe, precum și semnele clinice sau leziunile *post-mortem* observate.

În cazul porcilor deținuți într-o exploatație, se precizează informații clare privind vârsta, categoria și exploatarea de origine a porcilor supuși prelevării de probe. Se recomandă ca localizarea fiecărui porc supus prelevării de probe în exploatație să fie înregistrată în același timp cu marca sa specifică de identificare.

B. PRELEVAREA DE PROBE DESTINATE TESTELOR VIROLOGICE

1. Țesuturile provenind din amigdale, din ganglionii limfatici (gastrohepatici, renali, submaxilari și retrofaringieni), din splină, din rinichi și din plămâni porcilor morți sau eutanasiați constituie probele cele mai adecvate pentru a detecta virusul, antigenul sau genomul pestei porcine africane (¹). În cazul în care carcasele sunt autolizate, un os lung întreg sau sternul este proba ideală.
2. Probele de sânge anticoagulat și/sau coagulat trebuie să fie prelevate de la porcii care prezintă semne de febră sau alte semne de boală, în conformitate cu instrucțiunile autorității competente.

(¹) Se recomandă, de asemenea, prelevarea probelor de ileon, care pot fi utilizate la diagnosticarea pestei porcine clasice.

C. TRANSPORTUL PROBELOR

1. Se recomandă ca toate probele:
 - să fie corect identificate;
 - să fie transportate și depozitate în recipiente etanșe;
 - să fie conservate la rece, la temperatura de refrigerare. Cu toate acestea, în cazul în care se prevede că sunt necesare mai mult de 48 de ore pentru ca probele să ajungă la laborator, se contactează laboratorul pentru a furniza instrucțiuni privind condițiile de temperatură cele mai potrivite pentru transport;
 - să fie livrate cât mai repede la laborator;
 - să fie conservate în ambalaje cu saci de gheață sau zăpadă carbonică pentru a asigura refrigerarea;
 - de țesuturi sau de organe să fie puse în containere individuale din plastic, închise ermetic și etichetate corespunzător. Acestea vor fi apoi puse în containere mai mari și învelite într-o cantitate de material absorbant suficientă pentru a le proteja de orice vătămare și pentru a absorbi scurgerile;
 - pe cât posibil, să fie transportate direct la laborator de către o persoană competentă, astfel încât să se asigure un transport rapid și fiabil.
2. Pe partea exterioară a ambalajului se menționează adresa laboratorului de destinație și se afișează foarte vizibil următoarele indicații:
„Material patologic de origine animală, perisabil, fragil, a nu se deschide în afara unui laborator competent pentru pesta porcină africană”.
3. Persoana competentă din laboratorul de destinație a probelor trebuie să fie informată în timp util despre sosirea probelor.
4. În cazul în care probele sunt expediate pe calea aerului la laboratorul comunitar de referință pentru pesta porcină africană ⁽¹⁾, ambalajul se etichetează în conformitate cu regulamentele Asociației de Transport Aerian Internațional (AITA).

Capitolul VI

Principii și utilizări ale testelor virologice și evaluarea rezultatelor

A. DETECTAREA ANTIGENULUI VIRUSULUI

1. Test de imunofluorescență directă

Principiul testului este detectarea microscopică de antigeni virali pe frotiuri de amprentă sau pe lamele fine criogenice de material organic provenind de la porci suspecți de a fi infectați cu virusul pestei porcine africane. Antigenii intracelulari se detectează cu ajutorul unui anticorp specific conjugat FIT ⁽²⁾. În citoplasma celulelor infectate apar incluziuni celulare sau granule fluorescente.

Organele adecvate sunt rinichii, splina, precum și mai mulți ganglioni limfatici. Pentru porcii sălbatici, se poate folosi, de asemenea, un frotiu de măduvă osoasă, în cazul în care organele nu sunt disponibile sau sunt autolizate.

Testul se poate efectua pe parcursul a două ore. Deoarece probele de organe nu pot fi prelevate decât de la animale moarte, utilizarea lor în vederea depistării este limitată.

Este un test extrem de sensibil pentru a fi utilizat în cazurile de pestă porcină africană în formă acută. În ceea ce privește formele subacute sau cronice, sensibilitatea testului de imunofluorescență directă nu este decât de aproximativ 40 %, probabil datorită prezenței de complexe antigeni-anticorpi care blochează reacția cu anticorpii conjugat al pestei porcine africane. Gradul de încredere al rezultatelor poate fi limitat de colorații îndoielnice, mai ales în cazul în care experiența dobândită în materie de execuție a testului nu este mare sau în cazul în care organele examinate sunt autolizate.

2. ELISA pentru detectarea antigenului

Antigenul viral poate fi de asemenea detectat cu ajutorul tehnicilor ELISA, dar acest test nu se recomandă decât pentru formele acute ale bolii, din cauza slabei sensibilități în prezența complexelor antigeni-anticorpi. Sensibilitatea antigenului ELISA ar trebui să fie suficientă pentru a obține un rezultat pozitiv la animalele care prezintă semne clinice ale formei acute a pestei porcine africane. În orice situație, se recomandă utilizarea acestui test doar ca „test de efectiv de animale” și utilizarea în relație cu alte teste virologice.

⁽¹⁾ Laboratorul comunitar de referință dispune de autorizație nelimitată pentru a primi probe diagnostic și colonii de virusi de pestă porcină africană provenind din orice stat membru. În cazul în care proba provine din afara Uniunii Europene, se poate solicita laboratorului o copie a autorizației de import înainte de transport, care se introduce într-un plic lipit în exteriorul ambalajului.

⁽²⁾ Izotiocianat de fluoresceină.

B. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA VIRUSULUI PRIN TESTUL DE HEMADSORBȚIE

1. Izolarea virusului se bazează pe inocularea materialului din probă pe culturi celulare primare și sensibile de origine porcină, precum și pe celule monocite și macrofage. Cele mai bune probe pentru tehnica de izolare a virusului pești porcine africane sunt leucocitele și sângele integral prelevate de pe probe de sânge necoagulat sau organele menționate la partea A punctul 1. În cazul în care virusul pești porcine africane este prezent în probă, el se va reproduce în celule, iar în celulele infectate se va produce un efect citopatic caracteristic.
2. Testul de hemadsorbție se recomandă pentru identificarea izolatelor de viruși ai pești porcine africane, datorită sensibilității și specificității ridicate. Testul de hemadsorbție se bazează pe capacitatea virusului pești porcine africane de a se reproduce în macrofagele de porc și de a induce hemadsorbția în prezența eritrocitelor de porc. În jurul macrofagelor infectate se dezvoltă o rozetă de eritrocite caracteristică. Cu toate acestea, un număr mic de sușe virale și sălbatice de pești porcine africane nu poate induce hemadsorbția, dar poate produce un efect citopatic. Sușele pot fi identificate în mod specific cu ajutorul testului de imunofluorescență directă asupra sedimentelor de culturi celulare sau prin amplificarea în lanț cu polimerază (PCR).
3. Izolarea virusului este o tehnică mai adaptată la analiza probelor provenind de la un număr mic de animale decât la aplicarea unei supravegheri în masă. Această tehnică necesită un aport important de mână de lucru, iar rezultatele nu se cunosc decât mai târziu, de la una la trei zile. Alte două culturi celulare se pot dovedi necesare pentru depistarea unei mici cantități de virus în probă. De aici poate rezulta o durată a investigației care poate ajunge până la 10 zile pentru obținerea rezultatului final. Probele autolizate pot fi citotoxice pentru cultură, fiind astfel de o utilitate limitată.
4. Izolarea virusului și identificarea lui prin testul hemadsorbției se recomandă ca test de referință pentru confirmarea rezultatelor pozitive ale ELISA, ale PCR sau ale testului anterior de imunofluorescență directă. Se recomandă, de asemenea, în cazul în care pesta porcine africană a fost deja confirmată prin alte metode, în special în caz de focar primar sau în caz de pești porcine africane.

Virusii izolați în macrofage de porci pot servi la caracterizarea virusului și la epidemiologia moleculară.

5. Toate izolatele de virus de pești porcine africane provenind din toate focarele primare, din cazurile primare la porcii sălbatici sau din cazurile constatate la abator sau în mijloacele de transport trebuie să facă obiectul unei caracterizări de către un laborator național de referință în statele membre, de către orice alt laborator autorizat de statul membru interesat sau de laboratorul comunitar de referință, în conformitate cu partea E.

În orice caz, izolatele de viruși trebuie să fie trimise de îndată laboratorului comunitar de referință pentru a fi integrate în colecția de viruși.

C. DETECTAREA GENOMULUI VIRUSULUI

1. Reacția în lanț a polimerazei (PCR) servește la detectarea genomului virusului în probele de sânge, de ser, de țesut sau de organe. Fragmentele mici de ADN viral se amplifică de către PCR în cantități detectabile. Se poate detecta o gamă largă de izolate aparținând tuturor genotipurilor de viruși cunoscuți, atât viruși nehemadsorbanți, cât și izolate de slabă virulență, prin utilizarea amorselor dintr-o zonă a genomului bine conservată. Deoarece acest test nu detectează decât o secvență a genomului virusului, PCR poate da un rezultat pozitiv chiar în cazul în care virusul infecțios nu este detectat prin izolare (de exemplu, în țesuturile autolizate sau în probele de la porcii convalescenți care s-au vindecat și au devenit normali pe plan clinic).
2. PCR se poate utiliza pe un număr mic de probe atent selecționate de la animale suspecte. Metoda se recomandă pentru probele de organe care sunt citotoxice, la care izolarea virusului este imposibilă (în special probe de la porci sălbatici).
3. Materialul care este adecvat pentru PCR este compus din probe ale organelor menționate pentru izolarea virusului sau din ser. Pot fi de asemenea analizate cu PCR omogenatele de căpușe.
4. Testul se poate efectua pe parcursul unei zile. Acesta necesită echipament de laborator adecvat, spații separate și personal calificat. Unul dintre avantajele constă în faptul că virusul infecțios nu trebuie să fie reprodus în laborator. PCR este foarte sensibil, dar se poate produce cu ușurință contaminarea, ceea ce conduce la rezultate fals pozitive. Este deci indispensabilă punerea în aplicare a procedurilor stricte de control al calității.

D. TESTE VIROLOGICE RECOMANDATE ȘI EVALUAREA REZULTATELOR

Testele virologice sunt indispensabile pentru a confirma prezența pestei porcine africane.

Izolarea virusului și testul de hemadsorbție trebuie să fie considerate teste virologice de referință și trebuie să fie utilizate ca teste de confirmare, după caz. Utilizarea lor se recomandă în special în cazul în care rezultatele pozitive ale testelor de imunofluorescență directă sau de amplificare în lanț prin polimerază nu se asociază cu detectarea semnelor clinice sau cu leziunile bolii, precum și în alte cazuri îndoielnice.

Cu toate acestea, se poate confirma un focar secundar de pestă porcină africană în cazul în care se detectează semne clinice sau leziuni ale bolii la porcii respectivi și pe probe și în cazul în care cel puțin două teste diferite de detectare a antigenului, a genomului sau a anticorpului au dat un rezultat pozitiv pe probe prelevate de la aceiași porci suspecți.

Un focar secundar de pestă porcină africană poate fi confirmat în cazul în care, în afară de legătura epidemiologică cu un focar sau cu un caz confirmat, au fost detectate semne clinice sau leziuni ale bolii la porcii respectivi și în cazul în care un test de detectare a antigenului, a genomului sau a anticorpului a dat un rezultat pozitiv.

Apariția unui caz primar de pestă porcină africană la porcii sălbatici se poate confirma după izolarea virusului sau în cazul în care cel puțin două teste de detectare a antigenului, a genomului sau a anticorpului au dat un rezultat pozitiv. Alte cazuri de pestă porcină africană la porcii sălbatici, pentru care s-a stabilit o legătură epidemiologică cu cazuri confirmate anterior, se pot confirma în cazul în care un test de detectare a antigenului, a genomului sau a anticorpului a dat un rezultat pozitiv.

E. CARACTERIZAREA GENETICĂ A IZOLATELOR VIRUSULUI PESTEI PORCINE AFRICANE

1. Caracterizarea genetică a izolatelor virusului pestei porcine africane se obține prin determinarea profilurilor de restricție enzimatică și a secvențelor nucleotide de părți ale genomului virusului. Similaritatea între aceste profiluri de restricții sau aceste secvențe și cele deja obținute pornind de la izolatele anterioare ale virusului poate indica dacă focarele bolii sunt cauzate de viruși care urmează un model molecular european sau african.

Caracterizarea genetică a izolatelor virusului pestei porcine africane este extrem de importantă, dat fiind faptul că aceasta va îmbunătăți cunoștințele actuale privind epidemiologia moleculară a pestei porcine africane și variația genetică a virușilor. Datele moleculare permit clasificarea noilor izolate și furnizează informații despre originea lor posibilă.

2. În cazul în care caracterizarea moleculară a virusului nu se poate efectua într-un laborator național sau în orice alt laborator autorizat să diagnosticheze pesta porcină africană în scurt timp, proba originală a izolatului de virus trebuie transmisă laboratorului comunitar de referință, pentru a se face caracterizarea cât mai repede.

Datele privind analiza restricției enzimatică și secvențierea izolatelor de viruși ai pestei porcine africane de care dispun laboratoarele autorizate să diagnosticheze pesta porcină africană trebuie transmise laboratoarelor comunitare de referință în vederea introducerii informațiilor în baza de date a laboratorului.

Informațiile cuprinse în baza de date se pun la dispoziția tuturor laboratoarelor naționale de referință din statele membre. Cu toate acestea, în cazul publicării în reviste științifice, la cererea laboratorului respectiv, laboratorul comunitar de referință garantează confidențialitatea datelor, până la publicarea lor.

Capitolul VII

Principiile și utilizarea testelor serologice și evaluarea rezultatelor

A. PRINCIPII FUNDAMENTALE ȘI VALOARE DIAGNOSTICĂ

1. Detectarea anticorpilor specifici pestei porcine africane se recomandă pentru forma subacută și forma cronică a bolii, precum și pentru testele la scară mare și pentru programele de eradicare a pestei porcine africane, din mai multe motive:
 - (i) anticorpii se produc rapid în porcii infectați. În aceștia, anticorpii sunt în general detectabili în probele de ser prelevate între 7 și 10 zile de la infectare;
 - (ii) nu există nici un vaccin împotriva pestei porcine africane. Aceasta înseamnă că anticorpii specifici pestei porcine africane nu se produc decât după infectarea cu virusul pestei porcine africane, și
 - (iii) persistența anticorpilor. La porcii vindecați pot fi detectați anticorpi specifici la un nivel ridicat timp de mai multe luni, iar la unii dintre aceștia, toată viața.

Anticorpilor specifici peștei porcine africane de origine maternă se pot detecta în primele 10 săptămâni de viață a purceilor. Supraviețuirea anticorpilor materni la purcei este de aproximativ trei săptămâni. În cazul în care sunt detectați la purcei de peste trei luni, este puțin probabil ca anticorpilor peștei porcine africane să fie de origine maternă.

2. Detectarea anticorpilor împotriva virusului peștei porcine clasice în exudate de ser sau de plasmă din organe prezentate servește la confirmarea diagnosticului de pestă porcină africană în exploatațile suspecte, la stabilirea datei de introducere a infecției, în caz de focar confirmat, și la aplicarea măsurilor de monitorizare și de supraveghere.

Localizarea porcilor seropozitivi în exploatație poate furniza informații utile privind modul în care virusul peștei porcine africane a pătruns în exploatație.

Cu toate acestea, este necesar să se evalueze exact rezultatele testelor serologice, ținând seama de toate rezultatele clinice, virologice și epidemiologice, în contextul anchetei care urmează a fi efectuată în caz de suspiciune sau de confirmare a existenței peștei porcine africane, în conformitate cu articolul 8 din Directiva 2002/60/CE.

B. TESTE SEROLOGICE RECOMANDATE

1. Testul ELISA, testul de imunofluorescență indirectă și testul bazat pe tehnica Western blot sunt cele mai bune teste pentru a obține confirmarea serologică a peștei porcine africane.

Calitatea și eficacitatea diagnosticului serologic efectuat de laboratoarele naționale trebuie să fie controlate cu regularitate în cadrul testului de comparare interlaboratoare, organizat periodic de laboratorul comunitar de referință.

2. Testul ELISA este cel mai fiabil și cel mai util în cadrul studiilor serologice pe scară largă. În acest test, anticorpilor contra virusului peștei porcine africane, fixați pe proteinele virale care însoțesc faza solidă, se detectează prin adăugarea unei proteine A, conjugată cu o enzimă care produce o reacție colorată vizibilă, atunci când intră în contact cu substratul corespunzător.
3. Laboratoarele naționale trebuie să efectueze cu regularitate controlul calității privind sensibilitatea și specificitatea tuturor loturilor de reactivi ELISA, utilizând seria de seruri de referință furnizată de laboratorul comunitar de referință. Această serie cuprinde:
 - seruri provenind de la porci care sunt în stadiul inițial de infecție cu virusul peștei porcine africane (până la 17 zile de la infecție);
 - seruri provenind de la porci convalescenți (peste 17 zile de la infecție).

Testele ELISA care urmează a fi utilizate pentru diagnosticul serologic al peștei porcine africane trebuie să detecteze toate serurile de referință provenind de la porci convalescenți. Toate rezultatele obținute cu serurile de referință trebuie să poată fi reproduse. Se recomandă detectarea tuturor serurilor pozitive încă din faza inițială. Rezultatele obținute cu serurile de referință provenind de la porci aflați în faza inițială a infecției oferă o indicație privind sensibilitatea testului ELISA.

4. Testul de imunofluorescență indirectă este o tehnică rapidă care oferă o sensibilitate și o specificitate ridicate pentru detectarea anticorpilor contra virusului peștei porcine africane provenind din seruri sau exudate de țesut. Se bazează pe detectarea anticorpilor contra virusului peștei porcine africane care se leagă de monostratul de celule MS infectate de un virus adaptat al peștei porcine africane. Reacția anticorp-antigen este detectată de o proteină A fluorescență și etichetată. Probele pozitive prezintă o fluorescență specifică lângă nucleul celulelor infectate.

Testele de imunofluorescență directă și indirectă utilizate în combinație pentru a testa un organ, sânge sau exudate provenind de la animale care prezintă semne clinice ale peștei porcine africane pot conduce la confirmarea rapidă și fiabilă a bolii.

5. Tehnica Western blot este o tehnică foarte specifică și foarte sensibilă, care se bazează pe utilizarea benzilor de nitroceluloză care conțin proteine virale precum antigeni. Reacția anticorp-antigen specifică este detectată prin adăugarea unui conjugat peroxidază de proteină A și a substratului potrivit. Tehnica este foarte utilă pentru a testa serurile la care testul ELISA nu dă rezultate satisfăcătoare.

Capitolul VIII

Condiții minime de siguranță obligatorii în laboratoarele competente pentru pesta porcină africană

1. Condițiile prevăzute de tabelul 1 trebuie să fie respectate în orice laborator în care virusul peștei porcine africane se amplifică prin replicare în culturi celulare. Cu toate acestea, examenele *post-mortem*, pregătirea țesuturilor pentru testul de imunofluorescență directă sau pentru amplificarea în lanț prin polimerază și tehnicile serologice care utilizează un antigen inactivat se pot efectua în conformitate cu unele prescripții mai puțin stricte, în măsura în care se respectă condițiile minime prevăzute de tabelul 1, se aplică normele de igienă de bază și se efectuează operațiuni de dezinfecție la încheierea lucrărilor, cu eliminarea carcaselor, a țesuturilor și a serurilor, în condiții de siguranță.

2. Condițiile prevăzute de tabelul 2 trebuie să fie respectate de orice laborator în care virusul peștei porcine africane se inoculează animalelor.
3. Toate stocurile de viruși ai peștei porcine africane trebuie conservate într-un loc sigur, în stare congelată sau liofilizată. Fiecare fiolă trebuie să fie clar etichetată. Registrele complete trebuie să menționeze stocurile de viruși deținute, precum și data și rezultatele controalelor de calitate. Este de asemenea necesar să se țină un registru al virușilor adăugați la stoc, cu precizarea sursei, precum și a virușilor furnizați altor laboratoare.
4. Se recomandă completarea unităților de manipulare a virusului peștei porcine africane, concepute în conformitate cu principiile siguranței biologice, cu spații în care virusul este manipulat. Aceste spații ar trebui să servească pregătirii sticlăriei și a mediilor, întreținerii și preparării culturilor de celule neinfectate, tratării serurilor și examenelor serologice (altele decât metodele care utilizează virusul activ al peștei porcine africane) și activităților administrative și de birou.

Tabelul 1

Norme de izolare biologică aplicabile în laboratoarele de diagnostic

	Condiții minime	Condiții suplimentare
Mediu general	Presiune atmosferică normală Spații rezervate, a căror utilizare se limitează la proceduri stabilite	Presiune atmosferică normală. Simplă filtrare HEPA a aerului evacuat Spații rezervate, destinate exclusiv procedurilor de diagnostic al peștei porcine africane Tratarea efluenților susceptibili de a fi contaminați, pentru a neutraliza virusul peștei porcine africane (prin procedee termice sau chimice)
Îmbrăcăminte de laborator	Îmbrăcăminte exterioară specială, care nu se utilizează decât în unitatea rezervată virusului peștei porcine africane Mănuși de unică folosință pentru manipularea materialului infectat Sterilizarea îmbrăcăminteii exterioare înaintea ieșirii din unitate sau spălarea la temperatură ridicată în interiorul acesteia	Schimbarea completă a îmbrăcăminteii la intrare. Îmbrăcăminte de laborator care nu se utilizează decât în unitatea rezervată virusului peștei porcine africane. Mănuși de unică folosință pentru manipularea materialului infectat Sterilizarea îmbrăcăminteii înaintea ieșirii din unitate sau spălarea la temperatură ridicată în interiorul acesteia
Controlul personalului	Acces în unitate rezervat personalului desemnat, instruit corespunzător Spălarea și dezinfectarea mâinilor la ieșirea din unitate Interzicerea intrării personalului în spațiile în care se află porci, mai devreme de 48 de ore de la ieșirea din unitate	Acces în unitate rezervat personalului desemnat, instruit corespunzător Spălarea și dezinfectarea mâinilor la ieșirea din unitate Interzicerea intrării personalului în spațiile în care se află porci, mai devreme de 48 de ore de la ieșirea din unitate
Echipament	Incintă biologică de securitate (clasa I și II) destinată tuturor manipulărilor de viruși activi. Incinta dispune de un dispozitiv cu dublă filtrare HEPA a aerului evacuat Toate echipamentele necesare procedurilor de laborator trebuie să fie disponibile în interiorul spațiilor rezervate laboratorului	

Tabelul 2

Condiții de siguranță biologică pentru spațiile rezervate animalelor de laborator

	Condiții
Mediu general	Aerisire controlată prin presiune negativă Filtrare simplă HEPA a aerului evacuat Dispozitiv de fumigație/decontaminare completă la sfârșitul experienței Tratarea tuturor efluenților solizi și lichizi pentru neutralizarea virusului peștei porcine africane (prin procedee termice sau chimice)

	Condiții
Îmbrăcăminte de laborator	Schimbarea completă a îmbrăcăminte la intrare Sterilizarea îmbrăcăminte înainte de ieșirea din unitate sau spălarea la temperatură ridicată în interiorul acesteia
Controlul personalului	Acces în unitate rezervat personalului desemnat, instruit corespunzător Se recomandă lăsarea îmbrăcăminte în interior, înainte de a face duș. Duș integral la ieșirea din unitate Interzicerea intrării personalului în spațiile în care se află porcii, mai devreme de 48 de ore de la ieșirea din unitate
Echipament	Toate echipamentele necesare procedurilor de laborator trebuie să fie disponibile în interiorul unității Sterilizarea întregului material la ieșirea din unitate sau, în cazul probelor de origine animală, ambalarea într-un sac dublu plasat într-un recipient etanș, dezinfectat la suprafață pentru transportul spre laboratorul competent pentru pesta porcină africană
Animale	Sacrificarea tuturor animalelor înainte de ieșirea din unitate, examene <i>post-mortem</i> în spațiile de securitate biologică, incinerarea carcaselor la sfârșitul examenelor