

KOMMISJONSVEDTAK

2005/EØS/9/12

av 1. februar 2002

om godkjenning av en diagnosehåndbok som fastsetter diagnostiske metoder, prøvetakingsmetoder og kriterier for å vurdere laboratorieprøvene for bekreftelse av klassisk svinepest(*)

[meddelt under nummer K(2002) 381]

(2002/106/EF)

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESSKAP
HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske
felleskap,

under henvisning til rådsdirektiv 2001/89/EF av 23. oktober
2001 om fellesskapstiltak for bekjempelse av klassisk
svinepest⁽¹⁾, særlig artikkel 17 nr. 3 og artikkel 29 nr. 1, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Det bør på fellesskapsplan fastsettes diagnostiske metoder, prøvetakingsmetoder og kriterier for å vurdere resultatene av laboratorieprøver for bekreftelse av klassisk svinepest.
- 2) I vedlegg IV til direktiv 2001/89/EF er det fastsatt hvilke funksjoner og oppgaver Fellesskapets referanselaboratorium for klassisk svinepest skal ha, for i samråd med Kommisjonen å samordne metodene for diagnostisering av sykdommen i medlemsstatene. Disse funksjonene og oppgavene omfatter gjennomføring av periodiske, sammenlignende prøver og utlevering av reagenser på fellesskapsplan.
- 3) Klassisk svinepest-virus anses ikke for å utgjøre en fare for menneskehelsen.
- 4) Det er nylig utviklet laboratorieprøver som sikrer at klassisk svinepest kan diagnostiseres raskt.

- 5) På grunnlag av erfaringene med bekjempelse av klassisk svinepest i de siste årene har man kommet fram til de prøvetakingsmetoder og kriterier for å vurdere resultatene av laboratorieprøver som er best egnet til å stille en riktig diagnose av sykdommen i forskjellige situasjoner.
- 6) Tiltakene fastsatt i dette vedtak er i samsvar med uttalelse fra Den faste veterinærkomité —

GJORT DETTE VEDTAK:

Artikkel 1

1. Medlemsstatene skal påse at bekreftelsen av klassisk svinepest er basert på:
 - a) påvisning av kliniske tegn på og skader post mortem av sykdommen,
 - b) påvisning av virus, antigen eller genom i prøver av vev, organer, blod eller avføring fra svin,
 - c) påvisning av en spesifikk antistoffreaksjon i blodprøver,

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 39 av 9.2.2002, s. 71, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 26/2003 av 14. mars 2003 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitære forhold), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 29 av 5.6.2003, s. 9.

(¹) EFT L 316 av 1.12.2001, s. 5.

i samsvar med framgangsmåtene, prøvetakingsmetodene og kriteriene for å vurdere resultatene av laboratorieprøver fastsatt i håndboken som er vedlagt dette vedtak.

2. De nasjonale diagnoselaboratoriene nevnt i vedlegg III nr. 1 til direktiv 2001/89/EF, kan imidlertid endre laboratorieprøvene nevnt i håndboken som er vedlagt dette vedtak, eller bruke andre prøver, dersom det kan dokumenteres like stor følsomhet og spesifisitet.

Følsomheten og spesifisiteten til disse endrede eller andre prøvene skal vurderes innenfor rammen av de periodiske, sammenlignende prøvene som gjennomføres av Fellesskapets referanselaboratorium for klassisk svinepest.

Artikkel 2

Vedlegg I og IV til rådsdirektiv 80/217/EØF av 22. januar 1980 om innføring av fellesskapstiltak for kontroll med klassisk svinepest⁽¹⁾, sist endret ved tiltredelsesakten for Østerrike, Finland og Sverige, oppheves.

Artikkel 3

Dette vedtak får anvendelse fra 1. november 2002.

Artikkel 4

Dette vedtak er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel, 1. februar 2002.

For Kommissjonen

David BYRNE

Medlem av Kommissjonen

⁽¹⁾ EFT L 47 av 21.2.1980, s. 11.

VEDLEGG

DIAGNOSEHÅNDBOK FOR KLASSISK SVINEPEST

KAPITTEL I

Innledning, mål og definisjoner

1. For å sikre ensartede framgangsmåter for diagnostisering av klassisk svinepest, er det i denne håndboken fastsatt:
 - a) retningslinjer og minstekrav til diagnostiske metoder, prøvetakingsmetoder og kriterier for å vurdere resultatene av kliniske undersøkelser og kontroller post mortem og laboratorieprøver med sikte på å stille en riktig diagnose av klassisk svinepest⁽¹⁾,
 - b) minstekrav til biosikkerhet og kvalitetsstandarder som skal overholdes av laboratoriene som diagnostiserer klassisk svinepest, og ved transport av prøver,
 - c) laboratorieprøver som skal brukes til diagnostisering av klassisk svinepest, og laboratoriemetodene som skal brukes til å gentypebestemme isolater av klassisk svinepest-virus.
2. Denne håndboken henvender seg hovedsakelig til de myndigheter som er ansvarlige for å bekjempe klassisk svinepest. Derfor er det lagt vekt på prinsippene og virkeområdene for laboratorieprøvene og vurderingen av resultatene, framfor detaljerte laboratoriemetoder.
3. I tillegg til definisjonene nevnt i artikkel 2 i direktiv 2001/89/EF, menes det i denne håndboken med:
 - a) «driftsenhet under mistanke», en driftsenhet for svin med ett eller flere svin som er mistenkt for å være angrepet av klassisk svinepest-virus, eller en kontaktenhet som definert i artikkel 2 bokstav v) i direktiv 2001/89/EF,
 - b) «singel reagent», et svin som gir positivt resultat i serologiske prøver for klassisk svinepest, men som ikke på noe tidspunkt har vært i kontakt med klassisk svinepest-virus, og som ikke er påvist å ha spredt smitte til kontaktsvin⁽²⁾,
 - c) «epidemiologisk underenhet» eller «underenhet», bygningen, stedet eller arealet i nærheten av der grupper av svin i en driftsenhet holdes på en slik måte at de ofte har direkte eller indirekte kontakt med hverandre, men samtidig holdes atskilt fra andre svin i samme driftsenhet,
 - d) «kontaktsvin», svin som har oppholdt seg i en driftsenhet i direkte kontakt med ett eller flere svin som er mistenkt for å være angrepet av klassisk svinepest-virus i løpet av de siste 21 dagene.

KAPITTEL II

Beskrivelse av klassisk svinepest med hovedvekt på differensialdiagnostisering

A. Innledning

1. Klassisk svinepest forårsakes av et RNA-kappevirus som tilhører *Pestivirus*-slekten av *Flaviviridae*-familien. Dette viruset er beslektet med det viruset av slekten *Pestivirus* som rammer drøvtyggere, og som forårsaker bovin virusdiaré (BVDV) og border disease (BDV). Dette faktum kan få alvorlige diagnostiske konsekvenser siden det forekommer kryssreaksjoner som kan føre til falskt positive resultater av laboratorieprøvene.
2. Klassisk svinepest-virus er relativt stabilt i fuktige ekskretter fra angrepne svin, svineskrotter og ferskt svinekjøtt samt noen svinekjøttprodukter. Det kan lett inaktiveres av rengjøringsmidler, fettløsende midler, proteaser og vanlige desinfeksjonsmidler.
3. Den vanligste naturlige infeksjonsmåten er oro-nasalt ved direkte eller indirekte kontakt med angrepne svin eller ved føring med viruskontaminert fôr. I områder med stor svinetetthet, spres viruset lett mellom tilgrensende driftsenheter for svin. Sykdommen kan også overføres via sæd fra angrepne avlsræner.
4. Inkubasjonstiden hos det enkelte dyret er på fra sju til ti dager, men i praksis kan kliniske symptomer bli synlige i en driftsenhet først to-fire uker eller mer etter at viruset ble innført, dersom det er snakk om bare voksne avlsdyr eller milde virusstammer.

⁽¹⁾ Når det avgjøres hvor mange prøver som skal tas til laboratorieprøven, skal følsomheten til de anvendte prøvene også vurderes. Antallet dyr som det tas prøver fra, skal være større enn antallet som er angitt i denne håndboken, dersom følsomheten til den anvendte prøven ikke er særlig stor.

⁽²⁾ Single reagenter kan ha en virusnøytraliserende antistofftiter som går fra så vidt positiv (noe som oftest er tilfelle) til sterkt positiv. Ved en ny prøvetaking kan single reagenter vise en fallende eller konstant titer. Vanligvis er det bare noen få svin i en besetning som gir disse falskt positive reaksjonene.

5. De kliniske tegnene på klassisk svinepest er svært forskjellige og kan forveksles med mange andre sykdommer. Hvor alvorlige symptomene er, avhenger hovedsakelig av dyrets alder og virusets virulens. Vanligvis rammes unge dyr mer alvorlig enn eldre dyr. Hos eldre avlssvin er infeksjonsforløpet ofte mildt eller endatil subklinisk.
6. Klassisk svinepest kan opptre i akutt, kronisk og prenatal form.

B. Akutt form

1. Den akutte formen for klassisk svinepest opptrer oftest hos smågris og oppføringssvin. De første tegnene er manglende matlyst, sløvheter, feber, konjunktivitt, hovne lymfeknuter, luftveissymptomer og forstoppelse etterfulgt av diaré.

De typiske blødningene i huden ses vanligvis på øret, halen, buken og lemmenes innside i andre og tredje uke etter infeksjon og til dyret dør. Nevrologiske tegn ses ofte, som at dyret vakler på bakbeina, ikke kan koordinere sine bevegelser og får kramper.

Feber forekommer alltid. Den er vanligvis høyere enn 40 °C, men hos voksne svin overstiger den ofte ikke 39,5 °C.

2. Klassisk svinepest-virus forårsaker alvorlig leukopeni og immunsuppresjon som ofte fører til sekundære tarm- eller luftveisinfeksjoner. Tegnene på disse sekundære infeksjonene kan skjule eller overlappe de mest typiske tegnene på klassisk svinepest og kan villede gårdbrukeren eller veterinæren.

Døden inntreffer vanligvis i løpet av en måned. Dyr, som oftest voksne avlsdyr uten alvorlige kliniske tegn, kan bli friske og danne antistoffer. Antistoffer mot klassisk svinepest-virus kan påvises to-tre uker etter infeksjon.

3. Patologiske endringer som er synlige ved kontrollen post mortem, ses oftest i lymfeknutene og nyrene. Lymfeknutene blir hovne med ødemer og blødninger. Blødningene i nyrene kan variere i størrelse fra knapt synlige petekkier til bloduttredelser. Lignende blødninger kan også ses i urinblæren, strupehodet, strupelokket og hjertet og noen ganger i utstrakt grad på de serøse hinnene i buk- og brysthulen. En ikke-purulent encefalitt forekommer ofte. Skader som følge av sekundære infeksjoner kan også forekomme, og disse kan villede veterinæren. Infarkter i milten anses som patognomoniske, men er sjeldne.
4. Generelt fører den akutte formen for afrikansk svinepest til et klinisk og patologisk sykdomsbilde som er svært likt klassisk svinepest. Når det forekommer blødninger i huden og på ørene, er disse svært lette å oppdage og vekker mistanke om akutt afrikansk eller klassisk svinepest. Få andre sykdommer forårsaker lignende skader.

Akutt klassisk svinepest må også tas i betraktning ved mistanke om rødsyke, reproduksjons- og respirasjonssyndrom hos svin, kumarinforgiftning, purpura haemorrhagica, «post-weaning multisystemic wasting syndrome» (PMWS), «porcin dermatitis and nephropathy syndrome» (PDNS), *Salmonella*- og *Pasteurella*-infeksjoner eller tarm- eller luftveissyndromer med feber som ikke reagerer på antibiotikabehandling.

5. Klassisk svinepest-virus utskilles i spytt, urin og avføring fra de kliniske tegnene opptrer og til dyret dør. Klassisk svinepest-virus kan også utskilles gjennom sæd.

C. Kronisk form

1. Det kroniske infeksjonsforløpet forekommer når svin ikke kan utvikle en effektiv immunrespons mot klassisk svinepest-virus. De første tegnene på kronisk infeksjon ligner tegnene på akutt infeksjon. Senere inntreffer overveiende uspesifikke tegn, dvs. periodisk feber, kronisk enteritt og avmagring. De typiske blødningene i huden mangler.

Disse svinene kan vise kliniske tegn på sykdom i to-tre måneder før de dør. Klassisk svinepest-virus smitter hele tiden fra de kliniske tegnene opptrer og til dyret dør. Antistoffer kan påvises midlertidig i serumprøver.

2. Patologiske endringer er mindre typiske, særlig forekommer ikke alltid blødninger i organene og de serøse hinnene. Hos dyr med kronisk diaré er nekrotiske skader vanlig på ileum, ileocökalklaffen og endetarmen.
3. Siden de kliniske tegnene på kronisk klassisk svinepest er ganske uspesifikke, må mange andre sykdommer tas i betraktning ved differensialdiagnostiseringen. Økt kroppstemperatur inntreffer ikke nødvendigvis hos alle dyr, men i en infisert driftsenhet kan feber i det minste påvises hos noen svin.

D. Prenatal form og sent sykdomsutbrudd

1. Klassisk svinepest-virus kan gjennom morkaken hos drektige dyr overføres til fostrene, men hos purkene er sykdommen ofte subklinisk.

Omfanget av skadene på fosteret ved infeksjon gjennom morkaken avhenger i høy grad av drektighetsstadiet og virusets virulens. Dersom purken blir smittet tidlig i drektigheten, kan dette føre til abort eller dødfødsel, mumifisering eller misdannelse. Alt dette fører til et lavere fødselstall i driftsenheten.

Dersom en purke som har vært drektig i inntil 90 dager, smittes, kan dette føre til at det fødes griser med persistent viremi, som kan være klinisk normale ved fødselen og overleve i flere måneder. Etter fødselen kan de vise dårlig vekst, avmagring eller av og til medfødt skjelving. Dette infeksjonsforløpet betegnes som klassisk svinepest med sent sykdomsutbrudd. Disse smågrisene kan spille en avgjørende rolle i spredningen av sykdommen og i opprettholdelsen av virusets persistens i en bestand, siden de utskiller virus helt til de dør.

2. Det kan være spesielt vanskelig å påvise klassisk svinepest i driftsenheter med avlssvin siden infeksjonsforløpet kan være svært mildt og kan forveksles med mange andre patologiske tilstander. Redusert fruktbarhet og aborter kan forårsakes av både klassisk svinepest-virus og parvovirusinfeksjon, PRRS, leptospirose og pseudorabies. Materiale som aborteres på grunn av klassisk svinepest, kan patologisk ikke skjelnes fra aborter som skyldes andre sykdomsagenser.

Ved mistanke om en infeksjonssykdom i forplantningsorganene må det umiddelbart foretas en undersøkelse for klassisk svinepest dersom den berørte driftsenheten kan vurderes som truet (for eksempel på grunn av driftsenhetens beliggenhet i et område der klassisk svinepest forekommer hos viltlevende svin), og i alle tilfeller så snart mer vanlige infeksjonssykdommer i forplantningsorganene er utelukket.

KAPITTEL III***Retningslinjer for hvilke kriterier som skal vurderes for å bestemme at en driftsenhet kan klassifiseres som under mistanke for klassisk svinepest***

Avgjørelsen om å klassifisere en driftsenhet som en driftsenhet under mistanke skal treffes på grunnlag av følgende funn, kriterier og årsaker:

- a) kliniske og patologiske funn hos svin. De viktigste kliniske og patologiske funnene som skal vurderes, er:
 - feber med økt sykkelighet og dødelighet,
 - feber med hemoragisk syndrom,
 - feber med nevrologiske symptomer,
 - feber av ukjent opprinnelse der behandling med antibiotika ikke har forbedret helsetilstanden,
 - aborter og økte fruktbarhetsproblemer i løpet av de tre siste månedene,
 - medfødt skjelving hos smågris,
 - kronisk syke dyr,
 - nedsatt vekst (vantrivsel) hos unge dyr,
 - petekkier og bloduttredelser, særlig i lymfeknuter, nyrer, milt, blære og strupehode,
 - infarkt eller hematomer, særlig i milten,
 - knappeformede sårdannelse i tykktarmen hos kroniske tilfeller, særlig i nærheten av ileocøkalstedet,
- b) epidemiologiske funn. De viktigste epidemiologiske funnene som skal vurderes, er:
 - når svin har hatt direkte eller indirekte kontakt med en driftsenhet for svin som er bekreftet å være infisert med klassisk svinepest,
 - når en driftsenhet har levert svin som senere viste seg å være angrepet av klassisk svinepest,
 - når purker har fått kunstig sædooverføring fra en kilde under mistanke,

- når det har vært direkte eller indirekte kontakt med villlevende svin fra en bestand der det forekommer klassisk svinepest,
 - når svin holdes utendørs i en region der villlevende svin er angrepet av klassisk svinepest,
 - når svin er føret med skyller, og det er mistanke om at disse skyllene ikke er behandlet på en slik måte at klassisk svinepest-virus er blitt inaktivert,
 - når det kan ha forekommet eksponering, for eksempel på grunn av personer som er kommet inn i driftsenheten, transporter osv.,
- c) funn i forbindelse med resultatene av serologiske prøver. De viktigste laboratoriefunnene som skal vurderes, er:
- serologisk reaksjon framkalt av en uopdaget infeksjon av klassisk svinepest-virus eller av vaksinasjon⁽¹⁾,
 - kryssreaksjon mellom antistoffer mot klassisk svinepest og mot andre pestivirus⁽²⁾,
 - påvisning av single reagenter⁽³⁾.

KAPITTEL IV

Framgangsmåter for kontroll og prøvetaking

A. Retningslinjer og framgangsmåter for klinisk undersøkelse og prøvetaking av svin i driftsenheter under mistanke

1. Medlemsstatene skal påse at det gjennomføres hensiktsmessige kliniske undersøkelser, prøvetaking og laboratorieundersøkelser i driftsenheter under mistanke for å bekrefte eller utelukke klassisk svinepest, i samsvar med retningslinjene og framgangsmåtene fastsatt i nr. 2-7.

Uavhengig av om tiltakene nevnt i artikkel 4 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF gjennomføres i den berørte driftsenheten, skal disse retningslinjene og framgangsmåtene også få anvendelse ved sykdomstilfeller som undersøkes for klassisk svinepest som del av differensialdiagnostiseringen. Dette omfatter tilfeller der de kliniske tegnene og det epidemiologiske mønsteret som ses hos svinene, tyder på at det er svært liten sannsynlighet for at det dreier seg om klassisk svinepest.

I alle andre tilfeller der ett eller flere svin er mistenkt for å være angrepet av klassisk svinepest-virus, skal tiltakene nevnt i artikkel 4 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF, gjennomføres i den berørte driftsenheten under mistanke.

Ved mistanke om klassisk svinepest hos svin i et slakteri eller et transportmiddel, får retningslinjene og framgangsmåtene fastsatt i nr. 2-7, tilsvarende anvendelse.

2. Når en offentlig veterinær besøker en driftsenhet under mistanke for å bekrefte eller utelukke klassisk svinepest:
- skal det foretas en kontroll av driftsenhetens registre over produksjon og helsetilstand dersom disse er tilgjengelige,
 - skal det foretas en inspeksjon i hver underenhet i driftsenheten for å velge ut de svinene som skal undersøkes klinisk.

Den kliniske undersøkelsen skal omfatte måling av kroppstemperaturen, og skal først og fremst gjelde følgende svin eller grupper av svin:

- syke svin eller svin med manglende matlyst,
- svin som nylig er blitt friske etter sykdom,
- svin som nylig er innført fra steder med bekrefte utbrudd, eller fra andre kilder under mistanke,
- svin som holdes i underenheter som har hatt besøk av personer utenfra som nylig har vært i nær kontakt med svin som er mistenkt for å være eller som er angrepet av klassisk svinepest, eller som det er fastslått at har hatt annen særlig risikabel kontakt med en mulig kilde til klassisk svinepest-virus,
- svin som allerede har gjennomgått prøvetaking og serologiske prøver for klassisk svinepest dersom resultatene av disse prøvene ikke gjør det mulig å utelukke klassisk svinepest, og kontaktsvin.

⁽¹⁾ Dersom svin er vaksinert mot klassisk svinepest med en konvensjonell vaksine, kan dette gi positivt resultat bare på grunn av vaksinen eller som følge av en infeksjon hos vaksinerte dyr.

⁽²⁾ Under visse omstendigheter kan inntil 10 % av svinene i en besetning ha antistoffer mot drøvtyggerpestivirus som forårsaker bovin virusdiaré og border disease. Dette er for eksempel tilfellet når svin har direkte kontakt med storfe eller sauer som er angrepet av BVD-virus eller BD-virus, eller når svin har kontakt med materiale som er kontaminert med drøvtyggerpestivirus.

⁽³⁾ I alle nåværende serologiske prøver for klassisk svinepest gir en liten andel av seraene falskt positive resultater enten på grunn av prøvesystemets manglende spesifisitet eller på grunn av sera fra single reagenter.

Dersom det ved inspeksjonen i driftsenheten under mistanke ikke konstateres svin eller grupper av svin som nevnt i avsnittet ovenfor, skal vedkommende myndighet, uten at andre tiltak som eventuelt anvendes i driftsenheten i samsvar med direktiv 2001/89/EF berøres, og idet det tas hensyn til den epidemiologiske situasjonen:

- gjennomføre ytterligere undersøkelser i den berørte driftsenheten i samsvar med nr. 3, eller
- sørge for at det tas blodprøver til laboratorieprøver fra svinene i den berørte driftsenheten. I dette tilfellet skal framgangsmåtene for prøvetaking fastsatt i nr. 5 og i del F nr. 2, brukes som veiledning, eller
- innføre eller opprettholde tiltakene fastsatt i artikkel 4 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF, i påvente av ytterligere undersøkelser i den berørte driftsenheten, eller
- utelukke mistanken om klassisk svinepest.

3. Når det vises til dette nummer, skal den kliniske undersøkelsen i den berørte driftsenheten gjennomføres på tilfeldig utvalgte svin i de underenhetene der det er avdekket eller er mistanke om at det er risiko for at det er innført klassisk svinepest-virus.

Det skal undersøkes minst så mange svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en feberprevalens på 10 % i disse underenhetene.

Imidlertid skal det når det gjelder:

- avlspurker, undersøkes minst så mange purker at det med 95 % sikkerhet kan påvises en feberprevalens på 5 %,
- sædstasjoner, foretas undersøkelse av alle avlsråner.

4. Dersom det påvises døde eller døende svin i en driftsenhet under mistanke, skal det foretas kontroll post mortem, fortrinnsvis av minst fem av disse svinene og særlig svin:

- som viser eller har vist svært tydelige tegn på sykdom før de døde,
- med høy feber,
- som nylig har dødd.

Dersom denne kontrollen ikke har påvist skader som kan tyde på klassisk svinepest, men det på grunn av den epidemiologiske situasjonen vurderes som nødvendig å foreta ytterligere undersøkelser:

- skal det foretas en klinisk undersøkelse i samsvar med nr. 3, og tas blodprøver i samsvar med nr. 5 i underenheten der de døde eller døende dyrene ble holdt, og
- kan det foretas kontroll post mortem av tre-fire kontaktsvin.

Uavhengig av om det forekommer skader som tyder på klassisk svinepest, skal det tas prøver til virologiske undersøkelser i samsvar med kapittel V del B nr. 1 av organene eller vevet fra svin som har gjennomgått kontroll post mortem. Disse prøvene skal fortrinnsvis tas fra svin som nylig har dødd.

Når det foretas kontroll post mortem, skal vedkommende myndighet sørge for:

- at det treffes nødvendige forholdsregler og hygienetiltak for å hindre spredning av sykdommen, og
- når det gjelder døende svin, at de avlives på en human måte i samsvar med rådsdirektiv 93/119/EØF.

5. Dersom ytterligere kliniske tegn eller skader som kan tyde på klassisk svinepest, påvises i en driftsenhet under mistanke, men vedkommende myndighet mener at disse funnene ikke er tilstrekkelige for å bekrefte et utbrudd av klassisk svinepest, og at det derfor er nødvendig med laboratorieprøver, skal det tas blodprøver til laboratorieprøver fra svinene under mistanke og fra andre svin i hver underenhet der svinene under mistanke holdes, etter framgangsmåtene fastsatt nedenfor.

Det skal tas minst så mange prøver til serologiske prøver at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 10 % i den berørte underenheten.

Imidlertid skal det når det gjelder:

- avlspurker, tas prøver fra minst så mange purker at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 5 %⁽¹⁾,
- sædstasjoner, tas blodprøve av alle avlsråner.

Antallet prøver som skal tas til virologiske undersøkelser skal være i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet, som skal ta hensyn til utvalget av prøver som kan utføres, følsomheten til laboratorieprøvene som skal brukes, og den epidemiologiske situasjonen.

⁽¹⁾ I visse tilfeller, for eksempel når det er mistanke om klassisk svinepest i en driftsenhet med et begrenset antall unge svin, kan andelen av angrepne purker være svært lav. I disse tilfellene skal det tas prøver fra et høyere antall purker.

6. Dersom mistanken om klassisk svinepest i den berørte driftsenheten er knyttet til resultatene av tidligere serologiske prøver, skal følgende framgangsmåte følges, i tillegg til blodprøvene som tas fra svinene nevnt i nr. 2 annet ledd femte strekpunkt:
 - a) dersom de seropositive svinene er drektige purker, skal noen av dem, helst minst tre, avlives og gjennomgå en kontroll post mortem. Før avlivingen skal det tas en blodprøve til ytterligere serologiske prøver. Fostrene skal undersøkes for klassisk svinepest-virus, virusantigen eller virusgenom i samsvar med kapittel VI for å påvise intrauterin infeksjon,
 - b) dersom de seropositive svinene er purker med spedgriser, skal det tas blodprøver fra alle spedgrisene, og de skal undersøkes for klassisk svinepest-virus, virusantigen eller virusgenom som nevnt i kapittel VI. Det skal også tas blodprøver fra purkene til ytterligere serologiske prøver.
7. Dersom det ved undersøkelsen som gjennomføres i en driftsenhet under mistanke, ikke påvises kliniske tegn eller skader som tyder på klassisk svinepest, men vedkommende myndighet mener at ytterligere laboratorieprøver er nødvendige for å utelukke klassisk svinepest, skal framgangsmåtene for prøvetaking fastsatt i nr. 5, brukes som veiledning.

B. Framgangsmåter for prøvetaking i en driftsenhet der svin avlives etter at sykdommen er bekreftet

1. For å fastslå hvordan klassisk svinepest-virus er kommet inn i en infisert driftsenhet og hvor lenge det har funnet seg der, skal det når svin avlives i en driftsenhet etter at et utbrudd er bekreftet i samsvar med artikkel 5 nr. 1 bokstav a) i direktiv 2001/89/EF, tas blodprøver til serologiske prøver fra tilfeldig utvalgte svin når de avlives.
2. Det skal tas prøver fra minst så mange svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 10 % hos svinene i hver underenhet i driftsenheten⁽¹⁾.

Prøver til virologiske undersøkelser kan også tas i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet, som skal ta hensyn til utvalget av prøver som kan utføres, følsomheten til laboratorieprøvene som skal brukes, og den epidemiologiske situasjonen.

3. Når det gjelder sekundære utbrudd, kan imidlertid vedkommende myndighet beslutte å gjøre unntak fra nr. 1 og 2 og fastsette framgangsmåter for ad hoc-prøvetaking, idet det tas hensyn til de epidemiologiske opplysningene som allerede foreligger om viruskilden, om hvordan viruset er kommet inn i driftsenheten, og om den potensielle spredningen av sykdommen fra driftsenheten.

C. Framgangsmåter for prøvetaking når svin avlives som et forebyggende tiltak i en driftsenhet under mistanke

1. For å bekrefte eller utelukke klassisk svinepest og oppnå ytterligere epidemiologiske opplysninger, skal det når svin avlives som et forebyggende tiltak i en driftsenhet under mistanke i samsvar med bestemmelsene i artikkel 4 nr. 3 bokstav a) eller artikkel 7 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF, tas blodprøver til serologiske prøver samt blodprøver eller prøver fra mandlene til virologiske undersøkelser etter framgangsmåten fastsatt i nr. 2.
2. Det skal hovedsakelig tas prøver fra:
 - svin som viser tegn eller skader post mortem som tyder på klassisk svinepest, og kontaktsvin,
 - andre svin som kan ha hatt risikabel kontakt med angrepne svin eller svin under mistanke, eller som mistenkes for å være smittet med klassisk svinepest-virus.

Det skal tas prøver fra disse svinene i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet, som skal ta hensyn til den epidemiologiske situasjonen. I dette tilfellet skal framgangsmåten for prøvetaking fastsatt i annet, tredje og fjerde ledd nedenfor, brukes som veiledning.

Videre skal det tas prøver fra tilfeldig utvalgte svin fra hver enkelt av underenhetene i driftsenheten⁽²⁾. I dette tilfellet skal det tas minst så mange prøver til serologiske prøver at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 10 % i den berørte underenheten.

⁽¹⁾ Dersom unntaket fastsatt i artikkel 6 nr. 1 i direktiv 2001/89/EF er anvendt, skal prøvene imidlertid tas i de underenhetene i driftsenheten der svin er avlivet, uten at dette berører de ytterligere undersøkelsene og den ytterligere prøvetakingen av de resterende svinene i driftsenheten, som skal gjennomføres i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet.

⁽²⁾ Dersom vedkommende myndighet har begrenset anvendelsen av forebyggende avliving til den delen av driftsenheten der svinene som er mistenkt for å være angrepet av eller smittet med klassisk svinepest-virus, ble holdt, i samsvar med artikkel 4 nr. 3 bokstav a) i direktiv 2001/89/EF, skal imidlertid prøvene tas i de underenhetene i driftsenheten der dette tiltaket ble gjennomført, uten at dette berører de ytterligere undersøkelsene og den ytterligere prøvetakingen av de resterende svinene i driftsenheten, som skal gjennomføres i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet.

Imidlertid skal det når det gjelder:

- avlspurker, tas prøver fra minst så mange purker at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 5 %⁽¹⁾,
- sædstasjoner, tas blodprøve av alle avlsråner.

Typen prøver som skal tas til virologiske undersøkelser, og den prøven som skal brukes, skal være i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet, som skal ta hensyn til utvalget av prøver som kan utføres, disse prøvenes følsomhet og den epidemiologiske situasjonen.

D. Framgangsmåter for kontroll og prøvetaking før det gis tillatelse til å flytte svin fra driftsenheter i verne- eller overvåkingssoner, og dersom disse svinene slaktes eller avlives

1. Med forbehold for bestemmelsene i artikkel 11 nr. 1 bokstav f) annet ledd i direktiv 2001/89/EF skal den kliniske undersøkelsen som skal foretas av en offentlig veterinær, for at det kan gis tillatelse til å flytte svin fra driftsenheter i verne- eller overvåkingssoner i samsvar med artikkel 10 nr. 3 i nevnte direktiv:

- foretas i løpet av de siste 24 timene før svinene flyttes,
- foretas i samsvar med bestemmelsene fastsatt i del A nr. 2.

2. Når det gjelder svin som skal flyttes til en annen driftsenhet, skal det i tillegg til undersøkelsene som skal gjennomføres i samsvar med bestemmelsene i nr. 1, foretas en klinisk undersøkelse av svinene i hver underenhet i driftsenheten der det holdes svin som skal flyttes. Dersom svinene er eldre enn tre-fire måneder, skal denne undersøkelsen omfatte måling av kroppstemperaturen på en bestemt andel av svinene.

Det skal kontrolleres minst så mange svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en prevalens på 10 % i disse underenhetene.

Imidlertid skal det når det gjelder:

- avlspurker, undersøkes minst så mange purker at det med 95 % sikkerhet kan påvises en feberprevalens på 5 % i underenheten der purkene som skal flyttes, holdes,
- avlsråner, foretas undersøkelse av alle avlsråner som skal flyttes.

3. Når det gjelder svin som skal flyttes til et slakteri, et bearbeidingsanlegg eller andre steder med henblikk på avliving eller slaktning, skal det i tillegg til undersøkelsene som skal gjennomføres i samsvar med bestemmelsene i nr. 1, foretas en klinisk undersøkelse av svinene i hver underenhet i driftsenheten der det holdes svin som skal flyttes. Dersom svinene er eldre enn tre-fire måneder, skal denne undersøkelsen omfatte måling av kroppstemperaturen på en bestemt andel av svinene.

Det skal kontrolleres minst så mange svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en prevalens på 20 % i de berørte underenhetene.

Når det gjelder avlspurker eller avlsråner, skal det imidlertid undersøkes minst så mange svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en feberprevalens på 5 % i underenheten der svinene som skal flyttes, holdes.

4. Når svinene nevnt i nr. 3 blir slaktet eller avlivet, skal det tas blodprøver til serologiske prøver eller blodprøver eller prøver fra mandlene til virologiske undersøkelser fra svin fra hver av underenhetene som svinene er flyttet fra.

Det skal tas minst så mange prøver at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens eller virusprevalens på 10 % i hver underenhet.

Når det gjelder avlspurker eller avlsråner, skal det tas prøver fra minst så mange svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens eller virusprevalens på 5 % i underenheten der disse svinene ble holdt.

⁽¹⁾ I visse tilfeller, for eksempel når det er mistanke om klassisk svinepest i en driftsenhet med et begrenset antall unge svin, kan andelen av angrepne purker være svært lav. I disse tilfellene skal det tas prøver av et høyere antall purker.

Typen prøver som skal tas, og prøven som skal brukes, skal være i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet, som skal ta hensyn til utvalget av prøver som kan utføres, disse prøvenes følsomhet og den epidemiologiske situasjonen.

5. Dersom det når svinene slaktes eller avlives, påvises kliniske tegn eller skader post mortem som tyder på klassisk svinepest, får bestemmelsene om prøvetaking fastsatt i del C, anvendelse som unntak fra nr. 4.

E. Framgangsmåter for kontroll og prøvetaking i en driftsenhet ved gjeninnsetting

1. Når svin blir gjeninnsatt i en driftsenhet i samsvar med artikkel 13 nr. 2 bokstav a) eller nr. 2 bokstav b) eller artikkel 19 nr. 8 annet ledd bokstav b) i direktiv 2001/89/EF, skal følgende framgangsmåter for prøvetaking anvendes:

- ved gjeninnsetting av kontrollsvin skal det tas blodprøver til serologiske prøver fra så mange tilfeldig utvalgte svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 10 % i hver underenhet i driftsenheten,
- ved fullstendig gjeninnsetting skal det tas blodprøver til serologiske prøver fra så mange tilfeldig utvalgte svin at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 20 % i hver underenhet i driftsenheten.

Når det gjelder avlspurker eller avlstråner, skal det imidlertid tas så mange prøver at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 10 %.

2. Etter at svin er gjeninnsatt, skal vedkommende myndighet påse at de berørte svinene dersom det forekommer sykdom eller dødsfall av ukjente årsaker i driftsenheten, umiddelbart undersøkes for klassisk svinepest. Disse bestemmelsene får anvendelse til restriksjonene nevnt i artikkel 13 nr. 2 bokstav a) annet ledd og artikkel 19 nr. 8 annet ledd bokstav b) annet punktum i direktiv 2001/89/EF oppheves i den berørte driftsenheten.

F. Framgangsmåter for prøvetaking i driftsenheter i vernesonen for restriksjonene oppheves

1. For at tiltakene nevnt i artikkel 10 i direktiv 2001/89/EF kan oppheves i en vernesone, skal det i alle driftsenheter i sonen:

- foretas en klinisk undersøkelse etter framgangsmåtene fastsatt i del A nr. 2 og 3,
- tas blodprøver til serologiske prøver i samsvar med nr. 2 nedenfor.

2. Det skal tas minst så mange blodprøver at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 10 % hos svinene i hver underenhet i driftsenheten.

Imidlertid skal det når det gjelder:

- avlspurker, tas minst så mange prøver at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 5 %,
- sædstasjoner, tas blodprøve av alle avlstråner.

G. Framgangsmåter for prøvetaking i driftsenheter i overvåkingssonen for restriksjonene oppheves

1. For at restriksjonene nevnt i artikkel 11 i direktiv 2001/89/EF kan oppheves i en overvåkingssone, skal det i alle driftsenheter i sonen foretas en klinisk undersøkelse etter framgangsmåtene fastsatt i del A nr. 2.

Videre skal det tas blodprøver til serologiske prøver fra svin:

- i alle driftsenheter der det ikke holdes svin i alderen to til åtte måneder,
- når vedkommende myndigheter mener at klassisk svinepest kan ha spredt seg ubemerket blant avlspurker,
- i alle driftsenheter der vedkommende myndighet mener at prøvetaking er nødvendig,
- på alle sædstasjoner.

2. Når det tas blodprøver til serologiske prøver i driftsenheter i overvåkingssonen, skal antallet blodprøver som tas i disse driftsenhetene, være i samsvar med bestemmelsene i del F nr. 2. Dersom vedkommende myndighet mener at klassisk svinepest kan ha spredt seg ubemerket blant avlspurker, skal imidlertid prøvetakingen gjennomføres bare i de underenhetene der disse dyrene holdes.
- H. **Framgangsmåter for serologisk overvåking og prøvetaking i områder der klassisk svinepest er mistenkt for å forekomme eller er bekreftet hos villlevende svin**
1. Ved serologisk overvåking av villlevende svin i områder der det er mistanke om klassisk svinepest eller der den er bekreftet, skal størrelsen på og det geografiske området til den målbestanden som skal undersøkes, først bestemmes, slik at det kan fastslås hvor mange prøver som skal tas. Prøvestørrelsen skal bestemmes som en funksjon av det anslåtte antall levende dyr og ikke som en funksjon av felte dyr.
 2. Dersom det ikke foreligger data om bestandens tetthet og størrelse, skal det geografiske området der prøvetakingen skal finne sted, avgrenses idet det tas hensyn til den konstante forekomsten av villlevende svin og forekomsten av naturlige og kunstige hindringer som effektivt hindrer omfattende og kontinuerlig forflytning av dyrene. Når slike forhold ikke er til stede eller det dreier seg om store områder, anbefales det å avgrense prøvetakingsområder på høyst 200 km² der det normalt er en bestand på omtrent 400-1 000 villlevende svin.
 3. Med forbehold for bestemmelsene i artikkel 15 nr. 2 bokstav c) i direktiv 2001/89/EF skal det tas prøver fra minst så mange svin i det avgrensede prøvetakingsområdet at det med 95 % sikkerhet kan påvises en serumprevalens på 5 %. Dette innebærer at det skal tas prøver fra minst 59 dyr i hvert avgrensede område.
Det anbefales også at:
 - omtrent 50 % av dyrene som det tas prøver fra, er i alderen tre-tolv måneder, 35 % er i alderen ett-to år og 15 % er over to år gamle i områder med mer omfattende og regelmessig jakt, eller der det jaktes selektivt som et sykdomsbekjempende tiltak,
 - det tas prøver fra minst 32 dyr i hver av de tre aldersklassene i områder med svært begrenset eller ingen jakt,
 - prøvetakingen gjennomføres på kort tid, helst i løpet av én måned,
 - dyrenes alder bestemmes ut fra tennesens utvikling.
 4. Innsamling av prøver til virologiske undersøkelser fra villlevende svin som er skutt eller funnet døde, skal gjennomføres i samsvar med bestemmelsene i kapittel V del B nr. 1.
Når virologisk overvåking av felte villlevende svin anses å være nødvendig, skal den hovedsakelig gjennomføres på dyr som er tre-tolv måneder gamle.
 5. Alle prøver som sendes til laboratoriet, skal vedlegges spørreskjemaet nevnt i artikkel 16 nr. 3 bokstav l) i direktiv 2001/89/EF.

KAPITTEL V

Generelle framgangsmåter og kriterier for innsamling og transport av prøver

A. **Generelle framgangsmåter og kriterier**

1. Før prøvetakingen gjennomføres i en driftsenhet under mistanke, skal det utarbeides et kart over driftsenheten, og de epidemiologiske underenhetene i driftsenheten skal identifiseres.
2. Hver gang det anses nødvendig med en ny prøvetaking av svin, skal alle svin som det tas prøver fra, merkes entydig på en slik måte at det lett kan tas prøver fra dem på nytt.
3. Med forbehold for kapittel IV del A nr. 5 bokstav b) skal det ikke tas prøver til serologiske prøver fra smågriser som er under åtte uker gamle.
4. Alle prøver skal sendes til laboratoriet sammen med de relevante skjemaene i samsvar med kravene fastsatt av vedkommende myndighet. Disse skjemaene skal inneholde nærmere opplysninger om sykehistorien til svinene som det er tatt prøver fra, og de kliniske tegnene eller skadene post mortem som er observert.

Når det gjelder svin som holdes i driftsenheter, skal det gis tydelige opplysninger om alder, kategori og opprinnelsenhet for svinene som det tas prøver fra. Det anbefales at det stedet der hvert svin som det er tatt prøver fra, befinner seg i driftsenheten, registreres sammen med svinets entydige identifikasjonsmerke.

B. Innsamling av prøver til virologiske undersøkelser

1. Vev fra mandlene, milten og nyrene er de prøvene som egner seg best til å påvise klassisk svinepest-virus, -antigen eller -genom fra døde eller avlivede svin. Dessuten anbefales det å samle inn to prøver av andre lymfevev, for eksempel retrofaryngeale, parotideale og mandibulære lymfeknuter eller mesenteriets lymfeknuter og en prøve av ileum. Når det gjelder autolyserte skrotter, er en hel lang knokkel eller brystbeinet det prøvematerialet som egner seg best.
2. Prøver av blod tilsatt antikoagulerende middel eller størknet blod skal samles inn fra svin som viser tegn på feber eller andre sykdomstegn, i samsvar med anvisningene fra vedkommende myndighet.
3. Virologiske undersøkelser anbefales når det gjelder syke dyr. De har vanligvis begrenset verdi når de brukes til overvåking av dyr uten kliniske tegn. Dersom formålet med en omfattende prøvetaking derimot er å påvise klassisk svinepest-virus når svinene er i inkubasjonstiden, er mandlene det prøvematerialet som egner seg best.

C. Transport av prøver

1. Det anbefales at alle prøver:
 - transporteres og oppbevares i tette beholdere,
 - ikke fryses, men holdes kalde ved kjøleskapstemperatur,
 - leveres til laboratoriet snarest mulig,
 - oppbevares i en emballasje der det i stedet for is brukes kjøleelementer til å holde dem kalde,
 - av vev eller organer plasseres i egne forseglede plastposer som er behørig merket. De skal deretter plasseres i større, solide beholdere og emballeres med tilstrekkelig absorberende materiale som kan beskytte innholdet mot skade og absorbere væske som lekker ut,
 - om mulig, transporteres direkte til laboratoriet av kvalifisert personale slik at det sikres en rask og pålitelig transport.
2. På utsiden skal emballasjen være merket med adressen til mottakerlaboratoriet, og følgende opplysninger skal kunne ses tydelig: «Patologisk materiale fra dyr. Bederfelig. Skjørt. Må bare åpnes i et laboratorium for klassisk svinepest.»
3. Mottakerlaboratoriet skal på forhånd underrettes om når og hvordan prøvene ankommer.
4. Om prøvene transporteres med fly til Fellesskapets referanselaboratorium for klassisk svinepest⁽¹⁾ fra andre medlemsstater enn Tyskland eller fra andre tredjestater, skal emballasjen merkes i samsvar med reglene fra IATA.

KAPITTEL VI***Prinsipper for og anvendelse av virologiske undersøkelser og vurdering av resultatene av disse*****A. Påvisning av virusantigen****1. *Fluorescens-antigenprøve (FAT)***

Prinsippet for prøven er å påvise virusantigen på tynne snitt av fryst organmateriale fra svin som mistenkes for å være angrepet av klassisk svinepest-virus. Det intracellulære antigenet påvises ved hjelp av et FITC-konjugert antistoff. Et positivt resultat bør bekreftes ved at fargingene gjentas med et spesifikt monoklonalt antistoff.

Mandler, nyrer, milt, forskjellige lymfeknuter og ileum er egnede organer. Når det gjelder viltlevende svin, kan et utstrykningspreparat av beinmargceller også brukes, dersom disse organene ikke er tilgjengelige eller er autolysert.

Prøven kan gjennomføres på én dag. Ettersom organprøver kan fås bare fra døde dyr, er den bare av begrenset verdi ved kartlegginger. Tilliten til prøveresultatet kan være begrenset på grunn av tvilsom farging, særlig når det ikke foreligger så stor erfaring med å gjennomføre prøven, eller når organene i prøven er autolysert.

⁽¹⁾ Fellesskapets referanselaboratorium har ubegrenset tillatelse til å motta diagnostiske prøver og isolater av klassisk svinepest-virus. Før transporten kan dette laboratoriet be om en kopi av importtillatelsen, som legges i en konvolutt og festes på utsiden av emballasjen.

2. ELISA-prøve for påvisning av antigener

Virusantigener påvises ved hjelp av forskjellige ELISA-metoder. Antigen-ELISA-ens følsomhet bør være høy nok til å gi positivt resultat for dyr med kliniske tegn på klassisk svinepest.

ELISA-prøve for påvisning av antigener anbefales på prøver fra dyr med kliniske tegn på eller patologiske skader av sykdommen. Den egner seg ikke til undersøkelse av enkeltdyr. Egnede prøver er leukocytter, serum, ikke-koagulert blod samt suspensjoner av organene nevnt i nr. 1, fra svin som mistenkes for å være angrepet av klassisk svinepest-virus⁽¹⁾.

ELISA-prøven kan gjennomføres på én dag og kan foretas med automatisk utstyr. Den største fordelen er at et stort antall prøver kan behandles på kort tid. Det anbefales å bruke antigen-ELISA som gir tilfredsstillende resultater på referansemateriale. I dag er imidlertid alle ELISA-prøver på markedet mindre følsomme enn virusisolering på cellekultur, og følsomheten er betydelig bedre på blodprøver fra smågris enn fra voksne svin.

B. Virusisolering

1. Virusisolering er basert på inkubasjon av prøvemateriale på mottakelige cellekulturer fra svin. Dersom klassisk svinepest-virus forekommer i prøven, vil det formere seg i cellene til en mengde som kan påvises ved immunfarging av de infiserte cellene med konjugerte antistoffer. Antistoffer som er spesifikke for klassisk svinepest, kreves til differensialdiagnose når det gjelder andre pestivirus.
2. De prøvene som er beste egnet til isolering av klassisk svinepest-virus, er leukocytter, plasma eller fullblod fra ikke-koagulerte blodprøver eller organene nevnt i del A nr. 1.
3. Virusisolering er bedre egnet til å undersøke prøver fra et mindre antall dyr enn til masseovervåking. Virusisolering er arbeidskrevende og krever minst tre dager før resultatene foreligger. Ytterligere to cellekulturer kan være nødvendig for å påvise en liten mengde virus i prøven. Dette kan føre til en undersøkelsestid på inntil ti dager før et endelig resultat foreligger. Autolyserte prøver kan være cytotoxiske for cellekulturen og kan dermed begrense bruken av denne.
4. Det anbefales å foreta virusisolering også dersom klassisk svinepest tidligere er bekreftet ved hjelp av andre metoder. Den skal brukes som referanseprøve for å bekrefte positive resultater av en tidligere antigen-ELISA, PCR eller FAT eller indirekte peroksidasefarging.

Isolater av klassisk svinepest-virus som er framskaffet på denne måten, er nyttige til viruskarakterisering, herunder gentypebestemmelse og molekylær epidemiologi.

5. Alle isolater av klassisk svinepest-virus fra alle primærutbrudd, primærtillfeller hos viltlevende svin eller tilfeller i slakterier eller transportmidler skal gentypebestemmes i et nasjonalt referanselaboratorium i medlemsstatene eller i et annet laboratorium som vedkommende medlemsstat har godkjent, eller i Fellesskapets referanselaboratorium i samsvar med del E.

I alle tilfeller skal disse virusisolatene umiddelbart sendes til Fellesskapets referanselaboratorium slik at de kan inngå i virussamlingen.

C. Påvisning av virusgenom

1. Polymerasekjedereaksjon (PCR) anvendes for å påvise virusgenom i prøver av blod, vev eller organer. Små fragmenter av virus-RNA transkribes til DNA-fragmenter som forsterkes ved PCR til påviselige mengder. Ettersom denne prøven påviser bare en genomsekvens av viruset, kan PCR være positiv selv om det ikke foreligger klassisk svinepest-virus (for eksempel i autolysert vev eller prøver fra svin som er i bedring).
2. PCR kan brukes på et lite antall omhyggelige utvalgte prøver fra dyr under mistanke eller på materiale fra aborterte fostre. For skrotter av viltlevende svin kan det være den beste metoden dersom materialet er autolysert og virusisolering ikke lenger er mulig på grunn av cytotoxicitet.
3. Egnede prøvemateriale til diagnostisk PCR er de samme organene som til virusisolering eller ikke-koagulert blod.

⁽¹⁾ Det finnes flere ELISA-prøver for påvisning av klassisk svinepestantigen på markedet, og disse kan gjennomføres med forskjellige typer prøver.

4. PCR kan gjennomføres på 48 timer. Den krever riktig laboratorieutstyr, egne lokaler og kvalifisert personale. Det er en fordel at smittsomme viruspartikler ikke trenger å formere seg i laboratoriet. Metoden er svært følsom, men kontaminering kan lett forekomme og føre til falskt positive resultater. Derfor er streng kvalitetskontroll helt avgjørende. Noen metoder er spesifikke for pestivirus heller enn for klassisk svinepest og krever ytterligere bekreftende prøver, for eksempel sekvensering av PCR-produktet.

D. Vurdering av resultatene av virologiske undersøkelser

1. Virologiske undersøkelser er avgjørende for å bekrefte klassisk svinepest.

Virusisolering må anses som den virologiske referanseundersøkelsen, og skal om nødvendig brukes som bekreftende prøve. Den anbefales særlig dersom positive FAT-, ELISA- eller PCR-resultater ikke er forbundet med påvisning av kliniske tegn på eller skader av sykdommen og i alle andre tvilsomme tilfeller.

Et primærutbrudd av klassisk svinepest kan imidlertid bekreftes dersom kliniske tegn på eller skader av sykdommen er påvist hos de berørte svinene og minst to prøver for påvisning av antigen eller genom har gitt positivt resultat.

Et sekundærutbrudd av klassisk svinepest kan bekreftes dersom det i tillegg til den epidemiologiske forbindelsen til et bekreftet utbrudd eller tilfelle er påvist kliniske tegn på eller skader av sykdommen hos de berørte svinene og en prøve for påvisning av antigen eller genom har gitt positivt resultat.

Et primært tilfelle av klassisk svinepest hos villlevende svin kan bekreftes etter virusisolering, eller dersom minst to prøver for påvisning av antigen eller genom har gitt positivt resultat. Ytterligere tilfeller av klassisk svinepest hos villlevende svin der det er funnet en epidemiologisk forbindelse til tidligere bekreftede tilfeller, kan bekreftes dersom en prøve for påvisning av antigen eller genom har gitt positivt resultat.

2. Et positivt resultat for klassisk svinepest ved en prøve for påvisning av genom eller antigen krever at vedkommende prøve er utført med antistoffer som er spesifikke for klassisk svinepest-virus, eller primere. Dersom prøven ikke var spesifikk for klassisk svinepest-virus, men bare for pestivirus, må den gjentas med reagenser som er spesifikke for klassisk svinepest.

E. Gentypebestemmelse av isolater av klassisk svinepest-virus

1. Gentypebestemmelse av isolater av klassisk svinepest-virus oppnås ved å bestemme nukleotidsekvensen av deler av virusgenomet, det vil si spesifikke deler av det 5' ikke-kodende segmentet og/eller av E2-glykoproteingenet. Likheten mellom disse sekvensene og dem som allerede er oppnådd fra tidligere virusisolater, kan antyde hvorvidt sykdomsutbrudd er forårsaket av nye eller allerede kjente stammer, noe som kan underbygge eller forkaste hypoteser om overføringsveier som er oppnådd gjennom den epidemiologiske undersøkelsen.

Gentypebestemmelse av isolater av klassisk svinepest-virus er svært viktige for å bestemme sykdomskilden. Et nært slektskap mellom virus fra forskjellige utbrudd er imidlertid ikke absolutt bevis på en direkte epidemiologisk forbindelse.

2. Dersom virusbestemmelsen ikke kan utføres på kort tid i et nasjonalt laboratorium eller i et annet laboratorium som er godkjent for å diagnostisere klassisk svinepest, skal den opprinnelige prøven eller virusisolatet sendes til Fellesskapets referanselaboratorium for typebestemmelse snarest mulig.

Dataene om typebestemmelse og sekvensering av isolater av klassisk svinepest-virus som laboratoriene som er godkjent for å diagnostisere klassisk svinepest, har tilgang til, skal oversendes Fellesskapets referanselaboratorium og legges inn i dette laboratoriets database.

Opplysningene i denne databasen skal være tilgjengelige for alle nasjonale referanselaboratorier i medlemsstatene. Dersom opplysningene skal offentliggjøres i vitenskapelige tidsskrifter, skal imidlertid Fellesskapets referanselaboratorium på anmodning fra vedkommende laboratorium garantere at disse opplysningene behandles fortrolig til de er offentliggjort.

KAPITTEL VII

Prinsipper for og anvendelse av serologiske prøver og vurdering av resultatene av disse

A. Grunnprinsipper og diagnostisk verdi

1. Hos svin som er angrepet av klassisk svinepest-virus, kan antistoffer vanligvis påvises i serumprøver to-tre uker etter infeksjon. Hos svin som er blitt friske igjen av sykdommen, kan beskyttende nøytraliserende antistoffer påvises i flere år eller endatil i hele dyrets levetid. Antistoffer kan også påvises sporadisk i sykdommens sluttstadium hos dødssyke dyr. Hos noen svin som har den kroniske formen for klassisk svinepest, kan antistoffer påvises i noen få dager i slutten av den første måneden etter infeksjon.

Svin som er angrepet in utero, kan være immuntolerante overfor homologt klassisk svinepest-virus og ikke produsere spesifikke antistoffer. Antistoffer som stammer fra mordyret, kan imidlertid påvises i de første dagene dyret lever. Halveringstiden for antistoffer fra mordyret hos friske smågriser uten viremi, er omtrent to uker. Dersom det påvises antistoffer mot klassisk svinepest-virus hos smågriser som er eldre enn tre måneder, er det lite sannsynlig at de stammer fra mordyret.

2. Påvisning av antistoffer mot klassisk svinepest-virus i serum- eller plasmaprøver foretas for å støtte diagnostiseringen av klassisk svinepest i driftsenheter under mistanke, for å fastslå infeksjonens varighet ved et bekreftet utbrudd og til sykdomsovervåking. Serologiske prøver er imidlertid av begrenset verdi for å påvise klassisk svinepest dersom infeksjonen nylig har oppstått i en driftsenhet.

Noen få seropositive svin med lav nøytralisasjonstiter kan tyde på en nylig oppstått infeksjon (to-fire uker). Mange svin med høy nøytralisasjonstiter kan tyde på at viruset kom inn i driftsenheten for over en måned siden. Lokalisering av seropositive svin i driftsenheten kan gi nyttige opplysninger om hvordan klassisk svinepest-virus kom inn i driftsenheten.

Det må imidlertid foretas en nøyaktig vurdering av resultatene av de serologiske prøvene, idet det tas hensyn til alle de kliniske, virologiske og epidemiologiske funnene innenfor rammen av undersøkelsen som skal gjennomføres ved mistanke om eller bekreftelse av klassisk svinepest, i samsvar med artikkel 8 i direktiv 2001/89/EF.

B. Anbefalte serologiske prøver

1. Virusnøytraliseringsprøven (VNT) og ELISA-prøven er de prøvene som foretrekkes til serologisk diagnostisering av klassisk svinepest.

Kvaliteten på og effektiviteten av den serologiske diagnostiseringen som utføres i de nasjonale laboratoriene, skal kontrolleres regelmessig innenfor rammen av de sammenlignende prøvene som Fellesskapets referanselaboratorium med jevne mellomrom gjennomfører mellom laboratoriene.

2. VNT er basert på bestemmelse av den virusnøytraliserende effekten av antistoffene i serumprøven, uttrykt som nøytraliserende 50 % endepunkt.

En konstant mengde klassisk svinepest-virus inkuberes ved 37 °C med fortynt serum. Til kartleggingsformål må seraene først uttynnes 1/10. Når full titrering er nødvendig, kan det tilberedes doble serumfortynninger med utgangspunkt i 1/2 eller 1/5. Hver fortykning blandes med en like stor mengde virussuspensjon som inneholder 100 infiserte doser (TCID₅₀).

Etter inkubasjon inokuleres blandingen på cellekulturer som inkuberes i tre-fem dager. Etter denne inkubasjonstiden fikseres kulturene, og eventuell virusreplikasjon i de infiserte cellene påvises ved hjelp av et immunmerkingssystem. Det kan enten benyttes en nøytraliserings-immunoperoksidaseprøve (NPLA) eller en nøytraliserings-immunofluorescensprøve (NIF).

Resultatene av VNT uttrykkes som den resiproke verdien av den første serumfortynningen, der halvparten av de inokulerte cellekulturene (50 % endepunkt) ikke viser noen virusreplikasjon (ingen spesifikk merking). Det anslås et punkt mellom to fortynningsnivåer. Sluttfortynningen er basert på den faktiske serumfortynningen under nøytraliseringsreaksjonen, det vil si etter tilsetning av virus, men før tilsetning av cellesuspensjon.

3. VNT er den mest følsomme og mest pålitelige prøven for å påvise antistoffer mot klassisk svinepest-virus. Derfor anbefales den til serologisk undersøkelse av både ett enkelt dyr og en besetning. Ved denne prøven kan det imidlertid påvises kryssnøytraliserende antistoffer som er spesifikke for infeksjoner av drøvtyggerpestivirus hos svin.

VNT for påvisning av antistoffer mot BVD-virus og BD-virus følger de samme prinsippene som nevnt ovenfor, og utføres til differensialdiagnostisering av klassisk svinepest.

4. Pestivirusstammene som skal brukes i nøytraliseringsprøvene, skal være i samsvar med anbefalingen fra Fellesskapets referanselaboratorium.
5. Det er utviklet flere ELISA-metoder med bruk av spesifikke monoklonale antistoffer, som er basert på to formater: konkurrerende eller blokkerende ELISA og ikke-konkurrerende ELISA.

Den konkurrerende eller blokkerende ELISA-prøven er vanligvis basert på monoklonale antistoffer. Dersom serumprøven inneholder antistoffer mot klassisk svinepest-virus, vil bindingen av et utvalgt peroksidasekonjugert monoklonalt antistoff til virusantigen bli hemmet, noe som gir et svekket signal.

I den ikke-konkurrerende ELISA-prøven måles bindingen av serumantistoffer til antigen direkte ved hjelp av peroksidase-konjugerte antisvin-antistoffer.

6. De nasjonale laboratoriene skal foreta regelmessig kvalitetskontroll av følsomheten og spesifisiteten i hvert parti av en ELISA-prøve ved hjelp av det settet med referansesera som Fellesskapets referanselaboratorium leverer. Dette settet skal omfatte:

- sera fra svin i den tidlige fasen av infeksjon med klassisk svinepest-virus (før 21 dager etter infeksjon),
- sera fra svin som er i ferd med å bli friske (etter 21 dager etter infeksjon),
- sera fra svin som er angrepet av drøvtyggerpestivirus.

ELISA-prøven som skal brukes i den serologiske diagnostiseringen av klassisk svinepest, skal gjenkjenne alle referansesera fra svinene som er i ferd med å bli friske. Alle resultatene som oppnås med referanseseraene, skal være repeterbare. Videre anbefales det at de påviser alle positive sera fra den tidlige fasen og gir færrest mulig kryssreaksjoner med seraene fra svin som er angrepet av drøvtyggerpestivirus.

Resultatene som oppnås med referanseseraene fra svin i den tidlige infeksjonsfasen, gir en antydning om ELISA-prøvens følsomhet.

7. ELISA-prøven anses som mindre følsom enn VNT, og den bør derfor brukes til kartlegging av hele besetninger. ELISA-prøven krever imidlertid mindre spesialisert utstyr og kan utføres mye raskere enn VNT, takket være automatiserte systemer.

ELISA-prøvenskal sikre identifikasjon av alle infeksjoner med klassisk svinepest-virus på rekonvalesensstadiet og må så langt det er mulig være fri for påvirkning av antistoffer som kryssreagerer med drøvtyggerpestivirus.

C. Tolkning av serologiske resultater og differensialdiagnostisering med infeksjoner som skyldes drøvtyggerpestivirus (BVDV og BDV)

1. Ved påvisning av en nøytralisasjonstiter for klassisk svinepest-virus som er lik eller høyere enn 10 ND₅₀ i serumprøver tatt fra ett eller flere svin, eller et positivt ELISA-resultat i serumprøver fra en gruppe svin, får tiltakene nevnt i artikkel 4 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF, anvendelse umiddelbart, eller de får fortsatt anvendelse i den berørte driftsenheten, uten at bestemmelsene i artikkel 4 nr. 3 bokstav a) eller artikkel 7 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF berøres.

Prøvene som allerede er samlet inn fra denne driftsenheten, skal undersøkes på nytt ved hjelp av VTN ved sammenlignende endepunktitering av de nøytraliserende antistoffene mot klassisk svinepest-virus og drøvtyggerpestivirus.

2. Dersom de sammenlignende prøvene viser antistoffer mot drøvtyggerpestivirus og ingen eller klart lavere (mindre enn det tredobbelte) antistofftiter mot klassisk svinepest-virus, skal mistanken om klassisk svinepest-virus utelukkes, med mindre det er andre grunner til fortsatt å anvende tiltakene nevnt i artikkel 4 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF, i den berørte driftsenheten.
3. Dersom de sammenlignende prøvene viser en virusnøytraliseringstiter hos mer enn ett svin som er lik eller høyere enn 10 ND₅₀, og denne titeren er lik eller høyere enn titeren for andre pestivirus, skal vedkommende myndighet påse at klassisk svinepest bekreftes, forutsatt at det er funnet epidemiologiske bevis på sykdommen i den berørte driftsenheten.
4. Uten at bestemmelsene i artikkel 4 nr. 3 i direktiv 2001/89/EF berøres, skal vedkommende myndighet, dersom det ikke er funnet epidemiologiske bevis på sykdommen, eller dersom resultatene av de tidligere prøvene var tvilsomme, påse at:

- tiltakene nevnt i artikkel 4 nr. 2 i direktiv 2001/89/EF, fortsatt får anvendelse,
- ytterligere undersøkelser gjennomføres snarest mulig for å bekrefte eller utelukke klassisk svinepest i samsvar med kapittel IV,

i den berørte driftsenheten.

5. Dersom de ytterligere kontrollene og prøvene nevnt i nr. 4, ikke gjør det mulig å utelukke klassisk svinepest, skal det tas ytterligere blodprøver til serologiske prøver i driftsenheten etter at det er gått minst to uker siden forrige kontroll.

Som ledd i denne ytterligere prøvetakingen skal svinene som det allerede er tatt prøver fra, og som er kartlagt, gjennomgå ny prøvetaking med sikte på en sammenlignende serologisk undersøkelse med de prøvene som tidligere er tatt, for å påvise en eventuell serokonvertering for klassisk svinepest-virus eller drøvtyggerpestivirus.

Dersom disse ytterligere kontrollene og prøvene ikke gjør det mulig å bekrefte klassisk svinepest, kan tiltakene nevnt i artikkel 4 i direktiv 2001/89/EF, oppheves.

KAPITTEL VIII

Diskriminerende prøver ved nødvaksinasjon

Det finnes ingen egnede diskriminerende prøver som kan skjelne mellom vaksinerte svin og svin som er naturlig angrepet av klassisk svinepest-virus.

KAPITTEL IX

Minstekrav til sikkerheten i laboratorier for klassisk svinepest

1. Minstekravene fastsatt i tabell 1, skal være oppfylt i alle laboratorier der klassisk svinepest-virus håndteres, selv om det bare er i små mengder, som påkrevd ved virusisolasjons- og nøytraliseringsprøver. Kontroll post mortem, behandling av vev til FAT og serologi med bruk av inaktiverede antigener kan imidlertid foregå på et lavere inneslutningsnivå, forutsatt at grunnleggende hygiene og postoperativ desinfeksjon med sikker disponering av vev og sera er garantert.
2. Tilleggskravene fastsatt i tabell 1, skal oppfylles av alle laboratorier der omfattende virusreplikasjon finner sted.
3. Kravene fastsatt i tabell 2, skal oppfylles av alle laboratorier der dyreforsøk med klassisk svinepest-virus finner sted.
4. I alle tilfeller skal alle lagre av klassisk svinepest-virus oppbevares på et sikkert sted, enten i dypfryst eller frysetørret form. Det anbefales at fryserer og kjøleskap ikke brukes til andre virus enn klassisk svinepest eller til andre materialer som ikke er knyttet til diagnostiseringen av klassisk svinepest. Hver enkelt ampull skal merkes tydelig, og det skal føres detaljerte registre over viruslagrene med datoer for og resultater av kvalitetskontroller. Det skal også føres registre over virus som blir lagt inn på lageret, med utførlige opplysninger om kilden, og over virus som sendes til andre laboratorier.
5. Det anbefales at det i tilknytning til det biosikre området der arbeidet med klassisk svinepest-virus foregår, finnes områder der klassisk svinepest-virus ikke håndteres. Disse andre områdene bør stå til rådighet for klargjøring av glass og medier, vedlikehold og tilberedning av ikke-infiserte cellekulturer, bearbeiding av sera og serologiske undersøkelser (uten bruk av levende klassisk svinepest-virus) og til administrative oppgaver og kontorarbeid.

Tabell 1

Prinsipper for biologisk inneslutning som er relevant for diagnoselaboratorier

	Tilleggskrav	Minstekrav
Det generelle arbeidsmiljøet	Normalt atmosfærisk trykk. Dobbel HEPA-filtrering av utluften. Egne rom som brukes utelukkende til diagnostisering av klassisk svinepest-virus.	Normalt atmosfærisk trykk. Egne rom som utelukkende brukes til bestemte arbeidsoppgaver.
Laboratorietøy	Fullstendig omklledning ved ankomst. Laboratorietøyet skal brukes bare i enheten for klassisk svinepest-virus. Engangshansker til all håndtering av infisert materiale. Tøyet steriliseres før det fjernes fra enheten, eller vaskes i enheten.	Eget yttertøy som brukes bare i enheten for klassisk svinepest-virus. Engangshansker til all håndtering av infisert materiale. Yttertøyet steriliseres før det fjernes fra enheten, eller vaskes i enheten.
Kontroll av personale	Adgang til enheten bare for navngitt, kvalifisert personale. Hendene vaskes og desinfiseres før enheten forlattes. Personalet må ikke komme i nærheten av svin de første 48 timene etter at de har forlatt enheten.	Adgang til enheten bare for navngitt, kvalifisert personale. Hendene vaskes og desinfiseres før enheten forlattes. Personalet må ikke komme i nærheten av svin de første 48 timene etter at de har forlatt enheten.
Utstyr	Biosikkerhetsrom (klasse I eller II) til all håndtering av levende virus. Rommet bør ha dobbel HEPA-filtrering av utluften. Alt utstyr som kreves til laboratoriearbeidet, skal være tilgjengelig i den aktuelle laboratorieavdelingen.	

Tabell 2

Krav til biosikkerhet i lokaler til forsøksdyr

	Krav
Det generelle arbeidsmiljøet	Kontrollert undertrykksventilasjon. Dobbel HEPA-filtrering av utluften. Utstyr for fullstendig utgassing/desinfisering når forsøket avsluttes. Alt avløpsvann skal behandles for å inaktivere klassisk svinepest-virus (med varme eller kjemikalier).
Laboratorietøy	Fullstendig omkledding ved ankomst. Engangshansker til all håndtering. Tøyet steriliseres før det fjernes fra enheten, eller vaskes i enheten.
Kontroll av personale	Adgang til enheten bare for navngitt, kvalifisert personale. Dusjing før enheten forlates. Personalet må ikke komme i nærheten av svin de første 48 timene etter at de har forlatt enheten.
Utstyr	Alt utstyr som kreves til laboratoriearbeidet, skal være tilgjengelig i enheten. Alt materiale skal steriliseres før det fjernes fra enheten, eller skal, når det gjelder prøver fra dyr, plasseres i to tette beholdere – den ene inne i den andre – med desinfisert overflate med sikte på transport til laboratoriet for klassisk svinepest.
Dyr	Alle dyr skal slaktes før de fjernes fra enheten, kontroll post mortem skal foretas i det biosikre området, og skrottene skal forbrennes når kontrollen er fullført.