



Republica Moldova

GVERNUL REPUBLICII MOLDOVA

AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR

I.P. CENTRUL REPUBLICAN DE DIAGNOSTIC VETERINAR
SECȚIA VIRUSOLOGIE

MANUAL DE DIAGNOSTIC

pentru

Pesta Porcină Clasică

CHIȘINĂU 2019

Cuprins

CAPITOLUL I: Obiective și definiții

CAPITOLUL II: Descrierea pestei porcine clasice

1. Introducere
2. Forma acută
3. Forma cronică
4. Forma prenatală și izbucnirea târzie a bolii

CAPITOLUL III: Ghid la principalele criterii care trebuie luate în considerare pentru recunoașterea unei exploatații ca fiind suspectă de pestă porcină clasică

1. Cele mai importante semne clinice și lezionale ce trebuie luate în considerare
2. Cele mai importante aspecte epidemiologice ce trebuie luate în considerare
3. Cele mai importante aspecte legate de rezultatele testelor serologice care trebuie luate în considerare

CAPITOLUL IV: Proceduri de examinare și de prelevare a probelor

1. Linii directoare și proceduri pentru examinarea clinică și prelevarea de probe de la porcii din exploatațiile suspecte
2. Proceduri de prelevare a probelor într-o exploatație atunci când porcii sunt uciși în urma confirmării bolii
3. Proceduri de prelevare de probe atunci când într-o exploatație suspectă porcii sunt uciși ca măsură de prevenție
4. Proceduri de control și de prelevare a probelor înainte de acordarea autorizației de a muta porcii din exploatațiile situate în zone de protecție sau de supraveghere și în cazul în care acești porci sunt tăiați sau uciși
5. Proceduri de control și de prelevare a probelor într-o exploatație în relație cu repopularea
6. Proceduri de prelevare a probelor în exploatațiile din zona de protecție, înainte de ridicarea restricțiilor
7. Proceduri de prelevare a probelor în exploatații din zona de supraveghere, înainte de ridicarea restricțiilor
8. Monitorizarea serologică și procedurile de prelevare a probelor în zonele în care pesta porcină clasică este suspectată să apară sau a fost confirmată la porci sălbatici

CAPITOLUL V: Proceduri și criterii generale pentru colectarea și transportul probelor

1. Proceduri și criterii generale
2. Colectarea probelor pentru teste virusologice
3. Transportul probelor

CAPITOLUL VI: Principiile și utilizarea testelor virusologice și evaluarea rezultatelor acestora

1. Detectarea antigenului viral
2. Detectarea genomului viral
3. Metodologia de diagnostic în cazul pestei porcine clasice

CAPITOLUL VII: Principiile și utilizarea testelor serologice și evaluarea rezultatelor acestora.

1. Principii de bază și valoare de diagnostic
2. Teste serologice recomandate
3. Interpretarea rezultatelor serologice și diagnosticul diferențial cu infecții datorate pestivirusurilor rumegătoarelor (BVDV și BDV)

CAPITOLUL VIII: Teste de diferențiere în cazul vaccinării de urgență

1. Principii de bază
2. Linii directe pentru folosirea testelor de diferențiere în contextul unei vaccinări de necesitate cu vaccin marker într-o exploatare de porci menționat la art. 19 al Directivei 2001/89/CE transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016 (cap.XVII).

CAPITOLUL IX: Cerințe minime de securitate pentru laboratoarele de PPC

Anexa nr. 1 - diagrama flux diagnostic focar primar când primul test este IFD

Anexa nr. 2 - diagrama flux diagnostic focar secundar când primul test este IFD

Anexa nr. 3 - diagrama flux diagnostic focar primar pe animale la 30 de zile după vaccinare cu vaccin viu

Anexa nr. 4 - diagrama flux diagnostic focar primar când primul test este PCR

Anexa nr. 5 - diagrama flux diagnostic focar secundar când primul test este PCR

Anexa nr. 6 - diagrama flux diagnostic prin examene serologice

Abrevieri:

PPC: *pesta porcină clasică*

PPA: *pesta porcină africană*

TVN: *Testul de virus neutralizare*

IFD: *Testul de imunofluorescență directă*

IFAT: *Testul de imunofluorescență indirectă*

NPLA: *Testul de neutralizare a anticorpilor legați de peroxidază*

NIF: *Testul de neutralizare – imunofluorescență*

LIR: *Laboratorul Internațional de Referință*

BVD: *diareea virală bovină;*

BD: *boala de graniță (boala Border)*

CAPITOLUL I: Obiective și definiții

Prezentul Manual de Diagnostic pentru pesta porcină clasică transpune prevederile Directivei 2001/89/CE, privind măsurile comunitare pentru controlul PPC.

1) Pentru a se asigura proceduri uniforme pentru diagnosticul peștei porcine clasice (în continuare PPC), acest Manual:

- a) asigură un ghid al cerințelor minime pentru procedurile de diagnostic, metodele de prelevare de probe și criteriile pentru evaluarea rezultatelor examinărilor post-mortem și a testelor de laborator, în vederea stabilirii diagnosticului corespunzător al PPC⁽¹⁾;
- b) stabilește cerințe minime de Bio-securitate și standarde de calitate, pentru a fi urmărite de laboratoarele de diagnostic pentru PPC și pentru transportul probelor;
- c) stabilește testele de laborator ce urmează a fi folosite pentru diagnosticul PPC și tehnicile de laborator folosite pentru tipizarea genetică a culturilor de virus izolat al PPC.

2) Manualul pune accentul pe aplicațiile testelor și evaluarea rezultatelor acestora și nu pe tehnicile de laborator detaliate.

3) În acest manual, în plus față de definițiile la care se face referire în pct. 3 al Normei sanitar veterinar privind stabilirea măsurilor de control al PPC, aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 1368 din 19.12.2016, se aplică următoarele definiții:

- a) "*exploatație suspectă*" înseamnă orice exploatație de porci care conține unul sau mai mulți porci suspecti de a fi infectați cu virusul PPC sau orice exploatație de contact, așa cum este definită în art. 2 lit. (v) al Directivei 2001/89/CE;
- b) "*unic reactant*" înseamnă orice porc care prezintă un rezultat pozitiv la testele serologice pentru PPC, dar care nu are date anamnetice referitoare la un contact cu virusul PPC și de la care nu există nici un indiciu de răspândire a bolii la porcii de contact ⁽²⁾ ;
- c) "*subunitate epidemiologică*" sau "subunitate", înseamnă clădirea, spațiul sau terenul apropiat, în care sunt ținuti grupuri de porci în cadrul unei exploatații, în așa fel încât aceștia au contact frecvent direct sau indirect unul cu celălalt, dar separat de ceilalți porci din aceeași exploatație;
- d) "porci în contact" porcii care trăiesc într-o exploatație în contact direct cu unul sau mai mulți porci suspecti de a fi infectați cu virusul PPC în ultimele 21 de zile.

⁽¹⁾Atunci când se decide numărul probelor ce urmează a fi prelevate pentru testele de laborator, trebuie să fie luată în considerare și sensibilitatea testelor care vor fi folosite. Numărul animalelor de la care vor fi prelevate probele, trebuie să fie mai mare decât cel indicat în acest manual, în cazul în care sensibilitatea testului care va fi folosit nu este prea mare.

⁽²⁾La unicii reactanți titrul de anticorpi virus neutralizanți poate varia de la limită (în majoritatea cazurilor) până la puternic pozitiv. La o repetare a prelevării probelor, unicii reactanți pot prezenta un titru constant sau descrescător. În general numai câțiva porci din lot prezintă aceste reacții fals pozitive.

CAPITOLUL II: Descrierea pestei porcine clasice

1. Introducere

1) Pesta porcină clasică este cauzată de un virus ARN anvelopat care aparține genului Pestivirus din Familia Flaviviridae. Acest virus este înrudit cu pestivirusurile întâlnite la rumegătoare care provoacă diareea virală bovină (BVD) și boala de graniță (BD). Această înrudire are serioase consecințe asupra diagnosticului ca urmare a reacțiilor încrucișate, care pot conduce la rezultate fals pozitive ale testelor de laborator.

Genomul viral este reprezentat de un singur lanț de ARN de sens pozitiv cu o lungime de aproximativ 12.5 kilobaze. Genomul codifică cele 4 proteine structurale (C, Erns, E1, E2) și 7 proteine nestructurale (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Proteina E2 este proteina structurală majoră responsabilă de producerea anticorpilor neutralizanți și alături de proteina Erns joacă un rol important în atașarea virusului pe suprafața celulelor. La nivelul proteinei E2 au fost identificate mai multe domenii antigenice: domeniul A1, A2, A3, B, C și D. Anticorpi monoclonali neutralizanți au fost produși față de epitopii domeniilor A1-2 care sunt înalt conservate printre tulpinile virusului PPC. Structura antigenică a domeniilor A3, B și C variaza între tulpinile de Pesta porcină.

2) Virusul PPC este relativ stabil în excrețiile umede ale porcilor infectați, în carcasele de porci, în carnea proaspătă de porc și în unele produse din carne de porc. Este rapid inactivat de detergenți, solvenți lipidici, proteaze și substanțe dezinfectante obișnuite. Animalele infectate elimină virusul prin salivă, urină și fecale.

3) Principala cale naturală de infecție este cea oro-nazală, prin contact direct sau indirect cu porcii infectați sau prin consumul de hrană contaminată cu virus. În zonele cu o densitate mare de porci, răspândirea virusului se realizează cu ușurință între exploatațile de porci învecinate; transmiterea bolii se poate realiza și prin materialul seminal al vierilor infectați.

4) Perioada de incubație variază de la 2 - 14 zile cu medie șapte până la zece zile, dar în condiții de teren, simptomele clinice pot deveni evidente într-o exploatație doar după 2-4 săptămâni de la introducerea virusului sau, chiar mai mult, dacă sunt implicați numai porcii adulți sau tulpini de patogenitate medie.

În condiții naturale, modul de pătrundere a virusului în organism este cea oronazală iar tonsilele reprezintă primul loc de replicare al virusului. Virusul poate fi detectat la nivelul tonsilelor cel mai devreme la câteva ore după expunere, neputând fi detectat în alte zone ale cavității bucale la 24 de ore după expunere. Este interesant de menționat că după infecțiile intramusculare sau subcutanate, virusul PPC a fost detectat în mod constant și în concentrații mari la nivelul tonsilelor.

Virusul inițial infectează celulele epiteliale ale criptelor tonsilei și apoi se răspândește în țesutul limforeticular din jur. Din tonsile, virusul ajunge pe cale limfatică la nivelul limfonodurilor ce drenează regiunea tonsilară. După replicarea la nivelul limfonodurilor regionale, pe cale sangvină virusul ajunge la alte organe ale corpului. Titruri crescute de virus au fost găsite în splină, măduva osoasă, limfonoduri, viscerele și structuri limfoide asociate peretelui intestinal. Ca rezultat al multiplicării în țesuturile limfoide și în limfocitele circulante și celulele mononucleare, titrul virusului în sânge poate fi foarte crescut. Virusul nu invadează organele parenchimotoase decât în faza târzie a viremiei. În general, titrul viral este mai mare în țesuturile limfoide decât în organele parenchimotoase. Răspândirea virusului în corpul animalului este completă în 5-6 zile. A fost demonstrat că virusul afectează sistemul imun. O caracteristică generală este leucopenia generalizată care este observată înainte de apariția febrei. Studiile de imunofluorescență au demonstrat că virusul PPC are o afinitate distinctă pentru țesutul limforeticular. În aceste organe, virusul produce depleții (dispariții) severe ale limfocitelor afectând atât celulele B cât și zonele timodependente (limfocite T). A fost observată atrofia timusului și a măduvei osoase, ca și depleția generalizată a limfocitelor, cu o deficiență accentuată a limfocitelor B.

La porcii proveniți din infecții experimentale cu virusul PPC, analiza imunohistochimică pentru detecția gp 55 a virusului PPC a demonstrat infecția celulelor hematopoetice cu virusul PPC începând cu ziua a II postinfecție. Procentul celulelor infectate la 4 zile postinfecție era de 10-15% și care a crescut la 65-85% la 10 zile postinfecție cu fluctuații de 35-50% la 6-8 zile postinfecție. Liniile celulare în care s-a demonstrat prezența virusului PPC la nivelul măduvei hematogene au fost: megacariocitul, linia mieloidă, linia limfoidă și celulele stromale în special macrofage.

Porcii care supraviețuiesc infecției produc anticorpi ce pot persista timp îndelungat. În general anticorpii neutralizanți apar după 14 zile însă și la 28 de zile. Anticorpii care apar sunt produși față de 2 glicoproteine: E₂ și Erns.

5) Semnele clinice ale PPC sunt extrem de variabile și acestea pot fi confundate cu multe alte boli. Severitatea simptomelor depinde în principal de vârsta animalului și virulența virusului. În general, animalele tinere sunt afectate mai grav decât cele adulte. La porcii adulți de reproducție evoluția infecției este adesea moderată sau subclinică. Tulpinile foarte virulente de virus PPC produc morbiditate și mortalitate la niveluri foarte ridicate, în timp ce infecțiile produse de tulpini slab virulente pot determina doar afecțiuni congenitale sau să treacă chiar neobservate.

6) PPC a fost clasificată în funcție de momentul infecției ca infecție pre și post natală iar pe baza evoluției clinice în forma supraacută, acută, subacută, cronică și forma târzie a PPC. Totuși, trebuie avut în vedere că în condiții de teren, într-o exploatare, evoluează simultan diverse forme iar semnele clinice per ansamblu pot crea confuzie. Pot fi identificate forme acute, cronice și prenatale de pestă porcină clasică.

2. Forma acută

1) Purceii înțărcați și cei la îngrășat, prezintă adesea forma acută de pestă porcină clasică; semnele de început sunt anorexia, letargie, febră, conjunctivită, tumefierea limfonodurilor, semne respiratorii și constipație urmată de diaree.

2) Hemoragiile tipice ale pielii sunt observate de obicei pe urechi, coadă, abdomen și pe partea internă a membrilor în timpul celei de-a doua și a treia săptămâni de la infecție și până la moarte; sunt frecvent observate semne neurologice, ca de exemplu mersul vacilant, incoordonarea mișcărilor și convulsii.

3) Febra este un semn constant; aceasta este în general mai mare de 40°C, dar la porcii adulți febra poate să nu depășească 39.5°C.

4) Virusul PPC provoacă leucopenie și imunosupresie severă, ceea ce conduce adesea la infecții secundare respiratorii și enterice; semnele acestor infecții secundare pot masca sau se pot suprapune peste semnele cele mai caracteristice ale pestei porcine clasice și pot induce în eroare fermierul sau medicul veterinar.

5) Moartea survine de obicei într-o lună de zile. Animalele care nu mor în primele 4 săptămâni ale infecției devin convalescente, dezvoltând anticorpi neutralizanți sau devin bolnave cronic rămânând persistent infectate cu virusul PPC. Vindecarea cu producere de anticorpi, apare, cel mai adesea, la animalele adulte de reproducție care nu prezintă semne clinice severe. Anticorpii împotriva pestei porcine clasice sunt detectabili după 2-3 săptămâni de la producerea infecției.

6) La examinarea post-mortem:

- modificările patologice vizibile sunt cel mai frecvent observate în limfonoduri și rinichi;
- limfonodurile devin tumefiate, edemațiate și hemoragice;
- hemoragiile în rinichi pot varia de la peteșii abia vizibile până la echimoze;
- hemoragiile similare pot fi de asemenea observate în vezica urinară, laringe, epiglotă și cord și uneori răspândite pe seroasele abdominale și toracale;
- este adesea întâlnită o encefalită non-purulentă.
- pot fi observate leziuni datorate infecțiilor secundare care pot induce în eroare medicul veterinar;
- infarctele splenice sunt considerate patognomonice dar nu sunt întâlnite frecvent.

7) În general forma acută a pestei porcine africane prezintă o imagine clinică și patologică foarte similară cu cea a pestei porcine clasice. Atunci când sunt prezente hemoragiile ale pielii și pe urechi, acestea sunt ușor de detectat și conduc la suspiciunea de PPA sau PPC. Alte câteva boli pot provoca leziuni similare.

8) PPC acută, trebuie să fie de asemenea luată în considerație în cazul în care se suspectează rujet, sindromul reproductiv respirator al porcilor, intoxicații cumarinice, purpura hemoragică, sindromul de slăbire multisistemic după întărcare, sindromul de dermatita porcină și nefroză, infecții cu Salmonella sau Pasteurella sau orice sindroame enterice sau respiratorii cu febră care nu răspund la tratamentul cu un antibiotic.

9) Virusul PPC este eliminat prin salivă, urină și fecale de la apariția semnelor clinice până la moartea animalului. Virusul PPC, poate fi de asemenea eliminat prin spermă.

3. Forma cronică

1) Forma cronică a bolii apare atunci când porcii nu pot dezvolta un răspuns imun împotriva virusului PPC. Inițial semnele unei infecții cronice sunt similare cu cele ale infecției acute. Mai târziu, sunt prezente semne nespecifice, cum ar fi febra intermitentă, enterita cronică și slăbirea. Lipsesc hemoragiile tipice de la nivelul pielii.

2) Acești porci pot prezenta semne clinice de boală timp de 2-3 luni înainte de moarte. Virusul PPC este constant eliminat de la apariția primelor semne de boală până la moartea animalului. Anticorpii pot fi detectați temporar în probele de ser sanguin.

Infecția cronică de PPC a fost definită ca o boală letală cu o durată de 30 zile sau mai mult. Pe baza semnelor clinice se disting 3 faze. În prima fază se întâlnesc: o stare generală proastă, anorexie, depresie, creșterea temperaturii și leucopenie. După câteva săptămâni, apetitul și starea generală se îmbunătățesc iar temperatura corporală scade la normal sau este ușor peste valorile normale. Leucopenia de obicei persistă. Această îmbunătățire generală a semnelor clinice este caracteristică pentru faza a II - a a formei cronice. La anumite animale, titruri mici de anticorpi pot fi detectate în această fază, ce apare la aproximativ o lună după infecție.

În a III-a fază porcii redevin anorexici și depresati, febra este intermitentă cu o temperatură corporală ce crește la 41⁰C. Întârzieri în creștere, slăbire și diareea sunt cele mai evidente semne clinice. Astfel de porci au leziuni cutanate și frecvent cu spatele arcuit. Porcii cu forme cronice pot supraviețui până la 100 de zile. Infecțiile bacteriene și parazitare secundare sunt frecvent implicate și astfel, tabloul clinic este adesea necaracteristic și induce în eroare. Peteșiile sunt rar întâlnite în formele cronice. În intestinul gros apar butoni ulceroși urmați de enterită diftero-necrotică difuză. La nivelul limfonodurilor se observă hiperplazii. Deși formele cronice sunt rare, joacă un rol important în răspândirea infecției deoarece aceste animale continuă să excrete virus.

3) Modificările patologice sunt mai puțin caracteristice, în special, nu pot fi observate hemoragii în organe și pe seroase. La animalele care prezintă diaree cronică, sunt prezente leziuni necrotice pe ileon, pe valvula ileocecală și rect.

4) Semnele clinice ale formei cronice sunt mult mai nespecifice și fiind necesar să fie luate în considerație multe alte boli pentru realizarea diagnosticului diferențial. Temperatura ridicată a corpului nu este neapărat prezentă la fiecare animal, dar în exploatațiile infectate poate fi detectată cel puțin la câțiva porci.

4. Forma prenatală și izbucnirea târzie a bolii

1) Virusul PPC poate trece prin placenta animalelor gestante și infectează feteșii, dar la scroafe boala este adesea subclinică.

2) Rezultatul infecției transplacentare a feteșilor depinde în mare parte de stadiul gestației și de virulența virusului. Infecția din timpul unei gestații timpurii, poate avea ca rezultat avorturi, fătare de feteși morți, mumificări și malformații. Toate acestea conduc la o reducere a indexului de fertilitate din exploatație.

Infecția transplacentară provoacă moarte embrionară sau fetală ce poate duce la avort, malformații teratogene (anomalie morfologică înăscută) ale feteșilor, mumificări, purcei născuți morți, moarte neonatală precum și naștere de purcei clinic sănătoși persistent infectați cu virusul PPC. La o scroafă pot să coexiste purcei născuți morți sau mumificați împreună cu purcei viremici sau chiar purcei neinfecțați. În general, infecția timpurie a scroafelor (în primele 41 de zile de gestație) obișnuit duce la avort și purcei născuți morți, în timp ce infecția târzie (40 – 90 zile) duce la apariția animalelor viremice. Dezvoltarea sistemului imun al feteșului permite acestuia să combată infecția după a 85-90 zi de gestație. Astfel că în infecția după a 85-90 zi de gestație de obicei sunt fătați purcei normali nonviremici. Totuși, pot fi induse animale viremice în infecții cu tulpini cu virulență scăzută când animalele sunt infectate în fazele târzii ale gestației sau chiar imediat după naștere. Acesta este probabil echivalentul formei cronice a infecției postnatale.

3) Infectarea scroafelor până într-a 90-a zi de gestație, poate duce la fătarea de purcei cu viremie persistentă care pot fi normali clinic la naștere și pot să supraviețuiască câteva luni. După naștere ei pot prezenta o creștere încetinită, slăbire sau ocazional tremur congenital. Această evoluție a infecției se numește „izbucnirea târzie a PPC”. Acești purcei pot juca un rol crucial în răspândirea bolii și în menținerea persistenței virusului în interiorul populației, întrucât ei elimină constant virus până la moarte. Numai purcei persistent viremici care fac infecția în uter dezvoltă forma târzie a bolii. Această formă a infecției nu este totdeauna evidentă clinic și patologic. Se caracterizează inițial printr-o perioadă relativ lungă în care purceii viremici nu prezintă semne clinice. Anticorpii maternali derivați din colostru pot fi uneori detectați pentru o perioadă scurtă de timp comparativ cu scroafele nonviremice. La câteva săptămâni de la naștere purceii prezintă anorexie, depresie, conjunctivită, dermatită, diaree și tulburări locomotorii care duc la pareze ale trenului posterior. Nu sunt întâlnite leziunile hemoragice peteșiale din forma

acută a bolii. Temperatura corporală este normală. Întârzierea în creștere este cel mai des întâlnită. Acești purcei viremici elimină virusul permanent până la moarte. Cea mai mare perioadă de supraviețuire a unui porc viremic a fost de 11 luni.

4) Detectarea PPC poate fi deosebit de dificilă în exploatațiile de reproducție a porcilor, deoarece evoluția infecției poate fi foarte ușoară și poate fi ușor confundată cu multe alte aspecte patologice. Reducerea fertilității și avorturile pot fi provocate atât de virusul PPC ca și de infecția cu parvovirus, sindromul respirator reproductiv al porcilor, leptospiroză și boala lui Aujeszky. Materialul avortat datorită infecției cu virusul PPC nu poate fi deosebit patologic de avorturile produse de agenții altor boli.

5) În cazul suspectării unei boli infecțioase a tractusului reproductiv, trebuie să fie efectuată imediat o anchetă pentru detectarea PPC în orice situație în care exploatația în cauză poate fi considerată în pericol (de exemplu datorită localizării exploatației într-o zonă unde pesta porcină clasică apare la porci sălbatici) și în orice caz cu atât mai repede cu cât au fost eliminate mai multe boli infecțioase comune ale tractusului respirator.

CAPITOLUL III: Ghid la principalele criterii care trebuie luate în considerare pentru recunoașterea unei exploatații ca fiind suspectă de pestă porcină clasică

Decizia de a recunoaște o exploatație ca fiind suspectă trebuie să fie luată pe baza următoarelor aspecte, criterii și motive:

1. Cele mai importante semne clinice și lezionale ce trebuie luate în considerare:

- a) febră cu morbiditate și mortalitate crescută;
- b) febră cu sindrom hemoragic;
- c) febră cu simptome neurologice;
- d) febră de origine necunoscută la care tratamentul cu antibiotice nu a îmbunătățit starea de sănătate;
- e) avorturi și creșterea problemelor de fertilitate în ultimele 3 luni;
- f) tremur congenital la purcei;
- g) animale cu boli cronice;
- h) animale tinere rămase în urmă cu creșterea;
- i) hemoragii peteșiale și echimotice, în special în limfonoduri, rinichi, splină, vezică urinară și laringe;
- j) infarcte sau hematoame, cu predilecție în splină;
- k) în cazuri cronice - butoni, ulcere în intestinul gros, în special în apropierea joncțiunii ileo-cecale.

2. Cele mai importante aspecte epidemiologice ce trebuie să fie luate în considerare:

- a) oricând porcii au avut contact direct sau indirect cu porcii unei exploatații dovedită a fi infectată cu virusul PPC;

- b) oricând o exploatație a furnizat porci care ulterior au prezentat semne de infecție cu virusul PPC;
- c) oricând scroafele au fost însămânțate cu spermă provenind dintr-o sursă suspectă;
- d) oricând a existat un contact direct sau indirect între porci sălbatici și porcii unei populații în care a apărut PPC;
- e) oricând porcii sunt ținuti liberi într-o regiune în care porcii sălbatici sunt infectați cu virusul PPC;
- f) oricând porcii au fost hrăniți cu resturi culinare și există suspiciunea că acestea nu au fost tratate astfel încât să fie, eventual, inactivat virusul PPC;
- g) oricând există o posibilă expunere, de exemplu datorită intrării unor persoane, transporturi, etc.

3. Cele mai importante aspecte legate de rezultatele testelor serologice care trebuie luate în considerare sunt:

- a) reacția serologică provocată de o infecție neobservată cu virusul PPC sau de vaccinare ⁽¹⁾;
- b) reacția încrucișată între anticorpii peștei porcine clasice și alte pestivirusuri ⁽²⁾;
- c) detectarea porcilor unici reactanți ⁽³⁾;

⁽¹⁾ Dacă porcii au fost vaccinați contra peștei porcine clasice cu un vaccin convențional aceștia pot fi găsiți a fi pozitivi datorită doar vaccinării sau datorită unei infecții subclinice a animalelor vaccinate.

⁽²⁾ În anumite circumstanțe, până la 10 % din porcii dintr-un lot pot avea anticorpi împotriva pestivirusurilor rumegătoarelor ce produc diareea virală bovină și boala de graniță, de exemplu, atunci când porcii au contact direct cu bovine sau ovine infectate cu virusul BDV sau cu virusul BD sau atunci când porcii au intrat în contact cu materiale contaminante cu pestivirusuri de la rumegătoare.

⁽³⁾ În toate testele serologice curente pentru pesta porcină clasică, o mică proporție din seruri dau rezultate fals pozitive, fie datorate lipsei de specificitate a sistemului de testare, sau datorită serurilor de la porcii unici reactanți.

CAPITOLUL IV: Proceduri de examinare și de prelevare a probelor

1. Linii directoare și proceduri pentru examinarea clinică și prelevarea de probe de la porcii din exploatațiile suspecte.

1) În exploatațiile suspecte trebuie să fie efectuate examinări clinice adecvate, prelevări de probe și să se efectueze investigații de laborator pentru a confirma sau exclude PPC, în concordanță cu regulile și procedurile stabilite la subpct. de la 2) la 7) prezentate mai jos.

Independent de adoptarea măsurilor prevăzute la articolul 4 alineatul (2) din Directiva 2001/89/CE transpus în legislația națională prin Hotărîrea Guvernului nr. 1368 din 19.12.2016, cap. III, pct. 8 în exploatația respectivă, aceste orientări și proceduri se

aplică, de asemenea, tuturor patologiilor pentru care diagnosticul diferențial ia în considerare eventualitatea PPC.

Aceasta va privi, de asemenea, și cazurile în care semnele clinice și tabloul epidemiologic al bolii observate la porci sugerează o probabilitate foarte mică de apariție a PPC.

În toate celelalte cazuri suspecte de contaminare cu virusul PPC la unul sau mai mulți porci, măsurile menționate la articolul 4 alineatul (2) din Directiva 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin Hotărârea Guvernului nr. 1368 din 19.12.2016, cap. III, pct. 8 vor fi adoptate în exploatarea suspectă respectivă.

În caz că există suspiciunea de PPC la porci în abator sau în mijloace de transport, orientările și procedurile definite la subpct. 2) - 7) menționate în continuare se aplică *mutatis mutandis*.

În cazul suspectării PPC la porci într-un abator sau un mijloc de transport, liniile directoare și procedurile stabilite în subpct. 2)- 7), trebuie să se aplice ținând cont de situația particulară (*mutatis mutandis*.)

2) Atunci când un medic veterinar oficial vizitează o exploatare suspectă pentru a confirma sau infirma prezența PPC va efectua:

- a) un control al producției și a înregistrărilor de sănătate, dacă aceste înregistrări sunt disponibile;
- b) o inspecție în fiecare subunitate, pentru a selecta porcii care urmează să fie examinați clinic.

Examinarea clinică trebuie să includă înregistrarea temperaturii corporale și trebuie, în principal, să vizeze următorii porci sau grupe de porci:

- a) porcii bolnavi sau anorexici;
- b) porcii recent refăcuți după boală;
- c) porcii introduși recent din focare confirmate sau alte surse suspecte;
- d) porcii ținuti în subunități recent vizitate de vizitatori externi care au avut un recent contact strâns cu porci suspecti sau infectați cu virusul PPC sau pentru care au fost identificate alte contacte de risc cu o potențială sursă de virus al PPC;
- e) porcii de la care deja s-au prelevat probe și au fost testați serologic pentru PPC, în cazul în care rezultatele acestor teste nu au permis excluderea prezenței PPC și porcii în contact cu aceștia.

3) Atunci când se face referire la acest capitol, examinarea clinică în exploatarea vizată trebuie să fie efectuată la porci selectați randomizat (întâmplător) din subunitățile pentru care a fost identificat sau suspectat un risc de introducere al virusului pestei porcine clasice.

Numărul minim de porci ce urmează să fie examinați trebuie să permită detectarea febrei în aceste subunități, dacă aceasta apare la o prevalență de 10% cu 95% certitudine, cu următoarele particularități:

- a) în cazul scroafelor de reproducție, numărul minim de scroafe ce urmează să fie examinate, pentru detectarea febrei dacă aceasta apare, trebuie să permită o prevalență de 5% cu 95% certitudine (¹);
- b) în cazul centrelor de colectare a spermei toți vierii trebuie să fie examinați;

4) Dacă într-o exploatare suspectă, sunt detectați porci morți sau în agonie, examinările post-mortem trebuie să fie efectuate, de preferat, la cel puțin cinci porci și în special la porcii care înainte de moarte au prezentat sau prezintă semne foarte evidente de boală, cei cu febră mare sau cei morți recent.

Dacă la aceste examinări nu s-au evidențiat leziuni care să indice PPC dar, datorită situației epidemiologice, sunt considerate necesare investigații ulterioare:

- a) examinare clinică, așa cum este menționat în subalin. 3 și prelevare de probe de sânge, așa cum este stabilit la subalin. 5, în subunitățile în care au fost ținuți porcii morți sau în agonie; și
- b) trebuie să fie efectuate examinări post mortem la 3-4 porci de contact.

Când se efectuează examinarea post-mortem, medicul veterinar trebuie să se asigure că:

- a) sunt luate măsurile de precauție și de igienă necesare pentru a se preveni răspândirea bolii;
- b) în cazul porcilor în agonie, aceștia sunt uciși în concordanță cu normele de bunăstare și protecție a animalelor în vigoare.

5) Dacă sunt depistate semne clinice sau leziuni ulterioare care pot sugera prezența PPC într-o exploatare suspectă, dar autoritatea veterinară competentă consideră că aceste constatări nu sunt suficiente pentru a confirma un focar de PPC și de aceea sunt necesare teste de laborator, trebuie să fie prelevate probe de sânge pentru testele de laborator de la porcii suspecti și de la alți porci în fiecare subunitate în care sunt ținuți porcii suspecti, și probe de organe în concordanță cu procedura menționată anterior.

Numărul minim de probe ce trebuie prelevate pentru testări serologice, trebuie să permită detectarea seroprevalenței de 10% cu 95% certitudine, în subunitatea vizată, cu următoarele particularități:

- a) în cazul scroafelor de reproducție, numărul minim de scroafe de la care trebuie să se preleveze probe, trebuie să permită detectarea unei prevalențe de 5% cu 95% certitudine (¹);
- b) în cazul unui centru de colectare a spermei, trebuie prelevate probe de la toți vierii;

(¹)În anumite cazuri, de exemplu, atunci când este suspectată pesta porcină clasică într-o exploatație cu număr limitat de porci tineri, proporția scroafelor infectate poate fi foarte mică. În aceste cazuri trebuie să se preleveze probe de la un număr mai mare de scroafe.

Numărul probelor ce urmează a fi prelevate pentru testele virusologice va fi în concordanță cu instrucțiunile autorității veterinare competente care va ține cont de varietatea testelor ce pot fi efectuate, de sensibilitatea testelor de laborator ce vor fi folosite și de situația epidemiologică;

În cazul efectivelor de animale vaccinate cu vaccin viu conform unui plan de vaccinare aprobat, suplimentar față de probele de ser (care vor stabili dacă porcii au fost vaccinați sau nu) vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția aceleiași prevalențe.

În cazul exploatațiilor vaccinate cu vaccin marker testele serologice vor urmări detecția anticorpilor față de proteina Erns pe probe provenite de la animale vaccinate numai cu vaccin marker. Numărul de probe trebuie să permită detecția unei prevalențe de 10% cu confidență de 95%. În cazul scroafelor de reproducție, numărul minim de scroafe de la care trebuie să se preleveze probe, trebuie să permită detectarea unei prevalențe de 5% cu 95% confidență.

În cazul unui centru de colectare a spermei, trebuie prelevate probe de la toți vierii. Numărul probelor ce urmează a fi prelevate pentru testele virusologice va fi în funcție de efectivul de animale. Pentru examenele virusologice trebuie să fie colectate probe de organe sau țesuturi de la porcii care au fost examinați post-mortem. Numărul de animale cu leziuni de pestă porcină clasică de la care se prelevează organe trebuie să fie minim 5 pentru fiecare subunitate epidemiologică, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale. Suplimentar, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale, se prelevează probe de sânge pe anticoagulant de la animalele care prezintă febră pentru a detecta o prevalență de 10% cu o confidență de 95%.

6) Dacă suspectarea PPC în exploatația vizată este corelată cu rezultatele testelor serologice anterioare, în plus față de probele de sânge, ce urmează a fi prelevate de la porcii la care se face referire în cap. IV, pct.1, subpct.2), lit. e) al prezentului Manual, trebuie să se aplice următoarele proceduri:

- a) dacă animalele seropozitive sunt scroafe gestante, câteva dintre ele, de preferință nu mai puțin de trei, vor fi eutanasiate și supuse unei examinări post-mortem.

Înainte de eutanasiere, trebuie prelevate probe de sânge pentru testele serologice ulterioare. Fetusii trebuie să fie supuși examinării pentru detectarea virusului pestei porcine clasice, a antigenului sau genomului acestui virus, în concordanță cu capitolul VI, pentru a detecta infecția intrauterină;

- b) dacă animalele seropozitive sunt scroafe cu purcei sugari, trebuie prelevate probe de sânge de la toți purceii și aceștia trebuie să fie supuși examinării pentru virusul pestei porcine clasice, a antigenului sau a genomului viral, așa cum se face referire în capitolul VI al prezentului Manual. De asemenea, trebuie să fie prelevate probe de sânge și de la scroafe pentru teste serologice ulterioare.

7) Dacă după examinarea efectuată într-o exploatație suspectă, nu au fost detectate semne clinice sau leziuni care indică PPC, dar autoritatea veterinară competentă consideră necesară solicitarea unor teste de laborator ulterioare, pentru a infirma prezența PPC în scop de orientare, trebuie să fie utilizate procedurile de prelevare de probe menționate la capitolul IV, pct.1, subpct.5) al prezentului Manual.

2. Proceduri de prelevare a probelor într-o exploatație atunci când porcii sunt uciși în urma confirmării bolii

1) Pentru a se stabili maniera introducerii virusului PPC într-o exploatație infectată și perioada de timp scursă de la introducerea acesteia, atunci când porcii sunt uciși în exploatație ca urmare a confirmării unui focar de pestă porcină clasică, în concordanță cu cap. IV, pct. 10. al Normei sanitar – veterinară privind stabilirea măsurilor de control al pestei porcine clasice, aprobată prin HG nr. 1368 din 19 decembrie 2016, de la acești porci, când aceștia sunt uciși, trebuie să fie prelevate probe de sânge în mod randomizat, în vederea efectuării testelor de laborator.

2) Numărul minim de porci de la care urmează a fi prelevate probe de sânge, trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 10% cu o certitudine de 95% la porcii din fiecare subunitate a exploatației. ⁽¹⁾

De asemenea, pot fi recoltate probe pentru testele virusologice, în concordanță cu instrucțiunile autorității veterinare competente, care va ține cont de varietatea testelor ce pot fi utilizate, sensibilitatea testelor de laborator utilizate și situația epidemiologică.

În cazul efectivelor de animale vaccinate cu vaccin viu, suplimentar față de probele de ser (care vor stabili dacă porcii au fost vaccinați sau nu) vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția aceleiași prevalențe.

În cazul exploatațiilor vaccinate cu vaccin marker testele serologice vor urmări detecția anticorpilor față de proteina Erns pe probe provenite de la animale vaccinate numai cu vaccin marker. Numărul de probe trebuie să permită detecția unei prevalențe de 10% cu

confidență de 95%. În cazul scroafelor de reproducție, numărul minim de scroafe de la care trebuie să se preleveze probe, trebuie să permită detectarea unei prevalențe de 5% cu 95% certitudine;

În cazul unui centru de colectare a spermei, trebuie prelevate probe de la toți vierii.

Numărul probelor ce urmează a fi prelevate pentru testele virusologice va fi în funcție de efectivul de animale. Pentru examenele virusologice trebuie să fie colectate probe de organe sau țesuturi de la porcii care au fost examinați post-mortem. Nr. de animale cu leziuni de pestă porcină clasică de la care se prelevează organe trebuie să fie minim 5 pentru fiecare subunitate epidemiologică, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale. Suplimentar, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale se prelevează probe de sânge pe anticoagulant de la animalele care prezintă febră pentru a detecta o prevalență de 10% cu o confidență de 95%.

3) În cazul focarelor secundare, autoritatea veterinară competentă poate decide să facă o derogare de la subpct.1) și 2) al prezentului pct. și să stabilească proceduri de prelevare de probe ad-hoc, ținând cont de informațiile epidemiologice disponibile deja de la sursă, mijloacele de introducere a virusului în exploatație și potențiala răspândire a bolii în exploatație.

3. Proceduri de prelevare de probe atunci când într-o exploatație suspectă porcii sunt uciși ca măsură de prevenție

1) Pentru a se putea confirma sau infirma prezența PPC și a se obține informații epidemiologice suplimentare, atunci când porcii sunt uciși într-o exploatație, ca măsură de prevenție, în concordanță cu prevederile cap. III, pct. 6 al HG nr. 1368 din 19 decembrie 2016, anexa nr.1 Norma sanitar - veterinară privind stabilirea măsurilor de control al pestei porcine clasice, probele de sânge pentru testele serologice precum și probele de sânge sau de tonsile, organe și stern pentru testele virusologice, trebuie să fie prelevate în concordanță cu procedura stabilită la subpct. 2) al acestui punct.

2) Prelevarea de probe trebuie să vizeze cu prioritate:

- a) porcii prezentând semne clinice sau leziuni post-mortem care indică prezența pestei porcine clasice și porcii în contact;
- b) alți porci care ar fi putut avea contacte de risc cu porci infectați sau suspecti sau cu porci suspecti de a fi fost contaminați cu virusul pestei porcine clasice;

3) Prelevarea de probe de la acești porci trebuie să fie efectuată în concordanță cu instrucțiunile autorității veterinare competente, care va ține cont de situația epidemiologică. În acest caz, procedurile de prelevare a probelor stabilite la subpct. 2), 3) și 4), trebuie să fie folosite în scopuri de orientare.

4) De la porcii care provin din fiecare subunitate a exploatației trebuie prelevate probe în mod randomizat ⁽¹⁾. În acest caz, numărul minim de probe ce vor fi prelevate pentru testele serologice, trebuie să permită în unitățile în cauză detectarea unei prevalențe de 10% cu 95% certitudine, cu următoarele particularități:

- a) în cazul scroafelor de reproducție, numărul minim de scroafe de la care vor fi prelevate probe, trebuie să permită detectarea unor seroprevalențe de 5% cu 95% certitudine ⁽²⁾;
- b) în cazul unui centru de recoltare a materialului seminal, trebuie recoltate probe de sânge de la toți vierii;
- c) în cazul efectivelor de animale vaccinate cu vaccin viu în urma unui plan de vaccinare aprobat, suplimentar față de probele de ser (care vor stabili dacă porcii au fost vaccinați sau nu) vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția aceleiași prevalențe;
- d) în cazul exploatațiilor vaccinate cu vaccin marker testele serologice vor urmări detecția anticorpilor față de proteina Erns pe probe provenite de la animale vaccinate numai cu vaccin marker. Numărul de probe trebuie să permită detecția unei prevalențe de 10% cu confidență de 95% cu particularitățile menționate mai sus.

5) Tipul probelor care urmează a fi prelevate pentru testele virusologice și tipul testului care va fi folosit trebuie să fie în concordanță cu instrucțiunile autorității veterinare competente care va ține cont de varietatea testelor care pot fi utilizate, de sensibilitatea testelor și de situația epidemiologică.

Numărul probelor ce urmează a fi prelevate pentru testele virusologice va fi în funcție de efectivul de animale. Pentru examenele virusologice trebuie să fie colectate probe de organe sau țesuturi de la porcii care au prezentat semne clinice de pestaă porcină și febră. Numărul de animale cu leziuni de pestaă porcină clasică de la care se prelevează organe trebuie să fie minim 5 pentru fiecare subunitate epidemiologică, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale. Suplimentar, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale se prelevează probe de sânge pe anticoagulant de la animalele care prezintă febră pentru a detecta o prevalență de 10% cu o confidență de 95%.

⁽¹⁾Totuși, dacă autoritatea veterinară competentă a limitat aplicarea uciderii preventive, la numai o parte a exploatației unde sunt ținuți porci suspecti de a fi infectați sau contaminați cu virusul pestei porcine clasice, în concordanță cu art. 4, alin. (3) al Directivei 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap. III, pct.9, prelevarea de probe trebuie să intereseze subunitățile exploatației unde s-a aplicat măsura, fără a se prejudicia examinările și prelevările de probe ulterioare ce urmează a fi efectuate la porcii rămași în exploatație și care se vor efectua în concordanță cu instrucțiunile autorității veterinare competente.

⁽²⁾În anumite cazuri, de exemplu când PPC este suspectată într-o exploatație cu un număr limitat de porci tineri, proporția de scroafe infectate poate fi foarte mică. În aceste cazuri, trebuie prelevate probe de la un număr mai mare de scroafe.

4. Proceduri de control și de prelevare a probelor înainte de acordarea autorizației de a muta porcii din exploatațiile situate în zone de protecție sau de supraveghere și în cazul în care acești porci sunt tăiați sau uciși.

1) Fără a se prejudicia prevederile cap. X, pct. 26, subpct. 6) al HG nr. 1368 din 19 decembrie 2016, anexa nr.1 „Norma sanitar - veterinară privind stabilirea măsurilor de control al PPC”, pentru acordarea autorizației de mutare a porcilor din exploatațiile situate în zonele de protecție sau de supraveghere, în concordanță cu art. 10, alin. (3) al Directivei 2001/89/CE menționat, examinarea clinică efectuată de medicul veterinar oficial, trebuie:

- a) să fie efectuată într-o perioadă de 24 de ore înainte de mutarea porcilor;
- b) să fie în concordanță cu prevederile stabilite în cap.IV, pct. 1, subpct. 3) și 4) al prezentului Manual;

2) În cazul porcilor care vor fi mutați într-o altă exploatație, în plus față de investigațiile efectuate în concordanță cu subpct. 1) al prezentului pct., trebuie să fie efectuată o examinarea clinică a porcilor în fiecare subunitate a exploatației în care sunt ținuti porcii ce urmează să fie mutați. În cazul porcilor mai mari de trei până la patru luni, această examinare trebuie să includă și înregistrarea temperaturii corporale la un anumit număr din porci.

În aceste subunități numărul minim de porci ce urmează să fie controlați trebuie să permită detectarea febrei, dacă aceasta apare la o prevalență de 10% cu 95% certitudine, cu următoarele particularități:

- a) în cazul scroafelor de reproducție din subunitățile în care sunt ținute scroafe care urmează a fi mutate, numărul minim de scroafe ce urmează să fie examinate trebuie să permită detectarea febrei, dacă aceasta apare, la o prevalență de 5% cu 95% certitudine.
- b) în cazul vierilor, toți vierii ce urmează să fie mutați, trebuie examinați.

3) În cazul porcilor care urmează să fie mutați la un abator, la o întreprindere de prelucrare sau în alte spații pentru a fi apoi uciși sau tăiați, în plus față de investigațiile care urmează a fi efectuate în concordanță cu subpct. 1) al prezentului pct., trebuie să fie efectuată o examinare clinică a porcilor din fiecare subunitate în care sunt ținuti porcii ce vor fi mutați. În cazul porcilor mai mari de trei sau patru luni, această examinare trebuie să includă înregistrarea temperaturii corporale la o anumită proporție din porcii existenți.

Numărul minim de porci ce urmează să fie controlați în subunitățile în cauză, trebuie să permită detectarea febrei dacă aceasta apare, cu o prevalență de 20% cu 95% certitudine.

În cazul scroafelor de reproducție, numărul minim de porci ce urmează a fi examinați, trebuie să permită detectarea febrei dacă aceasta apare în subunitățile în care sunt ținuți porcii ce urmează a fi mutați, cu o prevalență de 5% cu 95% certitudine.

4) Atunci când porcii la care se face referire la alin. 4), 5) și 6) al prezentului subpct. sunt tăiați sau uciși, trebuie să fie prelevate probe de sânge pentru teste serologice sau probe de sânge sau de tonsile, organe și stern pentru testele virusologice, de la porcii proveniți din fiecare din subunitățile din care au fost mutați porci.

Numărul minim de probe ce urmează a fi prelevate, trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe sau virus prevalente de 10% cu o certitudine de 95%, în fiecare subunitate.

În cazul scroafelor de reproducție sau a vierilor, în subunitățile în care acești porci au fost ținuți, numărul minim de porci de la care urmează să se preleveze probe, trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe sau virus prevalente 5% cu o certitudine de 95%.

Tipul probelor ce urmează să fie prelevate și testul ce urmează să fie utilizat vor fi în concordanță cu instrucțiunile autorității veterinare competente care va ține cont de varietatea testelor care pot fi efectuate, sensibilitatea testelor și situația epidemiologică.

În cazul efectivelor de animale vaccinate cu vaccin viu în baza unui program de vaccinare aprobat, suplimentar față de probele de ser (care vor stabili dacă porcii au fost vaccinați sau nu) vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția aceleiași prevalențe.

În cazul exploatațiilor vaccinate cu vaccin marker testele serologice vor urmări detecția anticorpilor față de proteina Erns pe probe provenite de la animale vaccinate numai cu vaccin marker. Numărul de probe trebuie să permită detecția unei prevalențe de 10% cu confidență de 95% .

Numărul probelor ce urmează a fi prelevate pentru testele virusologice va fi în funcție de efectivul de animale. Pentru examenele virusologice trebuie să fie colectate probe de organe sau țesuturi de la porcii care au fost examinați post-mortem. Nr. de animale cu leziuni de pestă porcină clasică de la care se prelevează organe trebuie să fie minim 5 pentru fiecare subunitate epidemiologică, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale. Suplimentar, în cazul exploatațiilor cu un număr mare de animale se prelevează probe de sânge pe anticoagulant de la animalele care prezintă febră pentru a detecta o prevalență de 10% cu o confidență de 95%.

5) Totuși, dacă sunt depistate semne clinice sau leziuni post-mortem care indică PPC, atunci când porcii sunt uciși sau omorâți, prin derogare de la alin. 4) al prezentului

subpct., trebuie să se aplice prevederile cu privire la prelevarea de probe stabilite la cap. IV, pct. 3.

5. Proceduri de control și de prelevare a probelor într-o exploatație în relație cu repopularea

1) Atunci când sunt reintroduși porci într-o exploatație, în concordanță cu art. 13, alin. (2), lit. (b) sau art. 19, alin.8, lit. b al Directivei 2001/89/CE transpus în legislația națională prin HG nr. 1368 din 19 decembrie 2016, anexa nr.1 „Norma sanitar - veterinară privind stabilirea măsurilor de control al pestei porcine clasice”, trebuie să se aplice următoarele proceduri de prelevare a probelor:

- a) în cazul în care sunt reintroduși porci santinelă, trebuie prelevate în mod randomizat probe de sânge pentru teste serologice din fiecare subunitate a exploatației, de la un număr de porci ce permite detectarea unei prevalențe de 10% cu o certitudine de 95%;
- b) în cazul repopulării totale, probele de sânge pentru teste serologice trebuie prelevate în mod randomizat din fiecare subunitate a exploatației, de la un număr de porci care să permită detectarea unei seroprevalențe de 20% cu o certitudine de 95%.

În cazul scroafelor sau vierilor de reproducție, numărul probelor ce urmează să fie prelevate trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 10% cu o certitudine de 95%.

2) După reintroducerea porcilor, autoritatea veterinară competentă trebuie să se asigure că, în cazul oricărui caz de boală sau moarte la porcii din exploatație, cu cauze necunoscute, porcii vizați sunt imediat testați pentru PPC. Aceste prevederi trebuie să se aplice până când, în exploatația în cauză, sunt ridicate restricțiile la care se face referire la cap. XI, pct. 33, subpct. 1) al HG nr. 1368/2016.

3) În cazul exploatațiilor vaccinate în conformitate cu programele de vaccinare aprobate, procedurile de control și prelevare a probelor sunt următoarele:

a) În cazul exploatațiilor în care testarea spațiilor pentru prezența virusului pestei porcine clasice cu porci santinelă mai mari de 120 de zile nu este posibilă, efectivul repopulat trebuie strict supravegheat pentru o perioadă de cel puțin 21 de zile prin:

- examinare clinică randomizată, săptămânal, care să asigure o detecție a bolii la o prevalență de 5% la scroafe și 10% la alte categorii de porci și o confidență de 95%;

- examinarea lezională a tuturor porcinelor moarte sau bolnave cu prelevare de probe pentru examene virusologice;

- la două săptămâni după repopulare, prelevarea randomizată de probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă, pentru efectuarea examinării virusologice, de la un număr suficient de mare de porci, pentru a se putea detecta o prevalență a bolii de 10%, cu o confidență de 95%, pentru fiecare subunitate epidemiologică; subunitatea

epidemiologică este definită ca grup de adăposturi, adăpost sau compartiment al unui adăpost din exploatație.

b) în cazul în care se efectuează repopularea totală cu tineret porcine sau porcine la îngrășat, se prelevează randomizat probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă pentru efectuarea examinării virusologice, ce trebuie să asigure detecția unei prevalențe a pestei porcine clasice de 10%, cu confidență de 95%.

c) în cazul repopulării cu scroafe sau vieri, numărul de probe prelevate trebuie să asigure detecția unei prevalențe a pestei porcine clasice de 5%, cu o confidență de 95%.

d) în cazul exploatațiilor vaccinate cu vaccin marker se vor face și teste serologice care vor urmări detecția anticorpilor față de proteina Erns pe probe provenite de la animale vaccinate numai cu vaccin marker. Numărul de probe trebuie să permită detecția unei prevalențe de 10% cu confidență de 95%.

6. Proceduri de prelevare a probelor în exploatațiile din zona de protecție, înainte de ridicarea restricțiilor

1) Într-o zonă de protecție, pentru a putea fi ridicate măsurile la care se face referire la art. 10 al Directivei 2001/89/CE transpusă în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap. IX, în toate exploatațiile din acea zonă:

- a) trebuie să fie efectuată o examinare în concordanță cu procedurile stabilite la pct.1, subpct. 2) și 3) din prezentul capitol;
- b) trebuie să fie prelevate probe de sânge pentru testele serologice, așa cum este menționat în subpct.2) menționat în continuare.

2) În fiecare subunitate din exploatație, numărul minim de probe de sânge ce urmează a fi prelevate trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 10% cu o certitudine de 95% la porci, cu următoarele particularități:

- a) în cazul scroafelor pentru reproducție, numărul minim al probelor ce urmează să fie prelevate trebuie să asigure detectarea unei seroprevalențe de 5% cu o certitudine de 95%.
- b) în cazul unui centru de colectare a spermei, trebuie prelevate probe de sânge de la toți vierii.

3) În cazul efectivelor de animale vaccinate cu vaccin viu în conformitate cu planurile de vaccinare aprobate, suplimentar față de probele de ser (care vor stabili dacă porcii au fost vaccinați sau nu) vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția unei prevalențe menționate la subpct. 2) din prezentul pct.

4) Procedurile de prelevare a probelor în exploatații în care s-a efectuat vaccinarea în concordanță cu planurile de vaccinare sunt următoarele:

- a) examen clinic al tuturor porcinelor existente, în primele 7 zile după instituirea zonelor de restricție și inventarierea tuturor exploatațiilor de porcine, cu prelevare de probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă, de la porcine ce prezintă febră, precum și examen necropsic, cu prelevare de probe pentru teste virusologice, de la toate porcinele moarte recent.
- b) monitorizare a porcinelor din zona de protecție - pe toată perioada restricțiilor sanitare veterinare, cu prelevarea de probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă, de la porcinele bolnave și/sau febrile și probe de stern și organe pentru examene virusologice de la porcinele moarte;
- c) examene clinice, efectuate înainte de ridicarea măsurilor de carantină, pentru depistarea eventualelor porcine febrile, cu prelevare de la acestea a unor probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă, pentru examene de detecție de genom viral, după cum urmează:
 - pentru depistarea porcinelor febrile se examinează un număr de exemplare care să asigure depistarea infecției la o prevalență a bolii de 10%, cu o confidență de 95%;
 - pentru detecția scroafelor febrile, numărul de scroafe examinate trebuie să asigure depistarea eventualelor scroafe infectate, cu o prevalență de 5%, cu o confidență de 95%;
 - în centrele de colectare a materialului seminal de porcine se examinează toți vierii.
- d) În cazul exploatațiilor vaccinate cu vaccin marker testele serologice vor urmări detecția anticorpilor față de proteina Erns pe probe provenite de la animale vaccinate numai cu vaccin marker. Numărul de probe trebuie să permită detecția unei prevalențe menționate la lit. c,) aliniatul 2 din prezentul subpct. Suplimentar față de probele de ser vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția unei prevalențe menționate la lit. c,) aliniatul 2 din prezentul subpct.

7. Proceduri de prelevare a probelor în exploatații din zona de supraveghere, înainte de ridicarea restricțiilor

1) Într-o zonă de supraveghere, pentru a putea fi ridicate restricțiile la care se face referire la art. 11 al Directivei 2001/89/CE, transpusă în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap. X, trebuie să fie efectuată o examinare clinică în toate exploatațiile din zonă, în concordanță cu procedurile menționate la pct.1, subpct. 2) și 3) din prezentul capitol.

Se prelevează probe de sânge pentru teste serologice de la porci:

- a) din toate exploatațiile în care nu sunt ținuți porci între 2 și 8 luni;
- b) ori de câte ori autoritatea veterinară competentă consideră că pesta porcină clasică ar putea fi răspândită neobservat printre scroafele de reproducție;

- c) din orice altă exploatație în care prelevarea de probe este considerată necesară de către autoritatea veterinară competentă;
- d) în toate centrele de colectare a spermei.

2) Când se efectuează prelevări de probe de sânge pentru teste serologice în exploatațiile situate în zona de supraveghere, numărul probelor de sânge ce urmează a fi prelevate în aceste exploatații trebuie să fie în concordanță cu pct. 6, subpct. 2) din prezentul capitol. Totuși, dacă autoritatea veterinară competentă consideră că pesta porcină clasică ar putea fi răspândită neobservat printre scroafele de reproducție, prelevarea de probe poate fi efectuată numai în subunitățile în care sunt ținute aceste animale.

3) În cazul efectivelor de animale vaccinate cu vaccin viu în conformitate cu planurile de vaccinare aprobate, suplimentar față de probele de ser (care vor stabili dacă porcii au fost vaccinați sau nu) vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția unei prevalențe de 10% în cazul porcilor la îngrășat și de 5% în cazul scroafelor.

4) Procedurile de prelevare a probelor în exploatații în care s-a efectuat vaccinarea în concordanță cu planurile de vaccinare sunt următoarele:

- a) examen clinic al tuturor porcinelor existente, la 20 de zile după efectuarea acțiunilor de dezinfecție și inventarierea tuturor exploatațiilor de porcine, cu prelevare de probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă, de la porcine ce prezintă febră, precum și examen necropsic, cu prelevare de probe pentru teste virusologice, de la toate porcinele moarte recent;
- b) monitorizare a porcinelor din zona de supraveghere - pe toată perioada restricțiilor sanitare veterinare, cu prelevarea de probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă, de la porcinele bolnave și/sau febrile și probe de stern și organe pentru examene virusologice de la porcinele moarte;
- c) examene clinice, efectuate înainte de ridicarea măsurilor de carantină, pentru depistarea eventualelor porcine febrile, cu prelevare de la acestea a unor probe de sânge în tuburi cu substanță anticoagulantă, pentru examene de detecție de genom viral, după cum urmează:
 - pentru depistarea porcinelor febrile se examinează un număr de exemplare care să asigure depistarea infecției la o prevalență a bolii de 10%, cu o confidență de 95%;
 - pentru detecția scroafelor febrile, numărul de scroafe examinate trebuie să asigure depistarea eventualelor scroafe infectate, cu o prevalență de 5%, cu o confidență de 95%;
 - în centrele de colectare a materialului seminal de porcine se examinează toți vierii;
- d) în cazul exploatațiilor vaccinate cu vaccin marker testele serologice vor urmări detecția anticorpilor față de proteina Erns pe probe provenite de la animale

vaccinate numai cu vaccin marker. Numărul de probe trebuie să permită detecția unei prevalențe de 10 % în cazul porcilor la îngrășat și de 5% în cazul scroafelor.

Suplimentar față de probele de ser vor fi prelevate și probe de sânge pe anticoagulant pentru teste virusologice pentru a permite detecția unei prevalențe de 10 % în cazul porcilor la îngrășat și de 5% în cazul scroafelor.

8. Monitorizarea serologică și procedurile de prelevare a probelor în zonele în care PPC este suspectată să apară sau a fost confirmată la porci sălbatici.

1) În cazul monitorizării serologice la porcii sălbatici din zonele în care PPC a fost confirmată sau este suspectată existența acesteia, mărimea și zona geografică a populației țintă de la care urmează să fie prelevate probe, trebuie să fie definite anticipat, pentru a se stabili numărul probelor ce urmează a fi prelevate. Numărul de probe trebuie să fie stabilit în funcție de numărul estimat de animale vii și nu în funcție de numărul animalelor împușcate.

2) Dacă nu sunt disponibile date cu privire la densitatea și dimensiunea populației, zona geografică care face obiectul prelevării de probe, trebuie să fie identificată ținând cont de prezența continuă a porcilor sălbatici și de existența barierelor naturale sau artificiale eficiente pentru a preveni deplasarea masivă și continuă a animalelor.

3) Fără a se prejudicia prevederile art. 15, alin. (2) al Directivei 2001/89/CE transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap.XIII, pct. 38, în cadrul zonei de prelevare a probelor definite, numărul minim de porci de la care se vor preleva probe, trebuie să permită detectarea unei seroprevalențe de 5% cu o certitudine de 95%.

4) Se recomandă ca:

- a) în zonele în care vânătoarea este mai mare și este realizată cu regularitate, sau se aplică vânătoarea selectivă ca o măsură de control, aproximativ 50% din animalele aparținând clasei de vârstă între 3 luni și 1 an, 35% aparținând clasei de vârstă între 1 și 2 ani și 15% aparținând clasei de vârstă mai mare de 2 ani să fie supuse prelevării de probe;
- b) în zonele în care vânătoarea este rară sau absentă, cel puțin 32 de animale trebuie să fie supuse prelevării de probe, pentru fiecare din aceste clase de vârstă;
- c) prelevare de probe se efectuează într-o perioadă scurtă de timp, de preferat nu mai mare de 1 lună;
- d) vârsta animalelor utilizate pentru prelevare de probe este stabilită în funcție de erupția dinților.

5) Prelevarea probelor pentru testele virusologice de la porcii sălbatici împușcați sau găsiți morți, trebuie să fie efectuată așa cum este menționat la Capitolul V, pct.2, subpct.1).

6) Atunci când este considerată necesară monitorizarea virusologică a porcilor sălbatici împușcați, aceasta trebuie să fie efectuată în primul rând la animalele în vârstă de 3 luni până la 1 an.

7) Toate probele ce urmează să fie trimise la laborator trebuie să fie însoțite de chestionarul la care se face referire la art. 16, alin. (3), lit. 1) al Directivei 2001/89/CE transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap. XIV, pct.42, subpct. 12.

CAPITOLUL V: Proceduri și criterii generale pentru colectarea și transportul probelor

1. Proceduri și criterii generale

1) Înainte de efectuarea prelevării de probe dintr-o exploatație, trebuie să fie realizată o hartă a exploatației și trebuie să fie identificate subunitățile epidemiologice ale acesteia.

2) De fiecare dată când se consideră că ar putea fi necesară o reprelevare de probe, toți porcii de la care se prelevează probe, trebuie să fie unic marcați în așa fel încât să fie ușor de efectuat reprelevarea.

3) Fără a aduce atingere dispozițiilor capitolul IV pct.1, subpct. 6), lit. b), din prezentul Manual, nu se prelevează probe pentru testare serologică de la porci mai mici de 8 săptămâni.

4) Toate probele trebuie trimise la laborator, însoțite de documente corespunzătoare, în concordanță cu cerințele stabilite de autoritatea veterinară competentă. Aceste documente vor include detalii despre anamneză porcilor de la care s-au prelevat probe și semnele clinice sau leziunile post-mortem identificate.

5) În cazul porcilor ținuți în exploatații, trebuie să fie disponibile informații clare cu privire la vârstă, categorie și exploatația de origine a porcilor de la care s-au prelevat probe. Este recomandată ca localizarea fiecărui porc de la care s-au prelevat probe în exploatație, să fie înregistrată împreună cu marca sa unică de identificare.

2. Colectarea probelor pentru teste virusologice

1) Pentru detectarea virusului, antigenului sau genomului virusului PPC de la porcii morți sau eutanasiați, cele mai potrivite probe sunt țesuturile din tonsile, splină și rinichi. În

plus, este recomandat să se preleveze două probe din alte țesuturi limfatice, cum ar fi limfonodulul retrofaringian, parotidian, mandibular sau mezenteric, precum și stern și o probă din ileon. În cazul carcaselor autolizate, se alege un os lung întreg sau sternul.

2) De la porcii care au prezentat febră sau alte semne de boală, trebuie prelevate probe de sânge pe anticoagulant sau sânge coagulat, în concordanță cu instrucțiunile autorității veterinare competente.

3) Testele virusologice sunt recomandate în cazul animalelor bolnave. Acestea au de obicei o valoare limitată atunci când sunt utilizate în scopurile monitorizării animalelor care nu prezintă semne clinice. Totuși, dacă obiectivul unei prelevări de probe la scară largă este de a detecta virusul pestei porcine clasice, atunci când porcii sunt în perioada de incubație a bolii, tonsilele sunt cele mai adecvate probe.

3. Transportul probelor

1) Este recomandat ca toate probele:

- a) să fie transportate și depozitate în containere închise ermetic;
- b) să nu fie congelate dar să fie păstrate la rece, la temperatura frigiderului;
- c) să fie expediate la laborator cât mai repede posibil;
- d) să fie menținute preferabil pe pachete de refrigerare și nu pe gheață carbonică pentru a le păstra reci;
- e) țesuturile sau organele sunt puse într-o pungă de plastic separată, închisă și etichetată corespunzător; acestea trebuie să fie apoi puse în containere cu înveliș extern dur și împachetate cu suficient material absorbant pentru a le proteja de deteriorare și pentru a absorbi lichidele care se pot scurge;
- f) să fie transportate direct la laborator, când este posibil, de către personal competent, pentru a se asigura un transport rapid și sigur.

2) Exteriorul pachetului trebuie să fie etichetat cu adresa laboratorului destinatar și trebuie să fie înscris evident următorul mesaj: ***Material patologic animal; Perisabil; Fragil; A nu se deschide în afara unui laborator pentru pesta porcină clasică.***

3) Laboratorul care primește probele trebuie să fie informat în prealabil despre ora și modul sosirii acestora.

4) Pentru transportul aerian al probelor la Laboratorul Internațional de Referință pentru PPC⁽¹⁾, pachetul trebuie să fie etichetat în concordanță cu reglementările IATA.

⁽¹⁾ Laboratorul Internațional de Referință are o autorizație nelimitată de a primi probe pentru diagnostic și izolarea virusului PPC. Copiile după permisul de import pot fi solicitate înainte de transport la laborator și trebuie atașate la exteriorul pachetului într-un plic.

CAPITOLUL VI: Principiile și utilizarea testelor virusologice și evaluarea rezultatelor acestora

1. Detectarea antigenului viral

1) Testul cu anticorpi fluorescenți IFD (Testul de imunofluorescență directă)

Principiul testului este detectarea antigenului viral pe frotiuri de măduvă sternală sau pe criosecțiuni subțiri de material din organe de la porci suspectați de a fi infectați cu virusul PPC. Antigenul intracelular este detectat prin utilizarea unui anticorp conjugat cu FITC (colorant fluorescent). Orice rezultat pozitiv trebuie să fie confirmat prin repetarea colorării cu un anticorp monoclonal specific sau test RT-PCR specific pentru PPC.

Organele adecvate sunt tonsilele, rinichii, splina, diferite limfonoduri și ileonul. Frotiuri din celulele măduvei sternale pot fi de asemenea utilizate în cazul porcilor sălbatici în cazul în care aceste organe nu sunt disponibile sau sunt autolizate precum și în cazul cadavrelor de la porcii domestici. Testul poate fi efectuat într-o zi. Deoarece probele de organe pot fi obținute doar de la animale moarte, utilizarea acestuia în scop de testare pe un număr mare de probe este limitată.

2) ELISA pentru detectarea antigenului.

Antigenul viral este detectat utilizând diferitele tehnici ELISA.

Sensibilitatea testului ELISA pentru detectarea antigenului trebuie să fie suficient de mare pentru a detecta un rezultat pozitiv la animale care prezintă semne clinice de PPC.

Utilizarea testului ELISA pentru detectarea antigenului este recomandată pentru probele prelevate de la animale cu semne clinice sau leziuni patologice de boală. Nu este recomandată pentru investigarea individuală a animalelor. Probele prelevate de la porcii suspectați de a fi infectați cu virusul PPC, sunt leucocitele, serul sanguin, sângele necoagulat precum și os sternal din care se folosește măduva sternală și suspensiile organelor menționate la pct. 1, subpct. 1) din prezentul capitol (tonsilele, rinichii, splina, diferite limfonoduri și ileonul) prelevate de la porci suspectați a fi infectați cu virusul PPC.

ELISA poate fi efectuat într-o zi și poate fi executat de echipament automat. Cel mai important avantaj este numărul mare de probe care poate fi prelucrat într-o perioadă scurtă de timp. Este recomandat să fie utilizat un test antigen ELISA, care produce rezultate satisfăcătoare pe material de referință.

În prezent toate testele ELISA sunt mai puțin sensibile decât izolarea virusului pe culturi celulare iar sensibilitatea lor este semnificativ mai bună pe probe de sânge de la purcei decât pe cele de la porcii adulți. Rezultatele negative la ELISA pentru antigen trebuie confirmate prin RT-PCR sau testul de izolare pe culturi celulare.

⁽¹⁾În comerț sunt disponibile câteva kituri pentru antigen ELISA în pesta porcină clasică, care sunt validate cu diferite tipuri de probe.

2. Detectarea genomului viral

1) Reacția de amplificare a lanțurilor de acizi nucleici cu polimerază (PCR), este folosită pentru a se detecta genomul viral în probe de sânge, țesut sau organ. Fragmente mici ale ARN viral sunt transcrise în fragmente de ADN care apoi sunt amplificate prin reacția PCR, până la producerea unei cantități care poate fi detectată. Întrucât acest test detectează doar o secvență a genomului viral, PCR poate fi pozitiv chiar și atunci când în probe nu este viu virusul PPC (ex. țesut autolizat sau probe de la porcii convalescenți).

2) PCR poate fi folosit pentru un număr mic de probe, care au fost atent selectate de la animale suspecte sau din materii provenind de la feteșii avortați. Poate fi o metodă indicată pentru carcasele de porcii sălbatici, dacă materialul este autolizat și nu este posibilă izolarea virusului datorită citotoxicității.

3) Materialele potrivite ca probă pentru diagnosticul prin PCR sunt organele descrise pentru izolarea virusului sau sângele necoagulat.

4) PCR poate fi realizat în 48 de ore. Necesită un echipament de laborator adecvat, spații separate și personal calificat. Un avantaj este că particulele de virus nu sunt replicate în laborator. Metoda este foarte sensibilă, dar poate surveni ușor contaminarea, ceea ce conduce la rezultate fals pozitive. De aceea, este esențială existența unor proceduri eficiente pentru controlul calității. Unele metode sunt specifice mai degrabă pentru pestivirusuri decât pentru virusul PPC, necesitând teste de confirmare ulterioare, cum ar fi secvențierea materialului amplificat prin testul PCR. Când se folosesc reagenți (primeri) specifici pentru PPC pentru diagnostic nu este nevoie de secvențiere ci doar pentru studii de epidemiologie moleculară.

3. Metodologia de diagnostic în cazul pestei porcine clasice

a) IP CRDV efectuează analizele necesare infirmării/confirmării suspiciunii de PPC;

b) Pentru analizele efectuate de IP CRDV, prin tehnicile de detecție de antigen viral prin test de imunofluorescență directă IFD, și/sau detecție de genom viral prin RT-PCR, se emite Raport de încercări;

c) În situația în care rezultatul testului de imunofluorescență directă este negativ, iar cel al testului de detecție de genom este pozitiv, este necesară prelevarea suplimentară de probe de la alte porcine din aceeași exploatație, ce prezintă semne clinice și/sau leziuni pe baza cărora se suspicionează pesta porcină clasică;

d) În situația în care în exploatație nu mai există alte porcine, probele sunt trimise la Laboratorul Internațional de Referință pentru PPC și PPA, pentru efectuarea testului de

izolare pe culturi celulare și a altor teste confirmative; probele menționate la lit. c) sunt însoțite și de rezultatele examenelor de laborator efectuate la IP CRDV;

e) În toate situațiile în care un singur test rapid de detecție a antigenului sau genomului viral este pozitiv la examenele efectuate în IP CRDV, exploatația este considerată în continuare suspectă de contaminare și rămâne supusă măsurilor de restricție și supraveghere sanitară veterinară specială și supusă investigațiilor de laborator.

4. Metodologia de diagnostic pe probe prelevate de la animale vaccinate cu vaccin viu cu mai puțin de 30 de zile de la vaccinare

Atunci când probele provin de la animale care au fost vaccinate pe baza unui plan de vaccinare aprobat cu vaccin viu cu mai puțin de 30 zile de la momentul prelevării probelor, diagnosticul se face utilizând succesiunea de teste prevăzută în anexa nr. 3.

CAPITOLUL VII: Principiile și utilizarea testelor serologice și evaluarea rezultatelor acestora

1. Principii de bază și valoare de diagnostic

1) La porcii infectați cu virusul pestei porcine clasice, anticorpul sunt, de obicei, detectabili pe probe de ser începând cu a doua - a treia săptămână după infecție. La porcii vindecați, anticorpul neutralizanți pot fi detectați pe parcursul a câțiva ani sau chiar pe tot parcursul vieții. De asemenea, anticorpul sunt detectabili în mod sporadic în stadiul terminal al animalelor bolnave. La unii porci cu formă cronică de pestă porcină clasică, pot fi detectați anticorpul timp de câteva zile, la sfârșitul primei luni după infecție.

Purceii infectați intrauterin pot să fie imunotoleranți față de virusul omolog al pestei porcine clasice și să nu producă anticorpi specifici. Totuși, anticorpi de origine maternală pot fi detectați în timpul primelor zile de viață. Timpul de înjumătățire a anticorpilor maternali la purceii sănătoși neviremici este de aproximativ două săptămâni. Dacă se găsesc anticorpi ai pestei porcine clasice la purceii mai mari de 3- 4 luni, este puțin probabil ca aceștia să fie de origine maternală.

2) Detectarea anticorpilor împotriva virusului PPC în probe de ser sau plasmă sangvină este efectuată pentru a asista diagnosticul PPC în exploatațiile suspecte, pentru stabilirea perioadei de infectare în cazul focarelor confirmate și în scopul monitorizării și supravegherii.

Testele serologice sunt de valoare limitată pentru detectarea PPC într-o exploatație în cazul unei infecții recente datorită apariției anticorpilor după 2-3 săptămâni postinfecție.

Un nr. mic de porci seropozitivi cu un titru de neutralizare scăzut pot să fie indicatori ai unei infecții recente (două până la patru săptămâni). Un nr. mare de porci porci cu titru de neutralizare mare poate indica intrarea în exploatație a virusului cu mai mult de o lună

înainte. Poziționarea porcilor seropozitivi în exploatație poate furniza informații valoroase privind introducerea virusului peștei porcine clasice în exploatație.

3) Trebuie să se facă o evaluare adecvată a rezultatelor testelor serologice ținând cont de toate constatările clinice, virusologice și epidemiologice, în cadrul anchetei ce trebuie să fie realizată în cazul suspectării sau confirmării PPC, în concordanță cu art. 8 al Deciziei 2001/89/EC, transpus în legislația națională de HG nr. 1368/2016, cap. VII.

2. Teste serologice recomandate

1) Testul ELISA este testul pentru diagnosticul serologic al peștei porcine clasice. Calitatea și eficacitatea diagnosticului serologic se efectuează de IP CRDV.

2) Au fost perfectate mai multe tehnici ELISA, ce folosesc anticorpi monoclonali specifici, care sunt bazate pe două variante: ELISA competitiv sau de blocare și ELISA necompetitiv.

ELISA competitiv sau de blocare se bazează, de obicei, pe anticorpi monoclonali. Dacă proba de ser conține anticorpi ai virusului clasic, legătura unui anticorp monoclonal selectat conjugat cu peroxidază la antigenul viral va fi inhibată, rezultând un semnal redus. În testul ELISA necompetitiv legătura anticorpilor din ser cu antigenul viral este măsurată direct utilizând anticorpi anti IgG de porc conjugați cu peroxidază.

3) Controlul calității, cu privire la sensibilitatea și specificitatea fiecărui lot de teste ELISA, trebuie să fie efectuat în mod regulat de către laboratorul național, utilizându-se un panel de seruri de referință furnizată de LIR. Acest panel de seruri va cuprinde:

- a) seruri de la porci în faza inițială a infecției cu virusul PPC (înainte de 21 de zile de la infectare);
- b) seruri de la porci convalescenți (după 21 de zile de la infectare);
- c) seruri de la porci infectați cu pestivirusuri ale rumeșătoarelor.

Testul ELISA ce urmează a fi utilizat pentru diagnosticul serologic al peștei porcine clasice, trebuie să recunoască toate serurile de referință de la porcii în convalescență. Toate rezultatele obținute cu seruri de referință trebuie să fie repetabile. Este de asemenea recomandat ca acestea să detecteze toate serurile pozitive provenite de la porci aflați în faza inițială a bolii și să prezinte o minimă reacție încrucișată cu serurile de la porcii infectați cu pestivirusuri ale rumeșătoarelor. Rezultatele obținute cu seruri de la porci în faza inițială a infecției indică sensibilitatea testului ELISA.

4) Sensibilitatea testului ELISA este evaluată ca fiind mai mică decât a testului de virus neutralizare și se recomandă ca să fie folosită ca un test screening aplicat la un lot de porcine. Totuși, ELISA necesită facilități mai puțin specializate și poate fi realizată mult mai rapid decât testul de virus neutralizare, grație sistemului automatic.

Testul ELISA trebuie să asigure identificarea tuturor cazurilor de infecție cu virusul pestei porcine clasice în stadiul de convalescență și trebuie să fie pe cât posibil lipsite de interferențe prin reacții încrucișate cu anticorpii anti pestivirusuri ale rumegătoarelor.

3. Interpretarea rezultatelor serologice și diagnosticul diferențial cu infecții datorate pestivirusurilor rumegătoarelor (BVDV și BDV)

1) Fără a se aduce atingere prevederilor art. 4, alin. (3) sau art. 7, alin. (2) ale Directivei 2001/89/CE, transpuse prin HG nr. 1368/ 2016 cap. III, pct.9 sau cap.VI, pct.11, în cazul depistării unui titru de neutralizare a virusului PPC mai mare sau egal cu 10 ND₅₀ în probe de ser sanguin prelevate de la unul sau mai mulți porci, sau a unui rezultat pozitiv la testul ELISA, în probe de ser sanguin provenite de la un grup de porci, trebuie să fie aplicate imediat în exploatarea respectivă, măsurile la care se face referire la cap.III, pct.8 al HG nr. 1368/ 2016 sau trebuie să se continue aplicarea acestora.

Probele deja prelevate din această exploatare trebuie să fie retestate prin testul de virus neutralizare, prin titrarea comparativă a diluției finale a anticorpilor neutralizanți ai virusului pestei porcine clasice și a pestivirusurilor rumegătoarelor.

2) Dacă testele comparative evidențiază anticorpi față de pestivirusurile rumegătoarelor și lipsa sau un titru de anticorpi în mod evident mai scăzut (mai puțin de trei ori) față de virusul pestei porcine clasice, suspiciunea de pestă porcină clasică trebuie să fie exclusă, cu excepția cazului în care există alte motive care garantează aplicarea în continuare în exploatarea respectivă, a măsurilor la care se face referire art. 4, alin. (2) al Directivei 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin HG nr.1368/2016, cap.III, pct.8.

3) Dacă testele comparative indică, la mai mulți porci, un titru de virus-neutralizare mai mare sau egal cu 10 ND₅₀, iar acest titru este mai mare sau egal cu titrurile existente față de alte pestivirusuri, pesta porcină clasică va fi confirmată, ca urmare a constatării în exploatarea respectivă, a unor dovezi epidemiologice ale bolii.

4) Fără a se aduce atingere prevederilor art. 4, alin. (3) al Directivei 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap.III, pct.8, dacă nu s-au constatat dovezi epidemiologice ale bolii sau dacă rezultatele testelor precedente nu sunt concludente, autoritatea competentă trebuie să se asigure că în exploatarea vizată:

- a) se va continua aplicarea măsurilor la care se face referire la art. 4, alin. (2) al Directivei 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap. III, pct.8;
- b) sunt efectuate investigații ulterioare, cât mai curând posibil, pentru a se confirma / infirma existența PPC, în concordanță cu capitolul IV al prezentului Manual.

5) Dacă, în fapt, controalele ulterioare și testele la care se face referire pct.3. subpct. 4) al prezentului capitol, nu permit excluderea PPC, trebuie să fie efectuate prelevări de probe

ulterioare, pentru testare serologică a porcilor din exploatație, după ce trec cel puțin două săptămâni de la controlul precedent.

În cadrul acestei prelevări ulterioare de probe, porcii de la care deja s-au recoltat probe și care sunt deja testați, trebuie să fie retestați, pentru o testare serologică comparativă cu probele prelevate anterior, pentru a se depista sero-conversia pentru virusul pestei porcine clasice sau pentru pestivirusurile rumeșoarelor.

Dacă aceste controale și teste ulterioare nu permit confirmarea PPC, măsurile la care se face referire art. 4 al Directivei 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap.III, pot fi ridicate.

6) În cazul vaccinării cu vaccin viu în conformitate cu planurile de vaccinare diagnosticul prin teste serologice în exploatațiile în care s-a efectuat vaccinarea nu are utilitate.

CAPITOLUL VIII: Teste de diferențiere în cazul vaccinării de urgență

1. Principii de bază

1) În prezent, este disponibil un test serologic de diferențiere, pentru a se deosebi cu succes porcii care au fost vaccinați cu vaccinuri marker, care induc producerea de anticorpi numai față glicoproteinei E2 a virusului pestei porcine clasice, de porcii care au fost infectați cu tipul sălbatic al virusului pestei porcine clasice. Acest test este desemnat să detecteze anticorpii produși împotriva glicoproteinei E^{rms} a virusului pestei porcine clasice. Se bazează pe principiul că animale neinfectate, vaccinate cu vaccinuri marker, produc anticorpi numai împotriva glicoproteinei E2 a virusului pestei porcine clasice, în timp ce animalele infectate cu virusul sălbatic, reacționează și produc anticorpi inclusiv împotriva altor antigene virale, inclusiv față de proteina E^{rms}.

Acest test de diferențiere este sensibil și specific ⁽¹⁾. Totuși, porcii care au fost infectați cu alte Pestivirusuri, decât virusul pestei porcine clasice, cum este virusul BVD sau a bolii de graniță, vor reacționa de asemenea E^{rms} pozitiv. Mai mult, sensibilitatea acestui test nu este ideală, atât timp cât unele animale marker-vaccinate și infectate ulterior, pot să nu reacționeze pozitiv.

Datele disponibile în prezent, sugerează ca testul de diferențiere nu poate fi folosit cu încredere la probele de ser de testat provenind de la porcii sălbatici.

2) Testul de diferențiere este un test bloking în fază lichidă. Probele care urmează să fie testate, se incubează în microplăci, în prealabil căptușite cu anticorpi monoclonali anti-E^{rms} împreună cu o cantitate definită de antigen E^{rms}. Orice anticorp specific pentru E^{rms} se leagă de cantitatea definită de antigen E^{rms} din soluție și se formează un complex antigen/anticorp, care nu reacționează cu anticorpii anti-E^{rms} din placă. După spălarea plăcii pentru a îndepărta materialul nelegat, se adaugă un conjugat anti-E^{rms} marcat cu

peroxidază, care se leagă de antigenul E^{ms} care formează un complex cu anticorpul care a fost captușită suprafața microplăcii. Conjugatul care nu s-a legat se îndepărtează prin spălare și se adaugă un substrat ce conține cromogen. Intensitatea culorii care se dezvoltă, este invers proporțională cu cantitatea de anticorpi specifici pentru E^{ms} prezenți în probă. Dacă proba nu conține anticorpi (probă negativă) mare parte din cantitatea definită de antigen E^{ms} adăugat se poate lega de anticorpul anti-E^{ms} pe suprafața plăcii și se observă o reacție puternică de culoare.

Rezultatul se obține prin compararea densității optice (DO) a godeurilor ce conțin probe de testat cu cele ce conțin seruri de control negative sau pozitive.

2. Linii directe pentru folosirea testelor de diferențiere în contextul unei vaccinări de necesitate cu vaccin marker într-o exploatare de porci menționat la art. 19 al Directivei 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016 (cap.XVII)

1) Testul de diferențiere este desemnat să verifice prezența sau absența circulației virusului PPC într-o populație de porci vaccinată cu vaccin marker. Datele disponibile sugerează că acesta poate fi folosit cu succes în acest scop la loturi de animale, dar nu exclude cu certitudine infecția cu virusul PPC la nivel de individ. În mod deosebit, specificitatea testului de diferențiere, poate să nu fie suficientă pentru a deosebi cu certitudine porcii vaccinați cu vaccin marker de porcii infectați, în cazul vaccinării porcilor adulți. În cazul rezultatelor incerte, totuși, porcii vizați trebuie să fie abatorizați sau uciși într-o manieră umană în concordanță cu normele în vigoare iar organele acestora trebuie să fie testate pentru detecția virusului PPC. În acest scop, cele mai potrivite teste sunt izolarea de virus și testul PCR.

2) De aceste aspecte trebuie să se țină cont în special când se proiectează o strategie de vaccinare de urgență cu vaccin marker și apoi se interpretează rezultatele supravegherii peștei porcine clasice pe o populație vaccinată cu vaccin marker.

3) Procedura de prelevare a probelor și de testare a populației vaccinate înainte de ridicarea măsurilor de restricție ce urmează să fie aplicate într-o zonă vaccinată sau într-o exploatare în care se vaccinează cu vaccin marker, în concordanță cu art. 19 al Directivei 2001/89/CE, transpus în legislația națională prin HG nr. 1368/2016, cap.XVII, trebuie să fie elaborată în funcție de vârsta porcilor vaccinați, categoria de porci (ținuți pentru îngrășare/abatorizare, reproducție) și de nivelul de securitate dorit în evaluarea absenței circulației virusului peștei porcine clasice în populația de porci.

4) Prin urmare, detaliile pentru prelevarea de probe și testare trebuie să fie stabilite în planul de vaccinare de urgență.

(1)În concordanță cu rezultatele unui studiu efectuat de către laboratorul internațional de referință pentru pesta porcină clasică și laboratorul național de referință pentru pesta porcină clasică, sensibilitatea testului de diferențiere este de cea 94% iar specificitatea este de cea 98%.

CAPITOLUL IX: Cerințe minime de securitate pentru laboratoarele de PPC

1) Cerințele minime stabilite la tabelul 1, trebuie să fie îndeplinite de orice laborator în care urmează să fie manipulat virusul pestei porcine clasice, chiar și numai într-o cantitate mică, așa cum cer testele de izolare și neutralizare a virusului.

Totuși, examinările post-mortem, prelucrarea țesuturilor pentru testul FAT(IFD) și serologie ce utilizează antigene inactivate, pot fi efectuate la un nivel de biosecuritate mai scăzut, cu condiția să se aplice norme de igienă și decontaminări de bază și post-operaționale, împreună cu evacuarea în siguranță a deșeurilor de țesuturi și seruri.

2) Cerințele suplimentare stabilite la tabelul 1 al prezentului Manual trebuie să fie îndeplinite de către orice laborator în care sunt efectuate experimente ce presupun o multiplicare extensivă a virusul PPC.

3) Cerințele stabilite la tabelul 2 al Manualului trebuie să fie îndeplinite de către orice laborator în care sunt efectuate experimente pe animale infectate cu virusul PPC.

4) În orice caz, toate colecțiile de virus al pestei porcine clasice trebuie să fie ținute într-un depozit sigur, fie congelate fie liofilizate. Se recomandă ca frigidererele și congelatoarele să nu fie folosite pentru alte virusuri decât cel al pestei porcine, sau pentru alte materii care nu au legătură cu diagnosticul pestei porcine clasice. Toate fiolele individuale trebuie să fie etichetate clar și trebuie să se țină evidențe comprehensive a colecției de virusuri, împreună cu datele și rezultatele controalelor de calitate. Trebuie, de asemenea, să se țină evidențe ale virusurilor adăugate la stoc, împreună cu detalii privind sursa acestora precum și a virusurilor livrate altor laboratoare.

5) Se recomandă ca unitatea de biosecuritate pentru efectuarea lucrărilor cu virusul pestei porcine clasice, să fie înconjurată de spații în care nu se manipulează virusul menționat. Aceste spații trebuie să fie disponibile pentru prepararea sticlăriei și mediilor de cultură, menținerii și preparării culturilor de celule ne-infectate, pregătirii serurilor și testărilor serologice (altele decât metodele care folosesc virusul viu al pestei porcine clasice) și pregătirea suportului administrativ și de birou.

Tabel 1. Principii de siguranță biologică corespunzător pentru laboratoarele de diagnostic

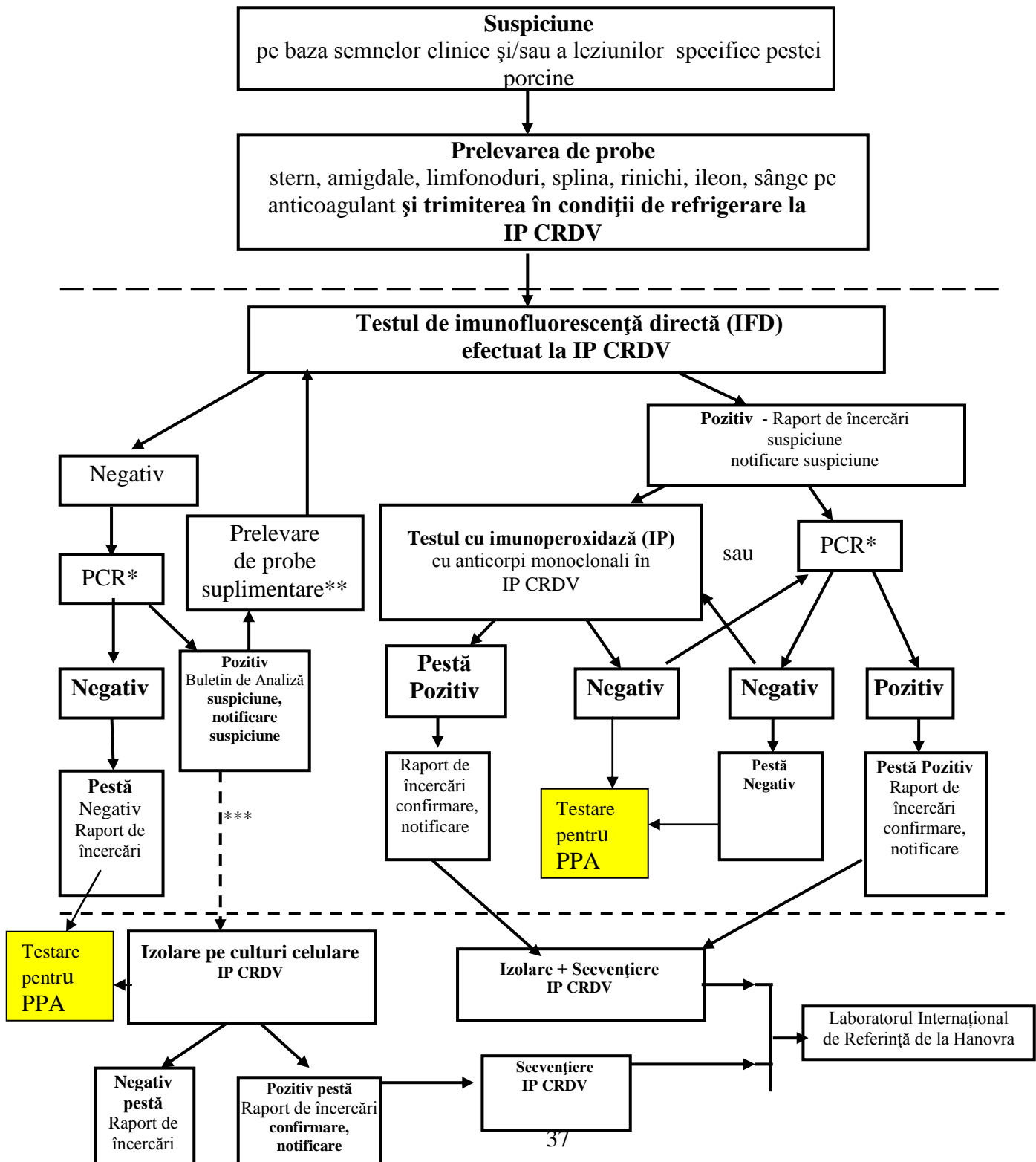
	Cerințe suplimentare	Cerințe minime
Mediu general	Presiune atmosferică normală. Filtrare dublă HEPA al aerului evacuat Camere speciale, folosite exclusiv pentru procedurile de diagnostic al PPC.	Presiune atmosferică normală Camere speciale, limitate la proceduri definite
Îmbrăcăminte de laborator	Schimbare completă a hainelor la intrare Îmbrăcăminte de laborator utilizată numai în unitatea în care se lucrează cu virusul pestei porcine clasice. Mănuși de unică folosință pentru toate tipurile de manipulare a materialului infectat. Îmbrăcăminte sterilizată înainte de scoaterea din unitate sau spălată în cadrul unității.	Îmbrăcăminte exterioară special folosită numai în unitatea unde se manipulează virusul pestei porcine clasice. Mănuși de unică folosință pentru toate tipurile de manipulare a materialului infectat, Îmbrăcăminte exterioară sterilizată înainte de părăsirea unității sau spălată în cadrul unității.
Controlul personalului	Intrarea în unitate se limitează la persoanele autorizate și instruite corespunzător. Spălarea și dezinfectarea mâinilor la părăsirea unității. Nu se permite apropierea personalului de porci timp de 48 de ore după părăsirea laboratorului.	Intrarea în unitate limitată la persoanele numite, instruite. Spălarea și dezinfectarea mâinilor la părăsirea unității. Nu se permite apropierea personalului de porci timp de 48 de ore după părăsirea unității.
Echipament	Cabinet de securitate biologică (clasa I sau II) folosit pentru toate tipurile de manipulare a virusului viu. Cabinetul trebuie să aibă o dublă filtrare HEPA al aerului evacuat. Tot echipamentul necesar să fie disponibil pentru procedurile de laborator din cadrul laboratorului specializat.	

Tabel 2. Cerințe de biosecuritate pentru camerele de experiențe pe animale

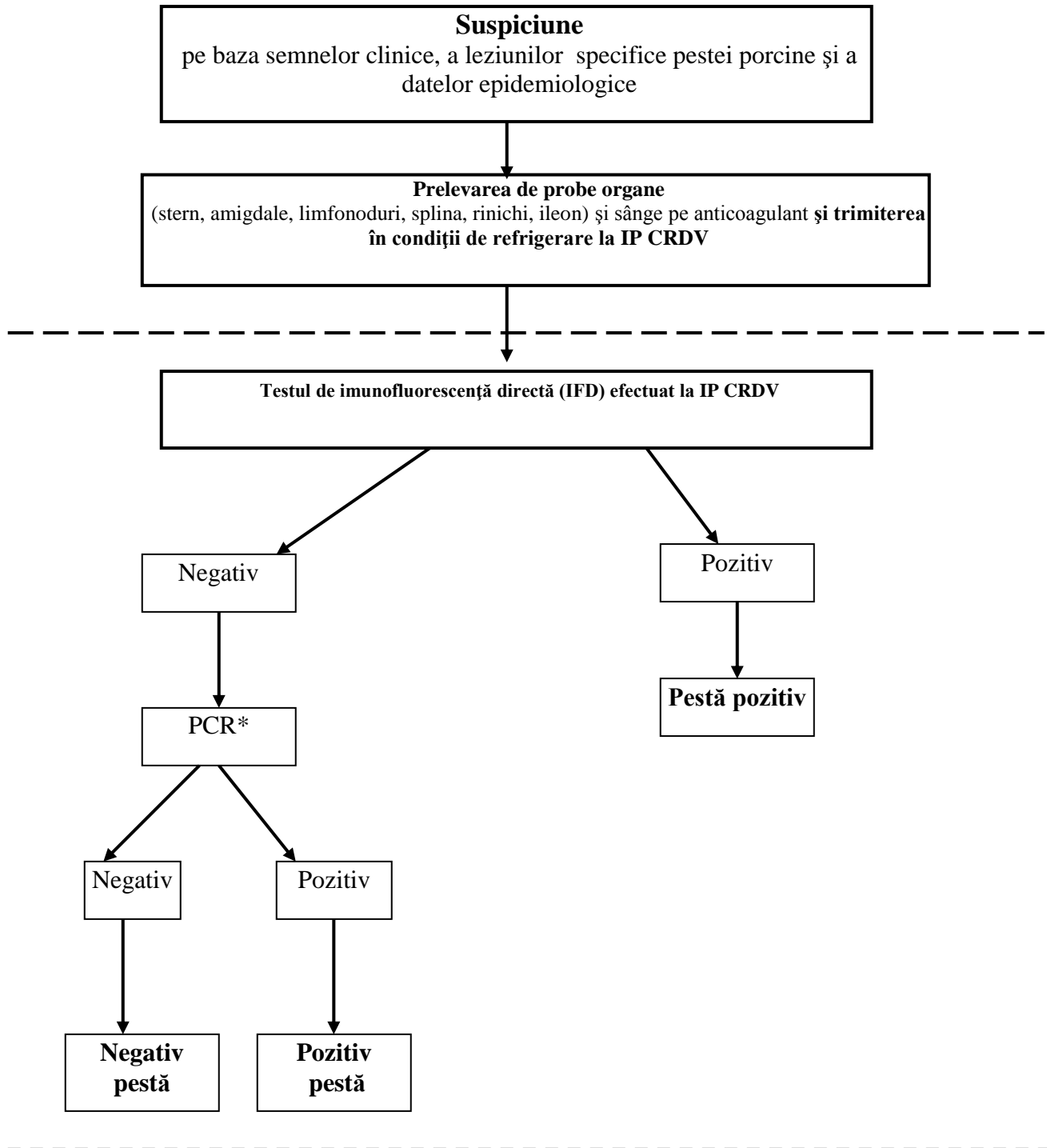
	Cerințe
Mediu general	Ventilație controlată cu presiune negativă Dublă filtrare HEPA al aerului evacuat. Spații pentru fumigare/dezinfecție completă la terminarea experimentului. Lichidele reziduale tratate pentru inactivarea virusului PPC (prin căldură sau chimic).
Îmbrăcăminte de laborator	Schimbarea completă a hainelor la intrare. Mănuși de unică folosință pentru toate tipurile de manipulare. Îmbrăcăminte sterilizată înainte de scoaterea din unitate sau se spală în cadrul unității.
Controlul personalului	Intrarea în unitate se limitează la persoanele autorizate, instruite. Se face duș integral la ieșirea din unitate. Nu se permite contactul personalului cu porci timp de 48 de ore după părăsirea unității.
Echipament	Echipamentul necesar pentru procedurile privind animalele, să fie disponibile în cadrul unității. Toate materialele se vor steriliza la evacuarea acestora din unitate sau, în cazul probelor prelevate de la animale, să fie dublu ambalate într-un container ermetic care este dezinfectat la suprafață pentru transportul către laboratorul de pestă porcină clasică.
Animale	Toate animalele să fie tăiate înainte de părăsirea unității, examinările post-mortem să fie finalizate în cadrul unei zone de biosecuritate, iar carcasele incinerate la definitivarea examinărilor.

**METODOLOGIA DE LUCRU
ÎN DIAGNOSTICUL PESTEI PORCINE CLASICE
FOCAR PRIMAR
TESTE VIRUSOLOGICE**

Când testul inițial este IFD

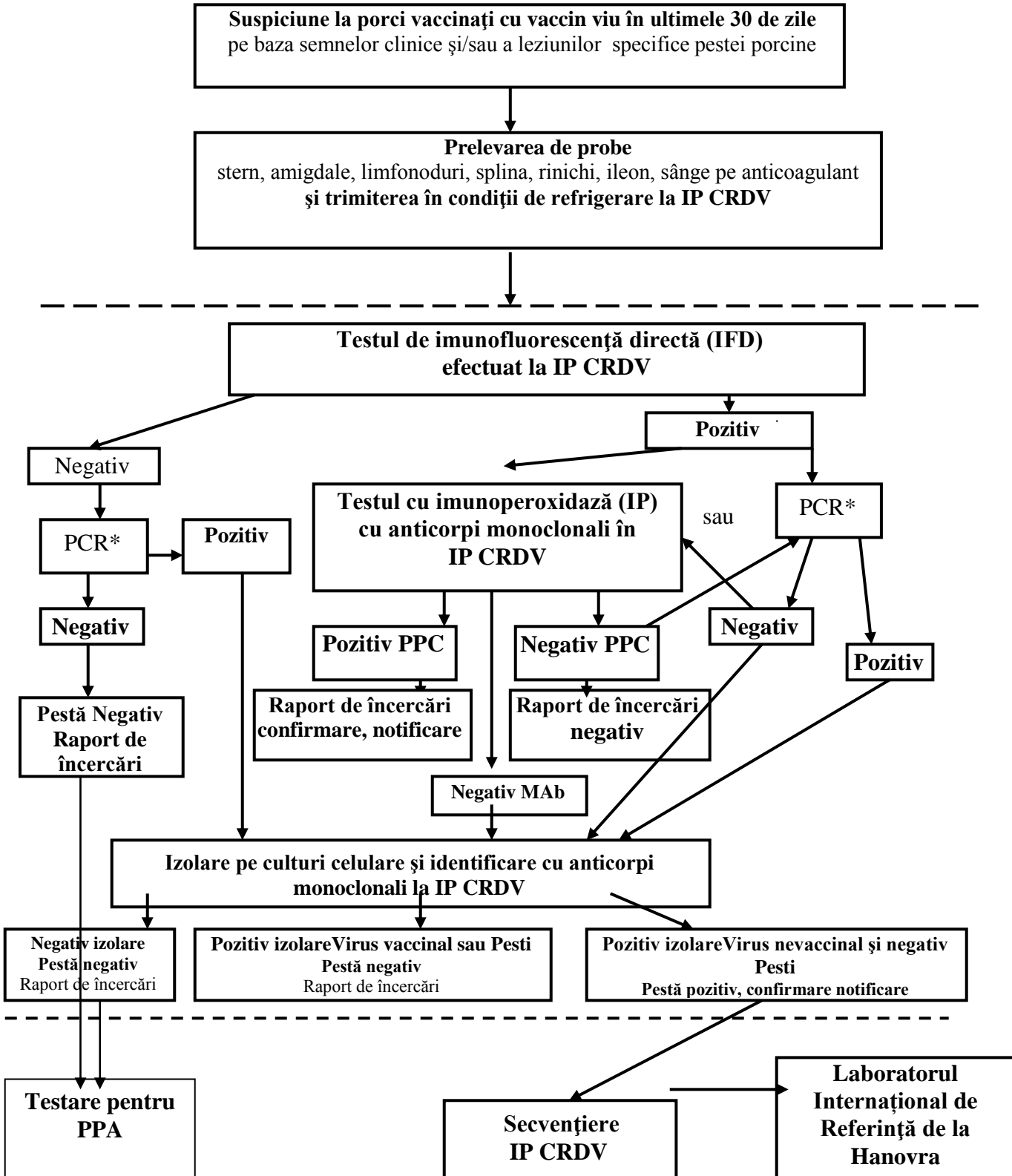


FOCAR SECUNDAR
Teste virusologice
Când testul inițial este IFD

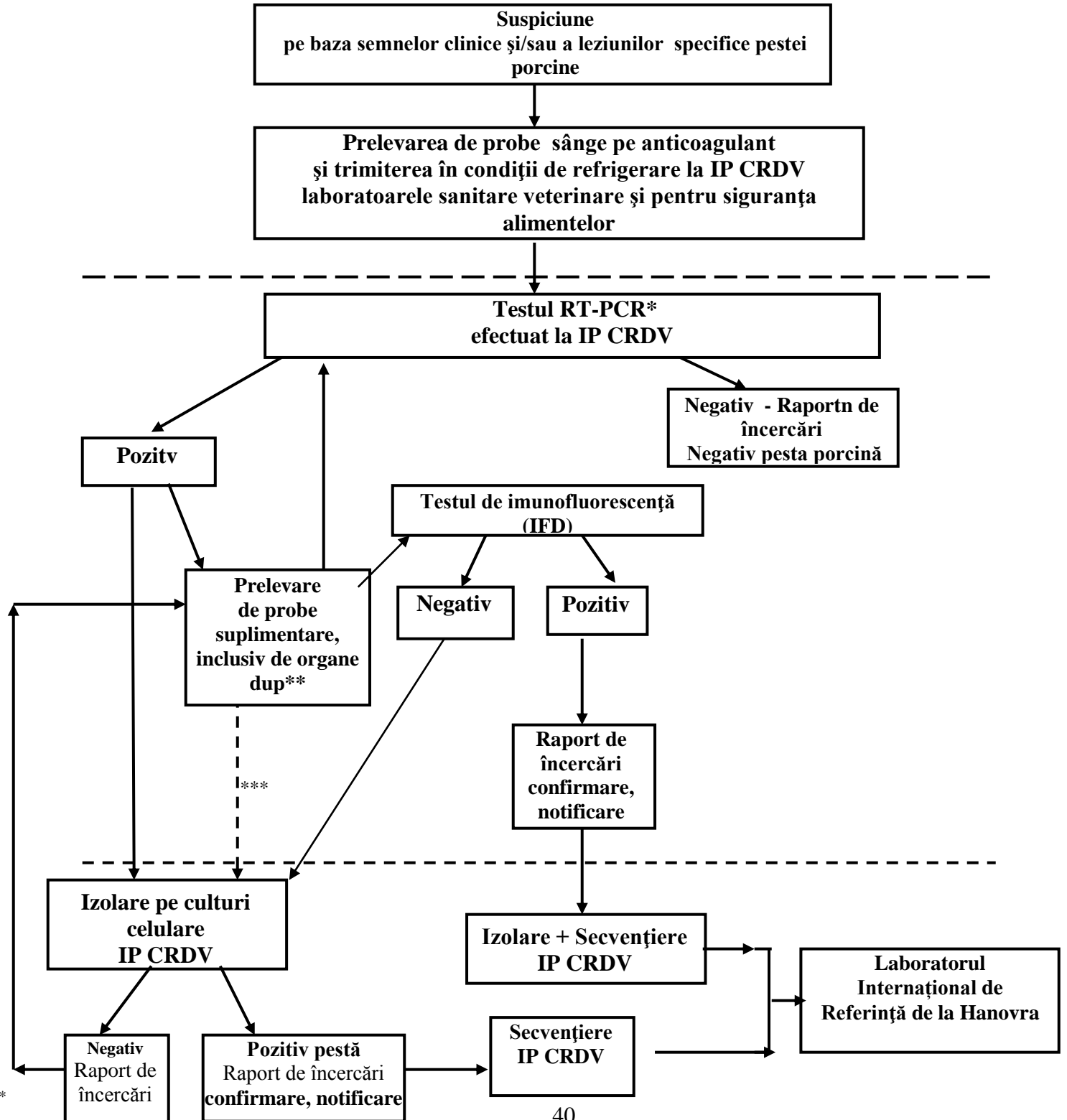


*

**METODOLOGIA DE LUCRU
ÎN DIAGNOSTICUL PESTEI PORCINE CLASICE
FOCAR PRIMAR
TESTE VIRUSOLOGICE
Când testul inițial este IFD**

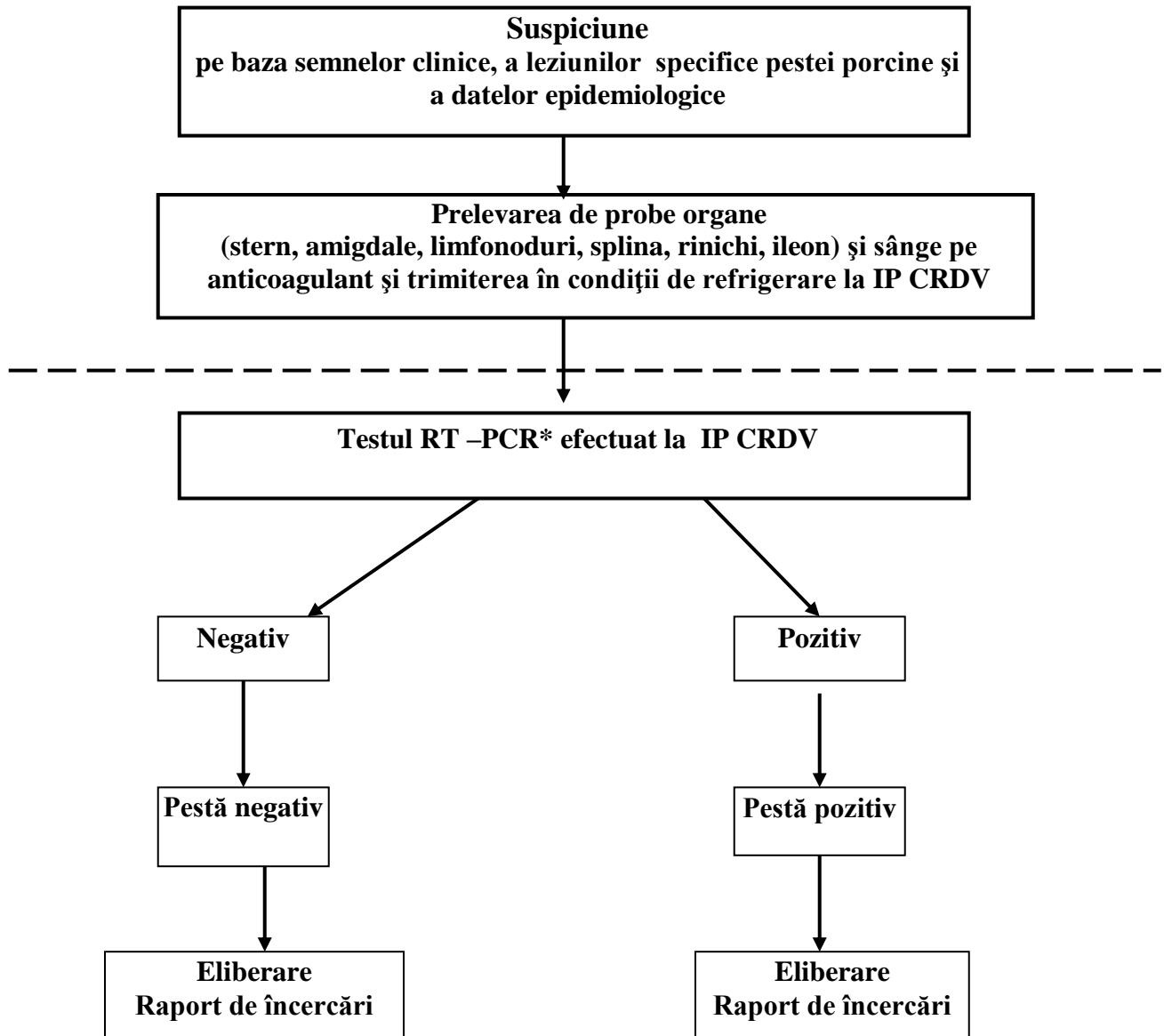


**METODOLOGIA DE LUCRU
ÎN DIAGNOSTICUL PESTEI PORCINE CLASICE**
Când testul inițial este RT-PCR
FOCAR PRIMAR
TESTE VIRUSOLOGICE



**METODOLOGIA DE LUCRU
ÎN DIAGNOSTICUL PESTEI PORCINE CLASICE
FOCAR SECUNDAR**

Teste virusologice
Când testul inițial este RT-PCR



METODOLOGIA DE LUCRU ÎN DIAGNOSTICUL PESTEI PORCINE CLASICE TESTE SEROLOGICE

