

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 4. juli 2000

om diagnosticeringsprocedurer, prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorieprøver til bekræftelse og differentialdiagnosticering af smitsom blæreudslæt hos svin

(meddelt under nummer K(2000) 1805)

(EØS-relevant tekst)

(2000/428/EF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 92/119/EØF af 17. december 1992 om generelle fællesskabsforanstaltninger til bekæmpelse af visse dyresygdomme samt om specifikke foranstaltninger vedrørende blæreudslæt hos svin ⁽¹⁾, senest ændret ved akten vedrørende Østrigs, Finlands og Sveriges tiltrædelse, særlig bilag II, punkt 3, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Der bør på EF-plan fastsættes diagnosticeringsprocedurer, prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorieprøver til bekræftelse af smitsom blæreudslæt hos svin (SVD) og hurtig differentiering fra mund- og klovesyge, således at de to sygdomme bedre kan bekæmpes.

(2) Ifølge bilag III til direktiv 92/119/EØF skal EF-reference-laboratoriet for SVD i samråd med Kommissionen koordinere de metoder til diagnosticering af sygdommen, der anvendes i medlemsstaterne, bl.a. ved at tilrettelægge sammenlignende undersøgelser med regelmæssige mellemrum og stille referenceagenser til rådighed på EF-plan.

(3) Der er for nylig udviklet laboratorieprøver, som sikrer, at smitsom blæreudslæt hos svin hurtigt kan diagnosticeres og skelnes fra mund- og klovesyge.

(4) Resultaterne af de senest sammenlignende undersøgelser på EF-plan viser navnlig, at der er udviklet pålidelige prøver til påvisning af SVD-virusantigenet eller -genomet, og at disse prøver kan være et udmærket supplement til virusisolationsprøven til diagnosticering af SVD-virus.

(5) På grundlag af de erfaringer, der er gjort med bekæmpelsen af smitsom blæreudslæt hos svin i de seneste år, er de prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorieprøver blevet indkredset, der er bedst egnet til at stille en korrekt diagnose af sygdommen i forskellige situationer.

(6) Der er taget hensyn til udtalelsen og anbefalingerne fra Den Videnskabelige Komité for Dyrs Sundhed og Trivsel.

(7) De i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Veterinærkomité —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

1. Medlemsstaterne sørger for, at bekræftelsen af SVD og differentialdiagnosen med mund- og klovesyge baseres på:

a) påvisning af kliniske sygdomstegn

⁽¹⁾ EFT L 62 af 15.3.1993, s. 69.

b) påvisning af virus, antigen eller genom i prøver af epitelvæv, blærevæske eller fæces

med regelmæssige mellemrum tilrettelægges af EF-referencelaboratoriet for SVD.

c) påvisning af en specifik antistofrespons i serumprøver

Artikel 2

efter procedurerne, prøvetagningsmetoderne og kriterierne for evaluering af resultaterne af laboratorieprøver i håndbogen i bilaget til denne beslutning.

Denne beslutning anvendes fra den 1. oktober 2000.

Artikel 3

2. De nationale diagnoselaboratorier, der er nævnt i punkt 5 i bilag II til direktiv 92/119/EØF, kan dog ændre de laboratorieprøver, der er fastlagt i håndbogen i bilaget til denne beslutning, eller anvende andre prøver, hvis det kan godtgøres, at der opnås lige så stor følsomhed og specificitet.

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 4. juli 2000.

Følsomheden og specificiteten af de ændrede eller andre prøver skal evalueres som led i de sammenlignende undersøgelser, der

På Kommissionens vegne

David BYRNE

Medlem af Kommissionen

BILAG

HÅNDBOG I DIAGNOSTICERINGSPROCEDURER, PRØVETAGNINGSMETODER OG KRITERIER FOR EVALUERING AF RESULTATERNE AF LABORATORIEPRØVER TIL BEKRÆFTELSE OG DIFFERENTIALDIAGNOSTICERING AF SVD

KAPITEL I

Indledning, mål og definitioner

1. Denne håndbog:
 - a) indeholder retningslinjer for og minimumskrav til diagnosticeringsprocedurer og prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorieprøver med henblik på at opnå en korrekt diagnose af SVD. Der er dog også lagt vægt på differentialdiagnosen over for mund- og klovesyge
 - b) integrerer bestemmelserne i bilag II til direktiv 92/119/EØF, særlig bilagets punkt 4, 7 og 8
 - c) henvender sig hovedsagelig til de myndigheder, der er ansvarlige for bekæmpelsen af SVD. Der er derfor lagt vægt på principperne og anvendelsesområderne for laboratorieprøver og evaluering af resultaterne frem for detaljerede laboratoriemetoder.
2. I denne håndbog forstås ved:
 - a) »seropositivt svin«: et svin, hvis serum har et antistoftiter, som er lig med eller større end SVD-referenceserum 4, der er nævnt i kapitel X, i det nationale laboratoriums virusneutralisationsprøve
 - b) »singletonreagent«: et enkelt seropositivt svin på en bedrift, der giver positivt resultat i serologiske prøver for SVD, men som ikke på noget tidspunkt har været i kontakt med SVD-virus, og fra hvilket der ikke er påvist infektionsspredning til kontaktsvin. Et seropositivt svin bekræftes som singletonreagent, hvis betingelserne i kapitel VIII, afsnit C, er opfyldt
 - c) »kontaktsvin«: svin, der har direkte kontakt eller inden for de sidste 28 dage har haft direkte kontakt med et eller flere seropositive svin eller med et eller flere svin, der mistænkes for at være smittet med SVD-virus. Kontaktsvin kan befinde sig eller kan have befundet sig i den samme sti eller i tilstødende stier, hvis der er mulighed for kontakt mellem stierne.

KAPITEL II

Retningslinjer for undersøgelse af svin med kliniske tegn på SVD

1. Medlemsstaterne sørger for, at embedsdyrlægen, hvis der er mistanke om tilstedeværelse af SVD-virus på en bedrift, hurtigst muligt undersøger et statistisk signifikant antal svin for de kliniske sygdomstegn, der er omtalt i kapitel IX.
2. Medlemsstaterne sørger for, at der, når svin viser kliniske tegn, som tyder på SVD eller mund- og klovesyge, hurtigst muligt stilles en differentialdiagnose ved hjælp af prøvetagning og laboratorieundersøgelser efter bestemmelserne i kapitel IV, VII og VIII i denne håndbog.

KAPITEL III

Generelle procedurer for prøvetagning og transport af prøver

1. Personer, der skal ind på eller forlader svinebedrifter, hvor der er mistanke om SVD, skal træffe alle de hygiejneforholdsregler, der er nødvendige for at mindske risikoen for kontamination eller spredning af virus.
2. Alle svin, som der tages prøver fra, skal mærkes entydigt, således at de kan identificeres med henblik på en eventuel gentagelse af prøvetagningen. Det anbefales, at det sted, hvor hvert af de svin, som der er udtaget prøver fra på bedriften, befinder sig, registreres sammen med dets entydige identifikationsmærke, navnlig hvis der tages prøver fra mistænkte svin.
3. Prøverne sendes til laboratoriet ledsaget af de relevante formularer, som skal indeholde nærmere oplysninger om de pågældende svins sygdomshistorie og om de eventuelle kliniske tegn, der er observeret.
4. Da alle vesikulære tilstande hos svin kan være mund- og klovesyge, må der træffes særlige forholdsregler, når det gælder emballering af mistænkte prøver. Disse forholdsregler skal navnlig forhindre, at beholdere går i stykker eller lækker, og forebygge risikoen for kontamination, men de er også vigtige for at sikre, at prøverne ankommer i tilfredsstillende tilstand. Hvis der anbringes is inden i en emballage, må det forhindres, at der siver vand ud. Beholdere med prøver, der mistænkes for at indeholde SVD-virus, må ikke åbnes, før de ankommer til laboratoriet.

5. Prøver, der mistænkes for at indeholde SVD-virus, må kun analyseres på et laboratorium, der er godkendt til at håndtere mund- og klovesygevirus til diagnostiske formål i henhold til EF-forskrifterne for bekæmpelse af mund- og klovesyge, medmindre mund- og klovesyge allerede er blevet udelukket.
6. Prøver kan transporteres ved 4 °C, hvis transporttiden til modtagerlaboratoriet forventes at være på under 48 timer, og skal i modsat fald holdes på en temperatur på højst - 20 °C.
7. Prøver fra andre medlemsstater end Det Forenede Kongerige, der er bestemt for EF-referencelaboratoriet, skal sendes som luftfragt til London-Heathrow eller London-Gatwick. Inden afsendelsen skal laboratoriet underrettes pr. telefax (44-1483-232621) eller e-post om rutenummer, dato, forventet ankomsttid og luftfragtbrevets nummer, så pakken kan lokaliseres ved ankomsten. Pakken adresseres til:

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

Desuden skal følgende oplysninger stå på etiketten: »Animal Pathological Material of no commercial value. Perishable. Fragile. To be collected at airport by addressee. Not to be opened outside the laboratory.«

Personale fra EF-referencelaboratoriet har autorisation til at afhente sendinger i lufthavnen i henhold til en særlig generel importtilladelse, som er udstedt af UK Ministry of Agriculture, Food and Fisheries til dette formål. Det er en fast ordning, og der kræves ikke en særskilt tilladelse for hver indførsel. Det er ikke tilladt, at uautoriseret personale fører mistænkt blæremateriale ind i Det Forenede Kongerige i deres håndbagage. Der må ikke benyttes kurerfirmaer.

8. Transport af prøver til de nationale laboratorier skal foregå i overensstemmelse med instrukserne fra medlemsstaternes myndigheder.

KAPITEL IV

Prøvetagningsprocedurer på bedrifter med klinisk mistænkte svin

1. Når der er mistanke om tilstedeværelse af SVD-virus på en bedrift, fordi der er observeret kliniske sygdomstegn, skal der indsamles prøver fra repræsentative grupper af svin, som viser disse tegn, med henblik på bekræftelse af sygdommen og differentialdiagnosticering over for mund- og klovesyge.
2. De foretrukne prøver til diagnosticering er epitel og blærevæske fra intakte eller nyligt bristede blærer, der er indsamlet fra svin med typiske sygdomstegn, og hvori SVD-virus, -antigen eller -genom kan påvises. Det anbefales, at der udtages prøver fra omkring 5-6 af disse svin.
3. Selv om der er en tilstrækkelig mængde (mindst 1 g) frisk epitelvæv og blærevæske til rådighed, skal følgende prøver også indsamles:
 - a) blodprøver fra mistænkte svin og kontaktsvin til serologisk undersøgelse og
 - b) fæcesprøver fra mistænkte svin og fra gulvet i deres sti og fra tilstødende stier til virologisk undersøgelse.
4. Prøverne skal indsamles og transporteres som følger:
 - a) epitelprøver og blærevæske:
 - der skal om muligt indsamles mindst 1 g epitelvæv fra en intakt eller nyligt bristet blære. Det anbefales at give dyrene et beroligende middel, inden prøverne tages, både for at undgå, at personalet kommer til skade, og for at tilgodese dyrenes velfærd
 - hvis epitelprøverne omgående (mindre end tre timer efter prøvetagningen) transporteres til det nationale laboratorium, kan de transporteres i tør tilstand og nedkølet. Hvis transporttiden kan forventes at overstige tre timer, skal prøverne anbringes i en lille mængde transportmedium bestående af lige dele glycerol og 0,04 M phosphatbufferopløsning eller en tilsvarende bufferopløsning (Hepes), således at pH-værdien holdes inden for det område, der giver de bedste overlevelsesmuligheder for mund- og klovesygevirus (pH-værdi fra 7,2 til 7,6). Transportmediet skal indeholde antibiotika. De egnede antibiotika og koncentrationen heraf pr. ml slutopløsning er:
 - i) penicillin 1 000 IE
 - ii) neomycinsulfat 100 IE
 - iii) polymyxin B sulfat 50 IE
 - iv) mycostatin 100 IE
 - hvis der kan indsamles blærevæske fra en intakt blære, skal den opbevares ufortyndet i en separat beholder

b) blodprøver:

- blodprøver kan indsamles med henblik på serologisk eller virologisk undersøgelse. De indsamles dog normalt kun fra svin, der mistænkes for at være kommet sig af en klinisk eller subklinisk infektion, med henblik på påvisning af antistof, da epitel-, blærevæske- og fæces-prøver fra svin med kliniske tegn er bedre egnet til viruspåvisning end blodprøver. Det anbefales, at der tages koagulerede fuldblodsprøver ved hjælp af vacutainere uden antikoaguleringsmiddel, og at vacutainerne transporteres uåbnet

c) fæcesprøver:

- fæcesprøver fra gulvet i stier, der mistænkes for at huse eller have huset SVD-inficerede svin, eller fækale svaberprøver og fæcesprøver fra mistænkte levende svin skal anbringes i solide, tætte beholdere.

Beholdere med mistænkte prøver skal desinficeres på ydersiden, inden de transporteres til laboratoriet. Følgende er egnede desinfektionsmidler:

- natriumhydroxid (fortynding 1:100)
- formalin (1:9 fortyndet formalinopløsning, der mindst indeholder 34 % formaldehyd) og
- natriumhypochlorit (2 % frit chlor).

Disse desinfektionsmidler skal håndteres med omhu.

KAPITEL V

Metoder til prøvetagning med henblik på serologisk overvågning af SVD

1. Når serologisk overvågning gennemføres med følgende formål:

- a) overvågning på bedrifter, hvor der ikke er bevis for eller mistanke om sygdommens tilstedeværelse
- b) overvågning på slagterier, markeder, opsamlingssteder og lign. ved rutinemæssig udtagning af prøver til serologisk undersøgelse
- c) ikke-diskriminerende overvågning af svin fra andre medlemsstater på importbedriften

skal der indsamles blodprøver fra svinene til serologisk undersøgelse efter bestemmelserne i de programmer eller planer for overvågning eller udryddelse, der er godkendt i henhold til Rådets beslutning 90/424/EØF ⁽¹⁾ eller Rådets direktiv 90/425/EØF ⁽²⁾, eller, hvis sådanne programmer eller planer ikke foreligger, efter de procedurer, som medlemsstaternes myndigheder har fastlagt.

2. Når serologisk overvågning gennemføres med følgende formål:

- a) overvågning af bedrifter i iagttagelsesdistrikter og overvågningsområder, der er blevet afgrænset efter bekræftelse af sygdomsudbrud i henhold til punkt 7 og 8 i bilag II til direktiv 92/119/EØF, eller
- b) overvågning af de bedrifter, der er nævnt i artikel 9 i direktiv 92/119/EØF

skal der indsamles blodprøver fra svinene til serologisk undersøgelse efter følgende procedure:

- når det gælder avlsbedrifter, tages der stikprøver på en sådan måde, at 5 % forekomst af serokonversion påvises med et konfidensniveau på 95 %
- når det gælder bedrifter, der kun holder fedesvin, skal prøvetagningen sikre, at det samlede antal indsamlede prøver mindst svarer til det antal, der kræves til påvisning af en forekomst på 5 % med et konfidensniveau på 95 %. Prøverne skal under alle omstændigheder tages fra så mange tilfældigt udvalgte stier som muligt
- når det gælder blandede avls- og opfedningsbedrifter, skal der tages så mange prøver fra hver separat anbragt gruppe svin, som der kræves for at påvise en 5 % forekomst af serokonversion med et konfidensniveau på 95 %.

KAPITEL VI

Andre foranstaltninger og gentaget prøvetagning ved fund af seropositive svin

1. Ved fund af et enkelt seropositivt svin på en bedrift på grundlag af den i kapitel V, punkt 1, litra a), eller punkt 2 nævnte overvågning, sørger myndighederne for:

- a) at foranstaltningerne efter artikel 4 i direktiv 92/119/EØF anvendes på denne bedrift, hvis det ikke allerede er sket
- b) at der foretages kontrol på bedriften i henhold til kapitel II, punkt 1

⁽¹⁾ EFT L 224 af 18.8.1990, s. 19.

⁽²⁾ EFT L 224 af 18.8.1990, s. 29.

- c) at der tages blodprøver til serologisk undersøgelse fra:
- det mistænkte svin
 - kontaktsvin, der befinder sig i den samme sti som det mistænkte svin og i tilstødende stier: der tages prøver fra disse svin på en sådan måde, at der i stien kan påvises en 50 % forekomst af serokonversion med et konfidensniveau på 95 %.
2. Myndighederne kan dog beslutte at ophæve de i punkt 1, litra a), nævnte foranstaltninger, hvis:
- a) den epidemiologiske undersøgelse i henhold til artikel 8 i direktiv 92/119/EØF tyder på, at der ikke er opstået SVD på bedriften
- b) der ikke er konstateret kliniske tegn på SVD på bedriften, og
- c) bedriften ikke ligger i et overvågningsområde eller et iagttagelsesdistrikt, som er afgrænset efter et bekræftet sygdomsudbrud eller er undergivet andre restriktioner i forbindelse med et bekræftet sygdomsudbrud, og
- under forudsætning af,
- at ingen svin flyttes fra bedriften med henblik på samhandelen inden for EF, og
 - at svin fra den pågældende bedrift kun flyttes til et slagteri til omgående slagting eller til en anden bedrift, hvorfra ingen svin flyttes med henblik på samhandelen inden for EF
- før SVD endeligt kan udelukkes på grundlag af resultaterne af de yderligere kontroller og serologiske prøver.
3. Hvis kontrollen og de serologiske prøver i henhold til punkt 1, litra b) og c):
- a) giver negative resultater eller kun bekræfter et positivt fund med hensyn til det svin, der tidligere er fundet positivt (singletonreagent), kan SVD udelukkes. Foranstaltningerne i henhold til punkt 1, litra a), ophæves, medmindre bedriften ligger i et iagttagelsesdistrikt eller et overvågningsområde omkring et sygdomsudbrud, hvor udryddelsesforanstaltningerne i henhold til punkt 7 eller 8 i bilag II til direktiv 92/119/EØF fortsat skal anvendes
- b) viser, at der er mere end et seropositivt svin på bedriften, må SVD enten bekræftes, eller der må, hvis betingelserne i punkt 4 i bilag II til direktiv 92/119/EØF for bekræftelse af sygdommen ikke er opfyldt, tages yderligere prøver på bedriften efter prøvetagningsprocedurerne i punkt 4.
4. Hvis der påvises mere end et seropositivt svin på en bedrift efter prøvetagningen og de serologiske undersøgelser i henhold til kapitel V, punkt 1, litra a) eller c), eller punkt 2, men betingelserne i punkt 4 i bilag II til direktiv 92/119/EØF for bekræftelse af SVD ikke er opfyldt, sørger myndighederne for:
- a) at bestemmelserne i artikel 4 i direktiv 92/119/EØF anvendes eller fortsat anvendes
- b) at der foretages kontrol på bedriften i henhold til kapitel II, punkt 1
- c) at der indsamles yderligere blodprøver fra seropositive svin og kontaktsvin til serologisk undersøgelse i henhold til punkt 1, litra c)
- d) at der indsamles blodprøver fra svin i andre bygninger på bedriften til serologisk undersøgelse i henhold til kapitel V, punkt 2
- e) at der indsamles et tilstrækkeligt antal fækale prøver til virologisk undersøgelse fra:
- de seropositive svin
 - gulvet i stierne med seropositive svin og i tilstødende stier
 - tilfældigt udvalgte stier i andre bygninger på bedriften.

Fækale prøver, der indsamles i henhold til første og andet led, skal undersøges snarest muligt. Hvis disse prøver er negative, men resultaterne af de serologiske prøver tyder på, at SVD kan have bredt sig til andre bygninger, skal de fækale prøver, der indsamles i henhold til tredje led, også undersøges.

Hvis betingelserne for bekræftelse af SVD i punkt 4 i bilag II til direktiv 92/119/EØF ikke er opfyldt efter disse yderligere kontroller og prøver, skal de seropositive svin aflives eller slagtes i henhold til punkt 4, litra d), i bilag II til direktiv 92/119/EØF. Hvis flere svin er fundet seropositive ud over dem, der allerede er fundet seropositive på grundlag af den tidligere prøvetagning, finder bestemmelserne og procedurerne i litra a), b), c), d) og e) ovenfor tilsvarende anvendelse.

5. Ved fund af et eller flere seropositive svin på grundlag af overvågningsaktiviteterne i henhold til kapitel V, punkt 1, litra b) eller c), skal myndighederne, uden at dette berører foranstaltningerne i henhold til artikel 9 i direktiv 92/119/EØF, sørge for:
- a) at der, hvis det er nødvendigt og gennemførligt, foretages yderligere relevante kontroller, herunder indsamling af prøver, til bekræftelse eller udelukkelse af SVD, på det sted, hvor disse svin er påvist, under hensyntagen til de lokale forhold
 - b) at foranstaltningerne i henhold til artikel 4 i direktiv 92/119/EØF anvendes på disse svins oprindelsesbedrift
 - c) at der foretages kontrol på disse svins oprindelsesbedrift i henhold til kapitel II, punkt 1, og
 - d) at der indsamles blodprøver fra svinene på de seropositive svins oprindelsesbedrift til serologisk undersøgelse i henhold til kapitel V, punkt 2.
6. Myndighederne kan dog beslutte at ophæve foranstaltningerne i henhold til punkt 5, litra b), hvis:
- a) den epidemiologiske undersøgelse i henhold til artikel 4 og 8 i direktiv 92/119/EØF tyder på, at der ikke er opstået SVD på bedriften
 - b) der ikke er konstateret kliniske tegn på SVD på bedriften, og
 - c) bedriften ikke ligger i et overvågningsområde eller et iagttagelsesdistrikt, som er afgrænset efter et bekræftet sygdomsudbrud eller er undergivet andre restriktioner i forbindelse med et bekræftet sygdomsudbrud
- og under forudsætning af:
- at ingen svin flyttes fra bedriften med henblik på samhandelen inden for EF, og
 - at svinene kun flyttes fra bedriften til et slagteri til omgående slagting eller til en anden bedrift, hvorfra ingen svin flyttes med henblik på samhandelen inden for EF
- før SVD definitivt kan udelukkes på grundlag af resultaterne af de yderligere kontroller og serologiske undersøgelser på det sted, hvor de seropositive svin er påvist, og på oprindelsesbedriften.

KAPITEL VII

Principper og anvendelsesområder for virologiske prøver og evaluering af resultaterne

A. Påvisning af virusantigen

1. Den indirekte ELISA-sandwichtest har afløst komplementbindingsprøven som den foretrukne metode til påvisning af SVD-virusantigen. Prøven er den samme som den, der anvendes til diagnosticering af mund- og klovesyge. Prøven for de to sygdomme skal udføres samtidig, medmindre mund- og klovesyge allerede er blevet udelukket. Den anbefales især til epitel- eller væskeprøver fra vesikulære læsioner, hvori der, når der er tale om akut inficerede svin, både kan forekomme SVD- og mund- og klovesygevirus i høje titere ^(*), som kan påvises inden for nogle få timer.

Flere rækker i flerhuls ELISA-plader adsorberes med kaninantiserum mod SVD-virus og hver af de syv serotyper mund- og klovesygevirus. Disse sera binder viruset. Der tilsættes suspensioner af prøvemateriale til hver af rækkerne. Der indgår også egnede kontroller. I næste fase tilsættes de respektive rækker homologt marsvinpåvisningsserum efterfulgt af kaninantimarsvinserum, som er konjugeret til et enzym, såsom peberrodsperoxidase. Der skylles grundigt mellem hver fase for at fjerne ikke bundne reagenser. Der foreligger en positiv reaktion, hvis der opstår en farvereaktion ved tilsætning af kromogen og substrat. Hvis reaktionerne er kraftigt positive, kan de ses med det blotte øje, men resultaterne kan også aflæses spektrofotometrisk, og i så fald angiver en absorbans aflæsning på 0,1 over baggrunden en positiv reaktion.

2. Alternative monoklonalt antistofbaserede ELISA-systemer med anvendelse af udvalgte monoklonale antistoffer som bindende antistof og peroxidasekonjugerede monoklonale antistoffer som påvisningsantistof kan anvendes til påvisning af SVD-antigen i epitelprøver, blærevæske eller inficeret vævskultur og til differentialdiagnosticering over for mund- og klovesyge.
3. En ELISA baseret på monoklonale antistoffer kan anvendes til undersøgelse af antigenvariation mellem stammer af SVD-virus. Virusantigener dyrket på vævskultur bindes ved hjælp af et kanin-hyperimmun-antiserum mod SVD adsorberet til den faste fase. Passende mængder monoklonale antistoffer bringes derpå til at reagere, og bindingen af monoklonale antistoffer til feltstammer sammenlignes med bindingen af monoklonale antistoffer til forældre-stammerne. Identisk binding tyder på tilstedeværelse af epitoper, der er fælles for forældre- og feltstammerne.

^(*) Positive ELISA-resultater er forbundet med tilstedeværelse af mindst 10^5 TCID₅₀ (vævskulturinfricerende doser) virus i prøven.

B. Isolering og dyrkning af virus

1. Klarede suspensioner af prøver af epitel, blærevæske eller fæces, som mistænkes for at indeholde SVD-virus, podes rutinemæssigt på følsomme cellekulturer. Hvis mængden og kvaliteten af de prøver fra vesikulære læsioner, der er indsendt til undersøgelse, er utilstrækkelig til direkte undersøgelse ved ELISA, er det nødvendigt at dyrke virus i vævskultur for at forstærke virusantigenet.
2. Til isolering og dyrkning af virus podes klaret epitelsuspension på enlagscellekulturer af IB-RS-2-celler. Der bør benyttes to fortyndinger af epitelsuspension, den ene stærkt fortyndet (1:500) og den anden svagt fortyndet (1:10), for at undgå, at frigivet interferon interfererer med SVD-virusets vækst. Ved virusisolering tilsættes der kun antibiotika til substratet. Ved differentialdiagnosticering over for mund- og klovesygevirus skal der også podes primære skjoldbruskceller fra kvæg eller babyhamsternyreceller (BHK-21).
3. Hvis der udvikler sig en cytopatisk effekt, høstes supernatanten fra positive kulturer, når effekten er komplet, og benyttes i ELISA til virusidentifikation. Negative kulturer podes på friske vævskulturer 48 eller 72 timer senere, og denne blindpassage undersøges senest 72 timer senere. Hvis der ikke forekommer nogen cytopatisk effekt efter endnu en blindpassage, kan prøven erklæres negativ for tilstedeværelse af levende virus.
4. Suspensioner af fækale prøver kan behandles som beskrevet i punkt 1. Da der normalt er mindre virus i fæces end i epitel, er det nødvendigt at inkludere en tredje blindpassage, hvis der ikke forekommer nogen cytopatisk effekt ved de første to passager.
5. Samtidig podning af en svinecellelinje og et af de ovennævnte vævskultursystemer (helst primære skjoldbruskceller fra kvæg) er en god rettesnor for, om vesikulære prøver indeholder SVD-virus eller mund- og klovesygevirus, da førstnævnte virus kun vil vokse i svineceller. Mund- og klovesygevirusisolater, som i længere tid er blevet overført mellem svin, kan dog også foretrække at vokse i svinecellesystemer.

C. Polymerasekædereaktion (PCR) til påvisning af genom

1. Identifikationsmetoder for nukleinsyre kan benyttes til påvisning af SVD-virusgenom i klinisk materiale ved hjælp af PCR og til at fastslå det indbyrdes forhold mellem isolater af SVD-virus ved bestemmelse af nucleotidsekvensen af en del af genomet. Der er udviklet PCR-metoder, som gør diagnosticeringen mere følsom. Der er beskrevet lidt afvigende omvendt transkriptase-PCR-procedurer, hvor der benyttes primere, som svarer til velbevarede regioner i 1C- og 1D-generne.
2. PCR-metoden er hurtig (resultaterne foreligger normalt inden for 24 timer), påviser alle genotyper af SVD-virus og er følsom nok til at kunne benyttes til prøver fra tilfælde af mistænkt klinisk sygdom.
3. Når der er mistanke om subklinisk infektion, eller når prøver indsamles, efter at den kliniske sygdom er overstået, eller når fækale prøver behandles, opnås der med forbedrede RT-PCR-metoder, som for eksempel nested RT-PCR, immun-PCR, ELISA-PCR og mere forfinede RNA-ekstraktionsmetoder et påvisningssystem, som er mindst lige så følsomt, men væsentligt hurtigere end gentagne passager på vævskultur.
4. Ved sekventering af omkring 200 nucleotider i 1D-genet, som koder for det vigtige strukturprotein VP1, er det muligt at gruppere SVD-virusstammer efter deres sekvenshomologi og epidemiologisk sammenkæde stammer, der forårsager sygdom i forskellige regioner eller på forskellige tidspunkter.

D. Evaluerings af resultaterne af virologiske prøver

Påvisning af SVD-virusantigen eller -genom ved hjælp af ELISA og PCR har samme diagnostiske værdi som virusisolation.

Virusisolationsprøven må dog betragtes som referenceprøven og skal anvendes som bekræftende prøve, når det er nødvendigt, navnlig hvis et positivt ELISA- eller PCR-resultat ikke er forbundet med:

- a) påvisning af kliniske sygdomstegn
- b) fund af seropositive svin eller
- c) en direkte epidemiologisk tilknytning til et bekræftet udbrud.

KAPITEL VIII

Principper og anvendelsesområder for serologiske prøver og evaluering af resultaterne**A. Virusneutralisationsprøve (VN)**

1. Den kvantitative VN-mikroprøve til påvisning af SVD-virusantistof udføres med IB-RS-2-celler eller et tilsvarende cellesystem i fladbundede mikrotiterplader til vævskultur.
2. Virus dyrkes i encellelag af IB-RS-2-celler og opbevares enten ved -20°C efter tilsætning af 50 % glycerol eller ved -70°C uden tilsætning af glycerol. Seraene inaktiveres ved 56°C i 30 minutter, inden prøven udføres.

B. ELISA'er

1. ELISA'en til påvisning af antistoffer er en konkurrerende ELISA baseret på monoklonale antistoffer. Hvis serumprøven indeholder antistoffer mod SVD-virus, vil bindingen af et udvalgt peroxidasekonjugeret monoklonalt antistof til virusantigen blive hæmmet.

I denne ELISA bindes SVD-virusantigenet til den faste fase ved hjælp af monoklonale antistoffer. Derpå inkuberes serumprøverne i en passende fortynding efterfulgt af tilsætning af det peroxidasekonjugerede monoklonale antistof. Derefter måles hæmningen af bindingen af det monoklonale antistof ved hjælp af substrat og kromogen.

2. En indirekte bindings-ELISA med anvendelse af isotypespecifikke monoklonale antistoffer til påvisning af porcint IgG eller IgM, der er specifikt for SVD-virus, kan være en hjælp ved vurderingen af tidspunktet for infektion af svinet eller på den angrebne bedrift.

I den isotypespecifikke ELISA bindes virusantigenet til den faste fase ved hjælp af et antigenbindende antistof. Hvis serumprøven indeholder antistoffer mod SVD-virus, påvises de ved hjælp af et anti-svin-IgG eller et anti-svin-IgM monoklonalt antistof konjugeret med peroxidase. Derefter måles bindingen ved hjælp af substrat og kromogen.

Den isotypespecifikke ELISA kan også hjælpe med til at skelne singletonreagenter fra ægte positive svin, jf. afsnit C.

C. Anvendelse af serologiske prøver og evaluering af resultaterne

1. VN-prøven og ELISA er de anbefalede serologiske prøver. I kapitel X er de referencesera anført, som leveres fra EF-referencelaboratoriet til udførelse af standardiserede serologiske prøver i EF.

VN-prøven må betragtes som referenceprøven, men har den ulempe, at den tager 2-3 dage at udføre og kræver vævskulturfaciliteter.

ELISA er hurtigere og kan lettere standardiseres. Den konkurrerende ELISA baseret på monoklonalt antistof er den hidtil mest pålidelige ELISA for SVD-antistof. Den anbefales som screeningtest for et stort antal prøver.

VN-prøven må dog om nødvendigt anvendes som bekræftende prøve, navnlig efter første påvisning af positive prøver på en bedrift. Der kan ses bort fra svin, som er positive ifølge ELISA, men negative ifølge VN-prøven.

2. Der kan opstå mistanke om tilstedeværelse af en singletonreagent^(*), når der er tale om fund af et enkelt seropositivt svin, eller når følgende kriterier er opfyldt:
 - a) der er ingen kliniske tegn på sygdom på bedriften
 - b) der er ingen relevante fortilfælde af klinisk sygdom på bedriften
 - c) der har ikke været nogen tidligere kontakt med et kendt sygdomsudbrud.
3. Et svin er en bekræftet singletonreagent, når:
 - a) der ikke identificeres andre seropositive svin ved opfølgingsprøver
 - b) prøver, der tages af kontaktsvin efter det første fund af singletonreagenten, ikke afslører serokonversion
 - c) antistoftiteren ved gentaget prøvetagning er konstant eller faldende.

^(*) En lille andel singletonreagenter kan påvises ved alle de gængse serologiske prøver for SVD. Faktorerne, der er bestemmende for singletonreagenter, er ukendte. Serologisk krydsreaktivitet med SVD-virus skyldes måske infektion med en anden, endnu ikke identificeret picornavirus, eller kan skyldes andre ikke specifikke faktorer i serumet.

4. Følgende supplerende kriterier og principper må dog også tages i betragtning ved bekræftelse af en singletonreagent:
- a) forekomsten af singletonreagenter er ca. 1 pr. 1 000 svin
 - b) sera fra singletonreagenter har normalt følgende profil:
 - lav antistoftiter i VN-prøven
 - ikke tydeligt positiv i den konkurrerende ELISA baseret på monoklonale antistoffer
 - udelukkende IgM og ingen IgG i den SVD-isotypespecifikke ELISA ⁽⁷⁾.

KAPITEL IX

Kliniske tegn på og karakteristika ved SVD

SVD er en smitsom svinesygdom, der forårsages af et enterovirus af Picornaviridae-familien, og som kan være en subklinisk, mild eller alvorlig vesikulær tilstand afhængig af virusstamme, eksponeringsvej og infektionsdosis og af de forhold, hvorunder svinene holdes. Supplerende stressfaktorer, såsom transport, sammenblanding med andre svin og ekstreme temperaturer kan også være prædisponerende for udviklingen af kliniske tegn.

SVD er karakteriseret ved let feber og blærer på kronranden, klovballerne, lemmehuden og mindre hyppigt på trynen, læberne, tungen og yveret. Morbiditeten kan være så høj som 100 %, men mortaliteten er ganske lav eller lig nul.

Infektionen kan udvikle sig i en upåfaldende eller mild form, der kun manifesterer sig i en midlertidig forringelse af dyrets almentilstand, men fører til udvikling af virusneutraliserende antistoffer i løbet af nogle få dage ⁽⁸⁾.

Da sygdommen er subklinisk eller mild, opstår der ofte først mistanke efter serologiske prøver med henblik på sygdomsovervågning eller udstedelse af eksportcertifikater. Nylige europæiske udbrud af SVD har været karakteriseret ved mindre alvorlige eller slet ingen kliniske tegn, og diagnosticeringen har ofte været afhængig af serologi.

De kliniske tegn på SVD kan dog ikke skelnes fra de kliniske tegn på mund- og klovesyge. Alle tilstande med blæredannelse skal i starten behandles som mistænkt mund- og klovesyge, og der skal fremskaffes en differentialdiagnose snarest muligt.

Inkubationstiden for SVD hos det enkelte svin er normalt på mellem 2 og 7 dage, hvorefter der forbigående kan opstå feber på op til 41 °C, men de kliniske tegn viser sig måske først efter længere tids forløb. Der udvikler sig derpå blærer på kronranden, typisk ved overgangen til kloven. De kan optræde på hele kronranden og resultere i, at kloven falder af. I sjældnere tilfælde kan der også opstå blærer på trynen, navnlig dorsalt, og på læberne, tungen og yveret, og der kan forekomme overfladiske erosioner på knæene. Angrebne svin kan blive lamme og miste ædelysten i nogle få dage.

Sygdomsforløbet er alvorligere hos yngre svin, selv om mortalitet som følge af SVD er meget sjælden i modsætning til mund- og klovesyge hos unge dyr.

Der er meldt om nervøse tegn, men de er sjældne. Abort er ikke typisk for SVD. Hjertesvigt på grund af multifokal myocarditis kan være et træk ved mund- og klovesyge og encephalomyocarditis, navnlig hos smågrise, men forekommer ikke ved SVD.

Dyrene kommer sig normalt helt i løbet af 2-3 uger med en mørk, horisontal linje på kloven, hvor væksten midlertidig er blevet afbrudt, som eneste tegn på infektion.

Angrebne svin kan udskille virus fra næse og mund og i fæces op til 48 timer, inden de kliniske tegn sætter ind. Der produceres mest virus de første 7 dage efter infektion, og virusudskillelsen fra næse og mund ophører normalt inden for 2 uger. Virus kan isoleres fra fæces i op til 20 dage efter infektion, selv om der er meldt om tilfælde med tilstedeværelse af virus i op til 3 måneder. Det kan overleve i ret lang tid i de nekrotiske væv i forbindelse med bristede blærer og i fæces.

⁽⁷⁾ Specifik IgG alene eller både IgG og IgM påvises normalt i serumprøver fra SVD-virusinficerede svin, mens sera fra singletonreagenter normalt kun indeholder IgM. Specifik IgG vil ikke kunne påvises i serumprøver fra svin, der er blevet inficeret med SVD-virus inden for de forudgående 10-14 dage, selv om specifik IgG bør kunne påvises i endnu en blodprøve. Nyligt inficerede svin kan dog ikke med sikkerhed skelnes fra singletonreagenter, før deres immunreaktion skifter fra IgM- til IgG-produktion. Se også kapitel IX og fodnote 6.

⁽⁸⁾ Specifik IgM kan normalt påvises i blodet fra 2 til 3 dage efter infektion og forsvinder efter ca. 30-50 dage; specifik IgG kan normalt påvises i blodet fra 10 til 14 dage efter infektion og varer nogle år. Ig-isotypen kan bestemmes ved hjælp af den ELISA, der er beskrevet i kapitel VIII, afsnit B, punkt 2.

KAPITEL X

SVD-referencesera

Referenceserum	Oprindelse	Kommentar (7)
1	Normalt svineserum	Negativt kontrolserum
2	Serum indsamlet 21 dage efter infektion fra et svin, som er inficeret med SVD-virusstamme UKG 27/72 (ren)	Stærkt positivt kontrolserum
3	En 1:10-fortynding i normalt svineserum af et serum indsamlet 5 dage efter infektion fra et svin, som er inficeret med SVD-virusstamme Italien 8/94	Et lavpositivt serum fra et svin kort tid efter infektion med et nyligt europæisk isolat af SVD-virus. Serumet er blevet fortyndet, så det giver et lavt positivt resultat i ELISA- og VN-prøven
4	En 1:40-fortynding af et serum indsamlet 21 dage efter infektion fra et svin, som er inficeret med SVD-virusstamme UKG 27/72	Et lavpositivt serum, hvis antistofindhold er det lavest mulige, som EF's nationale referencelaboratorier regelmæssigt kan konstatere positivt ved hjælp af ELISA og virusneutralisation Svarer til serum RS 01-04-94 (8)
5	Serum indsamlet 4 dage efter infektion fra et svin, som er inficeret med SVD-virusstamme UKG 27/72 (ren)	Et lavpositivt serum fra et svin kort tid efter infektion
6	Serum indsamlet 5 dage efter infektion fra et svin, som er inficeret med SVD-virusstamme UKG 27/72 (ren)	Et lavpositivt serum fra et svin kort tid efter infektion

(7) Disse kommentarer vedrører undersøgelsen af de enkelte svin. Ved seroovervågning bør der tages hensyn til den anvendte prøves følsomhed.

(8) Dvs. et serum med en titer, som er så meget højere end påvisningsgrænsen, at det altid giver positivt resultat ved gentagne ELISA- og VN-prøver.