

Anexă
la Ordinul Agenției Naționale
pentru Siguranța Alimentelor
nr. 162 din 26.03.2018



Republica Moldova

GVERNUL REPUBLICII MOLDOVA

AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR

I.P. CENTRUL REPUBLICAN DE DIAGNOSTICĂ VETERINARĂ
SECȚIA VIRUSOLOGIE

MANUAL DE DIAGNOSTIC

pentru

Influența Aviară

CHIȘINĂU 2018

Manualul de Diagnostic pentru Influența Aviară

Prezentul Manual de Diagnostic pentru Influența Aviară transpune prevederile Deciziei Comisiei nr. 437 din 4 august 2006 de aprobare a unui manual de diagnostic pentru influența aviară (OJ, L 118M , 8.5.2007, p. 1285–1311) privind punerea în aplicare a prevederilor Directivei 2005/94/CE din 20.12.2005 privind măsurile comunitare de combatere a influenței aviare și de abrogare a Directivei 92/40/CEE, Deciziei Comisiei Europene nr. 2006/563/CE din 11 august 2006 privind anumite măsuri de protecție în legătură cu prezența influenței aviare produse de tulpini înalt patogene de subtip H5N1 la păsările sălbatice din Comunitate și de abrogare a Deciziei nr. 2006/115/CE și Regulamentului Comisiei Europene nr. 616/2009 din 13 iulie 2009 de punere în aplicare a Directivei 2005/94/CE a Consiliului în ceea ce privește aprobarea compartimentelor de creștere a păsărilor de curte și a compartimentelor de creștere a altor păsări captive în privința gripei aviare, precum și a unor măsuri suplimentare de biosecuritate preventivă în aceste compartimente.

Capitolul I

Introducere, obiective și definiții

1. Pentru a asigura uniformitatea procedurilor utilizate pentru diagnosticul influenței aviare (IA), prezentul manual de diagnostic stabilește:
 - a) orientările și cerințele minime privind procedurile de diagnosticare, metodele de prelevare de eșantioane și criteriile de evaluare a rezultatelor testelor de laborator, în scopul diagnosticării corecte a IA;
 - b) testele de laborator care trebuie efectuate pentru diagnosticarea IA și tehnicile de laborator folosite pentru tipizarea genetică a izolațiilor de virus IA;
 - c) cerințele de biosecuritate și standardele minime de calitate care trebuie respectate de laboratoarele de diagnostic și la transportul eșantioanelor.
2. Prezentul manual de diagnostic se adresează autorităților responsabile de combaterea IA. Prin urmare, manualul se referă în special la principiile și aplicațiile testelor de laborator și la evaluarea rezultatelor testelor, precum și la tehnicile de laborator.
3. În sensul prezentului manual de diagnostic, pe lângă definițiile care figurează la articolul 2 din Directiva 2005/94/CE, se înțelege prin:
„eșantion de diagnostic”: orice materie animală, inclusiv un cadavru întreg, transportată pentru diagnosticare sau cercetare, cu excepția animalelor vii infectate.
4. Confirmarea IA la păsările de curte și la alte păsări captive trebuie să se efectueze în conformitate cu procedurile, metodele de prelevare de eșantioane și

criteriile de evaluare a rezultatelor testelor de laborator stabilite în prezentul manual de diagnostic și să se bazeze pe unul sau mai multe criterii menționate la literele a), b) și c):

- a) detectarea virusului infecțios, a antigenului sau a materialului genetic specific, în eșantioane de țesuturi, de organe, de sânge sau de materii fecale de la păsările de curte sau de la alte păsări;
- b) detectarea, la păsări, a semnelor clinice și a leziunilor post mortem ale bolii;
- c) demonstrarea formării de anticorpi specifici în eșantioane de sânge de la păsările respective.

5. Confirmarea infectării mamiferelor cu un virus influența A de origine aviară înalt patogen sau, în cazul în care este slab patogen, care aparține subtipurilor H5 și H7, trebuie să se bazeze pe unul sau mai multe criterii dintre cele menționate la literele a) și b);

- a) detectarea virusului infecțios al IA, a antigenului sau a materialului genetic specific în eșantioane de țesuturi, organe, sânge sau materii fecale de la mamifere;
- b) demonstrarea formării de anticorpi specifici în eșantioane de sânge de la mamiferele respective;

6. Procedurile, metodele de prelevare a eșantioanelor și criteriile de evaluare a rezultatelor testelor de laborator trebuie să fie:

- a) cele descrise în prezentul manual de diagnostic sau
- b) cele autorizate de autoritatea competentă, sub rezerva următoarelor condiții:
 - în cazul în care s-a stabilit, în urma unui test comparativ organizat de laboratorul internațional de referință pentru influența aviară, că sensibilitatea și specificitatea testelor de laborator autorizate sunt adecvate; sau
 - atunci când laboratorul internațional de referință nu a organizat nici o evaluare de acest gen pentru un anumit tip de test de laborator, sensibilitatea și specificitatea testului de laborator autorizat au fost validate de laboratorul național de referință, astfel încât testul de laborator este adaptat scopului în care este efectuat; rezultatele validării trebuie să fie prezentate laboratorului internațional de referință pentru examinare.

Capitolul II

Descrierea IA cu accent pe diagnosticul diferențial

1. Etiologie și virulență

IA este o infecție virală foarte contagioasă cauzată de viruși din familia Orthomyxoviride, genul Influenzavirus A. Virusurile influența A sunt singurele din familia Orthomyxovirus a căror capacitate de a infecta păsările a fost stabilită. S-a demonstrat că numeroase specii de păsări erau sensibile la infecția cu virusul influența A; în cazul în care păsările acvatice constituie primul rezervor al

virusului respectiv, o majoritate covârșitoare a izolațiilor erau slab patogeni la pui și la curcani, principalele păsări cu importanță economică atinse de maladie.

Virusurile influența A au nucleoproteine înrudite antigenic și proteine matriciale înrudite antigenic, dar sunt clasificate în subtipurii în funcție de caracterele antigenice ale glicoproteinelor de suprafață, hemaglutinină (HA) și neuraminidază (NA). Până în prezent au fost identificate șaisprezece subtipurii de HA (H1-H16) și nouă subtipurii de NA (N1-N9). Fiecare virus influența A conține un antigen HA și un antigen NA, aparent combinate în toate modurile posibile.

Virusurile influența A se împart în două grupe, în funcție de capacitatea lor de a provoca boala la păsările de curte sensibile:

- a) virusurile influenței aviare hiper patogene (HPAI), care provoacă o boală extrem de gravă caracterizată printr-o infecție generalizată a păsărilor de curte contaminate și o mortalitate foarte ridicată (până la 100 %) în cadrul efectivului;
- b) virusurile influenței aviare latent patogene (LPAI), care provoacă la păsările de curte o afecțiune benignă, în principal respiratorie, exceptând cazurile în care este exacerbată de alte coinfecții sau de alți factori.

Păsările sălbatice, în special păsările de apă migratoare, joacă un rol foarte important în calitate de rezervoare ale virusului influența A, astfel cum a arătat izolarea a aproape tuturor combinațiilor posibile ale subtipurilor HA și NA la păsările sălbatice. În general, la păsările sălbatice sunt detectate numai virusurile LPAI, cu excepția cazurilor răspândirii HPAI de către păsările de curte infectate.

Introducerea inițială a virusului IA în exploatațiile avicole rezultă cel mai probabil dintr-un contact direct sau indirect cu păsări sălbatice.

E posibil ca virusurile LPAI introduse de un rezervor sălbatic să poată circula la păsările domestice fără să fie detectate, dat fiind faptul că semnele clinice sunt adesea discrete, chiar absente.

O dată introduse la păsările de curte, sușele de virus LPAI aparținând subtipurilor H5 și H7 pot suferi mutații pentru a produce sușe HPAI. Până în prezent s-a stabilit că doar virusurile din subtipurile H5 și H7 provoacă HPAI.

Deși se pare că la transformarea virusului LPAI în virus HPAI intervin mai multe mecanisme, factorii care stau la originea acestui mecanism sunt necunoscuți. În anumite cazuri, mutația pare să se fi produs rapid, la situl inițial, după transmiterea prin păsări sălbatice, în timp ce în alte cazuri virusul LPAI a circulat la păsările de curte timp de câteva luni înainte de a suferi mutații. Prin urmare, este imposibil să se prevadă dacă și când va surveni o astfel de mutație. Cu toate acestea, se poate presupune pe drept că riscul de mutație la virusul HPAI este cu atât mai mare cu cât circulația virusului LPAI la păsările de curte este mai mare.

Perioada de incubație este dificil de estimat și probabil variază în funcție de sușa virusului și de gazdă. În general, se citează o cifră de cinci – șase zile; cu toate acestea, limita pentru diferitele păsări variază de la câteva ore până la aproximativ șapte zile.

2. Semne clinice la păsările infectate cu un virus HPAI

Semnele clinice sunt foarte diferite și sunt influențate de factori, precum virulența virusului care se află la originea infecției, specia afectată, vârstă, sex, prezența altor boli și mediul înconjurător.

Semnele precoce pot fi următoarele: anorexie, diminuarea cantității de apă ingerată și mortalitate relativ scăzută. Cu toate acestea, este posibil și ca boala să apară subit la un efectiv și să provoace moartea unui număr mare de păsări care nu prezentau nici un semn premonitoriu sau prezentau semne minime, spre exemplu depresie, anorexie, pene zburlite și febră. În general, cu cât păsările supraviețuiesc mai mult, cu atât semnele clinice sunt mai clare. Termenul de apariție a semnelor depinde de virus, de gazdă și de doza infectantă inițială, precum și de sistemul de creștere. Virusul se răspândește mai lent la găinile ouătoare din baterii sau la păsările care trăiesc în aer liber, decât la cele din cotețele pentru îngrășare.

La început, găinile infectate cu virusul HPAI pot face ouă cu coaja moale, dar apoi se opresc de îndată din ouat. Păsările bolnave sunt adesea într-o stare de semicomă, stând așezate sau în picioare, cu capul atingând solul. Crestele și carunculele lor sunt cianozate și edematoase și pot prezenta, la extremități, hemoragii cu peteșii sau cu echimoze. Apare adesea o diaree apoasă abundentă și păsărilor le este extrem de sete. Respirația poate fi dificilă și se poate observa o lăcrimare excesivă. Se pot constata hemoragii în zonele cutanate fără pene. Ratele de mortalitate în cadrul efectivului variază de la 50 la 100 %.

La puii de carne, semnele HPAI sunt adesea mai puțin evidente decât la alte păsări de curte și constau, în general, într-o depresie severă și în anorexie; creșterea clară a mortalității poate fi prima anomalie observată. De asemenea, se mai poate constata un edem la cap și la gât, precum și semne neurologice, cum ar fi torticolis și ataxia.

HPAI la curcani este asemănătoare cu cea observată la păsările domestice, dar anumite virusuri HPAI par mai virulente la curcani, iar altele mai puțin virulente.

La găștele infectate cu virusul HPAI, semnele de depresie, de anorexie și de diaree sunt comparabile cu semnele observate la găinile ouătoare, dar sunt adesea însoțite de o umflare a sinusurilor. Păsările tinere pot prezenta semne neurologice.

Rațele infectate cu un virus HPAI pot să nu prezinte nici un semn clinic. Cu toate acestea, s-a semnalat faptul că anumite sușe induc la rațe semne comparabile cu cele observate la găște, însoțite de o anumită mortalitate.

În ceea ce privește infecția struților africani cu un virus HPAI sau LPAI, semnele clinice pot lipsi. În cazul focarelor de HPAI cum au fost cele apărute în Italia în 1999/2000, s-a arătat că bibilicile și prepelițele japoneze erau sensibile la infecții, iar semnele prezente și mortalitatea erau asemănătoare cu felul în care se manifesta boala la pui sau la curcani. Cu toate acestea, studiile experimentale au stabilit că prepelițele sunt rezistente la anumite sușe HPAI. Pentru toate păsările, prezența anticorpilor dirijați împotriva aceluiași subtip H, indiferent dacă este consecința unei vaccinări sau a unei infectări naturale, poate însemna că infecția cu virusul HPAI nu determină semne clinice evidente.

3. Leziuni post mortem la păsările infectate cu virusul HPAI

Păsările care mor în faza foarte acută pot prezenta leziuni macroscopice minime, care constau în deshidratare și congestie viscerală și musculară.

La păsările care mor după o evoluție clinică prelungită, sunt prezente pe tot corpul hemoragii cu peteșii sau cu echimoze, în special în laringe, trahee, proventricul și în țesutul adipos al epicardului, precum și pe suprafețele seroase adiacente sternului. Se observă un important edem subcutanat, în special în jurul capului și al jaretelor. Cadavrul poate fi deshidratat. În splină, ficat, rinichi și plămâni pot fi prezente focare necrotice galbene. Sacul alveolar poate conține un exsudat. Splina poate prezenta o creștere a volumului și poate fi hemoragică.

Din punct de vedere histologic, IA se caracterizează prin tulburări vasculare care duc la formarea unui edem, hemoragii și infiltrație perivasculară, în special în miocard, splină, plămâni, creier, pancreas și caruncule. Se observă focare necrotice în plămâni, ficat și rinichi. În creier se pot observa glioză, proliferare vasculară și degenerare neuronală.

4. Diagnostic diferențial

În diagnosticul diferențial al HPAI trebuie să se ia în considerare, în special, următoarele boli:

- a) alte boli care provoacă o puternică mortalitate subită:
 - boala Newcastle;
 - laringotraheita infecțioasă;
 - pesta rațelor;
 - intoxicații acute;
- b) alte boli care provoacă o umflare a creștelor și a carunculelor, precum:
 - holera aviară (forma acută) și alte maladii septicemice;
 - celulita bacteriană a crestei și a carunculelor.

5. Semne clinice la păsările infectate cu un virus LPAI

Gravitatea bolii induse de virusul LPAI este mult influențată de:

- a) sușa virusului;
- b) specia și vârsta gazdei;

c) starea imunitară a gazdei față de virus, în special, prezența altor agenți infecțioși, precum:

- *Pasteurella* spp.;
- virusul bolii Newcastle (inclusiv sușe vaccinale);
- pneumovirusul aviari, virusul bronșitei infecțioase;
- *E. coli*;
- *Mycoplasma* ssp.;

d) patologii imunodeficitare:

e) factori de mediu (precum excesul de amoniac, praf, temperaturi crescute sau scăzute).

Pe de o parte, semnele clinice ale bolii pot fi invizibile sau discrete, luând numai forma unor semne respiratorii puțin grave sau a unor aspecte de producție de ouă la păsările de curte ouătoare. Pe de altă parte, infecțiile cu virusul LPAI se pot potrivi cu semne clinice severe ale bolii, în special la curcani, constând în general în raluri, tuse și o umflare a sinusurilor infraorbitare însoțite de o stare febrilă asociată cu pierdere de apetit și mortalitate ridicată.

LPAI se poate confunda cu numeroase maladii care provoacă semne respiratorii sau intestinale sau poate fi complicată de maladiile respective. Trebuie să se suspecteze prezența IA de fiecare dată când păsările sunt atinse de o boală care nu dispare în ciuda aplicării măsurilor preventive și terapeutice adaptate la alte boli.

6. Semne clinice la păsările captive

Gama semnelor clinice poate fi foarte largă și, precum în cazul păsărilor de curte, poate varia de la semne invizibile la semne severe ale bolii, însoțite de o mortalitate ridicată.

În general, infecția se răspândește mai lent într-un grup de păsări captive din cauza diversității speciilor prezente: sensibilitățile lor sunt diferite, nivelul de excreție al virusului este eterogen, iar transmiterea se face adesea relativ lent din cauza unui contact redus și a densităților reduse ale populațiilor.

Capitolul III

Orientări de luat în considerare în cazul suspiciunii de IA într-o exploatație

Variabilitatea semnelor clinice, atât pentru HPAI, cât și pentru LPAI este atât de mare încât este imposibil să se stabilească orientări bine definite pentru focarele suspectate. O mortalitate ridicată, bruscă, la păsările de curte, însoțită sau nu de semnele clinice descrise la capitolul II, trebuie să facă obiectul unei anchete constând, în special, din trimiterea de eșantioane pentru efectuarea cercetărilor de laborator. În schimb, în absența unei mortalități ridicate, este mai dificil să se suspecteze sau să se excludă prezența IA.

Dat fiind faptul că un diagnostic rapid al HPAI sau al LPAI cauzat de subtipurile H5 și H7 prezintă o importanță capitală pentru combaterea și eradicarea rapidă a bolii, IA trebuie luată mereu în considerare în diagnosticul diferențial al

problemelor respiratorii, al problemelor privind producția de ouă și al creșterii mortalității la păsările de curte și trebuie prezentate eșantioane potrivite pentru cercetările de laborator.

CAPITOLUL IV

Proceduri generale pentru prelevarea și transportul eșantioanelor

1. Legislația națională și manualul de diagnostic

Atunci când Norma sanitar-veterinară privind măsurile de supraveghere, control și combatere a gripei aviare, aprobată prin HG nr. 939 din 04.08.2008 cu modificările și completările ulterioare (în continuare *Norma sanitar – veterinară*), Planul de contingență al RM pentru IA și Manualul operațional pentru intervenția în focarele de IA, aprobate prin Ordinul ANSA nr.102 din 30.04.2014 fac trimitere la manualul de diagnostic, trebuie să se efectueze cercetări și să se preleveze eșantioane și totodată trebuie să se aplice procedurile de supraveghere în conformitate cu prezentul capitol din manualul de diagnostic.

2. Proceduri de urmat în cazul suspectării unor focare de IA

În cazul în care medicul veterinar oficial are o suspiciune clinică privind existența unui focar de IA sau atunci când rezultatele unui test de laborator pentru boala menționată nu sunt negative, autoritatea competentă trebuie să se asigure că se va efectua o anchetă care să respecte procedurile descrise în prezentul capitol din manualul de diagnostic, în conformitate capitolului III din Norma sanitar - veterinară și că ancheta respectivă va fi dusă la bun sfârșit înainte de a exclude prezența bolii.

3. Interpretarea testelor virusologice

Autoritatea competentă poate considera că prezența virusului IA poate fi exclusă atunci când un număr corespunzător de păsări bolnave sau moarte și de tampoane traheale/orofaringeale sau cloacale au fost supuse, în conformitate cu prezentul capitol, detectării virusului respectiv sau a genomului său, iar rezultatele testelor realizate în conformitate cu una dintre metodele de detectare a virusului menționate la capitolul V sau VI sau autorizate de către autoritatea competentă în conformitate cu punctul 6 litera (b) din capitolul I al prezentului Manual au fost negative.

4. Ansamblu standard de eșantioane pentru testele virusologice sau serologice în laborator

Pentru ancheta privind o exploatație suspectată de infecția cu virusul IA, trebuie prelevate și trimise direct eșantioanele menționate la literele a) și b), care alcătuiesc ansamblul standard pentru testele virusologice sau serologice („eșantioane standard”) în vederea efectuării testelor virologice și serologice în laborator.

a) Ansamblul standard de eșantioane pentru testele virusologice este alcătuit din următoarele:

- cel puțin cinci păsări bolnave/moarte, în cazul în care există și/sau;
- cel puțin douăzeci de tamponare traheale/orofaringeale și douăzeci de tamponare cloacale.

Cadavrele trebuie să provină de la păsări moarte cu puțin timp înainte și care erau grav bolnave sau muribunde și au fost eutanasiate.

Tamponarele trebuie prelevate de la un număr de păsări identic cu cel menționat la litera a) sau de la toate păsările din exploatarea suspectată, în cazul în care sunt mai puține. Eșantioanele trebuie să fie prelevate mai întâi de la păsările care prezintă semne clinice ale bolii.

Tamponarele cloacale trebuie să fie acoperite de excremente (cantitate optimă: 1 g.). În cazul în care, dintr-un motiv oarecare, nu se pot preleva tamponare cloacale de la păsările vii, o altă soluție o pot reprezenta eșantioanele de excremente proaspete colectate cu grijă.

Adesea este mai practic să se preleveze tamponare traheale/orofaringeale din cavitatea bucală.

De îndată ce se cunosc caracteristicile de creștere a virusului, autoritatea competentă poate decide să preleveze un singur tip de tamponare fie traheale/orofaringeale, fie cloacale, în loc de două, în funcție de locul în care replicarea virusului este mai importantă – în căile respiratorii sau în cele gastrointestinale – și, de asemenea, în funcție de specia implicată.

b) Ansamblul standard de eșantioane pentru testele serologice este alcătuit din cel puțin douăzeci de eșantioane de sânge.

Eșantioanele trebuie prelevate de la un număr de păsări identic cu cel menționat la litera b) sau de la toate păsările din exploatarea suspectată, în cazul în care sunt într-un număr mai mic. Eșantioanele trebuie să fie prelevate de la păsările care par bolnave sau de la cele care aparent s-au recuperat de curând.

Autoritatea competentă poate decide că nu este necesară prelevarea unei serii complete de eșantioane standard, ci numai a unui subansamblu din eșantioanele respective.

5. Transportul eșantioanelor

O atenție specială se va acorda conservării și transportului eșantioanelor către laborator în vederea analizelor.

Tamponarele trebuie refrigerate de îndată în gheață sau cu blocuri de răcire și trimise la laborator cât mai repede posibil. Cu excepția cazurilor de necesitate absolută, eșantioanele nu trebuie congelate. În cazul în care nu pot fi duse la laborator în termen de douăzeci și patru de ore, eșantioanele trebuie congelate de îndată, depozitate și apoi transportate în zăpadă carbonică.

Tampoanele trebuie depozitate într-un mediu antibiotic sau într-un mediu de transport viral specific la 4 °C, astfel încât să fie complet imersate (scufundate în lichid). În lipsa unui astfel de mediu, tampoanele trebuie reaşezate în învelișul lor și trimise uscate la laborator în vederea analizelor.

Stocarea și transportul eșantioanelor pot fi influențate de diverși factori. Prin urmare, metoda de transport trebuie adaptată ca atare.

6. Mediu antibiotic

Mediul antibiotic trebuie să aibă la bază o soluție salină tamponată cu fosfat cu valoarea pH-ului cuprinsă între 7,0 și 7,4 (se controlează după adăugarea antibioticelor), în special în timpul transportului.

Mediile pe bază de proteine, precum lichidul cord-creier sau lichidul triptoză tamponat cu tri, pot conferi virusului o mai mare sensibilitate, în special în timpul transportului.

Antibioticele folosite și concentrațiile acestora se pot modifica în funcție de condițiile locale și de disponibilități.

Pentru eșantioanele fecale pot fi necesare cantități foarte mari de antibiotice. Cantitățile potrivite sunt următoarele: 10 000 UI/ml penicilină, 10 mg/ml streptomycină, 0,25 mg/ml gentamicină și 5 000 UI/ml nistatină. Cantitățile menționate pot fi cu de până la cinci ori mai reduse pentru țesuturile și eșantioanele traheale.

În cazul în care se dorește neutralizarea *Chlamydothilei*, trebuie să se adauge 0,05 – 0,1 mg/ml oxitetraciclină.

7. Mediu lichid cord-creier

Soluția trebuie preparată în apă și trebuie să conțină 15 % p/v pudră de lichid cord - creier înainte de sterilizare (cu autoclavă la 121°C/15 minute).

După sterilizare, antibioticele trebuie adăugate după cum urmează: 10 000 UI/ml penicilină G, 20 µg amfotericină B și 1 000 µg/ml gentamicină. Mediile se pot conserva la 4 °C timp de maximum două luni.

8. Proceduri care trebuie aplicate în ceea ce privește dispozițiile corespunzătoare ale Normei sanitar - veterinare privind măsurile de supraveghere, control și combatere a gripei aviare, aprobată prin HG nr. 939 din 04.08.2008 (în continuare Norma sanitar veterinară)

8. A. Focare suspecte

8.1. Cap. III - Măsuri care trebuie aplicate în exploatațiile în care sunt suspectate focare

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație unde este suspectat un focar, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației, în cazul în care există astfel de registre. Informațiile referitoare la mortalitatea zilnică și datele zilnice privind producția de ouă, precum și cantitățile de alimente și/sau de apă ingerate în perioada care începe cu o săptămână înainte de data apariției semnelor clinice ale IA și se încheie în ziua inspectării exploatației de către medicul veterinar oficial trebuie documentate în raportul de inspecție întocmit de medicul veterinar oficial;
- b) re realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captive, în special a celor care par bolnave;
- c) eșantioanele standard trebuie prelevate din fiecare unitate de producție, cu excepția cazurilor în care autoritatea competentă a putut stabili că un focar suspectat poate fi exclus pe baza inspecției clinice realizate în conformitate cu literele a) și b);
- d) în mod independent de rezultatele negative la testele efectuate pe eșantioane standard și în funcție de factorii locali, trebuie să se efectueze o inspecție clinică a păsărilor de curte în fiecare unitate de producție înainte de a putea ridica supravegherea oficială.

8.2. Măsuri suplimentare justificate printr-o anchetă epidemiologică

În fiecare unitate de producție trebuie prelevate eșantioane standard de la păsările de curte sau de la alte păsări captive ucise.

8. B. Influența aviară înalt patogenă (HPAI)

8.3. Cap. IV, pct.14, alineatul 4 din Norma sanitar - veterinară - Măsuri care trebuie aplicate referitor la păsările de curte provenite din ouă recoltate în exploatații în care au fost confirmate focare

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație care deține păsări de curte deja ieșite din ouă recoltate pe parcursul perioadei de incubație într-o exploatație în care a fost confirmată prezența HPAI, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației. Informațiile referitoare la mortalitatea zilnică și, în cazul în care sunt disponibile, datele zilnice privind cantitățile de alimente și/sau de apă ingerate în perioada care începe cu o săptămână înainte de data apariției semnelor clinice ale HPAI și se încheie în ziua inspectării exploatației de către medicul veterinar oficial trebuie documentate în raportul de inspecție întocmit de către medicul veterinar oficial;

- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție și a unei examinări clinice a păsărilor de curte, în special a celor care par bolnave sau care nu cresc astfel cum s-a estimat;
- c) eșantioanele standard trebuie prelevate de la păsări de curte cu vârsta de două-trei săptămâni;
- d) măsurile de supraveghere oficială a exploatării pot fi ridicate după examinarea clinică a păsărilor mai mari de douăzeci și una de zile și după obținerea unor rezultate negative la testele efectuate pe eșantioane standard.

8.4. Cap. IV, pct.14 – Derogări privind anumite exploatații

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație care a primit autorizația de derogare, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației, în cazul în care există astfel de registre;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a păsărilor captive, în special a celor care par bolnave;
- c) în locul eșantioanelor standard, eșantioanele care trebuie prelevate din fiecare unitate de producție în vederea efectuării testelor de laborator, la douăzeci și una de zile după data ultimului rezultat pozitiv care atestă prezența HPAI și apoi la intervale de douăzeci și una de zile, sunt următoarele:
 - eșantioane prelevate de la toate păsările de curte sau de la alte păsări captive moarte care au fost prezente în momentul prelevării eșantioanelor;
 - atunci când se poate, tamponare traheale/orofaringeale și cloacale prelevate de la cel puțin șaiszeci de păsări de curte sau păsări captive sau de la toate păsările de curte sau captive în cazul în care exploatația are mai puțin de șaiszeci de păsări; sau, în cazul în care este vorba de mici păsări exotice care nu sunt obișnuite să fie manipulate sau a căror manipulare ar fi periculoasă pentru oameni, eșantioane de excremente proaspete.

Cu toate acestea, autoritatea competentă poate acorda derogări în ceea ce privește mărimea eșantionului menționat la lit. c) abzațul 1 și 2, pe baza rezultatelor unei evaluări a riscurilor;

Prelevarea eșantioanelor menționate la litera c) și analiza în laborator a eșantioanelor respective trebuie să continue până când se vor obține două rezultate de laborator negative consecutive, la un interval de cel puțin 21 de zile.

8.5. Măsuri care trebuie aplicate în exploatațiile de contact

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație de contact, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației, în cazul în care există astfel de registre. În cazul în care sunt disponibile, datele privind mortalitatea zilnică și datele zilnice privind cantitățile de alimente și/sau de apă ingerate în perioada care începe cu o săptămână înainte de data contactului cu efectivul suspectat de a fi infectat cu IA și se încheie în ziua inspectării exploatației de către medicul veterinar oficial trebuie documentate în raportul de inspecție întocmit de medicul veterinar oficial;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a păsărilor captive, în special a celor care par bolnave;
- c) în cazul prezenței la păsările de curte sau la alte păsări captive a unor semne clinice sau a unor elemente care indică o creștere a mortalității zilnice (nivel de mortalitate a efectivului de peste trei ori mai ridicat) sau o scădere a producției zilnice de ouă (>5 %) sau o diminuare a cantităților de elemente și/sau de apă ingerate zilnic (> 5 %), trebuie să se preleveze de îndată eșantioanele standard din fiecare unitate de producție;
- d) în absența semnelor menționate la literele b) și c), eșantioanele standard trebuie prelevate la douăzeci și una de zile după data ultimului contact suspectat cu o exploatație infectată sau în momentul uciderii păsărilor de curte sau a altor păsări captive.

8.6. Recensământ, inspecții efectuate de medicul veterinar oficial și supravegherea exploatațiilor situate în zona de protecție

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație comercială, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației. În cazul existenței unor elemente care indică o creștere a mortalității zilnice (nivel de mortalitate normal al efectivului de peste trei ori mai ridicat) sau o scădere a producției zilnice de ouă (>5 %) sau o diminuare a cantităților de elemente și/sau de apă ingerate zilnic (> 5 %), trebuie să se preleveze eșantioanele standard din fiecare unitate de producție;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte și a altor păsări captive, în special a celor care par bolnave;
- c) atunci când este posibil ca speciile de păsări de curte sau captive să nu prezinte în mod clar semnele clinice ale bolii sau în cazul păsărilor vaccinate, autoritatea competentă poate hotărî, pe baza rezultatelor unei evaluări a riscurilor, că trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție;

- d) în funcție de rezultatele evaluării riscurilor, autoritatea competentă trebuie să hotărască dacă trebuie luate măsuri suplimentare de supraveghere oficială pentru exploatații, sectoare de creștere sau tipuri țintă de producție, sub forma inspecțiilor clinice și a prelevării de eșantioane în vederea efectuării testelor de laborator.

8.7. Cap. IV, pct. 22, lit. h) - Măsuri care trebuie aplicate în exploatațiile situate în zonele de protecție

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație în care s-a semnalat o creștere a morbidității sau a mortalității sau o modificare a datelor de producție, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației. În cazul existenței unor elemente care indică o creștere a mortalității zilnice (nivel de mortalitate normal al efectivului de peste trei ori mai ridicat) sau o scădere a producției zilnice de ouă (>5 %) sau o diminuare a cantităților de elemente și/sau de apă ingerate zilnic (> 5 %), trebuie să se preleveze eșantioanele standard din fiecare unitate de producție;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a păsărilor captive, în special a celor care par bolnave;

8.8. Derogări pentru transportul direct al păsărilor de curte în vederea abatorizării imediate

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație care a primit autorizația de derogare de la **cap. IV, pct. 24, lit. b)**, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte, în special a celor care par bolnave, cu mai puțin de douăzeci și patru de ore înainte de ora plecării;
- c) pe baza rezultatelor evaluării riscurilor efectuate de către autoritatea competentă, trebuie să se preleveze din fiecare unitate de producție, în locul eșantioanelor standard, cel puțin șaiszeci de tamponare traheale/orofaringeale și/sau șaiszeci de tamponare cloacale de la păsările destinate abatorizării, cu mai puțin de patruzeci și opt de ore înainte de ora plecării.

8.9. Cap. IV, pct.26 - Derogări pentru transportul direct al păsărilor de curte pregătite de ouat

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație care a primit autorizația de derogare de la pct. 23 al Normei sanitar veterinare, măsurile care trebuie aplicate înainte de transportul direct al păsărilor pregătite pentru ouat sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte, în special a celor care par bolnave, cu mai puțin de douăzeci și patru de ore înainte de ora plecării;
- c) pe baza rezultatelor evaluării riscurilor efectuate de autoritatea competentă, trebuie să se preleveze din fiecare unitate de producție, în locul eşantioanelor standard, cel puțin şaiszeci de tampoane traheale/orofaringeale și/sau şaiszeci de tampoane cloacale de la păsările din fiecare unitate de producție destinate transportului, cu mai puțin de patruzeci și opt de ore înainte de ora plecării.

8.10. Cap. IV, pct. 27 – Derogare pentru transportul direct al ouălor destinate incubăției și al ouălor pentru consum

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație de efective de reproducție care a primit autorizația de derogare de la cap.IV, pct. 27, măsurile care trebuie aplicate înainte de transportul direct al ouălor destinate incubăției sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție o dată la fiecare cincisprezece zile;
- c) trebuie prelevate eşantioane standard din fiecare unitate de producție.

8.11. Cap. IV, pct. 30 – Durata măsurilor

Măsurile care se aplică în zona de protecție în conformitate cu cap.IV, pct. 30 pot fi ridicate cel mai devreme la douăzeci și una de zile după data încheierii operațiunilor preliminare de curățare și de dezinfectare a exploatațiilor infectate, cu respectarea următoarelor condiții:

- a) toate exploatațiile comerciale situate în zona de protecție au fost inspectate de un medic veterinar oficial și toate controalele, inspecțiile clinice și testele de laborator menționate la punctul 8.6 literele a), b) și c), precum și la punctul 8.7 au avut rezultate negative;
- b) toate exploatațiile necomerciale identificate situate în zona de protecție au fost inspectate de un medic veterinar oficial și nici examinarea clinică, nici rezultatele testelor de laborator efectuate nu au condus la o suspiciune de infecție cu IA;
- c) eventuala supravegherea oficială suplimentară efectuată în conformitate cu

punctul 8.6 litera d) a avut rezultate negative.

8.12. Cap. IV, pct. 31 – Măsurile care trebuie aplicate în zona de supraveghere

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație în care s-a semnalat o creștere a morbidității sau a mortalității sau o modificare a datelor de producție, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau captive, în special a celor care par bolnave;
- c) trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție.

8.13. Cap. IV, pct. 34– Anchetă asupra suspiciunii prezenței HPAI în abatoare și mijloace de transport

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează exploatația de origine a păsărilor de curte prezente într-un abator sau într-un mijloc de transport, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației, în cazul în care astfel de registre există;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captive și va fi realizată în colaborare cu medicul veterinar oficial al abatorului, care trebuie să comunice eventualele date de la inspecțiile anterioare și rezultatele examinărilor ante mortem și post mortem;
- c) trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție, cu excepția cazurilor în care autoritatea competentă a putut stabili că prezența suspectată a HPAI poate fi exclusă pe baza anchetei veterinare efectuate în conformitate cu literele a) și b);
- d) pe lângă eșantioanele standard, trebuie trimise la laborator pentru efectuarea testelor eșantioane prelevate de la cel puțin cinci păsări bolnave, moarte sau abatorizate prezente în abator și la care se observă semne patologice.

8.14. Cap. IV, pct. 34 – Măsurile care trebuie aplicate în abatoare

După încheierea anchetei menționate la punctul 8.13, supravegherea oficială poate fi ridicată cu condiția ca rezultatele testelor de laborator să fie negative și să nu existe suspiciune clinică a prezenței HPAI în exploatația de origine și în abator.

8.15. Cap. IV, pct. 36 – Măsurile care trebuie aplicate în punctele de control la frontieră și în mijloacele de transport

8.15.1. Atunci când un medic veterinar oficial examinează păsările de curte sau alte păsări captive ținute în izolare, care erau prezente într-un punct de control la frontieră sau într-un mijloc de transport și au fost transportate în altă parte din cauza unei suspiciuni sau a unei confirmări a prezenței HPAI, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul documentelor și al registrelor corespunzătoare, în cazul în care astfel de documente sau registre există;
- b) examinarea clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captive ținute în izolare și inspecția clinică a celorlalte păsări de curte sau captive, în special a celor care par bolnave;
- c) trebuie prelevate eșantioane standard de la păsări de curte sau de la alte păsări captive alese din diferite baterii sau lăzi de transport.

8.15.2. Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație de origine identificată în cazul abatorizării păsărilor de curte sau a altor păsări captive, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației, în cazul în care există astfel de registre;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captive și va fi realizată în colaborare cu medicul veterinar oficial al abatorului, care trebuie să comunice eventualele date de la inspecțiile anterioare și rezultatele examinărilor ante mortem și post mortem;
- c) trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție, cu excepția cazurilor în care autoritatea competentă a putut stabili că prezența suspectată a HPAI poate fi exclusă pe baza anchetei veterinare efectuate în conformitate cu literele a) și b);
- d) pe lângă eșantioanele standard menționate la litera c), trebuie trimise la laborator pentru efectuarea testelor eșantioane prelevate de la cel puțin cinci păsări bolnave, moarte sau abatorizate prezente în abator și la care se observă semne patologice;
- e) supravegherea oficială poate fi ridicată cu condiția ca rezultatele testelor de laborator efectuate pe eșantioanele menționate la literele c) și d) să fie negative și să nu existe suspiciune clinică a prezenței HPAI în exploatația de origine și în laborator.

8. C. Influența aviară slab patogenă (LPAI)

8.16. Cap. V, pct. 38, alineatul 2 și 3 – Măsurile care trebuie aplicate în exploatațiile în care este confirmată prezența LPAI

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație înainte de transportarea păsărilor de curte către abator sau o exploatație care deține păsări de

curte ieșite deja din ouăle recoltate în timpul perioadei de incubație, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captive;
- c) trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție de la păsări destinate abatorizării cu mai puțin de patruzeci și opt de ore înainte de ora plecării;
- d) trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție de la păsări ieșite deja din ouăle recoltate în timpul perioadei de incubație.

8.17. Cap. V, pct. 41, lit. b) – Derogări acordate anumitor exploatații cu privire la măsurile care trebuie aplicate în cazul unor focare confirmate

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație care a primit autorizația de derogare de la cap. V, pct. 38, alineatul 2 și 3 și de la, pct. 38, lit. b) din *Norma sanitar veterinară*, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației, în cazul în care există astfel de registre;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție la intervale regulate; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captive, în special a celor care par bolnave;
- c) în locul eșantioanelor standard, eșantioanele care trebuie prelevate din fiecare unitate de producție în vederea efectuării testelor de laborator, la 21 de zile după data ultimului rezultat pozitiv care atestă prezența LPAI și apoi la intervale de 21 de zile, sunt următoarele:
 - eșantioane prelevate de la păsările de curte sau de la alte păsări captive moarte care au fost prezente în momentul prelevării eșantioanelor;
 - tampoane traheale/orofaringeale și cloacale prelevate de la 60 de păsări de curte și alte păsări captive sau de la toate păsările de curte și alte păsări captive în cazul în care exploatația are mai puțin de 60 de păsări; sau, în cazul în care este vorba de păsări de curte sau de alte păsări captive de talie mică, exotice și care nu sunt obișnuite să fie manipulate sau a căror manipulare ar fi periculoasă pentru oameni, eșantioane de excremente proaspete.

Cu toate acestea, autoritatea competentă poate acorda derogări în ceea ce privește mărimea eșantionului menționat la lit. c), pe baza rezultatelor evaluării riscurilor;

- d) prelevarea eșantioanelor menționate la litera c) și analiza în laborator a eșantioanelor respective trebuie să continue până când se vor obține două rezultate de laborator negative consecutive, la un interval de cel puțin douăzeci și una de zile.

8.18. Cap.V, pct. 43, lit. a) - Măsuri aplicate în exploatațiile de contact

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație de contact, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației de contact, în cazul în care există astfel de registre;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a păsărilor captive, în special a celor care par bolnave;
- c) trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție sau în momentul uciderii păsărilor de curte sau a altor păsări captive.
- d)

8.19. Cap. V pct. 44, lit b) – Măsuri care trebuie aplicate în zonele de restricție

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație comercială într-o zonă de restricție, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captive, în special a celor care par bolnave;
- c) trebuie prelevate eșantioane standard din fiecare unitate de producție;
- d) în funcție de rezultatele evaluării riscurilor, autoritatea competentă trebuie să hotărască dacă trebuie luate măsuri suplimentare de supraveghere oficială pentru exploatații, sectoare de creștere sau tipuri țintă de producție, sub forma inspecțiilor clinice și a prelevării de eșantioane în vederea efectuării testelor de laborator.

8.20. Cap.V pct. 45, lit. a) și b) – Durata măsurilor

Măsurile care se aplică în zona de restricție în conformitate cu secțiunea 3, capitolul V din *Norma sanitar – veterinară* pot fi ridicate cel mai devreme la douăzeci și una de zile după data încheierii operațiunilor preliminare de curățare și de dezinfectare a exploatațiilor infectate după depopularea exploatației sau cel mai devreme la patruzeci și două de zile de la data confirmării prezenței LPAI, cu respectarea următoarelor condiții:

- a) toate exploatațiile comerciale situate în zona de restricție au fost inspectate de către un medic veterinar oficial și au fost efectuate toate testele de laborator pe eșantioanele menționate la punctul 8.13 literele c) și d), rezultatele fiind disponibile;
- b) rezultatele eventualelor inspecții clinice și ale testelor de laborator suplimentare care pot avea ca obiect exploatațiile necomerciale în scopul de a determina riscul de răspândire a LPAI sunt disponibile;

- c) autoritatea competentă a putut stabili, pe baza rezultatelor evaluării riscurilor, ținând seama de situația epidemiologică și de rezultatele testelor de laborator menționate la literele a) și b) că riscul răspândirii LPAI este neglijabil; o astfel de evaluare poate conduce la posibilitatea de a ridica restricțiile în cazul unor rezultate serologice pozitive și a unor rezultate virologice negative.

8. D. Măsuri care au în vedere evitarea răspândirii virusului IA la alte specii

8.21. Cap. VI, pct. 47, alineatul 5 – Teste de laborator și alte măsuri care se aplică în cazul porcilor și al altor animale

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație care deține porci după confirmarea prezenței unui focar de IA, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației, în cazul în care există astfel de registre;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a porcilor, în special a celor care par bolnavi;
- c) trebuie prelevate tampoane nazale/orofaringeale de la cel puțin șaiszeci de porci din fiecare unitate de producție sau de la toți porcii atunci când unitatea de producție are mai puțin de șaiszeci de porci; prelevările în cauză trebuie efectuate înainte sau în ziua uciderii păsărilor de curte sau a altor păsări captive infectate. Trebuie prelevate cel puțin șaiszeci de eșantioane de sânge de la porci, la două - patru săptămâni de la data sacrificării. Eșantioanele trebuie prelevate astfel încât să se obțină cel puțin un eșantion pentru fiecare dintre grupele de porci care sunt în contact direct unii cu alții;
- d) se poate aproba transferul porcilor către alte exploatații în cazul în care au dat rezultate negative cel puțin șaiszeci de tampoane nazale/orofaringeale și șaiszeci de eșantioane de sânge prelevate de la porci din fiecare unitate de producție la paisprezece zile după data rezultatului pozitiv care atesta prezența IA.

Transferul porcilor către un abator se poate autoriza în cazul în care au dat rezultate negative cel puțin șaiszeci de tampoane nazale/orofaringeale prelevate de la porci din fiecare unitate de producție la paisprezece zile de la data rezultatului pozitiv care atesta prezența IA.

În cazul în care rezultatele de laborator nu sunt concludente sau sunt pozitive, trebuie să se efectueze toate cercetările suplimentare necesare pentru a exclude infectarea porcilor cu IA sau transmiterea IA prin intermediul porcilor;

- e) atunci când medicul veterinar oficial bănuiește că și alte mamifere domestice prezente în exploatație, în special cele a căror sensibilitate la infecția cu virusul IA de subtipurile H5 și H7 a fost dovedită, ar fi putut intra în contact

cu păsările de curte sau cu alte păsări captivate infectate, trebuie prelevate eșantioane în vederea efectuării testelor de laborator.

8. E. Repopulare

8.22. Cap. VII, pct. 49, literele b) și c) – Repopularea exploatațiilor

Atunci când un medic veterinar oficial inspectează o exploatație comercială care a făcut obiectul unei repopulări, măsurile care trebuie aplicate sunt următoarele:

- a) controlul registrelor de producție și al registrelor sanitare ale exploatației;
- b) realizarea unei inspecții clinice în fiecare unitate de producție; inspecția va cuprinde o evaluare a istoricului clinic al unității respective și o examinare clinică a păsărilor de curte sau a altor păsări captivate, în special a celor care par bolnave;
- c) eșantioanele care trebuie prelevate din fiecare unitate de producție în locul eșantioanelor standard sunt următoarele:
 - cel puțin douăzeci de eșantioane de sânge prelevate de îndată ce păsările au fost plasate în exploatație cu excepția cazurilor puilor de o zi; atunci când un astfel de lucru este justificat, prelevarea eșantioanelor se poate efectua în exploatația de origine a păsărilor, înainte de transferul către exploatația care va fi repopulată;
 - eșantioane de la păsările moarte sau tampoane prelevate de la cadavrele păsărilor respective, de la maximum zece păsări moarte pe săptămână, pentru o perioadă de douăzeci și una de zile de la data repopulării;
- d) atunci când exploatația a mai fost infectată anterior cu virusul HPAI, trebuie, de asemenea, prelevate douăzeci de tampoane traheale/orofaringeale și douăzeci de tampoane cloacale de la păsările acvatice (rațe/gâște) din fiecare unitate de producție, după caz, în timpul ultimei săptămâni din perioada de douăzeci și una de zile următoare zilei de repopulare;
- e) atunci când exploatația a fost deja infectată anterior cu LPAI trebuie, de asemenea, prelevate douăzeci de tampoane traheale/orofaringeale și douăzeci de tampoane cloacale, precum și douăzeci de eșantioane de sânge din fiecare unitate de producție.

Capitolul V

Teste de diagnostic virologic și evaluarea rezultatelor

1. Până la descoperirea și dezvoltarea testelor de biologie moleculară, izolarea virusului prin inocularea în ouă de găină embrionate era considerată de departe ca fiind testul de diagnosticare a IA de departe cel mai sensibil, esențial pentru identificarea și caracterizarea ulterioară a virusului aflat la originea infecției. Etapele esențiale ale metodei respective sunt expuse în prezentul capitol.

2. *Tratamentul eșantioanelor*

În cazul în care sunt trimise uscate, eșantioanele trebuie așezate într-o cantitate de mediu antibiotic suficientă pentru a le asigura imersia totală. Eșantioanele pot fi grupate în grupuri de cinci atâta vreme cât provin de la aceeași specie, de la aceeași unitate epidemiologică și au fost prelevate la aceeași dată.

Cadavrele aduse la laborator trebuie să fie autopsiate și trebuie prelevate eșantioane din următoarele organe și din conținutul organelor: excremente sau conținut intestinal, țesuturi cerebrale, trahee, plămâni, ficat, splină și alte organe vizibil afectate. Organele și țesuturile menționate pot fi grupate, dar materiile fecale trebuie în mod imperativ tratate separat.

Eșantioanele de excremente și de organe trebuie omogenizate (cu un malaxor închis sau un pistil cu mortar și cu nisip steril) într-un mediu antibiotic până la obținerea suspensiilor de 10-20 % p/v în mediu.

Tampoanele imersate și suspensiile trebuie lăsate să se liniștească timp de circa două ore la temperatura mediului înconjurător (sau un timp mai îndelungat la 4 °C), apoi se limpezesc prin centrifugare (de exemplu, 800-1 000 × g timp de zece minute).

3. *Izolarea virusului în ouă de găină embrionate*

Se inoculează 0,1-0,2 ml de lichid limpezit de la suprafață în cavitatea alantoidiană a cel puțin patru ouă de găină embrionate, puse la incubat timp de nouă – unsprezece zile. În principiu, ouăle respective trebuie să provină de la un efectiv lipsit de agenți patogeni specifici, dar, în cazul în care acest lucru este imposibil, este permisă folosirea ouălor provenite de la un efectiv recunoscut ca fiind lipsit de anticorpi anti-IA (seronegativ).

Ouăle inoculate sunt păstrate la 37 °C și zilnic se efectuează mirajul. Treptat, ouăle care conțin embrioni morți sau muribunzi și toate ouăle care rămân după șase zile de inoculare trebuie refrigerate la 4 °C, iar lichidul lor alantoidian/amniotic trebuie testat prin hemaglutinare. În absența hemaglutinării, procedura prezentată trebuie repetată folosind ca inoculum lichidul alantoidian/amniotic nediluat. Atunci când există hemaglutinare, prezența bacteriilor trebuie exclusă prin cultură. În cazul în care sunt evidențiate bacterii, se acceptă trecerea lichidului printr-un filtru cu membrană cu pori de 450 nm, adăugarea unui complement de antibiotice și inocularea lichidului respectiv în ouăle embrionate în conformitate cu indicațiile anterioare.

Pentru a accelera diagnosticul, anumite laboratoare au realizat două treceri de trei zile sau o trecere de două zile, apoi o trecere de patru zile și au semnalat rezultate comparabile cu cele obținute în cazul a două treceri de șase zile, dar echivalența nu a fost încă evaluată pe deplin.

Lichidele pozitive trebuie să facă obiectul unui test care să excludă prezența bacteriilor. În cazul în care se detectează bacterii, lichidele pot fi trecute printr-un filtru cu membrană (450 nm) sau pot fi centrifugate pentru a le debarasa de bacterii și a le inocula din nou în ouă după ce s-au adăugat antibiotice.

4. Diagnostic diferențial

a) Diferențiere preliminară

Deoarece este important ca măsurile de combatere care vizează limitarea răspândirii virusului IA să fie aplicate cât mai repede posibil, fiecare laborator național de referință care a izolat un virus hemaglutinant trebuie să fie în măsură să identifice virusul respectiv ca fiind un virus gripal influența A de subtipul H5 sau H7 sau un virus al bolii Newcastle. Lichidele hemaglutinante trebuie folosite în teste de inhibare a hemaglutinării, astfel cum se descrie la capitolul IX. O inhibare pozitivă, de exemplu un titru de 2-3 log₂, a unui control pozitiv, cu antiseruri policlonale specifice pentru subtipurile H5 sau H7 ale influenței aviare de tip A, poate servi ca identificare preliminară și poate permite aplicarea măsurilor provizorii de combatere.

b) Confirmarea identificării

Având în vedere că există șaisprezece subtipuri de hemaglutinină și nouă subtipuri de neuraminidază ale virusurilor gripale și fiecare dintre subtipurile menționate prezintă variații, nu este nici posibil, nici rentabil pentru laboratoarele naționale de referință să conserve antiseruri care ar permite o identificare completă a subtipurilor izolațiilor gripei. Cu toate acestea, fiecare laborator național de referință trebuie cel puțin:

- să confirme faptul că izolatul este un virus al influenței A, printr-o dublă imunodifuzie care să permită detectarea antigenelor de grupă;
- să stabilească dacă izolatul este sau nu de subtip H5 sau H7, o identificare pozitivă necesitând aplicarea măsurilor de combatere a LPAI de subtipurile H5 și H7;
- să trimită de îndată toți izolații virusului LPAI și toți izolații subtipurilor H5 și H7 la laboratorul comunitar de referință în vederea confirmării și a caracterizării complete, în cazul în care nu s-a acordat derogare în conformitate cu litera (d).

De asemenea, este de dorit ca laboratoarele care dețin echipamente adecvate:

- să efectueze un test de cercetare a indicelui patogenicității intravenoase la puii de 6 săptămâni, în conformitate cu metoda descrisă la capitolul VII. Indicii patogenicității intravenoase mai mari de 1,2 indică prezența virusului și necesită aplicarea integrală a măsurilor de combatere a HPAI.

Laboratoarele naționale de referință trebuie, de asemenea, să aibă în vedere dotarea cu competențele specifice și cu echipamentele necesare pentru secvențierea

nucleotidelor genei hemaglutininei și determinarea prezenței sau absenței aminoacizilor bazici multipli la nivelul situs-ului de clivaj al proteinei precursoră hemaglutininei, pentru orice virus LPAI H5 sau H7. Cu toate că laboratorul comunitar de referință procedează mai întâi la determinarea indicelui patogenicității în cadrul misiunilor definite în anexa VII punctul 2 litera (b) din Directiva 2005/94/CE, o astfel de caracterizare a virusului la nivel național ar diminua substanțial timpul necesar diagnosticului și, în cazul unui diagnostic pozitiv, timpul necesar pentru aplicarea integrală a măsurilor de combatere a influenței aviare înalt patogene.

c) Urmărirea tipizării și caracterizarea izolațiilor

Laboratorul comunitar de referință trebuie să primească toate virusurile hemaglutinante de la laboratoarele naționale de referință pentru completarea studiilor antigenice și genetice care să permită o mai bună înțelegere a epizootiologiei bolii sau bolilor care afectează Comunitatea, în conformitate cu funcțiile și cu misiunile laboratorului comunitar de referință definite în anexa VII la Directiva 2005/94/CE.

Pe lângă funcțiile și misiunile menționate, laboratorul comunitar de referință va efectua tipizarea antigenică completă a tuturor virusurilor influența pe care le primește. Pentru virusurile H5 și H7 cu un indice al patogenicității intravenoase care nu depășește 1,2 trebuie, de asemenea, să se efectueze de îndată secvențierea nucleotidelor genei hemaglutininei pentru a determina prezența sau absența aminoacizilor bazici multipli la nivelul situs-ului de clivaj al proteinei înainte de hemaglutinină și pentru a informa laboratorul național de referință, precum și autoritatea competentă din țara de origine de îndată ce rezultatele sunt disponibile, pentru a se putea aplica pe deplin toate măsurile de combatere a HPAI.

d) Dată fiind situația epidemiologică schimbătoare asociată cu HPAI/LPAI, este posibil, cu acordul Comisiei și al laboratorului comunitar de referință, să se acorde o derogare laboratoarelor care dețin toate capacitățile de caracterizare rapidă a virusurilor, pentru ca laboratoarele respective să prezinte un subgrup din virusurile respective după examinarea informațiilor, iar laboratorul comunitar de referință să fie lăsat să efectueze o selecție pertinentă. Această derogare nu este permisă în cazul în care informațiile pot fi generate rapid de laboratorul național de referință și comunicate și laboratorului comunitar de referință.

Capitolul VI

Teste moleculare și evaluarea rezultatelor

Definiția actuală a influenței aviare înalt patogene (HPAI) permite identificarea moleculară a factorilor de virulență și validează folosirea tehnicilor moleculare pentru stabilirea diagnosticului IA. În ultimul timp, s-a înregistrat o evoluție în

aplicarea tehnicilor respective pentru detectarea și caracterizarea virusului IA plecând direct de la eșantioane clinice prelevate de la păsări infectate. În cazul în care primerii sunt corect definiți, tehnicile convenționale RT-PCR aplicate eșantioanelor clinice ar putea conduce la o detectare și la o identificare rapidă a subtipului (cel puțin de H5 și H7), precum și la un amplimer care ar putea fi folosit pentru secvențierea nucleotidelor; de asemenea, s-a mai demonstrat că tehnicile respective ar putea servi la identificarea rapidă a focarelor ulterioare, după detectarea primelor instalații atinse și caracterizarea virusului. Într-o singură etapă în „timp real”, folosind sisteme de sonde fluorogenice/primeri (rRT-PCR), RT-PCR permit un diagnostic și mai rapid și mai sensibil cu detectarea virusurilor IA și determinarea subtipului H5 sau H7 în eșantioanele clinice.

Cu toate acestea, un aspect important legat de tehnicile RT-PCR și rRT-PCR, întrucât, în prezent, diversele laboratoare au pus la punct sisteme diferite care, deși sunt perfect valabile, nu au fost validate sau testate pe un număr mare de eșantioane în laboratoare diferite. Laboratorul comunitar de referință și anumite laboratoare naționale de referință s-au ocupat de problema menționată în cadrul unui proiect finanțat de Comunitate (EU AVIFLU), în vederea stabilirii unor protocoale ratificate pentru tehnicile convenționale RT-PCR și rRT-PCR pe care le-ar putea adopta și alte laboratoare naționale de referință. În cazul în care parametrii de test, precum durata ciclului și timpul de rampă, sunt diferiți de cei recomandați în protocoalele specificate, trebuie ca înainte de orice utilizare să se demonstreze că parametrii respectivi sunt adecvați, în conformitate cu capitolul I punctul 6 din prezentul manual de diagnostic.

Protocoalele standard și evaluarea testelor moleculare menționate, astfel cum sunt aplicate de laboratorul comunitar de referință, sunt disponibile pe următorul site:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

Capitolul VII

Test de patogenicitate in vivo și evaluarea rezultatelor

Virulența, pentru pui, a virusurilor influența A izolate pe păsări trebuie evaluată cu ajutorul unui test de indice al patogenității intravenoase (IPIV) care se efectuează după cum urmează:

- a) Într-o soluție fiziologică sterilă se diluează la 1/10 lichid alantoidian infectat proaspăt, cu un titru hemaglutinant $> 1/16$ (> 24 sau $> \log_2$, reciproca 4), de la cel mai scăzut nivel de trecere disponibil și, de preferință, de la izolarea inițială, fără selecție prealabilă.
- b) Se injectează pe cale intravenoasă 0,1 ml de virus diluat la zece pui în vârstă de 6 săptămâni, lipsiți de agenți patogeni specifici sau seronegativi.

c) Se examinează subiectele la un interval de douăzeci și patru de ore timp de zece zile. La fiecare observare, fiecărei păsări *i* se atribuie un coeficient: 0 = normal, 1 = bolnav, 2 = grav bolnav, 3 = mort. Aprecierea „bolnav” sau „grav bolnav” constituie o evaluare clinică subiectivă.

În principiu, păsările „bolnave” prezintă numai unul dintre simptomele următoare, iar păsările „grav bolnave” mai multe: tulburări respiratorii, depresie, diaree, cianoză a pielii expuse sau a carunculelor, edem facial și/sau al capului, tulburări nervoase. Păsărilor moarte li se atribuie coeficientul 3 la fiecare dintre celelalte observări zilnice după constatarea morții.

Din motive de bunăstare, păsările prea bolnave pentru a mânca sau pentru a bea trebuie eutanasiate și înregistrate ca „moarte” la următoarea observare, deoarece ar fi murit și fără intervenție în următoarele douăzeci și patru de ore. Această metodă de a proceda este considerată acceptabilă de către autoritățile de aprobare.

(d) IPIV corespunde coeficientului mediu per pasăre și per observare pentru o perioadă de zece zile. Un indice de 3,00 înseamnă că toate păsările sunt moarte în douăzeci și patru de ore; un indice de 0,00 înseamnă că nici o pasăre nu a prezentat semne clinice pe parcursul perioadei de observare de zece zile.

Exemplul prezentat în continuare arată o metodă simplă de înregistrare a rezultatelor și de calculare a indicilor:

Semne clinice	Zile după inoculare										Coeficient total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12×0=0
Bolnav	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6×1=6
Grav bolnav	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6×2=12
Mort	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76×3=228
	0										Total=246

Note:

Zece păsări observate timp de zece zile = o sută de observări.

Indice = coeficient mediu per animal și per observare = 246/100 = 2,46.

Orice virus gripal de tip A, independent de subtipul său, care obține o valoare mai mare a 1,2 la testul IPIV este considerat virus al influenței aviare înalt patogene.

Capitolul VIII

Teste serologice și evaluarea rezultatelor

Pentru a demonstra prezența unui virus al influenței A, se folosește în general metoda care constă în a evidenția prezența antigenilor nucleoproteicici sau matriciali comuni tuturor virusurilor gripale de tip A.

În acest scop, se poate utiliza dubla imunodifuzie, care implică fie preparate de virus concentrat, fie extracte de membrane corioalantoidiene infectate.

Metodele de predilecție în ceea ce privește testele serologice pentru evidențierea anticorpilor virusului IA sunt hemaglutinarea (HA) și inhibarea hemaglutinării (IH).

Capitolul 2.7.12 din manualul testelor de diagnostic și al vaccinurilor pentru animalele terestre al Oficiului Internațional de Epizootii (OIE) conțin informații detaliate referitoare la tehnicile de laborator și la evaluarea rezultatelor.

Protocoalele standard și evaluarea rezultatelor testelor serologice menționate, astfel cum sunt aplicate de laboratorul comunitar de referință, sunt disponibile pe următorul sit de Internet:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

Capitolul IX

Sisteme de urmărire asociate vaccinării

1. Directiva 2005/94/CE și manualul de diagnostic

Secțiunile 2 și 3 din capitolul IX din Directiva 2005/94/CE permit să se recurgă la o vaccinare de urgență și preventivă cu respectarea anumitor condiții. Una dintre condiții este să se folosească o strategie „DIVA” (diferențierea animalelor infectate și a animalelor vaccinate).

Vaccinarea trebuie să ajute la prevenirea infecției și a răspândirii ulterioare a virusului de la un efectiv la altul. S-a demonstrat în mod incontestabil că vaccinarea crește cantitatea de virus necesară pentru infectarea păsărilor și diminuează cantitatea de virus excretat. Cu toate acestea, în cazul în care păsările vaccinate nu mai prezintă semne clinice, ele pot încă răspândi virusul în cazul în care organismul lor este infectat cu virusul respectiv. În consecință, virusurile de HPAI, subtipurile H5 și H7 ar putea circula pentru o anumită perioadă fără a fi observate în cadrul unui efectiv al cărui nivel de imunitate nu este cel mai bun, exact ca și virusul de LPAI în cadrul unui efectiv nevaccinat. Prin urmare, este necesar să se poată recunoaște efectivele vaccinate purtătoare ale virusului sălbatic pentru a putea pune în aplicare alte măsuri de combatere, precum abatorizarea sanitară.

2. Utilizarea santinelor pentru supravegherea infecției

În cadrul efectivului, o metodă simplă constă în a controla cu regularitate păsările santinelă nevaccinate din cadrul efectivelor vaccinate, dar metoda prezintă unele chestiuni de organizare, în special referitoare la recunoașterea santinelilor, mai ales în efectivele mari. Trebuie asigurat contactul dintre păsările santinelă și păsările vaccinate.

3. Teste de laborator DIVA pentru controlul infecției

În locul sau ca o completare la metoda respectivă, se poate stabili dacă păsările vaccinate au suferit o expunere naturală utilizând teste de laborator DIVA. În ultimii ani au fost puse la punct mai multe sisteme de teste, care permit și detectarea unei infectări naturale la păsările vaccinate. Metoda care s-a dovedit utilizabilă constă în folosirea unui vaccin care conține un virus de același subtip hemaglutinant (H) ca și virusul sălbatic observat, dar purtător al unei neuraminidaze (N) diferite. Anticorpilor dezvoltati împotriva neuraminidazei virusului sălbatic acționează ca markeri naturali ai infecției.

Sistemul menționat a fost folosit în Italia în urma reapariției unui virus LPAI H7N1 în 2000. Pentru a completa măsurile de combatere directă, s-a pus în aplicare o strategie DIVA care utilizează un vaccin alcătuit din H7N3 pentru a combate o infecție sălbatică de tipul H7N1. Păsările vaccinate au fost diferențiate de păsările expuse în mod natural printr-un test serologic care permite decelarea anticorpilor specifici anti-N1. Aceeași tehnică a fost folosită în Italia în 2002-2003 pentru a controla un virus LPAI provocat de H7N3, prin intermediul unui vaccin H7N1 și al unui test serologic care detecta anticorpilor anti-N3. În ambele cazuri, vaccinarea însoțită de o abatorizare sanitară pe baza strategiei DIVA a permis eradicarea virusului sălbatic.

Tehnica menționată este pusă în dificultate în cazul în care apare un virus sălbatic cu același antigen N ca virusul sălbatic observat, dar cu un subtip H diferit de H5 sau H7 sau în cazul în care subtipuri care prezintă aceiași antigeni N circulă deja pe teren. Rătele, în special, sunt cunoscute ca purtătoare ale mai multor subtipuri. De asemenea, era necesar să se pună la punct un test adaptat pentru depistarea sistematică a prezenței anticorpilor antineuraminidază în cadrul efectivelor. Italia a dezvoltat și a aplicat un test serologic ad-hoc bazat pe un test de imunofluorescență indirectă care folosea, ca antigen N, proteine exprimate de baculovirusuri recombinante. Testele respective vor beneficia poate de o aplicare mai extinsă și mai relaxată atunci când se va dezvolta un test ELISA.

Faptul de a recurge la vaccinuri care conțin numai substanța HA, precum vaccinurile cu vector recombinant, permite utilizarea testelor AGID clasice sau a testelor ELISA bazate pe o nucleoproteină, o proteină nestructurală sau proteine matriciale, pentru a detecta contaminarea păsărilor vaccinate.

Pentru vaccinurile inactivate, s-a descris un test care permite detectarea anticorpilor împotriva proteinei nestructurale a virusurilor, produși numai în momentul infectării naturale. O astfel de tehnică trebuie încă validată pe teren, dar este limitată de faptul că o infectare naturală a unui efectiv cu un virus gripal, indiferent de subtip, antrenează producția de anticorpi dirijați împotriva proteinei nestructurale.

Elaborarea metodelor rapide și sensibile de detectare a virusurilor, în special a celor care pot fi automatizate, precum RT-PCR în timp real, dovedește că ar fi posibil ca metodele respective să se folosească pentru a efectua teste simple, generalizate și regulate pe păsări vaccinate, pentru a detecta prezența virusurilor sălbatice. Cu toate acestea, detectarea agentului vizat nu va fi posibilă decât pentru o perioadă scurtă în faza acută a infecției și nu va putea duce la concluzia că un efectiv nu a fost expus virusului în trecut. Metoda respectivă este bine adaptată în special pentru efectuarea testelor asupra păsărilor vaccinate, înainte de deplasare, pentru a dovedi că nu sunt infectate.

Numărul de eșantioane care trebuie analizate prin metodele reținute va permite excluderea unei prevalențe a virusului IA în cadrul unui efectiv mai mare de 15 %, cu un nivel de încredere de 95 %.

Capitolul X

Strategii de diagnostic a IA

În conformitate cu anexa IV la Directiva 2005/94/CE, decizia de a aplica măsuri în anumite zone sau exploatații de contact, precum și severitatea măsurilor respective poate varia foarte mult în funcție de amploarea riscurilor. De asemenea, confirmarea solicitată a diagnosticului va depinde, probabil, de situația din teren, de amploarea pericolului și de nivelul de risc. Bazându-se pe elementele diagnosticului, autoritățile veterinare trebuie să adopte decizii care să pună în balanță controlul și eradicarea rapidă a bolii, pe de o parte, și potențialele consecințe ale unui diagnostic greșit, pe de altă parte. Aceste aprecieri trebuie să se sprijine pe numeroși factori existenți, dar unele situații pot fi prevăzute.

Situația zoosanitară	Problemă eventuală	Problemă eventuală
Nu există semne particulare, nu există suspiciune oficială	Exploatație izolată	Detectare rapidă prin tehnica RT-PCR gena M. După caz, diagnostic diferențial.
Focar primar suspectat	Exploatație izolată	Teste complete de diagnostic, izolare și caracterizare a virusului.
Focar primar suspectat	Exploatație situată într-o zonă cu o densitate mare de păsări de curte	Teste complete de diagnostic, izolare și caracterizare a virusului, dar cu predilecție pentru metodele rapide de detectare și de caracterizare, în special cele bazate pe RT-

		PCR și secvențiere (1) .
Focare secundare și ulterioare suspectate	Exploatații izolate, legate din punct de vedere epidemiologic de un focar primar suspectat	Predilecție pentru metodele rapide de detectare și de caracterizare, în special cele bazate pe RT-PCR și secvențiere (1) .
Focare secundare și ulterioare suspectate	Exploatații situate în zone cu o densitate mare de păsări de curte și care au numeroase legături epidemiologice	Metode rapide de detectare care demonstrează cel mai rapid prezența unui virus IA (1) .
Focare multiple suspectate sau răspândirea rapidă a bolii și supraveghere	Răspândirea va deveni incontrollabilă în absența unei intervenții rapide	Metode rapide de detectare care demonstrează cel mai rapid prezența unui virus IA sau aprecierea semnelor clinice (1) .

CAPITOLUL XI

Diagnosticul unei infecții cu un virus IA la porc și la alte mamifere

1. IA la porc

Porcii sunt vulnerabili la virusul IA și, deși replicarea este relativ limitată în majoritatea cazurilor, porcii infectați ar putea transmite boala păsărilor de curte și altor animale cu predispoziție. În prezent, nu există nici o dovadă concretă că porcii infectați transmit virusul IA subtipurile H5 și H7.

Experiența acumulată în cursul epidemiei care a afectat Țările de Jos în 2003 arată că porcii contaminați cu H7N7 nu prezintă nici un semn clinic care ar putea fi atribuit unei infecții cu H7N5. De asemenea, până în prezent, nu s-a semnalat nici un porc contaminat cu ocazia epidemiei de H5N1 care a afectat Asia și alte regiuni.

Prin urmare, nu ne putem baza pe semne clinice pentru a stabili dacă porcii sunt infectați, deși odată ce virusul s-a adaptat la gazdă pot apărea simptome clinice datorate contaminării porcilor cu alți viruși gripali de origine aviară. Diagnosticul unei infecții provocate de virusul IA la porci este, în ansamblu, similar cu diagnosticul pentru speciile aviare: se bazează pe izolarea virusului, pe tehnicile moleculare și pe detectarea anticorpilor specifici cu ajutorul testelor de inhibare a hemaglutinării. Cu toate acestea, există anumite diferențe și nici unul dintre teste nu este total validat pentru a permite confirmarea contaminării porcilor cu un virus IA.

2. Eșantioane folosite pentru izolarea virusului

Infecțiile porcilor cu virusul IA se limitează, în general, la aparatul respirator; prin urmare, eșantioanele trebuie să se compună din țesuturi ale aparatului respirator și, după caz, tamponate orofaringeale sau nazale, de preferință prelevate de la porci care prezintă simptome ale bolii. Eșantioanele și tamponatele respective pot fi tratate în vederea izolării sau a detectării moleculare a virusului, prin aceleași tehnici ca și cele descrise anterior în cazul păsărilor. Cu toate acestea, în cazul utilizării tehnicilor PCR, trebuie să se efectueze controale adecvate pentru a garanta că amplificarea nu este inhibată de substanțe prezente în eșantioanele prelevate de la porci.

3. Inocularea și incubarea ouălor

Pentru a izola virusul influenței al mamiferelor în ouă de găină embrionate în vârstă de 9-11 zile, se obișnuiește să se inoculeze fiecare ou prin cavitatea alantoidiană și în cavitatea amniotică. Cu toate acestea, cu ocazia testelor de detectare efectuate pe porci care au fost în contact cu virusul IA, inocularea prin cavitatea alantoidiană este probabil suficientă atunci când virusul a avut puțin timp să se adapteze.

În același fel, temperatura recomandată, în general, pentru incubarea ouălor în vederea izolării virusului influenței de tip A al mamiferelor este de 35 °C, dar, din nou, pentru virusurile puțin adaptate la porci, o temperatură de 37 °C nu ar împiedica izolarea.

4. Detectarea anticorpilor specifici cu ocazia testelor IH

Izolarea virusului sau detectarea moleculară constituie probabil metodele cele mai sensibile de determinare a prezenței unei infecții provocate de virusul IA la porc. Cu toate acestea, s-au decelat răspunsuri serologice la porci fără să se fi izolat sau detectat vreun virus. Testele IH care folosesc seruri provenite de la porci necesită anumite modificări față de testul folosit pentru serurile păsărilor, menționat la capitolul VIII.

Serurile de porci sunt cunoscute pentru proprietatea lor de inhibare nespecifică în momentul testelor IH și, prin urmare, fiecare eșantion de ser trebuie tratat cu o enzimă care distruge receptorul, pentru a evita fenomenul menționat. Trebuie folosită următoarea metodă:

- (a) se adaugă 400 μl enzimă pentru distrugerea receptorului (diluție de lucru predeterminată) la 100 μl antiser de porc și se amestecă atent;
- (b) se lasă la incubat la 37 °C timp de o oră;
- (c) se lasă apoi la incubat timp de treizeci de minute la 56 °C;

- (d) eșantioanele se lasă să se răcească la 4 °C timp de cel puțin cincisprezece minute;
- (e) se adaugă 10 μl globule roșii de pui la 30 % (v/v de concentrat globular) și se amestecă energic;
- (f) se lasă la incubat la 4 °C până a doua zi. În cazul în care eșantioanele trebuie folosite neapărat în aceeași zi, se lasă la incubat la 37 °C timp de o oră și se centrifughează la 300 × g timp de cinci minute.

Serul tratat astfel poate fi folosit în testele IH la fel ca pentru serurile de păsări, în conformitate cu alineatul [...], diluția inițială fiind de 1:10. Pentru a evalua specificitatea testului IH pentru sușa virală care trebuie folosită (vezi utilizarea pentru serologie a unei sușe virale care provine din focare în sensul serologiei, capitolul VIII), trebuie să se folosească o serie de seruri de porci seronegativi pentru influența aviară. Cu ocazia episodului din 2003 din Țările de Jos, până la 2,6 % din reacțiile nespecifice au fost detectate prin testul IH care a folosit seruri de porci prelevate în mod independent de epidemie.

5. Prelevarea eșantioanelor de la porci

În special, în cazul exploatațiilor care cresc porci și păsări de curte, indiferent dacă o fac în ferme comune sau separate, porcii riscă să fie infectați cu IA, în mod direct sau indirect, intrând în contact cu păsările de curte sau cu produsele avicole. Pentru a exclude posibilitatea unei astfel de contaminări, trebuie prelevate tampoane orofaringeale sau nazale și eșantioane de sânge, în conformitate cu procedurile descrise la punctul 8.21 din capitolul IV. Eșantioanele respective trebuie să provină de la porci care prezintă semne clinice ale bolii. Cu toate acestea, în cazul în care porcii nu prezintă semne clinice, eșantioanele se pot preleva la întâmplare din toate zonele fermei. Tampoanele trebuie supuse testelor moleculare rapide și/sau procedurii de izolare a virusului, în măsura în care laboratorul este dotat în acest sens. RT-PCR trebuie să fi fost validate într-un mod corespunzător și să aibă o sensibilitate cel puțin echivalentă la izolarea virusului în ouă pentru virusurile gripale de tip A.

Între două și patru săptămâni după abatorizarea sanitară a păsărilor de curte infectate cu IA trebuie prelevate cel puțin șaiszeci de eșantioane de sânge de la porci, astfel încât cel puțin o parte dintre eșantioane să provină de la grupe de porci în contact direct unii cu alții. Eșantioanele trebuie supuse unui test IH cu un virus provenit din focarul aviăr. Eșantioanele prelevate în faza acută și în faza de convalescență trebuie testate în același timp. Eșantioanele pozitive pot face obiectul unei confirmări prin intermediul testului de neutralizare virală și/sau Western Blot.

În cazul unui rezultat pozitiv pentru unul dintre eșantioane, va trebui efectuată o anchetă epidemiologică în toate crescătoriile de porci situate în zona de protecție, indiferent dacă sunt sau nu de tip mixt (ferme comune sau nu).

6. Virusul IA la alte mamifere decât porcul

Pe lângă porc, trebuie să se examineze și alte mamifere sensibile la IA, inclusiv pisicile. Fiind vorba de HPAI H5N1, pentru examinarea pisicilor trebuie îndeplinite următoarele modalități:

Deoarece leziunile patologice grave, însoțite de o replicare virală, se manifestă în mod esențial la nivelul plămânilor și al ficatului, este de preferat ca eșantioanele care trebuie folosite la examenele virologice să fie prelevate din aceste organe, la animale moarte. Pentru animalele vii, se va prefera prelevarea de eșantioane traheale/orofaringeale pentru detectarea virusului. De asemenea, se mai pot preleva separat tampoane fecale.

Eșantioanele de sânge care trebuie supuse testelor IH trebuie tratate termic la 56 °C timp de treizeci de minute; nu este necesar tratamentul cu enzime pentru distrugerea receptorilor.

Caitolul XII

Cerințe minime de securitate pentru transportul eșantioanelor

1. Transportul eșantioanelor care conțin germeni patogeni sau care sunt suspectați că ar conține germeni patogeni este supus unui regulament național și internațional strict care trebuie respectat în permanență. Izolații virusului nu sunt clasificați ca eșantioane diagnostice, dar trebuie condiționate în conformitate cu standardele internaționale.

Instrucțiunile formulate în prezentul capitol se referă la transportul aerian, dar o ambalare similară trebuie adoptată pentru transportul terestru sau maritim al eșantioanelor.

2. Ambalarea eșantioanelor de diagnostic în vederea transportului

Eșantioanele de diagnostic transportate în conformitate cu reglementările Asociației Transportului Aerian Internațional (IATA) primesc numărul de identificare ONU 2814, 2900 sau 3373, după caz.

Expeditorul, și nu compania de transport, este responsabil pentru colet până la sosirea la destinație.

3. Ambalajul principal

- (a) Recipientele primare trebuie să fie etanșe: de exemplu, capacele filetate trebuie sigilate cu Parafilm® sau adeziv sau trebuie adoptate măsuri similare de protecție.
- (b) Diversele recipiente primare trebuie ambalate individual pentru a evita spargerea.
- (c) Înainte de a stabili volumul eșantioanelor de diagnostic care trebuie expediate, trebuie luat în considerare mediul de transport viral.
- (d) Recipientele primare nu pot conține mai mult de 500 ml sau 500 g.

Recipientul primar conține numai eșantionul pentru analize.

4. Ambalajul secundar

- (a) Recipientul secundar trebuie să conțină material absorbant suficient pentru a absorbi tot conținutul recipientelor primare în caz de scurgere sau de deteriorare.
- (b) Ambalajul secundar trebuie să respecte prescripțiile IATA în ceea ce privește ambalarea eșantioanelor de diagnostic, inclusiv procedura de testare în caz de cădere de la o înălțime de 1,2 m (3,9 picioare). Cerințele privind ambalarea materiilor infecțioase (instrucțiuni de ambalare 602 ale IATA) sunt mai severe decât cele privind ambalarea eșantioanelor de diagnostic și pot servi ca referință.
- (c) Ambalajul unei materii infecțioase trebuie să poarte marcajul specific cerut („UN” încercuit), de exemplu:
„UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450”
- (d) Ambalajul secundar trebuie să fie etanș. Trebuie respectate instrucțiunile de ambalare ale fabricantului ambalajului sau ale oricărei părți abilitate, incluse în al doilea ambalaj.
- (e) Dimensiunea externă globală minimă a ambalajului secundar trebuie să fie de cel puțin 100 mm (patru inci).
- (f) Ambalajul secundar trebuie să fie suficient de mare pentru a cuprinde documente, precum o scrisoare de transport aerian.

5. Ambalajul exterior

- (a) Ambalajul exterior nu trebuie să conțină mai mult de 4 l sau 4 kg.
- (b) La nevoie, în afara ambalajului secundar se va așeza gheață carbonică sau gheață. În cazul în care se folosește gheață carbonică, ambalajul trebuie să permită evacuarea gazului carbonic și să nu permită acumularea presiunii care ar poate face ambalajul să cedeze. În cazul în care se folosește gheață, ambalajul trebuie să fie etanș.

Fiecare ambalaj, precum și scrisorile de transport aerian trebuie să poarte următoarea mențiune exactă:

„UN 3373 DIAGNOSTIC SPECIMEN

PACKED IN COMPLIANCE WITH

IATA PACKING INSTRUCTION 650”

- (c) Între ambalajul secundar și ambalajul exterior trebuie așezată o listă detaliată a conținutului.
- (d) Ambalajul exterior trebuie așezat într-un sac de plastic sigilat pentru a fi protejat de umiditate.
- (e) Nu este necesar să se anexeze o declarație de marfă periculoasă.

Capitolul XIII

Expedierea virusului și a eșantioanelor la laboratorul comunitar de referință

1. Eșantioanele care trebuie trimise la laboratorul comunitar de referință trebuie să respecte recomandările privind transportul agenților patogeni periculoși în interiorul Comunității, precum și regulamentele și legislația în vigoare în Regatul Unit.

Trebuie respectate instrucțiunile furnizate în prezentul capitol.

2. Expedierea virusului sau a altor materiale biologice la laboratorul comunitar de referință

- (a) Toate materialele trebuie ambalate în conformitate cu instrucțiunile furnizate în prezentul capitol.
- (b) Ambalajul exterior va purta următoarea mențiune:

„ANIMAL PATHOGEN – PACKAGE ONLY TO BE OPENED AT THE AVIAN VIROLOGY SECTION, VLA, WEYBRIDGE. IMPORTATION AUTHORISED BY LICENCE NUMBER*ISSUED UNDER THE IMPORTATION OF ANIMAL PATHOGENS ORDER.”

- (c) Trebuie să se menționeze unul dintre următoarele numere de licență:

(i) pentru virusurile IA:	„AHZ/2232/2002/5*”
(ii) pentru țesuturi și alte materiale:	„AHZ/2074C/2004/3*”

Deoarece numerele de licență se modifică din când în când, laboratoarele care trimit eșantioanele se vor asigura că folosesc numerele de licență actualizate.

- (d) Coletul trebuie expedit la următoarea adresă:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
United Kingdom

(e) Coletul trebuie însoțit de o scrisoare care să conțină cât mai multe informații posibile cu privire la izolați, precum specia vizată, vârsta, zona/țara de izolare, orice antecedent clinic etc.

(f) Coletele vor fi expediate cu poșta aeriană sau cu un transport aerian.

În cazul în care coletele sunt expediate cu un transport aerian, numărul scrisorii de transport aerian trebuie comunicat prin fax, telefon sau poștă electronică laboratorului comunitar de referință înainte de sosirea materialelor.

Coletele expediate cu un transport aerian pot avea marcate clar următoarele etichete:

„CARE OF TRANSGLOBAL”, pentru a le asigura o preluare rapidă la aeroport.

Persoane de contact la laboratorul comunitar de referință

Ian H. Brown, Director al laboratorului de referință

Tel.: (44-1932) 37 73 39;

Fax: (44-1932) 35 72 39;

E-mail: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, responsabil al laboratorului de referință

Tel.: (44-1932) 35 77 36 sau (44-1932) 35 77 08

Fax: (44-1932) 35 78 56

E-mail: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

CAPITOLUL XIV

Condiții minime de securitate pentru laboratoarele de diagnostic IA

1. Prescripțiile de securitate în laboratoarele de diagnostic care lucrează cu virusul IA trebuie să aibă în vedere atât izolarea virusului, ca amenințare pentru

sănătatea animală, cât și protecția personalului care lucrează în laborator (și a persoanelor din exterior) împotriva oricărui risc zoonotic.

În Comunitate, cerințele minime în materie de securitate pentru laboratoare sunt stabilite prin mai multe directive. De asemenea, aspectele practice sunt descrise și stabilite în standarde europene subiacente (EN). Pentru exploatarea laboratoarelor în vederea stabilirii diagnosticelor, se aplică și alte reglementări (EN), precum bunele practici de laborator.

2. Directive comunitare referitoare la laboratoare

Directiva 89/391/CEE a Consiliului din 12 iunie 1989 privind punerea în aplicare de măsuri pentru promovarea îmbunătățirii securității și sănătății lucrătorilor la locul de muncă (JO L 183, 29.6.1989, p. 1).

Directiva 90/679/CEE a Consiliului din 26 noiembrie 1990 privind protecția lucrătorilor împotriva riscurilor legate de expunerea la agenți biologici la locul de muncă (a șaptea directivă specială în sensul articolului 16 alineatul (1) din Directiva 89/391/CEE) (JO L 374, 31.12.1990, p. 1).

În cazul în care se pune un diagnostic prin PCR și are loc clonarea produselor PCR într-o plasmidă bacteriană pentru răspândire, de exemplu în scopul secvențierii ADN-ului, se aplică următoarea directivă și standardele europene (EN), pe lângă cele două directive menționate anterior:

Directiva 90/219/CEE a Consiliului din 23 aprilie 1990 privind utilizarea în condiții de izolare a microorganismelor modificate genetic (JO L 117, 8.5.1990, p. 1).

3. Pe lângă directivele comunitare, trebuie, de asemenea, să se țină seama de următoarele standarde europene (EN):

EN 12128 Biotehnologie. Laboratoare de cercetare, dezvoltare și analiză. Niveluri de izolare a laboratoarelor de microbiologie, zone cu risc, situațiile și cerințele fizice de securitate.

EN 12738 Biotehnologie. Laboratoare de cercetare, dezvoltare și analiză. Ghid pentru izolarea animalelor inoculate cu microorganisme folosite în scopuri experimentale.

EN 12740 Biotehnologie. Laboratoare de cercetare, dezvoltare și analiză. Ghid pentru manipularea, inactivarea și controlul deșeurilor.

EN 12741 Biotehnologie. Laboratoare de cercetare, dezvoltare și analiză. Ghid pentru operațiunile din laboratoarele biotehnologice.

Pentru exploatarea/administrarea unui laborator trebuie respectate următoarele condiții:

4. Condiții care trebuie respectate de laboratoare (niveluri de izolare de la 1 la 4)

Directiva 2000/54/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 18 septembrie 2000 privind protecția lucrătorilor împotriva riscurilor legate de expunerea la agenți biologici la locul de muncă (a șaptea directivă specială în sensul articolului 16 alineatul (1) din Directiva 89/391/CEE) (JO L 262, 17.10.2000, p. 21), Directiva 90/219/CEE și standardele europene EN 12128, EN 12740 și EN 12741.

Măsurile de izolare	Nivel de izolare			
	1	2	3	4
Laborator: izolat	nu	da	da	da
Laboratoare separate prin uși	nu	da	da	da
Prezența unei ferestre de observare sau a unui dispozitiv similar pentru ca ocupanții să poată fi văzuți	facultativ	facultativ	facultativ	da
Instalații pentru spălarea mâinilor	da	da	da	da
Instalații pentru dezinfectarea mâinilor	facultativ	da	da	da
Acces limitat	nu	da	da	da
Măsurile specifice pentru a controla răspândirea de aerosoli	nu	da minimizare	da prevenire	da prevenire
Semn de pericol biologic pe ușă	nu	da	da	da
Duș	nu	da	facultativ	da
Dispozitiv pentru clătirea ochilor	da	da	da	da
Laborator: închis ermetic pentru fumigație	nu	nu	da	da
Suprafețe rezistente la apă, acizi, alcali, solvenți, dezinfectanți, agenți de decontaminare și ușor de curățat	da (plan de lucru)	da (plan de lucru)	da (plan de lucru și sol)	da (plan de lucru și sol)
Intrare în laborator printr-un sas	nu	nu	facultativ	da
Presiune negativă față de presiunea mediului înconjurător imediat	nu	nu	facultativ	da
Aerul care intră și iese din laborator trebuie filtrat printr-un filtru HEPA	nu	nu	da (filtrarea aerului care iese)	da
Autoclavă	sit	clădire	sala de lângă laborator	laborator, cu intrare dublă
Îmbrăcăminte de protecție	Îmbrăcăminte de protecție	Îmbrăcăminte de protecție	Îmbrăcăminte de protecție	Îmbrăcăminte este schimbată

	adecvată	adecvată	adecvată (încălțăminte adecvată facultativă)	complet
Mănuși	nu	facultativ	da	da

Mai există și alte standarde europene care se ocupă de administrarea și de organizarea laboratoarelor.

De asemenea, există alte reglementări și recomandări naționale și internaționale care trebuie respectate. OMS a publicat Manualul de securitate biologică în laborator, a treia ediție, pe următorul sit de Internet:

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

5. Izolarea în relație cu sănătatea animală

Autoritățile veterinare ale fiecărui stat membru trebuie să pună în aplicare normele referitoare la izolarea virusului IA, în special HPAI, dar și pentru toate virusurile AI subtipurile H5 și H7. Oficiul Internațional de Epizootii (OIE) furnizează sfaturi la capitolul 1.4.5. din Codul sanitar pentru animalele terestre 2005, iar influența aviară declarată în mod obligatoriu înalt patogenă este considerată un agent patogen clasificat în grupa 4 de izolare a OIE.

Dispozițiile care reglementează manipularea virusului IA vor fi aplicate de către autoritățile veterinare din statele membre.

Condițiile minime de securitate aplicate de către laboratorul comunitar de referință, care sunt și normele naționale ale Regatului Unit, pot fi consultate la următoarea adresă:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

6. Izolarea în relație cu sănătatea umană

Laboratoarele care manipulează virusuri IA trebuie să fie mereu atente la faptul că virusurile respective constituie, cel puțin potențial, agenți patogeni pentru om, și să își organizeze activitatea astfel încât să evite infectarea personalului și răspândirea virusului în exterior.

Instrucțiuni pentru manipularea eșantioanelor suspectate că ar conține un virus IA se găsesc pe situl web al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS):

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/

(1) Pentru acest lucru, trebuie efectuată o eșantionare completă, iar eșantioanele trebuie conservate pentru o evaluare ulterioară.

