



Приложение № 10

към Заповед № РД 09-298/20.05.2014 г.

ПРОГРАМА

**ЗА НАДЗОР ВЪРХУ НЮКЯСЪЛСКАТА БОЛЕСТ (ПСЕВДОЧУМА) ПО
ПТИЦИТЕ ПРЕЗ 2014 ГОДИНА**

Идентификация на програмата

Държава членка: Република България

Заболяване: Нюкясълска болест по птиците

Година на изпълнение: 2014

Законови разпоредби:

1. **Закон за ветеринарномедицинска дейност** (ДВ 87/1 Ноември 2005 в сила от 1 май 2006)

“Чл. 123. (1) БАБХ изготвя проекти на национални програми за надзор на някои специфични заразни болести, Министъра на земеделието и храните одобрява програмите по ал. 1 след предложение на изпълнителния директор на БАБХ.

2. **НАРЕДБА № 31 от 29.12.2005 г.** за мерките за профилактика, ограничаване и ликвидиране на Нюкясълската болест (псевдоочума) по птиците и за условията и реда за прилагането им; Издадена от министъра на земеделието и горите, обн., ДВ, бр. 12 от 7.02.2006 г., в сила от 1.05.2006 г., изм. и доп., бр. 76 от 15.09.2006 г., бр. 64 от 18.07.2008 г., изм. и доп., бр. 8 от 29.01.2010.

3. **Практическо ръководство за борба с Нюкясълската болест по птиците**, приложение към Заповед № РД 11- 754/ 20.07.2009 год. на генералния директор на НВМС.

Описание на програмата:

ЦЕЛ: Настоящата програма има за цел да следи за наличието и

разпространението на вируса на Нюкясълската болест по домашните и диви птици.

Продължителност: 01.01.2014- 31.12.2014 г.

Компетентни органи:

Българска агенция по безопасност на храните (БАБХ) е централната компетентна власт отговорна за контрол по изпълнението на програмата.

Програмата се изпълнява от регистрирани лекари на ветеринарна практика под контрола на официални ветеринарни лекари, отговарящи за общините в страната в двадесет и осемте области на страната.

Ежемесечно Началник отдел здравеопазване на животните на 28- те ОДБХ писмено докладват в Дирекция ЗХОЖКФ към БАБХ за резултатите от изпълнението на програмата чрез месечни отчети по образец ЗХОЖ 74.

Ежемесечно Националната Референтна Лаборатория за Инфлуенца и Нюкясълска болест по птиците изпраща информация в Дирекция ЗХОЖКФ към БАБХ за изследваните проби по програмата.

Изследването на пробите се извършва в:

- Националната Референтна Лаборатория за Инфлуенца и Нюкясълска болест към Националния научноизследователски ветеринарномедицински институт /НДНИВМИ/, София
- Регионалната Лаборатория за диагностика на птичи грип и Нюкясълска болест във Варна.

Всички положителни резултати от–вирусологичните изследвания трябва бъдат изпратени до Референтната лаборатория на Европейската Общност за инфлуенца и Нюкясълска болест по птиците.

ОБЩИ ИЗИСКВАНИЯ И КРИТЕРИИ:

Настоящата програма се извършва чрез вземане и изследване на проби от птици чрез:

I. Серологични изследвания за Нюкясълска болест на проби взети от следните видове и категории птици:

1. неваксинирани срещу Нюкясълска болест домашни птици от кокошевия вид
2. домашни водоплаващи птици.
3. птици, развъждани и използвани за лов (жив пернат дивеч- фазани, яребици, пъдпъдъци, полудиви патици и т.н.).
4. домашни и диви гълъби.
5. прелетни /мигриращи/ птици.
6. екзотични птици, отглеждани във ферми или в клетки на територията на страната (щрауси, папагали и др.)
7. всички видове вносни птици - кокошеви, водоплаващи, екзотични.

8. птици от зоопарковете.
9. за контрол на извършената ваксинация във промишлените ферми

II. Вирусологични изследвания за хемаглутиниращи вируси на следните видове и категории птици:

1. пресни трупове от домашни птици от различни видове, категории и възрасти, умрели и/или убити с диагностична цел, проявяващи характерни признаци от страна на дихателната, кръвоносната, нервната или храносмилателната система за Нюкясълска болест.
2. домашни и полудиви водоплаващи птици, отглеждани на открито.
3. внесени от трети страни кокошеви, водоплаващи и екзотични птици, както и на трупове от същите, умрели по време на транспорта и до две седмици след това.
4. птици, отглеждани в зоопарковете, особено от водоплаващите и крайбрежните птици, както и пресни трупове от такива.
5. пресни трупове от птици, събрани от резерватите.
6. диви птици - от районите на "влажните зони", езерата, язовирите и поречията на реки, обхващащи миграционните пътища и местата за почивка и гнездене. Видов състав на пробите - 70% водоплаващи, 20% крайбрежни и 10% други птици.
7. различни партии в птицекланиците, произхождащи от различни селища;

ПОДБОР НА ПРОБИТЕ, СЪБИРАНЕ И ИЗПРАЩАНЕ:

За серологичните изследвания се вземат и изпращат за изследване серумни проби от клинично здрави птици съгласно Инструкцията за вземане на кръв от птици.

За вирусологичните изследвания се вземат и изпращат за изследване следните проби:

- Цели трупове на птици, умрели преди не повече от 4 часа, като пробите са охладени при незабавно изпращане, или замразени при забавяне на изпращането.
- Органни проби от:

Вътрешни органи от умрели или заклани птици (черен дроб, далак, бял дроб, трахея, бъбрек), приготвени като обща проба в стерилен плик, стерилна петриева паничка или друг стерилен стъклен съд или в отделни стерилни пликчета от всяка птица.

Клоака с части от черва със съдържание като отделна от вътрешните органи сборна проба.

Глава с шия опаковани в отделен плик.

Така събраните проби се замразяват до тяхното изпращане без добавяне на транспортна среда.

- Клоакални тампон- проби - вземат се от живи или прясно убити птици със стерилен тампон, който се въвежда дълбоко в клоаката на птицата и енергично се остъргва стената на червото. Тампонът трябва добре да се напои със клоакално съдържание. След това той се потапя в транспортната среда на контейнера придружаващ стерилния тампон, които се затваря добре.

изследване в лабораторията не се изпращат клоакални тампон-проби без транспортна среда, която задължително трябва да бъде за вирусологично изследване.

- Трахеални тампон-проби - получават се от живи птици чрез въвеждане на сух памучен тампон в трахеята и внимателно остъргване на стената, след което тампонът се поставя в контейнер с транспортна среда.
- Фекални проби - вземат се съвсем пресни, влажни изпражнения, в които се потапя тампон и добре напоен с тях се поставя в контейнер с транспортна среда. Пробите се изпращат веднага до лабораторията, поставени в контейнер с лед. Ако не е възможно незабавното им изпращане, могат да се държат на 0 - 4oC за 48 - 72 часа, а за по-дълъг период - на -70oC.

БРОЙ НА ПРОБИТЕ:

Той се определя съобразно епизоотичната обстановка в страната в момента, броя птицевъдните обекти и броя места, посещавани от прелетните птици. Целта е да се вземат достатъчно брой проби за да се открие, ако има макар и едно болно животно в популацията.

В настоящата програма е предвиден определен брой проби за изследване, като са взети предвид рисковите райони и групи птици. В случай на промяна на епизоотологичната обстановка, броят на пробите също подлежи на промяна, като последните се завишават. Подробното описание на броя проби по селища и вид изследване (серологично или вирусологично) е посочено в приложения 1 и 2. В приложение 3 са посочени критериите за определяне на броя на пробите. При определяне на броя на животновъдните обекти, вкл. и "задните дворове", от които трябва да бъдат взети проби се спазва изискването да бъдат обхванати 99% от животновъдните обекти в населените места: /промишлени ферми, малки ферми с търговска цел и "задните дворове", в които се отглеждат птици за собствена консумация/.

При определяне на броя на пробите за вземане и изпращане за изследване се спазва изискването посочено в таблицата Приложение 3 при 95 % достоверност на резултатите и 10 % разпространение на вируса на заболяването.

При взимане и изпращане на проби от птице- и гъшекланици се спазва изискването: от всяка постъпваща за клане партия се определя броя на пробите съгласно таблицата за 95% достоверност и 10% разпространение на вируса на заболяването, посочена в приложение 3.

Честотата за провеждане на надзора в критичните точки трябва да бъде определена индивидуално в зависимост от специфичните особености на всяка една от тях (източници на инфекцията, начин на предаване, движещи сили на инфекциозния процес, инкубационен период, природни резервоари, климатични фактори, сезон, стопански дейности, период на миграция на птиците и др.)

Режимът на надзор в останалите части от страната, които се считат с по-ниска степен на риск може да бъде с по-малка интензивност.

При изпълнение на настоящата програма е необходимо да се обръща внимание на индикатори като:

- броя и честотата на извършените проверки на животновъдните обекти и местата на обитаване на дивите птици за месеца в дадения регион,

броя на посетените обекти, броя на прегледаните животни, констатирани случаи на смъртност и заболявания, промени в поведението на мигриращите птици;

- регистрираните за месеца болести, наблюдаваните клинични симптоми, вида и броя на засегнатите животни вида и броя на изпратените проби за лабораторни изследвания и резултатите от тях;
- регистрираните случаи на съмнение за дадена болест и процента на лабораторно потвърдените случаи;
- времето за реакция от подаването на сигнала при съмнение за заболяване, налагането на ограничителните мерки, вземането и изпращането на проби за лабораторно изследване до потвърждаването или отхвърлянето на диагнозата.
- Осъщественото движение на птици и продукцията за периода предхождащ клиничните признаци характерни за заболяването или периода предхождащ получените положителни серологични резултати.

СЪПРОВОДИТЕЛНО ПИСМО: Всички изпращани до Националната Референтна лаборатория проби се съпровождат с писмо по образец одобрено със заповед на изпълнителния директор на БАБХ.

ДИАГНОСТИКА ЗА НЮКЯСЪЛСКА БОЛЕСТ ПО ПТИЦИТЕ:

Диагностиката се провежда по следните методики:

Изолиране на вирус в кокоши ембриони по рутинните процедури на пробите от трупове, вътрешни органи и фекалии или РТП.

Идентификация на изолиран вирус чрез реакция задържане на хемаглутинацията.

Типизиране на изолираните вируси на нюкясълската болест, за определяне принадлежността им към велогенните, мезогенните или лентогенните щамове чрез провеждане на биологични тестове: средно време за умиране на 10 дневни кокоши ембриони, определяне на интрацеребрален патогенен индекс на 1-дневни пилета, а при нужда - изпращане на материал в международна референтна лаборатория за генетичен анализ.

Откриване на нуклеиновата киселина на вируса на нюкясълската болест чрез Обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция в реално време.

Серологичен мониторинг на птиците на територията на Република България за наличие на антитела срещу Нюкясълска болест чрез РЗХА и ЕЛАЙЗА.

УПРАВЛЕНИЕ НА ПОЛУЧЕНАТА ИНФОРМАЦИЯ:

В ЦУ на БАБХ се води регистър на получените резултати при изпълнение на настоящата програма. Получените резултати се анализират за определяне на стратегията за профилактика и надзор на заболяването Нюкясълска болест.

При констатиране на наличие на вирус и антитела при неваксинирани птици за заболяването Нюкясълска болест по птиците се предприемат мерките посочени в НАРЕДБА № 31 от 29.12.2005 г. за мерките за профилактика, ограничаване и ликвидиране на Нюкясълската болест (псевдочума) по птиците и за условията и реда за прилагането им.

ПРИЛОЖЕНИЕ I:

Схема по региони за изпращане на **серумни проби** от различни видове птици за лабораторен надзор срещу Нюкясълска болест (НБ). Програмата включва изследване срещу Нюкясълска болест само на неваксинирани птици или при съмнение за неправилно извършена ваксинация. Там където са посочени бройки за кокошки, вместо това може да се взема кръв и от пуйки. Пробите от кокошеви птици и от водоплаващи птици да се изпращат с отделни писма. Вземането на проби трябва да съвпада с периода на прелет на птиците и може да включва голям брой заклани домашни птици.

Пробите от 1 селище трябва да включват най-малко 3 различни двора.

№	Област	Селище/ферма	Вид птици, брой проби	Вид изследване	Изпращане през месеци	Общ брой проби
1.	Благоевград	10 селища	Водоплаващи - по 20 от селище	НБ	I - XII	200
2.	Бургас:	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
3.	Варна	5 селища	Водоплаващи - по 20 от селище	НБ	I - XII	100
		5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
4.	Велико Търново	2 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	60
5.	Видин	10 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	300

6.	Враца	10 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	300
7.	Габрово	2 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	60
8.	Добрич	10 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	300
9.	Кюстендил	10 селища	Водоплаващи - по 20 от селище	НБ	I - XII	200
10.	Кърджали	20 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	600
11.	Ловеч	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
12.	Монтана	10 селища	Водоплаващи - по 20 от селище	НБ	I - XII	200
13.	Пазарджик	6 ферми за угодяване на патици - мюлари	по 30 от ферма, от 2 партиди	НБ	I-IV X- XII	360
14.	Перник	5 селища	Водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	50

15.	Плевен	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
16.	Пловдив	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, ферми водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
17.	Разград	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
18.	Русе	5 селища	водоплаващи - по 20 от селище	НБ	I - XII	100
19.	Силистра	От 5 селища около Сребърна	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I-IV X- XII	150
20.	Сливен	2 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	60
21.	Смолян	2 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	60

22.	София - град	Зоопарк	Диви и екзотични птици - поне по 5 проби от всяка клетка и волиера и от всички новопристигнали	НБ,	I - XII	20
23.	София- област	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
24.	Стара Загора	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
25.	Търговище	2 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	60
26.	Хасково	От 3 селища около яз. Тракиец	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I-IV X- XII	90
27.	Шумен	5 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	150
28.	Ямбол	2 селища	Кокошки - по 20 от селище, водоплаващи - по 10 от селище	НБ	I - XII	60

	От всички зоопаркове в страната, където се отглеждат птици - поне по 5 проби от всяка клетка и волиера
	От всяка вносна екзотична птица
ОБЩ БРОЙ ПРОБИ ЗА НЮКЯСЪЛСКА БОЛЕСТ	
	4680

ПРИЛОЖЕНИЕ II

За вирусологично изследване трябва да се имат предвид видовете и категории птици, посочени в програмата. Пробите могат да бъдат **клоакални тампони, фекалии или цели трупчета**.

Домашни птици - изпращат се в случаите, в които не може да бъде изключено заболяването Нюкясълска болест (внезапна и бърза смъртност, характерни клинични признаци и патологични изменения).

Диви птици - от районите на езерата, язовирите и поречията на реки, обхващащи миграционните пътища и местата за почивка и гнездене. Видов състав на пробите - 70% водоплаващи, 20% крайбрежни и 10% други птици. Пробите от диви птици обхващат умрели птици (съвсем пресни трупове), отстреляни птици, а също и заловени птици с цел маркиране, типизиране, огледи и др., които след вземане на проба се освобождават.

Птици, отглеждани на открито - вземат се предвид посочените цифри, пробите могат да се вземат в кланицата и включват вътрешни органи или клоакални тампон-проби.

Период на изпращане - от дивите птици пробите се изпращат в сезона на прелета, а от домашните - през цялата година.

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Необходимо е да се определи доверителната граница (95% или 99%) и очаквания процент на разпространение на болестта сред популацията от възприемчиви животни, за да може да се изчисли броя на пробите които ще се изследват.

Определяне броя на необходимите проби за откриване на поне едно серопозитивно животно в заразеното стадо при 95% гаранционна вероятност.

Големина на стадо (N) Бр жив	Процент на разпространение на заболяването в стадото (d/N)											
	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0,5%	0,1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	48	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	55	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
120	5	6	9	10	13	18	26	47	86	111	120	120
140	5	6	9	11	13	18	26	48	92	124	139	140
160	5	6	9	11	13	18	27	49	97	136	157	160
180	5	6	9	11	13	18	27	50	101	146	174	180
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
250	5	6	9	11	14	18	27	53	112	175	228	250
300	5	6	9	11	14	18	28	54	117	189	260	300
350	5	6	9	11	14	18	28	54	121	201	287	350
400	5	6	9	11	14	19	28	55	124	211	311	400
450	5	6	9	11	14	19	28	55	127	218	331	450
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
600	5	6	9	11	14	19	28	56	132	235	379	597
700	5	6	9	11	14	19	28	57	134	243	402	691
800	5	6	9	11	14	19	28	57	136	249	421	782
900	5	6	9	11	14	19	28	57	137	254	437	868
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950
1200	5	6	9	11	14	19	29	57	140	264	471	1102
1400	5	6	9	11	14	19	29	58	141	269	487	1236
1600	5	6	9	11	14	19	29	58	142	272	499	1354
1800	5	6	9	11	14	19	29	58	143	275	509	1459
2000	5	6	9	11	14	19	29	58	143	277	517	1553
3000	5	6	9	11	14	19	29	58	145	284	542	1895
4000	5	6	9	11	14	19	29	58	146	288	556	2108
5000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	290	564	2253
6000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	291	569	2358
7000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	292	573	2437
8000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	293	576	2498
9000	5	6	9	11	14	19	29	59	148	294	579	2548
10000	5	6	9	11	14	19	29	59	148	294	581	2588
∞	5	6	9	11	14	29	29	59	149	299	598	2995

Определяне броя на необходимите проби за откриване на поне едно серопозитивно животно в заразеното стадо при 99% гаранционна вероятност

Големината на стадо-то(N)	Процент на разпространение на заболяването в стадото (d/N)											
	50	40	30	25	20	15	10	5	2	1	0,5	од
10	5	6	7	10	10	10	10	10	10	10	10	10
20	6	8	10	11	13	15	18	20	20	20	20	20
30	6	8	11	13	15	19	23	30	30	30	30	30
40	7	8	11	13	16	21	27	36	40	40	40	40
50	7	9	12	14	17	22	29	42	50	50	50	50
60	7	9	12	14	18	23	31	47	60	60	60	60
70	7	9	12	15	18	24	33	51	68	70	70	70
80	7	9	12	15	19	24	34	54	76	80	80	80
90	7	9	12	15	19	25	35	57	83	90	90	90
100	7	9	13	15	19	25	36	59	90	100	100	100
120	7	9	13	15	19	26	37	63	102	118	120	120
140	7	9	13	16	20	26	38	67	113	135	140	140
160	7	9	13	16	20	26	39	69	122	151	160	160
180	7	9	13	16	20	27	39	71	129	166	179	180
200	7	9	13	16	20	27	40	73	136	180	198	200
250	7	9	13	16	20	27	40	76	150	210	244	250
300	7	9	13	16	20	27	41	78	160	235	286	300
350	7	9	13	16	21	28	42	80	168	256	325	350
400	7	9	13	16	21	28	42	81	174	273	360	400
450	7	9	13	16	21	28	42	82	179	288	392	450
500	7	9	13	16	21	28	42	83	183	300	421	500
600	7	9	13	16	21	28	43	84	190	321	470	600
700	7	9	13	16	21	28	43	85	195	336	512	700
800	7	9	13	16	21	28	43	85	199	349	546	798
900	7	9	13	16	21	28	43	86	202	359	576	895
1000	7	9	13	16	21	28	43	86	204	368	601	990
1200	7	9	13	16	21	28	43	87	208	381	642	1175
1400	7	9	13	16	21	2	44	87	211	391	674	1348
1600	7	9	13	16	21	29	44	88	213	399	699	1510
1800	7	9	13	16	21	29	44	88	215	405	720	1661
2000	7	9	13	16	21	29	44	88	216	410	737	1800
3000	7	9	13	16	21	29	44	89	220	425	792	2353
4000	7	10	13	16	21	29	44	89	222	433	821	2735
5000	7	10	13	16	21	29	44	89	223	438	840	3009
6000	7	10	13	16	21	29	44	90	224	442	852	3214
7000	7	10	13	16	21	29	44	90	225	444	861	3373
8000	7	10	13	16	21	29	44	90	225	446	868	3500
9000	7	10	13	16	21	29	44	90	226	447	874	3604
10000	7	10	13	16	21	29	44	90	226	448	878	3689
∞	7	10	13	16	21	29	44	90	228	459	919	4603

Избира се таблицата със съответно ниво на доверие (95 % или 99 %), след което по колоната, отговаряща на очаквания процент на инфектираните животни, и по колоната за големината на стадото се определя броят на необходимите проби.

1. Съображения при определяне големината на извадката (брой на пробите)

Решението за необходимия брой проби трябва да се вземе, имайки предвид следните фактори:

- точността която се изисква (90%, 95% или 99% доверителен интервал)
- използвания метод на изследване (чувствителност и специфичност)
- размерът на най- малката подгрупа и действителното отклонение на различните варианти (подгрупи) спрямо средната стойност за популацията
- теоремата за основните ограничения от теорията за пробовземането, която казва, че при голям брой проби разпределението на стойностите в представителната извадка ще е близко до това на популацията от която е взета. Доверителния интервал може да се изчисли с 90% сигурност с отклонение от средната стойност (в двете посоки на махалото) ± 1.65 (т.нар. стандартна грешка) или при 95% сигурност с отклонение от средната стойност ± 1.96 (стандартна грешка), а при 99% сигурност с отклонение от средната стойност ± 2.58 (стандартна грешка). Доверителния интервал се тълкува, като например при 90% или 95% или пък 99% съответно 90, 95 или 99 от случаите на 100 проби взети от прицелната популация ще съдържат истинските стойности за тази популация и ще са в доверителните граници.

2. Опростен метод за определяне на необходимия брой проби за откриване на дадена болест в голяма популация

Съществува опростен метод за определяне броя на необходимите проби за откриване на дадена болест в животинската популация, както и възможния брой на заболелите животни, които са пропуснати и останали неразкрити при вземането на пробите. В случая когато се касае за 95% доверително ниво, метода е познат като "правилото на триъгълника". При него за определяне на необходимия брой проби за изследване (т.нар. представителна извадка за стадото, групата или популацията), с цел да се открие заболяването в дадено стадо или популация, числото 300 се дели на очакваното разпространение.

Пример. Ако искаме да използваме опростената формула за изчисляване броя на пробите необходими за откриване заболяване в стадо от 500 птици, при очаквано разпространение на болестта в стадото 25%, трябва просто да разделим $300 : 25 = 12$. Това е минималния брой проби необходим за да ни даде 95% сигурност, че в изследваното стадо не е проникнала болестта. При доверително ниво 99%, числото 300 трябва да се замени с 460 (т.е. $460 : 25 = 18,4$), а при 99,99% с числото 690 ($690 : 25 = 27,6$).

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

ИНСТРУКЦИЯ ЗА ВЗЕМАНЕ, СЪХРАНЕНИЕ И ИЗПРАЩАНЕ НА КРЪВНИ ПРОБИ ОТ ПТИЦИ

За получаване на качествени кръвни проби от птици, респ. получаване на обективни резултати при лабораторното им изследване, следва да се спазват общо приетите правила за вземане, обработка, съхранение и транспортиране на същите. Желателно е в лабораторията да се изпращат серумни проби, тъй като транспортирането и съхраняването на проби с коагулум често води до хемолиза и разваляне и невъзможност пробата да се изследва.

1. Кръвни проби за лабораторни изследвания се вземат от нормални (клинично здрави) птици, избрани на случаен принцип от различни части на птичарника.
2. За скринингови изследвания от едно стадо се вземат, за статистическа достоверност, не по-малко от 30 броя индивидуални кръвни проби в обем 1,5 - 3 мл всяка (за кеклици и по-дребни птици - около 1 - 1,5 мл).
3. Кръвта се взема най-често от подкрилната вена, като се спазват правилата на асептиката, включително туширане на мястото със спирт или йодна тинктура.
4. Кръвта се взема със индивидуални стерилни спринцовки от обем 2-3 мл и индивидуални тънки игли с остър връх, с размер в зависимост от големината на птицата.
5. Кръвта от спринцовката се излива внимателно като се маха иглата, без излишен натиск, в сухи, стерилни малки шишенца, като се оставя да се стича по стената на шишето и се внимава да не се образува пяна. Кръвта не бива да запълва повече от 1/2 от шишенцето. Кръвта се предпазва от замърсяване чрез затваряне на шишенцата с плътна гумена тапа. Препоръчително е шишето, до коагулиране на кръвта, да е поставено в легнало положение, тъй като така се благоприятства образуването на възможно най-тънък слой кръвен съсирек и се отделя максимално количество и качествен серум.
6. Кръвта се оставя за съсирване (коагулиране) при стайна температура за около 15 минути, след което трябва съсирекът да бъде внимателно открит (отделен) от стената с предварително потопена в спирт, фламбирана на пламък и охладена игла от спринцовка, мандрен или тънка тел (кламер), чрез няколкократно въртеливи движения (кръжене) между стената на стъклото и оформения коагулум, без да се допуска раздробяването му.
7. Отделянето на кръвните серуми може да стане чрез изваждане на коагулумите или чрез отливане на серумите в нови шишенца.
8. Шишенцата с кръвни проби, добре затапени, наредени в изправено положение и добре пакетирани, се транспортират най-бързо до съответната диагностична лаборатория или оставят за отделяне на серума на стайна температура за 12-18 часа, предпазени от директна слънчева светлина. Кръвни проби с коагулум не трябва да се замразяват (тоест да се държат при по-ниска от +4°C температура), нито разклащат, тъй като настъпва хемолиза и стават негодни за изследване и се бракуват. Ако не е възможно бързото доставяне на

кръвните проби в диагностичната лаборатория (повече от 24 часа), серумите от тях следва на място, внимателно да се отлеят в други шишенца или коагулумът им внимателно да се отдели от шишето. Отделените по такъв начин серуми могат да се съхраняват в хладилник на +4oC до 3-4 дни, а за по-продължителен период - и в замразено състояние на възможно най-ниска температура.

9. Пробите се изпращат до съответната диагностична лаборатория най-добре чрез куриер и се съпровождат с писмо с име и адрес на изпращача, собственика, вида на птиците, техния общ брой, както и броя на изпратените проби, наличието на някакви заболявания и информация за извършените ваксинации. В него задължително се посочват заболяванията, за които се очаква да се изследват пробите. Писмото трябва да се постави в полиетиленов плик, за да не се изцапа при евентуално изтичане на серум от някое шишенце.
10. Възрасти на птиците, най-подходящи за скринингови изследвания са:
 - Пилета-бройлери - на 1 дневна, 4-5 седмична и в края на угоителния период;
 - Подрастващи родители и стокови носачки - както при бройлерите плюс на 10-18,20 седмична възраст.
11. Носачки (разплодни и стокови) - през целия експлоатационен период.
12. Предпочитани за серологични лабораторни изследвания са стада, които са показали проблеми предимно от респираторен или друг характер, включително усложнения от вторични инфекции.
13. Не се препоръчва изпращане за изследване в диагностични лаборатории на кръвни проби с видима хемолиза, в процес на загниване и замърсен.