

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, ŠUMARSTVA I VODNOGA GOSPODARSTVA

282

Na temelju članka 11. stavka 2. i članka 41. stavka 6. Zakona o veterinarstvu (»Narodne novine«, broj 70/97, 105/01 i 172/03), ministar poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva donosi

PRAVILNIK

O DIJAGNOSTIČKOM PRIRUČNIKU ZA KLASIČNU SVINJSKU KUGU

Članak 1.

Ovim Pravilnikom utvrđuju se dijagnostički postupci, način uzorkovanja i čimbenici za procjenu laboratorijskih metoda koje se preporučuju u dijagnosticiranju klasične svinjske kuge, opisani u Dijagnostičkom priručniku koji je njegov sastavni dio.

Članak 2.

Potvrda nazočnosti klasične svinjske kuge, koja se utvrđuje u skladu s Pravilnikom o mjerama za otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje klasične svinjske kuge (»Narodne novine«, broj 187/2004) mora se temeljiti na:

- a) kliničkim znakovima i *post mortalmom* nalazu;
- b) otkrivanju virusa, virusnih antigena ili genoma u uzorcima tkiva, organa, krvi ili tjelesnih izlučevina svinja;
- c) postojanju specifične reakcije protutijela u krvnome uzorku, u skladu s dijagnostičkim postupcima, metodama uzimanja uzoraka i čimbenicima za ocjenjivanje rezultata testova utvrđenim u Dijagnostičkom priručniku iz članka 1. ovog Pravilnika.

Članak 3.

1) Laboratorij ovlašten za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge može primijeniti modifikacije laboratorijskih testova koji su opisani u Dijagnostičkom priručniku iz članka 1. ovog Pravilnika ili druge testove pod uvjetom da imaju jednaku osjetljivost i specifičnost kao u njemu opisani testovi.

2) Osjetljivost i specifičnost modificiranih ili drugih testova iz stavka 1. ovoga članka procjenjuje se u okviru provođenja periodičnih usporednih testiranja, koje za klasičnu svinjsku kugu organizira Referentni laboratorij EU za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge.

Članak 4.

Dijagnostički priručnik iz članka 1. ovoga Pravilnika tiskan je u prilogu i čini njegov sastavni dio.

Članak 5.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u »Narodnim novinama«.

Klasa: 322-01/05-01/3

Urbroj: 525-01-05-01

Zagreb, 18. siječnja 2005.

Ministar
Petar Čobanković, v. r.

PRILOG I
DIJAGNOSTIČKI PRIRUČNIK
POGLAVLJE I.

Uvod, ciljevi i definicije

1. U cilju ujednačavanja postupaka dijagnosticiranja klasične svinjske kuge (u daljnjem tekstu: KSK) ovim se Priručnikom:

a) daju smjernice i minimalni uvjeti koje moraju zadovoljavati dijagnostički postupci, metode uzimanja uzoraka te mjerila za ocjenjivanje rezultata kliničkog i *post-mortalnog* pretraživanja te laboratorijskih testova za postavljanje dijagnoze KSK¹;

b) određuju minimalni bio-sigurnosni uvjeti i norme kakvoće kojih se treba pridržavati u laboratorijima za dijagnosticiranje KSK te prilikom prijevoza uzoraka;

c) određuju laboratorijski testovi koji će se koristiti za dijagnosticiranje KSK i laboratorijske tehnike za genetsku tipizaciju izolata virusa KSK.

2. Ovaj je Priručnik namijenjen prvenstveno državnim tijelima odgovornim za nadzor i kontrolu KSK. Naglasak je stoga na načelima i primjeni laboratorijskih testova te procjenjivanju njihovih rezultata, a ne na pojedinostima provođenja laboratorijskih tehnika.

3. Za potrebe ovog Priručnika, osim definicija navedenih u članku 2. Pravilnika o mjerama za otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje KSK («Narodne novine», broj 187/2004), (u daljnjem tekstu: Pravilnik), primjenjuju se sljedeći pojmovi:

a) »sumnjivo gospodarstvo« označava svinjogojsko gospodarstvo na kojem se za jednu ili više svinja sumnja da su zaražene virusom KSK ili gospodarstvo u kontaktu s njim, u smislu definicije iz članka 2. točke 6. Pravilnika;

b) »singleton reaktori« označavaju sve svinje koje su nakon serološkoga pretraživanja polučile pozitivne rezultate, a da se zna da nisu bile u kontaktu s virusom KSK i da ne postoje dokazi da se zaraza s njih proširila na svinje koje su bile u kontaktu s njima²;

c) »epidemiološka podjedinica« ili »podjedinica« označava nastambu, mjesto ili prostor na kojemu se skupine svinja s gospodarstva drže na takav način da često dolaze u izravan ili neizravan međusoban kontakt, ali se drže odvojeno od drugih svinja s istoga gospodarstva;

d) »svinje koje su bile u kontaktu sa zaraženim svinjama« označava svinje koje su tijekom zadnjih 21 dan na gospodarstvu bile u izravnom dodiru s jednom ili više svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom KSK.

POGLAVLJE II.

Opis KSK s naglaskom na diferencijalnu dijagnostiku

A. UVOD

1. Uzročnik KSK je RNK virus koji je svrstan u porodicu *Flaviviridae*, rod *Pestivirus*. Virus KSK je antigeno srodan s ostalim pestivirusima, a to su virus virusnog proljeva/bolesti sluznice goveda (VP/BSG) i virus borderske bolesti (BB). Ova srodnost može dovesti do pojave lažno pozitivnih rezultata laboratorijskih pretraživanja zbog mogućih unakrižnih reakcija.

2. Virus KSK razmjerno je stabilan u sekretima i ekskretima zaraženih svinja, lešinama, svježem mesu i proizvodima od mesa svinja. Inaktiviraju ga detergentski, otapala za masti,

proteaze i uobičajeni dezinficijensi.

3. Najčešći izvori i putevi širenja KSK su oro-nazalne sluznice. Virus KSK se širi bilo izravnim ili neizravnim kontaktom sa zaraženim svinjama ili hranom kontaminiranom virusom KSK. U područjima s velikom gustoćom svinja virus se lako širi među susjednim svinjogojским gospodarstvima. Moguća je i zaraza putem sjemena zaraženih nerastova.

4. Inkubacija traje od 7 do 10 dana, s time da u pojedinim slučajevima klinički znakovi bolesti mogu postati vidljivi 2 do 4 tjedna nakon infekcije virusom KSK pa i duže ako se radi o odraslim rasplodnim svinjama ili o infekciji slabo virulentnim sojevima virusa.

5. KSK se očituje različitim znakovima bolesti koje je moguće zamijeniti s kliničkim znakovima drugih bolesti. Intenzitet simptoma ovisi o dobi životinje i virulenciji virusa. Mlađe dobne kategorije svinja su osjetljivije. U rasplodnih svinja tijekom zaraze je često blag ili čak subklinički.

6. Razlikujemo perakutni, akutni, subakutni i kronični tijek bolesti, od kojih su akutni i kronični najznačajniji. Poseban oblik KSK javlja se nakon intrauterine infekcije fetusa (u daljnjem tekstu: prenatalni oblik).

B. AKUTNI TIJEK

1. Akutni tijek KSK najčešće se javlja u odbijene prasadi i tovljenika. Prvi znakovi su: prestanak uzimanja hrane, tromost, povišena tjelesna temperatura, sljepljeni kapci, otečeni limfni čvorovi, teškoće kod disanja (apnea, dispnea), opstipacija nakon koje slijedi dijareja. Tipična krvarenja na koži obično se uočavaju na uškama, repu, trbuhu i s unutrašnje strane nogu tijekom drugog i trećeg tjedna bolesti, a traju do uginuća. Ponekad se javljaju i neurološki znakovi poput oduzetosti stražnjih nogu, teturanja i grčeva. Stalno je prisutna vrućica. Tjelesna temperatura uglavnom je viša od 40 °C, no kod odraslih svinja ne mora prijeći 39,5 °C.

2. Klasična svinjska kuga izaziva tešku leukopeniju i imunosupresiju što često dovodi do sekundarnih crijevnih i dišnih infekcija. Znakovi tih sekundarnih infekcija mogu prikriti ili preklopiti najučestalije znakove KSK te tako dovesti do postavljanja pogrešne dijagnoze. Uginuće obično nastupa unutar mjesec dana. Oporavak i nastanak protutijela je moguć i to najčešće u odraslih rasplodnih svinja koje nisu pokazivale teške kliničke znakove KSK. Protutijela za virus KSK mogu se utvrditi 2 do 3 tjedna nakon infekcije.

3. Patološke promjene koje se uočavaju prilikom *post-mortalnog* pregleda najčešće su na limfnim čvorovima i bubrezima. Limfni čvorovi su edematozni i hemoragični. Bubrezi mogu biti posuti petehijalnim i ekhilotičnim hemoragijama. Slična krvarenja uočavaju se na sluznicama mokraćnog mjehura, grkljana, epiglotisa te na serozama prsne i trbušne šupljine i srcu. Čest je nalaz negnojnog encefalitisa. Promjene koje nastaju kao posljedica sekundarnih infekcija mogu prikriti kliničke znakove KSK. Patognomonične promjene su infarkti na slezeni, ali se rijetko javljaju.

4. Općenito gledano, klinička i patološka slika akutnog tijeka afričke svinjske kuge vrlo je slična onoj KSK. Krvarenja na koži i uškama lako se uočavaju i upućuju na postavljanje sumnje u akutnu afričku svinjsku kugu ili KSK. Neke druge bolesti dovode do sličnih promjena. Na akutni tijek KSK treba posumnjati i kod sumnje na: vrbnac, reprodukcijski i respiratorni sindrom svinja (RRSS), otrovanje kumarinom, purpurno krvarenje, sindrom kržljivosti odbite prasadi, sindrom dermatitisa i nefropatije svinja, infekcije salmonelama ili pasterelama te pri ostalim promjenama na organima probavnog i dišnog sustava koje prati povišena tjelesna temperatura i kod kojih svinje ne reagiraju na liječenje antibioticima.

5. Virus KSK izlučuje se i širi slinom, urinom i izmetom, počevši od pojave kliničkih znakova do uginuća. Virus KSK može se širiti i sjemenom.

C. KRONIČNI TIJEK

1. Kronični tijek bolesti javlja se u svinja koje ne mogu razviti odgovarajući imunosni odgovor na virus KSK. Početni znakovi kroničnog tijeka KSK su slični akutnom tijeku bolesti. Kasnije prevladavaju nespecifični znakovi KSK poput intermitentne vrućice, kroničnog enteritisa i kržljivosti. Tipične hemoragije na koži izostaju. Kliničke znakove bolesti svinje mogu pokazivati dva do tri mjeseca prije uginuća. Svinje izlučuju virus KSK od infekcije do uginuća.

2. Patološke promjene su manje karakteristične, naročito zbog izostanka krvarenja na organima i serozama. U svinja s kroničnom dijarejom uobičajene su promjene na ileumu, ileocekalnom području i rektumu.

3. Budući da su klinički znakovi kronične KSK razmjerno nespecifični, za postavljanje diferencijalne dijagnoze potrebno je razmotriti mnoge druge bolesti. Vrućica se ne pojavljuje nužno u svih bolesnih svinja, ali je uvijek prisutna u nekoliko svinja na zaraženom gospodarstvu.

D. PRENATALNI OBLIK I ZAKAŠNJELA POJAVA KSK

1. Virus KSK može proći kroz posteljicu (placentu) suprasnih krmača i inficirati plodove, a da pri tome krmače ne pokazuju znakove bolesti. Ishod transplacentalne infekcije ovisi o stadiju suprasnosti i virulenciji virusa. Infekcija krmača u ranim stadijima suprasnosti može rezultirati pobačajem, prasenjem mrtvorođene prasadi, mumifikacijom ili malformacijom plodova. Navedene promjene dovode do smanjenja indeksa prasenja na gospodarstvu. Infekcija krmača do 90-og dana suprasnosti može dovesti do prasenja perzistentno inficirane prasadi koja prilikom prasenja ne pokazuje kliničke znakove bolesti, a ugiba nakon nekoliko mjeseci. Po prasnju, takva prasad zaostaje u rastu i razvoju te povremeno pokazuje znakove kongenitalnog tremora. Ovakav se tijek naziva »zakašnjelom pojavom KSK«. Ova prasad može imati ključnu ulogu u širenju bolesti i održavanju virusa KSK u populaciji svinja budući da do ugibanja stalno izlučuje virus KSK.

2. Prepoznavanje KSK može biti posebno teško na gospodarstvima rasplodnih svinja zato što tijek bolesti može biti vrlo blag i može ga se zamijeniti s drugim bolestima. Smanjenu plodnost i pobačaje može prouzročiti virus KSK jednako kao i zaraza virusima parvoviroze svinja, RRSS-a, bolesti Aujeszkoga te infekcija leptospirama. Nakon pobačaja uzrokovanog virusom KSK pobačeni sadržaj patološki nije moguće razlikovati od pobačenog sadržaja pobačaja uzrokovanih drugim uzročnicima. Ukoliko postoji sumnja na neku zaraznu bolest reprodukcijskog sustava kad god se dotično gospodarstvo smatra ugroženim (npr. zbog smještaja gospodarstva u području u kojem se KSK pojavljuje u divljih svinja) i u svakom slučaju kada su učestalije zarazne bolesti reprodukcijškoga sustava isključene, potrebno je odmah provesti pretrage na KSK.

POGLAVLJE III.

Glavni kriteriji prema kojima se neko gospodarstvo može smatrati sumnjivim na zarazu virusom klasične svinjske kuge

Odluka o tome da se neko gospodarstvo smatra sumnjivim na KSK donosi se na temelju sljedećih nalaza, mjerila i razloga:

a) kliničkih i patoloških nalaza na svinjama. Glavni klinički i patološki nalazi koje treba razmotriti su:

- vrućica s pojačanim pobolom i smrtnošću;
- vrućica sa sindromom krvarenja;
- vrućica s neurološkim simptomima;
- vrućica nepoznatog podrijetla kod koje liječenje antibioticima nije uspjelo poboljšati zdravstveno stanje;

- pobačaji i povećani problemi plodnosti tijekom zadnja tri mjeseca;
 - urođeno drhtanje prašćića (kongenitalni tremor);
 - kronično bolesne životinje;
 - mlade životinje zaostale u razvoju (kržljave);
 - petehijalna i ekhilotična krvarenja, posebno na limfnim čvorovima, bubrezima, slezeni, mokraćnom mjehuru i grkljanu;
 - infarkti ili hematomi, osobito na slezeni;
 - butoni na debelom crijevu u kroničnim slučajevima, osobito pored ileo-cekalnog spoja;
- b) epidemioloških istraživanja. Glavni epidemiološki podaci koje treba razmotriti su:
- jesu li svinje bile u izravnom ili neizravnom kontaktu sa svinjogojkim gospodarstvom za koje je dokazano da je zaraženo KSK;
 - je li gospodarstvo isporučilo svinje za koje se naknadno pokazalo da su zaražene KSK;
 - jesu li krmače umjetno oplodene sjemenom koje potječe od nerasta sumnjivih na KSK;
 - je li bilo izravnih ili neizravnih dodira svinja iz populacije u kojoj se pojavila KSK s divljim svinjama;
 - drže li se svinje na otvorenom u području u kojem su divlje svinje zaražene KSK;
 - jesu li svinje hranjene napojem i postoji li sumnja da se s tim napojem nije postupalo na način da se inaktivira virus KSK;
 - je li postojala mogućnost izlaganja virusu KSK (npr. preko osoba i prijevoznih sredstava koji su ulazili na gospodarstvo);
- c) nalaza serološkoga pretraživanja. Glavni laboratorijski nalazi koje treba uzeti u obzir su:
- nalaz specifičnih protutijela nastalih nakon neopažene infekcije virusom KSK ili cijepljenja³;
 - unakrižna reakcija između protutijela na virus KSK i na druge pestivirus⁴;
 - otkrivanje tzv. singleton reaktora⁵.

POGLAVLJE IV.

Postupci provjere i uzimanja uzoraka

A. SMJERNICE I POSTUPCI ZA KLINIČKI PREGLED I UZIMANJE UZORAKA SVINJA SA SUMNJIVIH GOSPODARSTAVA

1. Nadležni veterinarski inspektor mora narediti obavljanje odgovarajućih pregleda, uzimanje uzoraka i laboratorijsko pretraživanje uzoraka uzetih na sumnjivim gospodarstvima kako bi se potvrdila ili isključila KSK u skladu sa smjernicama i postupcima utvrđenim u točki A. podtočkama 2. do 7. ovoga Poglavlja.

Bez obzira jesu li usvojene mjere iz članka 4. stavka 2. Pravilnika na gospodarstvu gdje se sumnja na pojavu KSK, smjernice i postupci iz točke A ovoga Poglavlja moraju se primijeniti i u slučajevima kada se diferencijalno dijagnostički sumnja na KSK. Tu su svrstani i slučajevi gdje klinički znakovi i epidemiološki podaci o tijeku bolesti u svinja ukazuju na malu vjerojatnost pojave KSK.

U svim ostalim slučajevima kad se sumnja da su jedna ili više svinja zaražene virusom KSK, na dotičnome sumnjivom gospodarstvu usvojiti će se mjere iz članka 4. stavka 2. Pravilnika.

U slučaju sumnje na KSK u klaonici, prijevoznome sredstvu, sajmu ili drugom mjestu primjenjivat će se smjernice i postupci utvrđeni podtočkama od 2. do 7. točke A. ovoga Poglavlja.

2. Kada nadležni veterinarski inspektor posjećuje sumnjivo gospodarstvo kako bi potvrdio ili isključio KSK, mora:

- provjeriti podatke o proizvodnji i zdravstvenom stanju svinja na gospodarstvu;
- pregledati sve proizvodne podjedinice na gospodarstvu kako bi odredio koje će svinje biti klinički pregledane.

Klinički pregled mora uključivati mjerenje tjelesne temperature i mora prvenstveno biti proveden na sljedećim svinjama ili skupinama svinja:

- bolesne i one koje slabije uzimaju hranu (anoreksične svinje);
- svinje u rekonvalescenciji od nekih drugih bolesti;
- svinje koje su nedavno dovedene iz područja u kojima je naknadno potvrđena pojava KSK ili s drugih sumnjivih mjesta;
- svinje koje su bile držane u podjedinicama koje su nedavno posjetile osobe koje su bile u kontaktu sa svinjama zaraženim ili sumnjivim na KSK ili osobe za koje je utvrđeno da su imale rizične kontakte s potencijalnim izvorom virusa KSK;
- svinje koje su već serološki pretražene na KSK, a na temelju rezultata sero-pretraživanja nije moguće isključiti KSK i svinje koje su bile u kontaktu sa zaraženim svinjama.

Ukoliko pregledom sumnjivog gospodarstva nisu nađene svinje ili skupine svinja navedenih u prethodnom stavku ove podtočke, nadležni veterinarski inspektor, ne dovodeći u pitanje ostale mjere koje se primjenjuju na dotičnome gospodarstvu u skladu s Pravilnikom i uzimajući u obzir epidemiološku situaciju, mora:

- obaviti dodatne preglede na dotičnom gospodarstvu u skladu s podtočkom 3. ove točke;
- ili

– narediti uzimanje uzoraka krvi svinja s dotičnoga gospodarstva za laboratorijsku pretragu. U tom se slučaju kao smjernice koriste postupci uzimanja uzoraka opisani u podtočki 5. ove točke i točki F. podtočki 2. ovoga Poglavlja; ili

- narediti provedbu mjera iz članka 4. stavka 2. Pravilnika, ili
- isključiti sumnju na KSK.

3. U odnosu na ovaj stavak, klinički pregled na dotičnome gospodarstvu mora se provoditi na slučajno odabranim svinjama iz pojedinih podjedinica za koje je utvrđeno ili se sumnja da postoji opasnost da je u njih unesen virus KSK.

Minimalni broj svinja koje treba pregledati mora omogućiti otkrivanje, s 95%-tnom sigurnošću, barem jedne svinje s povišenom tjelesnom temperaturom ako je povišena tjelesna temperatura prisutna u 10 % jedinki u tim podjedinicama.

Međutim, ako se radi o:

- rasplodnim krmačama, minimalni broj pregledanih krmača mora omogućiti otkrivanje barem jedne krmače s povišenom tjelesnom temperaturom, s 95%-tnom sigurnošću, ako se povišena tjelesna temperatura pojavljuje u 5% jedinki;
- centrima za prikupljanje sjemena, treba pregledati sve rasplodne neraste.

4. Ako se na sumnjivom gospodarstvu otkriju uginule svinje ili svinje na umoru potrebno je izvršiti preglede *post mortem*, po mogućnosti na barem pet takvih svinja, a osobito na svinjama koje:

- su prije uginuća pokazivale ili pokazuju tipične znakove KSK;
- imaju vrućicu;
- su uginule nedavno.

Ako takvi pregledi ne pokažu bolesne promjene koje ukazuju na prisutnost KSK, ali se smatra da je zbog epidemiološke situacije potrebno provesti daljnje pretrage:

- u podjedinici u kojoj su se držale uginule svinje ili svinje na umoru obvezno treba

obaviti klinički pregled u skladu s podtočkom 3. te uzeti uzorke krvi u skladu s podtočkom 5. ove točke, a

– mogu se obaviti i pregledi *post mortem* na 3 do 4 svinje koje su bile u doticaju sa zaraženim svinjama.

Bez obzira na prisutnost ili izostanak bolesnih promjena koje ukazuju na KSK, obavezno treba, radi obavljanja viroloških testova u skladu s Poglavljem V. točkom B. podtočkom 1. ovoga Dijagnostičkog priručnika, od svinja podvrgnutih pregledu *post mortem*, uzeti uzorke organa ili tkiva.

Preporuča se da to budu uzorci od nedavno uginulih svinja.

Prilikom obavljanja pregleda *post mortem* nadležni veterinarski inspektor treba narediti:

– poduzimanje potrebnih mjera predostrožnosti i higijenskih mjera radi sprječavanja širenja bolesti i

– da svinje, ako se radi o svinjama na umoru, budu usmrćene na human način.

5. Ako se na sumnjivom gospodarstvu otkriju daljnji klinički znakovi ili bolesne promjene koji bi mogli ukazivati na KSK, ali nadležno državno tijelo ocijeni da ti nalazi nisu dostatni da se potvrdi epidemija KSK te da stoga treba provesti laboratorijske testove, tada od sumnjivih svinja i od drugih svinja u svakoj od podjedinica u kojima se drže sumnjive svinje, u skladu s postupcima utvrđenima u nastavku, treba uzeti uzorke krvi za serološku pretragu.

Minimalni broj uzoraka koji se uzimaju za serološko pretraživanje mora s 95%-tnom sigurnošću omogućiti otkrivanje 10 % seroprevalencije (protutijela/prokuženosti) u dotičnoj podjedinici.

Međutim, ako se radi o:

– rasplodnim krmačama, minimalni broj krmača kojima se uzimaju uzorci mora s 95%-tnom sigurnošću¹ omogućiti otkrivanje prevalencije od 5%,

– središtima za sakupljanje sjemena, uzorke krvi treba uzeti od svih rasplodnih nerasta.

Broj uzoraka koji se uzima za virološke testove mora biti u skladu naputcima Uprave za veterinarstvo (u daljnjem tekstu: Uprave), koja mora voditi računa o raspoloživosti dijagnostičkih testova, osjetljivosti testova koji će se koristiti i o postojećem epidemiološkom stanju.

6. Ako je sumnja u prisutnost virusa KSK na dotičnome gospodarstvu povezana s rezultatima ranijih seroloških pretraživanja, osim uzimanja uzoraka krvi svinja navedenih u podtočki 2. ove točke, stavak drugi, peta alineja, primjenjuje se i sljedeći postupak:

a. ako su seropozitivne svinje ujedno i bređe krmače, neke od njih, po mogućnosti ne manje od tri, eutanazirat će se i podvrgnuti pregledu *post mortem*. Prije nego se krmače usmrte treba im uzeti uzorke krvi za daljnje serološko pretraživanje. Fetusi se podvrgavaju pregledu na virus KSK, virusni antigen ili genom virusa u skladu s Poglavljem VI. ovog Dijagnostičkoga priručnika radi otkrivanja intrauterine infekcije;

b. ako su seropozitivne svinje krmače koje doje prasad, svoj prasadu treba uzeti uzorke krvi i podvrgnuti ih pregledu na virus KSK, virusni antigen ili genom virusa kako se navodi u Poglavlju VI. ovog Dijagnostičkog priručnika. Uzorci krvi moraju se uzeti i krmačama te ih uputiti na daljnje serološko pretraživanje.

7. Ako nakon obavljenih pregleda na sumnjivom gospodarstvu nisu otkriveni klinički znakovi koji ukazuju na prisutnost virusa KSK, ali Uprava ocijeni da treba provesti daljnje laboratorijsko pretraživanje kako bi se KSK isključila, prilikom uzimanja uzoraka krvi kao smjernice će se upotrijebiti postupci utvrđeni u podtočki 5. ove točke.

B. POSTUPCI UZIMANJA UZORAKA NA GOSPODARSTVU PRILIKOM USMRĆIVANJA SVINJA NAKON ŠTO JE BOLEST POTVRĐENA

1. U svrhu utvrđivanja načina na koji je virus KSK unesen na zaraženo gospodarstvo i utvrđivanja vremena koje je proteklo od njegovog unošenja, prilikom ubijanja svinja na imanju, nakon što je izbijanje bolesti potvrđeno u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom a) Pravilnika, svinjama se radi obavljanja serološkog pretraživanja moraju nasumično uzeti uzorci krvi.

2. Minimalni broj svinja čiji se uzorci uzimaju mora biti dovoljan da se u svinja u svim podjedinicama na gospodarstvu, s 95%-tnom sigurnošću, otkrije 10%-tna seroprevalencija⁶.

Uzorci za virološke testove mogu se uzimati i u skladu s naputcima Uprave koja mora voditi računa o raspoloživosti dijagnostičkih testova, osjetljivosti testova koji će se koristiti kao i postojećoj epidemiološkoj situaciji.

3. Međutim, u slučaju sekundarnih epidemija, Uprava može odstupiti od podtočaka 1. i 2. ove točke te odrediti *ad hoc* postupke uzimanja uzoraka, pri čemu treba voditi računa o već raspoloživim epidemiološkim podacima na mjestu izbijanja KSK, o načinima na koji je virus unesen u gospodarstvo i o mogućnostima da se bolest s njega raširi.

C. POSTUPCI UZIMANJA UZORAKA OD SVINJA USMRĆENIH U OKVIRU PREVENTIVNIH MJERA NA SUMNJIVOM GOSPODARSTVU

1. Radi potvrde ili isključivanja KSK i radi prikupljanja novih epidemioloških podataka, kad se svinje na sumnjivom gospodarstvu usmrćuju u okviru preventivne mjere u skladu s odredbama članka 4. stavka 3. točke a) i članka 7. stavka 2. Pravilnika, moraju se, u skladu s postupkom utvrđenim podtočkom 2. ove točke, radi seroloških pretraživanja uzeti uzorci krvi, te radi viroloških pretraživanja uzorci krvi i tonzila.

2. Uzorci se prvenstveno uzimaju od:

- svinja koje pokazuju bolesne promjene *post mortem* koje upućuju na nazočnost KSK te od svinja koje su bile u doticaju s tim svinjama;
- drugih svinja koje su mogle biti u rizičnom kontaktu sa zaraženim svinjama ili onima za koje se sumnja da su zaražene virusom KSK.

Uzorci tih svinja uzimaju se u skladu s naputcima Uprave, koja mora voditi računa o postojećem epidemiološkom stanju. U tom slučaju, kao smjernice se koriste postupci uzimanja uzoraka utvrđeni u trećem i četvrtom podstavku ove podtočke.

Osim toga, svinje, podrijetlom iz svake podjedinice⁷ na gospodarstvu, od kojih se uzimanju uzorci treba odabrati metodom slučajnoga odabira. U tom slučaju, minimalan broj uzoraka koji se uzimaju za serološko pretraživanje mora s 95%-tnom sigurnošću omogućiti otkrivanje 10%-tne seroprevalencije u dotičnoj podjedinici.

Međutim, ako se radi o:

- rasplodnim krmačama, minimalni broj krmača od kojih se uzimaju uzorci mora s 95%-tnom sigurnošću omogućiti otkrivanje 5%-tne seroprevalencije⁸,
- centru za sakupljanje sjemena, uzorke krvi treba uzeti od svih nerasta.

Vrsta uzoraka koji se uzimaju za virološke testove i vrsta testa koji se koristi trebaju biti u skladu s naputcima Uprave koja mora voditi računa o raspoloživosti dijagnostičkih testova, osjetljivosti laboratorijskih testova te o postojećoj epidemiološkoj situaciji.

D. POSTUPCI PROVJERE I UZIMANJA UZORAKA PRIJE DAVANJA ODOBRENJA ZA PRESELJENJE SVINJA IZ GOSPODARSTAVA SMJEŠTENIH U ZARAŽENOM I UGROŽENOM PODRUČJU I U SLUČAJU DA SU TE SVINJE ZAKLANE ILI USMRĆENE

1. Ne dovodeći u pitanje odredbe članka 11. stavka 1. točke f) podstavka drugog Pravilnika, da bi se u skladu s člankom 10. stavkom 3. Pravilnika, odobrilo preseljenje svinja s gospodarstava smještenih u zaraženom i ugroženom području, klinički pregled koji obavlja

nadležni veterinarski inspektor mora:

- biti obavljen u vremenu od najviše 24 sata prije preseljenja svinja,
- biti u skladu s odredbama točke A. podtočke 2. ovoga Poglavlja.

2. Ako se radi o svinjama koje treba preseliti na drugo gospodarstvo, osim ispitivanja koje treba provesti u skladu s podtočkom 1. ove točke, u svim podjedinicama u kojima se drže svinje koje se sele potrebno je provesti klinički pregled svinja. Ako se radi o svinjama starijim od tri do četiri mjeseca taj pregled mora uključiti i mjerenje tjelesne temperature određenom broju svinja.

Minimalni broj svinja koje treba provjeriti mora, s 95%-tnom sigurnošću, omogućiti otkrivanje vrućice u tim podjedinicama, ako je ona prisutna u 10% svinja u populaciji.

Međutim, ukoliko se radi o:

- rasplodnim krmačama, minimalni broj svinja koje treba pregledati mora s 95%-tnom sigurnošću omogućiti otkrivanje 5%-tne prevalencije u podjedinici u kojoj se drže svinje koje će se seliti,
- nerastima, treba pregledati sve neraste koji se sele.

3. Ukoliko se radi o svinjama koje treba preseliti u klaonicu, u pogon za preradu ili na druga mjesta na kojima će biti usmrćene ili zaklane, osim pretraga koja se obavljaju u skladu s podtočkom 1. ove točke, u svim podjedinicama u kojima se drže svinje koje se sele potrebno je provesti klinički pregled svinja. Ako se radi o svinjama starijim od tri do četiri mjeseca taj pregled mora uključiti i mjerenje tjelesne temperature određenom broju svinja.

Minimalni broj svinja koje treba provjeriti mora, s 95%-tnom sigurnošću, omogućiti otkrivanje vrućice ukoliko se ona u dotičnim podjedinicama pojavljuje u prevalenciji od 20%.

Međutim, ako se radi rasplodnim krmačama i nerastima, minimalni broj svinja koje treba pregledati mora, s 95%-tnom sigurnošću, omogućiti otkrivanje vrućice ukoliko se ona u podjedinici u kojoj se drže svinje koje treba seliti, pojavljuje u prevalenciji od 5%.

4. Kod usmrćivanja ili klanja svinja o kojima govori podtočka 3. ove točke, potrebno je za provedbu seroloških pretraživanja uzeti uzorke krvi ili uzorke krvi i tonzila za provedbu viroloških testova, iz svake podjedinice iz koje se svinje sele.

Minimalni broj uzoraka koji treba uzeti mora, s 95%-tnom sigurnošću, omogućiti otkrivanje 10%-tne seroprevalencije ili prevalencije virusa u svakoj podjedinici.

Međutim, ukoliko se radi o rasplodnim krmačama ili nerastima, minimalni broj svinja čije uzorke treba uzeti mora, s 95%-tnom sigurnošću, omogućiti otkrivanje 5%-tne seroprevalencije ili prevalencije virusa u podjedinici u kojoj se te svinje drže.

Vrste uzoraka koji se uzimaju kao i test koji će se upotrijebiti, moraju biti u skladu s naputcima Uprave koja mora voditi računa o raspoloživosti dijagnostičkih testova, osjetljivosti testova, te o postojećoj epidemiološkoj situaciji.

5. Ukoliko su klinički znakovi i *post-mortalne* promjene koje ukazuju na nazočnost KSK otkriveni nakon što su svinje zaklane ili usmrćene, odstupajući od podtočke 4. ove točke, primijenit će se odredbe točke C ovog Poglavlja.

E. POSTUPCI PROVJERE I UZIMANJA UZORAKA NA GOSPODARSTVU PRILIKOM OBNOVE POPULACIJE

1. Kad se svinje na gospodarstvo dovode u skladu s člankom 13. stavkom 2. točkom a) ili stavkom 2. točkom b), ili člankom 19. stavkom 8. točkom c) Pravilnika, primjenjuje se sljedeći postupak uzimanja uzoraka:

- ako se na gospodarstvo dovode sentinel svinje, uzorci krvi moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja da se, s 95%-tnom sigurnošću, omogući otkrivanje 10 %-tne seroprevalencije u svakoj pojedinoj podjedinici na gospodarstvu;
- ukoliko se obavlja obnova cjelokupne populacije, uzorci krvi za serološke testove

moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja da se, s 95%-tnom sigurnošću, omogući otkrivanje 20% seroprevalencije u svakoj pojedinoj podjedinici na gospodarstvu.

U slučaju rasplodnih krmača i nerasta broj uzoraka koje treba uzeti mora biti toliki da s 95%-tnom sigurnošću, omogući otkrivanje 10%-tne seroprevalencije.

2. Nadležni veterinarski inspektor će po dovođenju svinja osigurati da, u slučaju pojave kakve bolesti ili uginuća svinja na gospodarstvu iz nepoznatih razloga, dotične svinje odmah budu pretražene na KSK. Ove odredbe primjenjuju se do ukidanja ograničenja iz članka 13. stavka 2. točke a) podstavka 2. i članka 19. stavka 8. točke c) Pravilnika, na dotičnome gospodarstvu.

F. POSTUPCI UZIMANJA UZORAKA NA GOSPODARSTVIMA U ZARAŽENOM PODRUČJU PRIJE UKIDANJA OGRANIČENJA

1. Kako bi se u zaraženom području omogućilo ukidanje ograničenja iz članka 10. ovog Pravilnika, na svim gospodarstvima u tom području:

– treba provesti ispitivanje u skladu s postupcima utvrđenim točkom A. podtočkama 2. i 3. ovog Poglavlja;

– uzorci krvi za serološke testove moraju se uzeti u skladu s podtočkom 2. ove točke.

2. Minimalni broj uzoraka koje treba uzeti mora omogućiti da se s 95%-tnom sigurnošću omogući otkrivanje 10%-tne seroprevalencije u svinja u svim podjedinicama na gospodarstvu.

Međutim, ako se radi o:

– rasplodnim krmačama, minimalni broj uzoraka koje treba uzeti mora, s 95%-tnom sigurnošću, omogućiti otkrivanje 5%-tne seroprevalencije,

– centru za sakupljanje sjemena, uzorke krvi treba uzeti od svih nerasta.

G. POSTUPCI UZIMANJA UZORAKA NA GOSPODARSTVIMA U UGROŽENOM PODRUČJU PRIJE UKIDANJA OGRANIČENJA

1. Da bi se u ugroženom području mogla ukinuti ograničenja iz članka 11. Pravilnika na gospodarstvima u tom području treba obaviti klinički pregled u skladu s postupcima utvrđenima pod točkom A. podtočkom 2. ovoga Poglavlja.

Osim toga, uzorke krvi za serološko pretraživanje treba uzeti:

– na svim gospodarstvima na kojima se drže svinje u dobi od dva do osam mjeseci,

– kad Uprava ocijeni da se KSK mogla neopaženo proširiti među rasplodnim krmačama,

– na svim ostalim gospodarstvima za koje Uprava ocijeni da je s njih potrebno uzeti uzorke,

– u svim centrima za sakupljanje sjemena.

2. Kad se na gospodarstvima smještenim u ugroženom području provode serološka pretraživanja, broj uzoraka uzet na tim gospodarstvima mora biti u skladu s točkom F. podtočkom 2. ovoga Poglavlja. Međutim, ako Uprava prosudi da se KSK neopaženo mogla proširiti među rasplodnim krmačama, uzorke treba uzeti samo u podjedinicama u kojima se drže te životinje.

H. POSTUPCI SEROLOŠKOGA PRETRAŽIVANJA I UZORKOVANJA U PODRUČJIMA NA KOJIMA SE SUMNJA NA KSK ILI JE ONA POTVRĐENA U DIVLJIH SVINJA

1. U slučaju seroloških pretraživanja (monitoringa) divljih svinja u područjima u kojima je potvrđena KSK ili se na nju sumnja, veličinu i zemljopisno područje ciljane populacije od koje će se uzimati uzorci treba utvrditi prethodno radi određivanja točnog broja uzoraka koje treba uzeti u svrhu serološkog pretraživanja. Veličina uzorka određuje se prema procijenjenom broju živih životinja, a ne prema broju ustrijeljenih.

2. Ako nema podataka o gustoći i veličini populacije treba utvrditi zemljopisno područje

na kojemu će se uzimati uzorci, vodeći pri tom računa o stalnoj nazočnosti divljih svinja i postojanju prirodnih i umjetnih prepreka koje su u stanju spriječiti velika i stalna kretanja životinja. Ako takvih okolnosti nema ili se radi o velikim područjima, preporuča se da se za uzimanje uzoraka odrede područja ne veća od 200 km², na kojima obično živi između 400 i 1000 divljih svinja.

3. Ne dovodeći u pitanje odredbe članka 15. stavka 2. točke c) Pravilnika, minimalni broj svinja od kojih je potrebno uzeti uzorak unutar utvrđenog područja, mora, s 95%-tnom sigurnošću, omogućiti otkrivanje 5%-tne seroprevalencije. U tu je svrhu potrebno uzeti uzorke barem 59 životinja sa svakog utvrđenog područja.

Preporuča se također da:

– u područjima u kojima je lov učestaliji i lovi se redovito ili se u njima kao mjera nadzora nad bolestima obavlja selektivni izlov, otprilike 50% životinja čiji se uzorci uzimaju bude iz dobne skupine od tri mjeseca do godine dana, 35% od jedne do dvije godine, a 15% starije od 2 godine,

– u područjima u kojima se rijetko lovi ili se uopće ne lovi, uzorci budu uzeti od barem 32 životinje iz svake od tri dobne skupine,

– uzimanje uzoraka obavi se u kratkom vremenu, po mogućnosti ne dužem od mjesec dana,

– dob životinja od kojih su uzeti uzorci odredi se prema izraslim zubima.

4. Uzimanje uzoraka divljih svinja koje su ustrijeljene ili su pronađene uginule, za potrebe viroloških testova, obavlja se na način utvrđen u Poglavlju V. točki B. u podtočki 1. ovog Dijagnostičkog priručnika.

Ocijeni li se da je potrebno provesti virološku pretragu organa ustrijeljenih divljih svinja, potrebno je uzorkovati materijal od svinja starosti tri mjeseca do godine dana.

5. Svi uzorci koji se upućuju u laboratorije moraju biti popraćeni upitnikom iz članka 16. stavka 3. točke l) Pravilnika.

POGLAVLJE V.

Opći postupci i mjerila za uzimanje i prijevoz uzoraka

A. OPĆI POSTUPCI I MJERILA

1. Prije nego na sumnjivom gospodarstvu počne uzimanje uzoraka, treba pripremiti nacrt gospodarstva i odrediti njegove epidemiološke podjedinice.

2. Svaki put kad se ocijeni da bi moglo zatrebati ponavljanje uzimanja uzoraka, sve svinje kojima su uzeti uzorci moraju se označiti na jedinstven način kako bi se olakšalo ponovno uzimanje njihovih uzoraka.

3. Ne dovodeći u pitanje Poglavlje IV. točku A. podtočku 6. b. ovog Dijagnostičkog priručnika, uzorci za serološko pretraživanje ne smiju se uzimati od prasadi mlađih od osam tjedana.

4. Svi uzorci obavezno se šalju u laboratorij u pratnji odgovarajućih obrazaca, u skladu s uvjetima koje odredi Uprava. Ti obrasci moraju sadržavati pojedinosti o držanju i kretanju svinja od kojih su uzorci uzeti, o kliničkim znakovima ili uočenim bolesnim promjenama *post mortem*.

Ako se radi o svinjama koje se drže na gospodarstvu, treba dati i jasne podatke o dobi, kategoriji i gospodarstvu podrijetla svinja kojima su uzorci uzeti. Potrebno je za svaku svinju od koje se uzima uzorak zabilježiti njezino mjesto na gospodarstvu i njezinu jedinstvenu identifikacijsku oznaku.

B. SAKUPLJANJE UZORAKA ZA VIROLOŠKE TESTOVE

1. Za otkrivanje virusa, antigena i genoma KSK u uginulih ili eutanaziranih svinja najprikladniji su uzorci tkiva tonzila, slezene i bubrega. Preporuča se, osim toga, prikupljanje po dva uzorka drugih limfnih tkiva kao što su retrofaringealni (lat. retropharyngiales) parotidni (lat. parotidei), mandibularni (lat. mandibulares) i mezenterijalni (lat. mesenterici) limfni čvorovi te uzorak vitog tankog crijeva. U slučaju lešina u raspadu, cijela duga ili prsna kost može poslužiti kao uzorak izbora.

2. Uzorci nezgrušane ili zgrušane krvi moraju se sakupiti od svinja koje pokazuju znakove vrućice ili druge znakove bolesti u skladu s naputcima nadležnoga državnoga tijela.

3. Za bolesne životinje obvezna je provedba viroloških testova. Njihova je vrijednost obično ograničena ako se koriste za promatranje životinja koje ne pokazuju kliničke znakove. Ukoliko se sumnja da su svinje u inkubaciji, za dokazivanje virusa su najprikladniji uzorci tonzile.

C. PRIJEVOZ UZORAKA

1. Uzorci se:

- prevoze i pohranjuju u nepropusnim spremnicima;
- ne zamrzavaju, nego pohranjuju na temperaturi hladnjaka;
- isporučuju laboratoriju u najkraćem roku;
- drže u paketu u kojemu se za hlađenje koriste ledeni ulošci umjesto vlažnoga leda;
- tkiva i organa smještaju u zasebne, zapečaćene, propisno označene plastične vrećice. Potom se smještaju u veće i čvršće vanjske spremnike i pakiraju s dovoljnom količinom upijajućeg materijala koji štiti od oštećenja i sprječava curenje;
- kad god je to moguće, izravno prevoze u laboratorij kako bi se osigurao brz i pouzdan prijevoz, te da to čini kompetentno osoblje.

2. Vanjska strana paketa mora sadržavati adresu odredišnog laboratorija, a treba istaknuti i sljedeću naznaku: životinjski patološki materijal; pokvarljivo; lomljivo; ne otvarati izvan laboratorija za klasičnu svinjsku kugu.

3. Prijemni laboratorij mora unaprijed biti obaviješten o vremenu i načinu stizanja uzoraka.

4. U zračnom prijevozu uzoraka koji se prevoze u Referentni laboratorij EU⁹, paket mora biti označen u skladu s propisima Međunarodne udruge za prijevoz uzoraka zrakoplovom (IATA-e).

POGLAVLJE VI.

Provedba virološkoga pretraživanja i procjena rezultata

A. OTKRIVANJE VIRUSNOGA ANTIGENA

1. *Imunofluorescentni test (imunofluorescencija)*

Načelo ovog testa je otkrivanje virusnoga antigena u kriostatskim rezovima tkiva svinja za koje se sumnja da su inficirane virusom KSK. Virusni antigen otkriva se protutijelom konjugiranim fluoresceinizotiocijanatom (FITC-om). Prikladni organi za pretraživanje su tonzile, bubrezi, slezena, razni limfni čvorovi i vito tanko crijevo. Obrisak stanica koštane srži bi se također mogao iskoristiti u divljih svinja, ako prije navedeni organi nisu dostupni ili se raspadaju.

Test se može napraviti u jednome danu. Budući da se uzorci organa mogu dobiti samo s mrtvih životinja njegova je primjena ograničena. Pouzdanost rezultata testova može osujetiti nevješto bojenje, osobito ako nema dovoljnog iskustva potrebnog za provedbu testova ili se organi koji se testiraju raspadaju.

2. *ELISA za otkrivanje antigena*

Virusni antigen otkriva se korištenjem raznih ELISA tehnika. Osjetljivost ELISA-e za otkrivanje antigena trebala bi biti dovoljno visoka da u životinja koje pokazuju kliničke znakove KSK daje pozitivan rezultat.

Korištenje ELISA-e za otkrivanje antigena preporuča se na uzorcima životinja koje pokazuju kliničke ili patološke znakove bolesti. Nije prikladna za pretraživanje pojedinačnih životinja. Primjereni uzorci su leukociti, serum, nezgrušana krv kao i suspenzije organa navedenih u podtočki 1. ove točke uzetih od svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom KSK¹⁰.

ELISA se može provesti u jednome danu, a za njenu primjenu je dostupna i automatizirana oprema. Njezina je glavna prednost u tome što se velik broj uzoraka može obraditi u kratkom vremenu. Preporuča se korištenje ELISA-e za otkrivanje antigena koji daje zadovoljavajuće rezultate na referalnim materijalima. Trenutno su, međutim, svi komercijalni ELISA kompleti slabije osjetljivi nego izolacija virusa na staničnoj kulturi, a osjetljivost im je znatno bolja na uzorcima krvi prasadi nego odraslih svinja.

B. IZOLACIJA VIRUSA

1. Izolacija virusa temelji se na uzgoju virusa iz suspenzije organa podrijetlom od sumnjivih svinja na prikladnoj staničnoj kulturi. Ukoliko se u uzorku nalazi virus KSK on će se na stanicama umnožiti u tolikoj mjeri da će ga se moći otkriti imuno-bojenjem zaraženih stanica konjugiranim protutijelima. Za diferencijalnu dijagnozu s obzirom na druge pestiviruse potrebna su specifična protutijela za virus KSK.

2. Najbolji uzorak za izolaciju virusa KSK su leukociti, plazma ili cjelovita krv dobivena iz nezgrušanog krvnog uzorka ili od organa navedenih u točki A. podtočki 1. ovoga Poglavlja.

3. Izolacija virusa prikladnija je za ispitivanje uzoraka malog broja životinja nego za masovan nadzor. Postupak izolacije virusa zahtijeva intenzivan rad i potrebna su barem tri dana da se poluče rezultati. Postoji mogućnost da će trebati i dvije dodatne pasaže virusa za otkrivanje virusa koji se u uzorku nalazi u vrlo niskom titru. Ispitivanje tako može potrajati i desetak dana prije nego li se dobije konačni rezultat. Uzorci koji se raspadaju mogu za staničnu kulturu biti citotoksični te tako ograničiti njezino korištenje.

4. Metoda izolacije virusa preporuča se također ako je KSK prethodno potvrđena drugim metodama. Treba je koristiti kao referentni test za potvrdu prethodnih pozitivnih rezultata ELISA-e za otkrivanje antigena, PCR-a i imunofluorescencije.

Izolati virusa KSK uzgojeni na ovaj način korisni su za daljnje dijagnostičke postupke, uključujući i genetsku tipizaciju izolata i molekularnu epidemiologiju.

5. Svi izolati virusa KSK iz svih primarnih epidemija, primarni slučajevi među divljim svinjama ili slučajevi u klaonicama ili prijevoznim sredstvima moraju se genetski tipizirati u nacionalnom referentnom laboratoriju ili Referentnom laboratoriju EU u skladu s točkom E ovoga Poglavlja.

Izolati virusa mogu biti poslani u Referentni laboratorij EU za sakupljanje virusa.

C. OTKRIVANJE VIRUSNOG GENOMA

1. Za otkrivanje virusnog genoma u uzorcima krvi, tkiva i organa primjenjuje se lančana reakcija polimerazom (PCR). Odsječci virusne RNK prevode se u DNK oblik koji se uz pomoć PCR-a umnožavaju do količine koju je moguće otkriti. S obzirom na to da ovaj test otkriva nazočnost genomskih odsječaka, PCR može biti pozitivan iako cjeloviti virus nije prisutan u uzorku (npr. u raspadnutim tkivima ili na uzorcima svinja koje se oporavljaju).

2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) se može upotrijebiti na manjem broju pomno odabranih uzoraka uzetih od sumnjivih životinja ili iz materijala pobačenih plodova. Na lešinama divljih svinja to može biti jedna od odabranih metoda ako se materijal raspada, a zbog citotoksičnosti više nije moguća izolacija virusa.

3. Materijal prikladan za dijagnozu PCR-om su leukociti, plazma ili nezgrušani krvni uzorak, te organi navedeni u točki A. podtočki 1. ovoga Poglavlja.

4. PCR se može provesti u roku od 48 sati. Zahtijeva odgovarajuću laboratorijsku opremu, zasebne prostorije i vješto osoblje. Metoda je vrlo osjetljiva, ali pri njenom provođenju može doći i do kontaminacije uzoraka, što rezultira lažno pozitivnim reakcijama. Zbog toga je neophodan strogi nadzor i visoka kvaliteta provedbe. Ovisno o primjeni različitih početnica, mogu se otkriti i drugi pripadnici roda *Pestivirus* što zahtijeva primjenu dodatnih diferencijalnih testova.

D. OCJENA REZULTATA VIROLOŠKIH PRETRAŽIVANJA

1. Virološka pretraživanja su neophodna za potvrdu prisutnosti virusa KSK.

Izolaciju virusa treba smatrati referentnim virološkim testom i treba je, prema potrebi, rabiti kao potvrdni test. Osobito se preporuča ako pozitivni rezultati testova FAT, ELISA ili PCR nisu popraćeni uočavanjem kliničkih znakova ili patoanatomskih promjena uzrokovanih KSK i u slučaju bilo kojih drugih sumnji.

Međutim, primarno izbijanje KSK može se potvrditi ako su u svinja utvrđeni klinički znakovi i patoanatomske promjene, a da su najmanje dva testa za otkrivanje antigena i genoma dala pozitivne rezultate.

Sekundarno izbijanje KSK može se potvrditi ako su osim epidemiološke poveznice s potvrđenom epidemijom ili potvrđenim slučajem, u svinja otkriveni klinički znakovi ili patoanatomske promjene, a testovi za otkrivanje antigena ili genoma su dali pozitivan rezultat.

Primarni slučaj KSK u divljih svinja može se potvrditi nakon što je provedena izolacija i identifikacija virusa ili su najmanje dva testa za otkrivanje antigena ili genoma dala pozitivne rezultate. Dodatni slučajevi KSK u divljih svinja za koje postoji epidemiološka poveznica s ranije potvrđenim slučajevima mogu se potvrditi ako je test za otkrivanje antigena ili genoma dao pozitivan rezultat.

2. Za utvrđivanje pozitivnog rezultata testa na temelju dokaza antigena ili analize odsječaka genoma virusa KSK, potrebno je rabiti protutijela i početnice (eng. primers) koje su specifične za virus KSK. Ako upotrijebljeni test nije bio specifičan za virus KSK već za pestiviruse, treba ga ponoviti uz korištenje reagensa specifičnog za virus KSK.

E. GENETSKA TIPIZACIJA IZOLATA VIRUSA KSK

1. Genetska tipizacija izolata virusa KSK postiže se određivanjem nukleotidnih sljedova pojedinih odsječaka genoma virusa KSK, tj. točno određenih dijelova unutar 5. nekodirajuće regije i/ili gena koji kodira za glikoprotein E2. Sličnost ovih sljedova sa sljedovima ranije dobivenih virusnih izolata može ukazivati na podrijetlo epidemije tj. je li ona uzrokovana novim ili već poznatim sojem virusa.

To može poduprijeti ili opovrgnuti postavke o putovima prijenosa na koje je ukazalo epidemiološko istraživanje.

Genetska tipizacija izolata virusa KSK od iznimnog je značenja za utvrđivanje izvora bolesti. Međutim, visoka genetska srodnost između virusa prikupljenih u različitim epidemijama nije apsolutan dokaz izravne epidemiološke povezanosti.

2. Ako genetsku tipizaciju nije moguće u kratkom roku obaviti u nekom od nacionalnih laboratorija ili u bilo kojem laboratoriju ovlaštenom za dijagnosticiranje KSK, izvorni uzorak virusnoga izolata treba na tipizaciju što prije poslati u Referentni laboratorij EU.

Podatke koje o tipizaciji i sljedovima izolata virusa KSK imaju na raspolaganju laboratoriji ovlašteni za dijagnosticiranje KSK treba proslijediti Referentnom laboratoriju EU kako bi ih tamo unijeli u svoje postojeće baze podataka.

POGLAVLJE VII.

Provedba serološkoga pretraživanja i procjena rezultata

A. TEMELJNA NAČELA I DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST

1. Kod svinja zaraženih virusom KSK, protutijela se mogu utvrditi u uzorcima seruma dva do tri tjedna nakon infekcija. Kod svinja koje su bolest preboljele, specifična protutijela mogu se utvrditi tijekom nekoliko sljedećih godina ili čak do uginuća. Protutijela se povremeno mogu utvrditi u završnom stadiju bolesti. Kod nekih svinja s kroničnim oblikom KSK, protutijela se mogu utvrditi krajem prvog mjeseca od infekcije.

Svinje inficirane *in utero* mogu biti imuno-snošljive prema virusu KSK te stoga ne proizvode specifična protutijela. Ipak, tijekom nekoliko prvih dana života kod njih se mogu utvrditi protutijela podrijetlom od majke. Poluživot majčinih protutijela u zdrave, neviremične prasadi je oko dva tjedna. Pronađu li se u prasadi starijih od tri mjeseca, vrlo je malo vjerojatno da su protutijela KSK podrijetlom od majke.

2. Utvrđivanje protutijela za virus KSK u serumu ili plazmi provodi se kao pomoć dijagnosticiranju KSK na sumnjivim gospodarstvima, za određivanje vremena trajanja zaraze u slučaju potvrđene epidemije i za potrebe praćenja i nadzora. Vrijednost seroloških testova je ograničena kod otkrivanja prisutnosti virusa KSK ako se zaraza na gospodarstvu pojavila tek nedavno.

Malen broj seropozitivnih svinja s niskim neutralizacijskim titrom može upućivati na to da je virus na gospodarstvo unešen prije dva do četiri tjedna. Velik broj svinja s visokim neutralizacijskim titrom može upućivati da je virus na gospodarstvo ušao prije više od mjesec dana. Mjesto na gospodarstvu na kojem se nalaze seropozitivne svinje može ponuditi vrijedne informacije o tome kako je virus KSK ušao na gospodarstvo.

U okviru ispitivanja koje se provodi u slučaju sumnje na KSK ili potvrde KSK, u skladu s člankom 8. Pravilnika, u procjeni rezultata serološkog pretraživanja treba uzeti u obzir i kliničke, virološke te epidemiološke nalaze.

B. PREPORUČENI SEROLOŠKI TESTOVI

1. Preporučeni testovi za postavljanje serološke dijagnoze KSK su virus-neutralizacijski test (VNT) i ELISA.

Kakvoća i učinkovitost serološkog pretraživanja treba se provjeravati učešćem nacionalnih laboratorija u među-laboratorijskim usporednim testiranjima koje povremeno organizira Referentni laboratorij EU.

2. VNT temelji se na utvrđivanju neutralizacijske aktivnosti protutijela iz uzorka seruma prema virusu, izražene u mjerilu 50% neutralizacije (ND50).

Virus KSK utvrđenog titra inkubira se na temperaturi od 37 °C s razrijeđenim serumom. Za potrebe brzih metoda utvrđivanja serološkoga stanja serumi se početno razrjeđuju 1/10. Kad je potrebna potpuna titracija serum se može pripremno razrijediti dvostruko, počevši od 1/2 ili 1/5. Svaki od tih razrijeđenih seruma miješa se s jednakim volumenom virusne suspenzije koja sadržava 100 infektivnih doza (TCID 50).

Nakon inkubacije mješavina se nasađuje na prikladne stanične kulture i inkubira tri do pet dana. Nakon inkubacije stanice se fiksiraju, a reakcija se očitava nakon dodavanja konjugiranih protutijela. U tu svrhu rabe se protutijela obilježena peroksidazom ili fluoresceinom.

Rezultati VNT-a se izražavaju u razrjeđenjima seruma i to kao zadnja razrjeđenja seruma pri kojima je došlo do umnožavanja virusa u 50% inokuliranih stanica.

3. VNT je najosjetljiviji i najpouzdaniji test za otkrivanje protutijela za virus KSK. Zbog toga se preporučuje za individualna i množstvena (krdo) serološka pretraživanja. Međutim, ovim je testom moguće dokazati i protutijela specifična i za ostale pestiviruse.

Kad se VNT koristi za otkrivanje protutijela na virus VP/BSG primjenjuju se već

navedena načela, a provode se za dobivanje diferencijalne dijagnoze KSK.

4. Sojevi pestivirusa koji se koriste za neutralizacijske testove moraju biti usklađeni s preporukama Referentnog laboratorija EU.

5. Koriste se različiti ELISA kompleti koji se funkcionalno temelje na kompetitivnoj (blokirajućoj) ili nekompetitivnoj ELISA-i.

Kompetitivne ili blokirajuće ELISA-e najčešće primjenjuju monoklonska protutijela. Sadrži li uzorak seruma protutijela, onemogućit će vezivanje odabranih monoklonskih protutijela konjugiranih peroksidazom za virusni antigen, a rezultat će biti smanjeni signal prebojenja.

Kod nekompetitivnih ELISA vezivanje protutijela iz seruma na antigen mjeri se izravno upotrebom protutijela za svinjska protutijela konjugirana peroksidazom.

6. Nacionalni laboratoriji obvezno obavljaju nadzor kakvoće osjetljivosti i specifičnosti svake serije ELISA kompleta, koristeći pri tom referentne serume koji su pripremljeni u Referentnom laboratoriju EU. To su:

– serumi svinja u ranom stupnju zaraze virusom KSK (prije nego protekne 21 dan od početka zaraze);

– serumi svinja u rekonvalescenciji (po isteku 21 dana od početka zaraze);

– serumi svinja zaraženih pestivirusima preživača.

ELISA komplet koji treba upotrijebiti za postavljanje serološke dijagnoze KSK mora prepoznavati sve referentne serume dobivene od svinja koje se oporavljaju. Svi rezultati referentnih seruma moraju biti ponovljivi. Ujedno trebaju prepoznati pozitivne serume uzete od svinja u ranom stupnju zaraze i imati visoku specifičnost s obzirom na moguće unakrižne reakcije kod svinja zaraženih pestivirusima preživača.

Rezultati dobiveni referentnim serumima uzetim od svinja u ranom stupnju zaraze pokazatelj su osjetljivosti ELISA-e.

7. Smatra se da je osjetljivost ELISA-e manja nego osjetljivost VNT te se ona preporuča kao brzi test za provjeru prisutnosti zaraze na razini krda. ELISA ne zahtijeva tako specijalizirane pogone, a zahvaljujući automatiziranim sustavima, provodi se znatno brže nego VNT.

ELISA mora osigurati prepoznavanje svih zaraza KSK u stadiju oporavka, a treba biti maksimalno oslobođena smetnji nastalih unakrižnom reakcijom s pestivirusima preživača.

C. TUMAČENJE SEROLOŠKIH REZULTATA I DIFERENCIJALNIH DIJAGNOZA INFEKCIJA UZROKOVANIH PESTIVIRUSIMA PREŽIVAČA

1. Ne dovodeći u pitanje odredbe članka 4. stavka 3. točke a) ili članka 7. stavka 2. Pravilnika, u slučaju otkrivanja neutralizacijskog titra virusa KSK jednakog ili višeg od 10 ND50 u uzorcima seruma prikupljenih od jedne ili više svinja ili dobivanja pozitivnog rezultata testa ELISA u uzorcima seruma uzetih od neke skupine svinja, na dotičnome gospodarstvu treba odmah primijeniti mjere iz članka 4. stavka 2. Pravilnika ili ako se one već primjenjuju, treba nastaviti s njihovom primjenom.

Već sakupljene uzorke s tog gospodarstva treba pretražiti VNT-om usporednom titracijom neutralizacijskih protutijela za virus KSK i pestiviruse preživača.

2. Pokažu li usporedni testovi nalaz protutijela za pestiviruse preživača, a izostanak ili značajno niži titar protutijela (niži od trostruko) za virus KSK, treba odbaciti sumnje na KSK, osim ako ne postoje drugi razlozi koji traže nastavak primjene mjera iz članka 4. stavka 2. Pravilnika na dotičnome gospodarstvu.

3. Pokažu li usporedni testovi neutralizacijski titar virusa jednak ili viši od 10 ND50 kod više od jedne svinje, a taj je titar jednak ili viši nego titri za druge pestiviruse, Uprava mora

potvrditi prisutnost virusa KSK, uz uvjet da su na dotičnome gospodarstvu pronađeni i epidemiološki dokazi te bolesti.

4. Ne dovodeći u pitanje odredbe članka 4. stavka 3. Pravilnika, ukoliko nisu pronađeni epidemiološki dokazi bolesti ili ako su rezultati ranije provedenih testova nedorečeni, Uprava mora osigurati da se na dotičnome gospodarstvu:

- nastavi primjena mjera iz članka 4. stavka 2. Pravilnika;
- što prije, u skladu s Poglavljem IV. ovog Dijagnostičkog priručnika, provedu daljnja pretraživanja radi potvrde ili odbacivanja prisutnosti KSK.

5. Ukoliko, međutim, daljnje provjere i testovi iz podtočke 4. ove točke ne dopuste da se isključi mogućnost prisutnosti KSK na gospodarstvu se, nakon što su protekla barem dva tjedna od prethodnih provjera, provodi dodatno uzimanje uzoraka za serološko pretraživanje.

U okviru tog dodatnog uzorkovanja, ponovno se uzimaju i pretražuju uzorci istih svinja kako bi se otkrila sero-konverzija virusa KSK ili pestivirusa preživača, ako ona postoji.

Ukoliko ni te dodatne provjere i testovi ne omoguće potvrđivanje prisutnosti virusa KSK, mjere iz članka 4. Pravilnika mogu se ukinuti.

POGLAVLJE VIII.

Razlikovni testovi u slučaju provedbe hitnog cijepljenja

A. OSNOVNA NAČELA

1. Razlikovni serološki imunoenzimni test, ELISA (razlikovni test) je danas dostupan, a njegova primjena omogućuje uspješno razlikovanje svinja cijepljenih markiranim cjepivom koje potiče tvorbu protutijela za glikoprotein (gp) E2 virusa KSK od svinja zaraženih terenskim sojevima virusa. Razlikovnim testom se utvrđuju protutijela za gp E^{ms} virusa KSK. Postupak se temelji na načelu da u nezaraženih svinja nakon cijepljenja markiranim cjepivom dolazi do tvorbe protutijela samo za gp E2 virusa KSK, dok u svinja koje su inficirane terenskim sojevima virusa dolazi do tvorbe protutijela za sve virusne antigene.

Navedeni razlikovni test je osjetljiv i specifičan.¹¹ Međutim, njegovom primjenom je moguća pojava lažno pozitivnih reakcija ukoliko su svinje inficirane nekim od ostalih pestivirusa (virus VP/BSG ili virus BB). Nadalje, osjetljivost testa može biti umanjena ukoliko su životinje cijepljene markiranim cjepivom naknadno inficirane terenskim sojem virusa KSK, kada pozitivna reakcija može izostati.

Prema trenutno dostupnim podacima razlikovni test se ne može s pouzdanošću upotrijebiti za pretraživanje uzoraka seruma divljih svinja.

2. Razlikovni test je blokirajuća ELISA s tekućinskom fazom. Uzorci se inkubiraju zajedno s točno definiranom količinom gp E^{ms}-a u mikrotitarskoj plitici čije su jažice obložene monoklonskim protu-E^{ms} protutijelima. Protutijela iz uzoraka koja su specifična za gp E^{ms} će se vezati za gp E^{ms} i stvoriti kompleks protutijelo/antigen te onemogućiti vezivanje gp E^{ms}-a za protu-E^{ms} protutijela u jažicama mikrotitarske plitice. Samo će se slobodni Erns antigen zadržati u jažicama vezan za monoklonska protu-E^{ms} protutijela. Nakon ispiranja plitice dodaje se protu-Erns konjugat obilježen peroksidazom, koji reagira sa ostatkom E^{ms} antigena koji je vezan za monoklonska protu-E^{ms} protutijela kojima su jažice obložene. Nevezani konjugat se uklanja pranjem, te dodaje supstrat koji sadrži kromogen. Intenzitet prebojenja reakcije je recipročno razmjernan količini protutijela u uzorcima. Rezultat se dobiva usporedbom optičke gustoće (OD) u jažicama u kojima se nalaze uzorci s OD u jažicama u kojima se nalaze negativni i pozitivni kontrolni serumi.

B. SMJERNICE ZA KORIŠTENJA RAZLIKOVNOGA TESTA U ODNOSU NA HITNO CIJEPLJENJE MARKIRANIM CJEPIVOM NA SVINJOGOJSKIM GOSPODARSTVIMA NA KOJA SE ODNOSI ČLANAK 19. PRAVILNIKA.

Razlikovni test je namijenjen za potvrđivanje ili isključivanje cirkulacije virusa KSK na gospodarstvu na kojem je provedeno cijepljenje svinja markiranim cjepivom. Dosadašnji rezultati istraživanja potvrđuju vjerodostojnost njegove primjene ukoliko se koristi na razini krda, iako nije u cijelosti pouzdan pri isključivanju infekcije prilikom pojedinačnih pretraživanja. Specifičnost razlikovnoga testa bi mogla biti nedovoljno pouzdana u prepoznavanju svinja cijepljenih markiranim cjepivom od inficiranih, ako se radi o odraslim svinjama. U slučaju dvojbenih rezultata dotične svinje moraju se zaklati ili usmrtniti na human način, a njihove organe treba testirati na nazočnost virusa KSK. Za to su najprikladniji testovi izolacije virusa i PCR.

Navedeno treba uzeti u obzir prilikom osmišljavanja strategije provedbe hitnoga cijepljenja markiranim cjepivom te prilikom tumačenja rezultata istraživanja na nazočnost virusa KSK u gospodarstvu gdje su svinje cijepljene markiranim cjepivom.

Uzorkovanje materijala i pretraživanje cijepljene populacije prije ukidanja ograničenja koja se primjenjuju u cijepljenome području u skladu s člankom 19. Pravilnika trebali bi ovisiti o starosti cijepljenih svinja, kategoriji svinja (tovljenici, svinje za klanje, rasplodne svinje) i razini željene sigurnosti da virus ne cirkulira u populaciji.

Pojedinosti postupaka uzimanja uzoraka i pretraživanja će biti utvrđene planom provedbe hitnoga cijepljenja koji će biti dostavljen Europskoj komisiji u skladu s člankom 19. stavkom 3. Pravilnika.

POGLAVLJE IX.

Minimalni sigurnosni uvjeti za laboratorije za dijagnosticiranje KSK

1. Minimalni uvjeti utvrđeni u Tablici 1. ovoga Poglavlja moraju se ispuniti u svim laboratorijima u kojima se rukuje virusom KSK, čak i ako se radi o maloj količini, potrebnoj za izolaciju virusa i neutralizacijske testove. Za *post-mortalne* preglede, te pripremu uzoraka za imunofluorescenciju i serologiju kod kojih se koristi inaktivirani antigen, potrebno je primjenjivati osnovna načela higijene i dezinfekcije uključujući neškodljivo uklanjanje tkiva i seruma.

2. Dodatne uvjete utvrđene u Tablici 1. moraju ispuniti svi laboratoriji u kojima se obavljaju postupci koji uključuju i umnažanje virusa.

3. Uvjete utvrđene Tablicom 2. ovoga Poglavlja moraju ispuniti svi laboratoriji u kojima se provode pokusi s virusom KSK na životinjama.

4. Sve zalihe virusa KSK moraju se držati sigurno pohranjene, bilo duboko zamrznute ili liofilizirane. Preporučuje se da se zamrzivači i hladnjaci ne koriste za pohranu drugih virusa ili materijala koji nisu povezani s dijagnostikom KSK.

Svaka pojedina ampula u kojoj je pohranjen virus KSK mora se jasno označiti, te treba voditi opsežne evidencije o zalihama virusa zajedno s datumima i rezultatima izvršenih provjera kakvoće. Evidencija virusa pridodanih zalihi treba sadržavati pojedinosti o izvoru, a evidencija se mora voditi i o virusima koji su poslani drugim laboratorijima.

5. Preporučuje se da se bio-sigurnosna jedinica za rad s virusom KSK dodatno osigura okolnim prostorijama u kojima se ne rukuje virusom KSK. U tim prostorijama bi se pripremalo stakleno posuđe, pribor i ostala oprema koja se rabi pri dijagnosticiranju KSK, umnažalo stanične kulture, pripremao serum i provodila serološka pretraživanja (osim metoda koje koriste živi virus KSK) te bi tu bile uključene i prostorije za upravu i uredske poslove.

Tablica 1. – NAČELA BIOLOŠKOG OKRUŽENJA PRIKLADNOG ZA DIJAGNOSTIČKE LABORATORIJE

	Dodatni uvjeti	Minimalni uvjeti
Opće okruženje	<p>Normalan atmosferski pritisak.</p> <p>Dvostruko HEPA filtriranje ispušnoga zraka.</p> <p>Posebne prostorije koje se isključivo koriste za postupke dijagnosticiranja KSK.</p>	<p>Normalan atmosferski pritisak.</p> <p>Posebne prostorije čije je korištenje ograničeno za točno određene postupke.</p>
Odijevanje u laboratoriju	<p>Potpuno presvlačenje po ulasku.</p> <p>Laboratorijska odjeća koja se koristi samo u jedinicama za rad s virusom KSK.</p> <p>Rukavice za jednokratnu uporabu za svako rukovanje sa zaraženim materijalom.</p> <p>Prije uklanjanja iz jedinice odjeća se sterilizira ili se pere u samoj jedinici.</p>	<p>Dodijeljena vanjska odjeća koristi se samo u jedinici za rad s virusom KSK.</p> <p>Rukavice za jednokratnu uporabu za svako rukovanje zaraženim materijalom.</p> <p>Vanjska odjeća sterilizira se prije uklanjanja iz jedinice, ili se pere u samoj jedinici.</p>
Nadzor osoblja	<p>Ulazak u jedinicu dozvoljen samo obučenom osoblju koje ima dozvolu za ulaz.</p> <p>Po odlasku iz jedinice ruke se peru i dezinficiraju.</p> <p>Po napuštanju jedinice osoblju je 48 sati zabranjeno približavanje svinjama.</p>	<p>Ulazak u jedinicu dozvoljen samo obučenom osoblju.</p> <p>Po odlasku iz jedinice ruke se peru i dezinficiraju.</p> <p>Po napuštanju jedinice osoblju je 48 sati zabranjeno približavanje svinjama.</p>
Oprema	<p>Bioški sigurnosni kabinet (Klasa I. ili II.) koji se koristi za sva rukovanja živim virusima, treba imati dvostruko HEPA filtriranje ispušnoga zraka.</p> <p>Sva oprema potrebna za laboratorijski postupak mora biti dostupna unutar dodijeljenih laboratorijskih prostorija.</p>	

Tablica 2. – BIOSIGURNOSNI UVJETI PROSTORIJA ZA POKUSNE ŽIVOTINJE

	Uvjeti
Opći uvjeti	<p>Prozračivanje s nadziranom pritiskom.</p> <p>Dvostruko HEPA filtriranje ispušnoga zraka.</p> <p>Oprema za potpuno raskuživanje /dezinfekciju na kraju pokusa.</p> <p>Sve otpadne vode obrađene radi inaktiviranja virusa KSK (kemijskom ili toplinskom obradom).</p>

Odijevanje u laboratoriju	Potpuno presvlačenje po ulasku. Rukavice za jednokratnu uporabu za sva rukovanja. Prije uklanjanja iz jedinice odjeća se sterilizira ili se pere u samoj jedinici.
Nadzor osoblja	Ulazak u jedinicu dozvoljen samo obučenom osoblju koje ima dozvolu za ulaz. Potpuno tuširanje po izlasku iz jedinice. Po napuštanju jedinice osoblju je 48 sati zabranjeno približavanje svinjama.
Oprema	Sva oprema potrebna za postupke sa životinjama mora biti dostupna u samoj jedinici. Sav materijal mora se prije uklanjanja iz jedinice sterilizirati ili, ako se radi o uzorcima životinja, dvostruko omotati nepropusnim spremnikom čija je površina dezinficirana radi prijevoza u laboratorij za dijagnosticiranje KSK.
Životinje	Sve životinje zaklane prije napuštanja jedinice, moraju biti pregledane <i>post mortem</i> unutar bio-sigurnosnog područja, a trupla po završetku pregleda spaljena.