

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

1322

Na temelju članka 17. stavka 3. Zakona o veterinarstvu (»Narodne novine«, broj 41/07) ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

PRAVILNIK

O UTVRĐIVANJU PREVALENCIJE *SALMONELLA* SPP. I METICILIN REZISTENTNOG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* U STADIMA RASPLODNIH SVINJA^[1]

Predmet i područje primjene

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom utvrđuju pravila za provedbu Osnovne studije za procjenu prevalencije *Salmonella* spp. i Meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (u daljnjem tekstu: MRSA) u stadima rasplodnih svinja uzorkovanih na razini farme.

Pojmovnik

Članak 2.

Za potrebe ovoga Pravilnika koriste se sljedeći pojmovi:

- (1) »*rasplodno gospodarstvo*« je gospodarstvo na kojem se drže i uzgajaju svinje namijenjene za daljnji rasplod.
- (2) »*proizvodno gospodarstvo*« je gospodarstvo na kojem se drže svinje za proizvodnju prasadi za tov.
- (3) »*nadležno tijelo*« za provedbu ovog Pravilnika je Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Uprava za veterinarstvo.

Predmet pretraživanja

Članak 3.

- (1) Utvrđivanje salmoneloze provodi se u skladu s Dijelom A i B Dodatka I. ovoga Pravilnika.
- (2) Utvrđivanje MRSA-e provodi se u skladu s Dijelom A i C Dodatka I. ovoga Pravilnika.

Uzimanje uzoraka i pretrage

Članak 4.

Uzorkovanje i pretrage provodi nadležno tijelo ili se ono provodi pod njegovim nadzorom u skladu s tehničkim specifikacijama iz Dodatka I. ovoga Pravilnika.

Prikupljanje podataka, procjena i izvješćivanje

Članak 5.

(1) Nadležno tijelo odgovorno za pripremu nacionalnog godišnjeg izvješća propisanog člankom 9. stavkom 1. Pravilnika o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza (»Narodne novine«, br. 52/05)[\[2\]](#) prikuplja i procjenjuje rezultate ispitivanja i dostavlja ih Europskoj komisiji.

(2) Prikupljeni podaci i rezultati bit će javno dostupni u obliku u kojem se osigurava povjerljivost prikupljenih podataka.

Podaci o troškovima

Članak 6.

Podatke o utrošenim financijskim sredstvima institucije uključene u provedbu moraju nadležnom tijelu dostaviti na obrascu iz Dodatka II. ovoga Pravilnika.

Dodaci

Članak 7.

Dodaci I. i II. tiskani su u prilogu ovoga Pravilnika i njegov su sastavni dio.

Stupanje na snagu

Članak 8.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osam dana od dana objave u »Narodnim novinama«, osim točke 2., stavka 1. Dijela D. Dodatka I. ovoga Pravilnika koja stupa na snagu danom pristupanja Republike Hrvatske Europskoj uniji.

Klasa: 011-02/10-01/29

Urbroj: 525-06-1-0246/10-2

Zagreb, 8. travnja 2010.

Ministar
Petar
Čobanković, v. r.

DODATAK I.

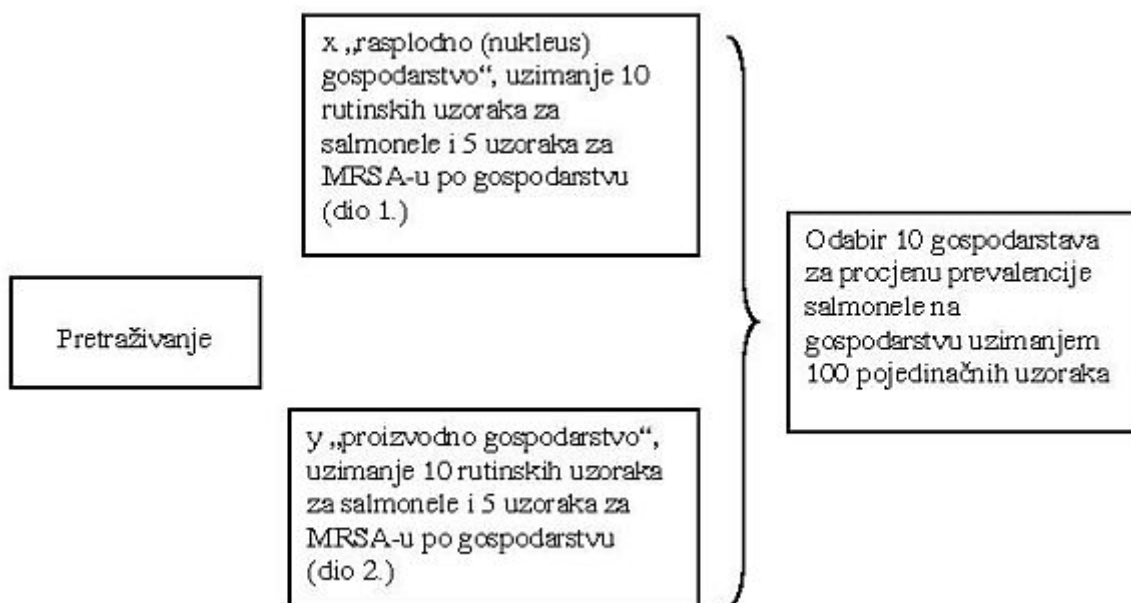
TEHNIČKE SPECIFIKACIJE IZ ČLANKA 3., ČLANKA 4. I ČLANKA 5. OVOGA PRAVILNIKA

Dio A: Prikaz i okvir uzorkovanja

1. Pregled pretraživanja

Pretraživanje se provodi prema prikazu na slici 1.

Slika 1. Pregled pretraživanja



2. Uzorkovanje

2.1. Opis populacije

Pretraživanje se provodi na gospodarstvima na kojima se ukupno drži najmanje 80% populacije rasplodnih svinja u zemlji. Uzorci se, ukoliko je moguće, uzimaju na gospodarstvima koja imaju 50 ili više rasplodnih svinja. Ukoliko gospodarstva koja drže 50 rasplodnih svinja ili više ne predstavljaju 80% stada rasplodnih svinja u zemlji, uzorke je potrebno uzeti na gospodarstvima koja drže manje od 50 svinja.

Gospodarstva s rasplodnim svinjama dijele se na »rasplodna gospodarstva« ili »proizvodna gospodarstva«.

Rasplodna gospodarstva prodaju nazimice i/ili neraste za rasplod. Uobičajeno takva gospodarstva prodaju 40% ili više nazimica uzgojenih za rasplod dok ostatak prodaju za klanje.

Proizvodna gospodarstva uglavnom prodaju svinje za tov ili klanje.

Prevalencija salmonelle i MRSA-e mora se utvrđivati odvojeno na rasplodnim gospodarstvima (dio 1. pretraživanja salmonelle i MRSA-e) i na proizvodnim gospodarstvima (dio 2.

pretraživanja salmonele i MRSA-e), na kojima su zastupljena stada kako je prikazano na slici 2. ove podtočke, isključujući odbitu prasid i tovljenike.

Slika 2. Pregled gospodarstava



2.2. Uzorak i strategija uzorkovanja

Oba dijela pretraživanja salmonele i MRSA-e imaju sličnu koncepciju uzimanja uzoraka u dvije faze. U prvoj se fazi odabire nasumičan uzorak gospodarstava u zemlji s rasplodnih gospodarstava, a u drugoj se fazi odabire nasumičan uzorak iz skupine komercijalnih gospodarstava. Broj potrebnih gospodarstava naveden je u podtočki 2.3. ove točke. U drugoj se fazi odabire određen broj boksova za uzimanje uzoraka unutar svakog odabranog gospodarstva (vidi: podtočka 2.2.2. ove točke).

2.2.1. Prva faza: odabir gospodarstava

Nadležno tijelo propisuje dva načina uzorkovanja. U prvom će biti popisana sva rasplodna gospodarstva koja zadovoljavaju uvjete (gospodarstva koja drže najmanje 50 rasplodnih svinja – vidi: podtočka 2.1. ove točke), a u drugom proizvodna gospodarstva koja zadovoljavaju uvjete. Sa svakog popisa nasumično se odabire potreban broj gospodarstava za svaki dio pretraživanja na salmonele i MRSA-u. Nasumičnim odabirom uzoraka osigurava se da se u pretraživanje uključe gospodarstva s različitim veličinama stada iz svih područja zemlje u kojima se uzgajaju svinje. Potrebno je voditi računa da u zemlji možda ima nekoliko gospodarstava (npr. manje od 10% od svih prihvatljivih gospodarstava) s vrlo velikim stadima. Stoga bi se nasumičnim odabirom moglo dogoditi da se ne odabere ni jedno od tih velikih stada. Nadležno tijelo može prije odabiranja gospodarstva primijeniti kriterij stratifikacije – primjerice, definiranjem stratuma kojim je obuhvaćeno 10% najvećih stada i na koji se raspoređuje 10% od potrebne količine uzimanja uzoraka. Nadležno tijelo također može stratificirati uzimanje uzoraka po administrativnim područjima u skladu s udjelom odgovarajućih stada u pojedinoj regiji. Svaku stratifikaciju koja se uzima u obzir potrebno je opisati u izvješću koje nadležno tijelo dostavlja Europskoj komisiji u skladu s dijelom D stavkom 1. ovoga Dodatka.

Ukoliko se uzorkovanje ne može provesti na odabranom gospodarstvu (npr. gospodarstvo više ne postoji u trenutku provedbe uzorkovanja), nasumično se odabire novo gospodarstvo iz

istoga okvira uzimanja uzoraka. Ukoliko se provodi stratifikacija (npr. prema veličini stada ili području), onda se novo gospodarstvo odabire iz istoga stratuma.

Veličinu primarnog uzorka (broj gospodarstava na kojima se uzimaju uzorci) potrebno je otprilike podjednako rasporediti tijekom godine kako bi se obuhvatila, koliko je god to moguće, sva godišnja doba. Uzorci se uzimaju na jednoj dvanaestini ukupnog broja gospodarstava svaki mjesec.

U pretraživanjima se moraju obuhvatiti i gospodarstva koja drže stada na otvorenom, no nema obavezne stratifikacije za tu vrstu proizvodnje.

2.2.2. Druga faza: uzorkovanje na gospodarstvu

U svakom odabranom rasplodnom i komercijalnom stadu nasumično se odabiru za uzimanje uzoraka boksovi, dvorišta ili skupine rasplodnih svinja starijih od šest mjeseci.

Broj boksova, dvorišta ili skupina koji će se uzorkovati mora se proporcionalno rasporediti prema broju rasplodnih svinja u različitim stadijima proizvodnje (gravidne, negravidne, i druge kategorije rasplodnih svinja). Nisu propisane određene starosne kategorije od kojih se uzimaju uzorci, ali se podaci o dobi životinja moraju prikupljati prilikom uzorkovanja.

Novonabavljene rasplodne svinje koje se drže u karanteni ne uključuju se u pretraživanja na salmonele i MRSA-u.

2.3. Izračunavanje veličine uzorka

2.3.1. Veličina primarnog uzorka (veličina uzorka u prvoj fazi)

Izračunavanje veličine primarnog uzorka provodi se zasebno za rasplodna gospodarstva i proizvodna gospodarstva. Veličina primarnog uzorka je broj rasplodnih gospodarstava na kojima se uzimaju uzorci te broj proizvodnih gospodarstava na kojima se uzimaju uzorci, a određuje se nasumičnim odabirom uzoraka uzimajući u obzir sljedeće:

(a) ukupan broj rasplodnih gospodarstava (rasplodna gospodarstva, dio 1. pretraživanja na salmonele i MRSA-u);

(b) ukupan broj proizvodnih gospodarstava (proizvodna gospodarstva, dio 2. pretraživanja na salmonele i MRSA-u);

(c) očekivana godišnja prevalencija (p): 50%;

(d) željena razina pouzdanosti (Z): 95%, sukladno vrijednosti $Z\alpha$ od 1,96;

(e) točnost (L): 7,5%;

(f) primjenom tih vrijednosti i formule:

$$n_{\infty} = \frac{(Z\alpha)^2 p(1-p)}{L^2}$$

Izračun se najprije radi za rasplodna gospodarstva, a potom za proizvodna gospodarstva. U svakom slučaju pretpostavke iz točaka c) do e) ove podtočke su iste.

Ukoliko se u okviru za uzorkovanje rasplodnih ili proizvodnih stada nalazi 100.000 ili više gospodarstava, tada se ta populacija, iz praktičnih razloga, smatra beskonačnom, a broj gospodarstava koja se nasumično odabiru iz okvira za uzorkovanje je 171 (Tablica 1.). Ukoliko je broj rasplodnih ili proizvodnih stada manji od 100.000 primjenjuje se faktor korekcije konačne populacije i potrebno je uzeti uzorke na manjem broju gospodarstava na način prikazan u Tablici 1.

Npr. ako u zemlji 1.000 gospodarstava pripada skupini proizvodnih gospodarstava i 250 gospodarstava pripada skupini rasplodnih gospodarstava, uzorci se moraju uzeti na 147 gospodarstava iz skupine proizvodnih gospodarstava i na 102 gospodarstva iz skupine rasplodnih gospodarstava.

Tablica 1. Broj gospodarstava s rasplodnim svinjama od kojih se uzimaju uzorci u svakom dijelu pretraživanja na salmonelle i MRSA-u (ukupan broj gospodarstava s rasplodnim svinjama u zemlji)

Broj gospodarstava s rasplodnim svinjama (N)	Veličina uzorka (n) za konačnu veličinu populacije s 7,5% točnosti
100 000	171
10 000	169
5 000	166
2 000	158
1 000	147
500	128
250	102
150	80
125	73
100	64
90	59
80	55
70	50

60	45
50	39
40	33
30	26
20	18
10	10

Potrebno je voditi računa o neodgovarajućim gospodarstvima npr. povećanjem veličine uzorka u svakoj skupini za 10%. Svako neodgovarajuće gospodarstvo mora biti zamijenjeno u postupku pretraživanja na salmonele i MRSA-u (vidi podtočku 2.2.1 ove točke).

Ukoliko prije početka pretraživanja nije moguće procijeniti broj rasplodnih gospodarstava, broj gospodarstava za uzorkovanje odabire se u skladu s Tablicom 1., na temelju ukupnoga broja gospodarstava sa krmačama (X gospodarstava). Broj gospodarstava koji će se uzorkovati povećava se za najmanje 30% ($(X + 30\%)$ gospodarstava). Prije pretraživanja nadležno tijelo utvrđuje broj rasplodnih gospodarstava, koji mora biti najmanje jednak onom uvećanom za dodanih 30%. Prilikom posjete gospodarstvima, u skladu s navedenim definicijama, pojedino se gospodarstvo na licu mjesta klasificira kao rasplodno ili proizvodno gospodarstvo.

2.3.2. Veličina sekundarnog uzorka (veličina uzorka u drugoj fazi)

Na svakom odabranom gospodarstvu uzorci se prikupljaju iz 10 nasumično odabranih boksova, dvorišta ili skupina rasplodnih svinja. Ukoliko je potrebno (npr. u prasilištu ili kad se krmače drže u malim skupinama s manje od 10 životinja), skupina može obuhvatiti više od jednog boksa. Najmanje 10 pojedinačnih rasplodnih svinja treba biti uključeno u svakom rutinskom uzorku za salmonelu.

Kad je na malim gospodarstvima ili gospodarstvima s velikim brojem rasplodnih svinja držanih vani na ograđenim pašnjacima, broj boksova, dvorišta ili skupina manji od 10, potrebno je uzorkovati isti boks, dvorište ili skupinu, na način da se prikupi ukupno 10 rutinskih uzoraka na salmonelu.

Dio B: Prikupljanje uzoraka i analiza za pretraživanje na salmonele

1. Prikupljanje uzoraka u stadima

1.1. Vrsta i pojedinosti rutinskog uzorka

Materijal koji se prikuplja za bakteriološku analizu je svježi izmet reprezentativan za cijelo gospodarstvo, koje se smatra jedinicom uzorkovanja. Budući da je svako gospodarstvo jedinstveno, prije početka uzimanja uzoraka mora se odlučiti iz kojeg će se boksa, dvorišta ili skupine na gospodarstvu uzeti uzorci. Prikupljeni uzorak stavlja se u odvojenu posudicu kako bi se spriječila križna kontaminacija i šalje u laboratorij.

Svaki skupni uzorak mora imati ukupnu težinu od najmanje 25 grama, a isti se može prikupiti na dva načina:

Postupak 1. Kada se na području jednoga boksa ili dvorišta nakupljena mješavina izmeta, pomoću velike špatule s vatom (npr. 20 cm x 20 cm) potrebno je proći kroz masu izmeta, osiguravajući pri tome da se prikupi najmanje 25 g miješanoga materijala. To se može postići primjerice pomicanjem špatule duž cik-cak linije od 2 metra tako da se na nju nahvata fekalni materijal. Ako je potrebno, na primjer zbog vrućine ili na rešetkastom podu, špatula se može navlažiti odgovarajućom tekućinom poput vode za piće.

Postupak 2. Kada nema nakupljene mješavine izmeta, primjerice na polju, velikom dvorištu, u prasilištu, ili boksovima ili drugim nastambama s manjim brojem svinja u skupini, uzimaju se manje količine izmeta iz pojedinačnih masa svježeg izmeta ili mjesta, na način da se najmanje 10 životinja uključi u ukupnu količinu od najmanje 25 g. Mjesta s kojih se uzimaju manje količine treba rasporediti na reprezentativan način preko cijelog područja.

Postupak 1. ima prednost ukoliko je praktičan. U tom postupku najmanje 10 pojedinačnih svinja mora biti uključeno u svaki uzorak, inače se mora primijeniti postupak 2.

1.2. Dodatno uzorkovanje za pretraživanje prevalencije unutar gospodarstva

Ukupno 10 gospodarstava, nasumično odabranih od ukupnoga uzorka rasplodnih gospodarstava i proizvodnih gospodarstava, podvrgava se intenzivnijem uzorkovanju. Na tih 10 gospodarstava 10 rutinskih uzoraka prikuplja se na isti način kako je ranije opisano (podtočka 2.1. dijela A). Dodatno tome prikuplja se 10 pojedinačnih uzoraka od najmanje 30 g iz svakog odabranog boksa, koji se obilježavaju na način da se te pojedinačne uzorke može povezati s rutinskim uzorcima iz odabranog boksa. Tako se prikuplja ukupno 10 rutinskih uzoraka i 100 (10 x 10) pojedinačnih uzoraka sa svakog od tih 10 gospodarstava. Obrada tih probnih uzoraka opisana je u podtočki 2.3.1. ove točke.

1.3. Podaci o uzorcima

Svi relevantni podaci dobiveni od uzorka evidentiraju se na obrascu za uzorkovanje koji propisuje nadležno tijelo kako bi se omogućilo ispunjavanje zahtjeva vezano uz podatke iz dijela D ovoga Dodatka.

Svaki uzorak i njegov obrazac obilježavaju se jedinstvenim brojem, koji se koristi od uzimanja uzorka do testiranja, te kodom/brojem boksa. Nadležno tijelo odgovorno je za izdavanje i primjenu jedinstvenog sustava numeriranja.

1.4. Prijevoz uzoraka

Poželjno je da se uzorci drže na +2 do +8 °C, a za vrijeme prijevoza moraju biti zaštićeni od vanjske kontaminacije. Uzorci se otpremaju u laboratorij što je prije moguće unutar 36 sati, ekspresnom poštom ili putem dostavljača i moraju stići u laboratorij najkasnije 72 sata od uzimanja uzorka.

2. Metode pretrage u laboratoriju

2.1. Laboratoriji

Pretrage i serotipizacija provode se u nacionalnom referentnom laboratoriju (NRL). Ukoliko NRL ne raspolaže kapacitetima za provedbu svih pretraga ili ako to nije laboratorij koji rutinski provodi utvrđivanje, nadležno tijelo može odlučiti i odrediti da pretrage provodi ograničen broj drugih laboratorija koji sudjeluju u službenoj kontroli salmonele. Ti laboratoriji moraju imati dokazano iskustvo primjene potrebnih metoda utvrđivanja i imati sustav osiguranja kvalitete u skladu s važećom revizijom norme HRN EN ISO/IEC 17025 i moraju biti pod nadzorom NRL.

Nacionalni referentni laboratorij za *Salmonella spp.* i Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* u svinja je Hrvatski veterinarski institut Zagreb, Odjel za bakteriologiju i parazitologiju, Laboratorij za opću bakteriologiju i mikologiju, Savska cesta 143, Zagreb.

2.2. Prijem uzoraka

U laboratoriju se uzorci moraju držati u hladnjaku sve do bakteriološkog pretraživanja, koje se, po mogućnosti, provodi u roku od 24 sata nakon prijema uzorka, ali u svakom slučaju najkasnije 96 sati nakon što je uzorak prikupljen.

2.3. Pretraga uzorka

Nadležno tijelo jamči da su sve uključene stranke odgovarajuće osposobljene za provedbu pretraga.

2.3.1. Priprema

U laboratoriju se rutinski uzorci pažljivo i temeljito promiješaju prije nego se 25 g odvoji za pretragu.

Za procjenu prevalencije na gospodarstvu u skladu sa podtočkom 1.2. ovoga Dijela, svaki pojedinačno prikupljeni uzorak (30 g) mora biti podijeljen na dva dijela. Jedan se dio težine najmanje 25 g pažljivo i temeljito promiješa i potom odvojeno kultivira. Preostali drugi dio koristi se za pripremu skupnog uzorka od 10 pojedinačnih uzoraka iz odabranih boksova, skupina ili dvorišta. Taj drugi dio se priprema dodavanjem 10 puta 2,5 g pojedinačnih uzoraka kako bi se napravio laboratorijski skupni uzorak od 25 g. Laboratorijski skupni uzorci se prije pretrage pažljivo i temeljito promiješaju. Sveukupno se analizira 10 rutinskih uzoraka, 10 laboratorijskih skupnih uzoraka i 100 pojedinačnih uzoraka sa svakog od 10 gospodarstava odabranih za procjenu prevalencije na gospodarstvu.

2.3.2. Metode utvrđivanja i identifikacije

2.3.2.1. Utvrđivanje salmonele

Za izdvajanje se primjenjuje metoda koju preporučuje referentni laboratorij Europske unije (CRL) za salmonelu u Bilthovenu, Nizozemska. Metoda je opisana u posljednjoj važećoj verziji Dodatka D HRN EN/ISO 6579:2007: »Otkrivanje *Salmonella spp.* u izmetima životinja i uzorcima iz primarne proizvodnje«.

2.3.2.2. Serotipizacija salmonele

Iz svakog pozitivnog uzorka, NRL tipizira se barem jedan izolat po najnovijem važećem izdanju »White-Kauffmann-LeMinor« shemi.

Za osiguranje kvalitete, 16 sojeva koji se mogu tipizirati i 16 sojeva koji se ne mogu tipizirati šalju se u CRL za salmonelu. Izolati se šalju CRL kvartalno. Ako je izolirano manje sojeva, potrebno je poslati sve sojeve.

2.3.2.3. Fagotipizacija salmonele

U slučaju izdvajanja serovarova *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium, može se provesti fagotipizacija u skladu s metodom opisanom od strane referentnog centra WHO-a za fagotipizaciju salmonele Health Protection Agency (HPA – Agencije za zaštitu zdravlja), Colindale, London.

Dio C: Prikupljanje uzoraka i pretrage za utvrđivanje MRSA-e

1. Vrsta i pojedinosti o uzorku

1.1. Prikupljanje uzorka

Pet uzoraka prašine prikuplja se uz korištenje pet suhih sterilnih brisova na površini od otprilike 500 cm² svaki, iz pet od 10 boksova odabranih za uzorkovanje sukladno dijelu A ovoga Dodatka. Tih pet boksova odabire se na način da se obuhvate rasplodne svinje u različitim fazama proizvodnje. Za svaki boks uzimaju se brisovi sa gornjih površina pregradnih zidova boksa. Ukoliko nema dovoljno prašine, dodatno se uzimaju uzorci iz ventilacijskih otvora i sl. Upotrijebljeni brisovi stavljaju se u sterilne plastične vrećice.

Za vrijeme uzimanja uzoraka potrebno je u objektu spriječiti stvaranje aerosola.

1.2. Podaci o uzorku

Svaki uzorak i njegov obrazac mora biti obilježen jedinstvenim brojem koji se koristi od uzimanja uzorka do testiranja. Nadležno tijelo mora osigurati izdavanje i primjenu jedinstvenog sustava numeriranja.

1.3. Prijevoz uzoraka

Uzorci se moraju držati na stalnoj temperaturi od +2 do +25 °C (sobna temperatura) i mora se spriječiti kontaminacija za vrijeme pohrane i prijevoza. Uzorci se otpremaju u laboratorij što je prije moguće i moraju se u dostaviti laboratorij najkasnije 10 dana nakon uzimanja uzorka.

2. Metode pretrage u laboratoriju

2.1. Laboratoriji

Pretrage i pod-tipiziranje MRSA-e provodi se u osposobljenim laboratorijima. To je po mogućnosti nacionalni referentni laboratorij (NRL) za *Staphylococcus aureus* i/ili antimikrobnu otpornost. Ukoliko NRL ne raspolaže kapacitetima ili iskustvom za provedbu pretraga ili ako to nije laboratorij koji rutinski provodi utvrđivanje, pretrage mogu provoditi

drugi laboratoriji s iskustvom ili NRL u drugoj državi. Ti laboratoriji moraju imati dokazano iskustvo primjene potrebnih metoda utvrđivanja i biti akreditiran prema zahtjevima važeće norme HRN EN ISO/IEC 17025. Ažurirani popis odobrenih laboratorija objavljuje se na službenoj web-stranici Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (www.mps.hr).

2.2. Prijem uzoraka

Uzorci koji se zaprime 10 dana nakon uzorkovanja odbacuju se osim ukoliko bakteriološka pretraga može započeti unutar 13 dana od uzorkovanja. U laboratoriju se uzorci drže na stalnoj temperaturi od +2 °C do 25 °C do bakteriološkog pretraživanja koje mora biti provedeno u roku od 13 dana nakon uzimanja uzoraka.

2.3. Pretraga uzoraka

2.3.1. Selektivno obogaćivanje

U laboratoriju se pet brisova prašine objedinjuje u 100 ml Mueller-Hinton bujona uz dodavanje 6,5% NaCl i na temperaturi od 37 °C inkubira 16 do 20 sati. Od toga se jedan mililitar precjepljuje u 9 ml Tryptone-Soy bujona + 3,5 mg/l cefoxitina i 75 mg aztreonama, te se inkubira daljnjih 16 do 20 sati na 37 °C. Od toga se jedna puna bakteriološka ušica nacijepi na kromogenski selektivni agar za MRSA-u i inkubira 24 do 48 sati na 37 °C. Potrebno je koristiti selektivni agar preporučen od referentnog laboratorija EU za antimikrobnu otpornost.

Na temelju izgleda i boje kolonija, do pet kolonija koje ukazuju na MRSA-u precjepljuje se krvni agar. Sumnjivi *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) se u toj fazi pohranjuje pod primjerenim uvjetima (-80 °C) za kasniju identifikaciju i karakterizaciju ili se odmah obrađuje.

2.3.2. Identifikacija MRSA-e

Sumnjivi *S. aureus* identificiraju se kao *S. aureus* i MRSA pomoću PCR-a. Identifikacija se provodi primjenom multipleks PCR-a uz istovremenu identifikaciju *mecA*-gena ili dva različita PCR-a. Kako bi se smanjio opseg rada najprije se identificira jedan od pet sumnjivih *S. aureus* izolata. Ako je taj izolat identificiran kao MRSA, on se pohranjuje. Nije potrebno testirati preostala četiri izolata ukoliko je prvi izolat identificiran kao MRSA, te se oni mogu odbaciti. Ako prvi izolat nije identificiran kao MRSA, testira se sljedeći od početnih pet izolata. Postupak se ponavlja sve dok se ne identificira MRSA ili dok se ne ispita svih pet izolata. Umjesto toga može se kao prvi korak poduzeti identifikacija PCR-om objedinjenog uzorka pet sumnjivih kolonija iz uzorka. U slučaju pozitivnog PCR-a, pretraga se ponavlja na pojedinačnim kolonijama kako bi se identificirala pozitivna kolonija.

Za osiguranje kvalitete, 16 sumnjivih izolata *S. aureus* koji nisu identificirani kao MRSA i 16 sojeva MRSA, koji su uzorkovani tijekom 2010. godine šalju se CRL. Dio tih izolata šalje se u CRL kvartalno. Ako je manje od 16 izolata dokazano kao MRSA, potrebno je poslati sve izolate.

2.3.3. Pod-tipiziranje radi povezanosti s humanim izolatima

Pozitivni MRSA-e testiraju se na *Staphylococcus* tipa A (Spa-tipiziranje). Tipiziranje se provodi u NRL ili pod njegovim nadzorom, ili se izolati šalju u CRL koji potom provodi tipizaciju.

Na podskupini reprezentativnih izolata (otprilike 2% broja objedinjenih uzoraka) NRL ili CRL provodi MLST-tipizaciju (*engl.: Multi locus secvence typing*).

2.3.4. Testiranje na antimikrobnu osjetljivost

Testiranje na antimikrobnu osjetljivost nije obavezno. Ukoliko se provodi, izolati MRSA-e se testiraju na antimikrobnu osjetljivost uz primjenu mikrorazrjeđenja na najmanje sljedeća antimikrobna sredstva: ciprofloxacina, eritromicina, fusidičku kiselinu, gentamicina, linezolid, mupirocin, sulfametoxazole, trimetoprim, tetracikline, kloramfenicol, vancomicina i kvinupristin/dalfopristin. O rezultatima testiranja na antimikrobnu osjetljivost izvještava se u skladu s člankom 9. stavkom 1. Pravilnika o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza («Narodne novine», br. 52/05)[\[3\]](#).

2.4. Pohranjivanje izolata

Izolati se pohranjuju u NRL-u uz primjenu metode za prikupljanje kultura NRL-a kojom se osigurava preživljavanje i jamči nepromjenljivost svojstava soja najmanje pet godina. Time se omogućava kasnije testiranje na antimikrobnu osjetljivost ili druge vrste pretraga. Izolati poslani u CRL također se pohranjuju na najmanje pet godina. Izolati se pohranjuju pod uvjetima na kojima ne dolazi do promjene svojstava (-80 °C). Ako nadležni laboratorij nema na raspolaganju kapacitete za pohranu, izolati se otpremaju u CRL koji pohranjuje izolate.

3. Izvješćivanje od strane laboratorija

Svi rezultati pretraga dostavljaju se iz laboratorija nadležnom tijelu uz poštivanje povjerljivosti podataka.

Dio D: Izvješćivanje

1. Opis provođenja pretraživanja na salmonelle i MRSA-e

Izvješće u pisanom obliku mora sadržavati najmanje sljedeće podatke:

(a) naziv zemlje;

(b) opis populacije na gospodarstvima s rasplodnim svinjama:

1. rasplodna gospodarstva:

(i) ukupan broj rasplodnih gospodarstava;

(ii) ukupan broj nukleusa gospodarstava;

(iii) ukupan broj gospodarstava s pradjedovima, djedovima ili roditeljima;

(iv) broj rasplodnih gospodarstava predviđenih za uzimanje uzoraka i broj rasplodnih gospodarstava sa kojih su uzeti uzorci; broj gospodarstava predviđenih za uzimanje uzoraka, ali s kojih nisu uzeti uzorci te razlozi zašto to nije provedeno;

(v) napomena o ukupnoj reprezentativnosti uzorkovanja rasplodnih gospodarstava u programu.

2. proizvodna gospodarstva:

(i) ukupan broj proizvodnih gospodarstava;

(ii) ukupan broj proizvodnih gospodarstava s krmačama i prasadi do odbića /predtov;

(iii) ukupan broj gospodarstava s krmačama i prasadi od prašenja do kraja tova;

(iv) broj proizvodnih gospodarstava predviđenih za uzimanje uzoraka i broj proizvodnih gospodarstava s kojih su uzeti uzorci; broj gospodarstava predviđenih za uzimanje uzoraka, ali s kojih nisu uzeti uzorci te razlozi zašto to nije provedeno;

(v) napomene o ukupnoj reprezentativnosti uzorkovanja na proizvodnim gospodarstvima u programu;

(c) broj dobivenih i pretraženih uzoraka na salmonele iz:

(i) rasplodnih gospodarstava;

(ii) proizvodnih gospodarstava;

(iii) gospodarstava s kojih su uzeti uzorci za utvrđivanje prevalencije na gospodarstva;

(d) ukupni rezultati pretraživanja na salmonele:

(i) prevalencija na rasplodnim gospodarstvima i proizvodnim gospodarstvima zaraženih salmonelom i serotip *Salmonella*;

(ii) rezultat prevalencije na gospodarstvu;

(e) popis laboratorija određenih za pretraživanje salmonele:

(i) utvrđivanje;

(ii) serotipizacija;

(iii) fagotipizacija (ako se provodi);

(f) broj dobivenih i pretraženih uzoraka za MRSA-u iz:

(i) rasplodnih gospodarstava;

(ii) proizvodnih gospodarstava;

(g) ukupni rezultati pretraživanje MRSA-e: prevalencija na rasplodnim gospodarstvima i proizvodnim gospodarstava zaraženih s MRSA-om, na osnovi utvrđivanja i potvrde PCR-om;

(h) popis laboratorija određenih za pretraživanje MRSA-e za:

(i) utvrđivanje;

(ii) PCR;

(iii) Spa-tipiziranje;

(iv) MLST tipiziranje.

2. Cjeloviti podaci o svakom gospodarstvu s kojeg su uzeti uzorci s odgovarajućim rezultatima testiranja

Nadležno tijelo dostavlja Europskoj komisiji rezultate pretraživanja na salmonele i MRSA-u elektroničkim putem u obliku neobrađenih podataka uz korištenje rječnika za podatke i zahtjevima za prikupljanje podataka koje je utvrdila Europska komisija.

2.1. Informacije o gospodarstvu

Sljedeće informacije moraju biti prikupljene za svako gospodarstvo odabrano za uzimanje uzoraka:

(a) šifra gospodarstva (JIBIG);

(b) vrsta gospodarstva ovisno proizvodnji:

(i) omjer gospodarstava koja drže svinje u objektima i gospodarstava koje svinje drže vani;

(ii) nukleus, rasplod, od krmača do odbite prasadi, prašenje do završetka tova, prašenje do početka tovljenja (pred-tov);

(c) veličina gospodarstva: broj rasplodnih svinja prisutan u vrijeme uzimanja uzoraka (odrasla populacija);

(d) strategija remonta stada: sve rasplodne svinje za remont stada su kupljene; neke rasplodne svinje za remont stada su iz vlastitog uzgoja ili sve rasplodne svinje za remont stada su iz vlastitog uzgoja;

(e) (dobrovoljno) klinički simptomi proljeva: da li su utvrđeni simptomi proljeva u posljednja tri mjeseca prije uzimanja uzoraka?

2.2. Informacije o svim uzorcima prikupljenim u okviru pretraživanja salmonele

Za svaki uzorak poslan u laboratorij u okviru pretraživanja salmonele moraju biti prikupljeni sljedeći podaci:

(a) šifra uzorka;

- (b) šifra (naziv) laboratorija koji sudjeluje u početnoj pretrazi;
- (c) datum uzimanja uzorka;
- (d) datum početka pretrage u laboratoriju;
- (e) utvrđivanje salmonele: kvalitativan nalaz (pozitivan/negativan);
- (f) serotipiziranje salmonele: utvrđeni serotipovi (može ih biti više od jednoga);
- (g) dob svinja: sve nazimice naspram rasplodnih svinja različite dobi;
- (h) spol: samo krmače; krmače i nerasti ili samo nerasti;
- (i) faza proizvodnje: dojenje; parenje, graviditet (drugo);
- (j) nastambe: rešetkasti pod (u cijelosti/djelomično); čvrsti pod; debeli sloj slame ili drugo;
- (k) hranidba: u boksu, dvorištu ili skupini isključivo krmnom smjesom;
- (l) dodaci hrani: uporaba dodataka koji smanjuju salmonele (poput organske kiseline, probiotika);
- (m) sistemska uporaba antibiotika: koriste li se antibiotici kod svih životinja te skupine bilo kojim načinom promijene;
- (n) posljednji dan davanja antimikrobnih pripravaka životinjama (unutar zadnja četiri tjedna).

2.3. Dodatne informacije o prikupljenim uzorcima u okviru pretraživanja salmonele za utvrđivanja prevalencije na gospodarstvu

Dodatne informacije koje se prikupljaju za svaki pojedinačni uzorak poslan u laboratorij u okviru uzimanja uzoraka za utvrđivanja prevalencije na gospodarstvu su:

- (a) šifra skupnog uzorka;
- (b) utvrđivanje salmonele u svakom pojedinačnom uzorku: kvalitativan nalaz (pozitivan/negativan);
- (c) serotipiziranje salmonele u svakom pojedinom uzorku: utvrđeni serotipovi (može ih biti više od jedan).

2.4. Informacije o uzorcima prikupljenim u okviru pretraživanja MRSA-e

Za svaki uzorak poslan u laboratorij moraju biti prikupljeni sljedeći podaci:

- (a) šifra uzorka;
- (b) šifra (naziv) laboratorija koji sudjeluje u utvrđivanju;

- (c) datum uzimanja uzorka;
- (d) datum početka pretrage u laboratoriju;
- (e) rezultat utvrđivanja MRSA-e (pozitivan/negativan);
- (f) šifra (naziv) laboratorija koji sudjeluje u PCR-u;
- (g) rezultat PCR-a;
- (h) šifra (naziv) laboratorija koji sudjeluje u Spa – tipiziranju;
- (i) rezultat Spa- tipiziranja;
- (j) šifra (naziv) laboratorija koji sudjeluje u MLST-tipiziranju;
- (k) rezultat MLST tipiziranja.

DODATAK II.

Ovjereno financijsko izvješće o provedbi utvrđivanja prevalencije *Salmonella* spp. i MRSA-e u stadima rasplodnih svinja

Razdoblje izvješćivanja:

– do za pretraživanje salmonele

(datum) (datum)

– do za pretraživanje MRSA-e

(datum) (datum)

Izjava o nastalim troškovima

Troškovi nastali vezano uz postupke:	Broj testova/brisoa	Ukupni troškovi testiranja i brisoa nastalih tijekom razdoblja izvješćivanja (izraženo u kunama + PDV)
Bakteriološko pretraživanje na salmonelu (<i>Salmonella</i> spp)		
Serotipiziranje izolata salmonele		
utvrđivanje MRSA-e		
Identifikacija MRSA-e PCR-om		

Spa-tipiziranje MRSA-e		
MLST tipiziranje MRSA-e		
Brisovi za testiranje na MRSA-e		

Izjava korisnika

Ovime potvrđujem da:

- su troškovi navedeni u tablici iznad izvorni i da su nastali provođenjem odredbi propisanih ovim Pravilnikom te su bili neophodni za primjerenu provedbu istih;
- su svi dodatni dokumenti koji opravdavaju troškove dostupni za reviziju;
- za ovaj program nije zatražen nikakav drugi financijski doprinos.

Datum: _____

Osoba odgovorna za financije: _____

Potpis odgovorne osobe: _____

[1]Pravilnikom se preuzimaju odredbe Odluke Komisije 2008/55/EZ od 20. prosinca 2007. o financijskom sudjelovanju Zajednice u ispitivanjima o pojavljivanju Salmonella spp i Staphylococcus aureus otpornog na meticilin u stadima rasplodnih svinja, koja se provode u državama članicama.

[2]Člankom 9. Pravilnika o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza (»Narodne novine«, br 52/05) preuzete su odredbe iz članka 9. Direktive 2003/99/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 17. studenog 2003 o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza kojom je izmijenjena Odluka Vijeća 90/424/EZ i ukinuta Direktiva Vijeća 92/117/EZ.

[3]Člankom 9. Pravilnika o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza (»Narodne novine«, br 52/05) preuzete su odredbe iz članka 9. Direktive 2003/99/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 17. studenog 2003 o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza kojom je izmijenjena Odluka Vijeća 90/424/EZ i ukinuta Direktiva Vijeća 92/117/EZ.