

Na osnovu člana 15. stav (1) Pravilnika o mjerama za suzbijanje i kontrolu influence ptica ("Službeni glasnik BiH", broj 35/10), Ured za veterinarstvo Bosne i Hercegovine donio je

DIJAGNOSTIČKI PRIRUČNIK ZA INFLUENCU PTICA

Član 1. (Predmet)

(1) Dijagnostičkim priručnikom za influencu ptica (u daljem tekstu: Priručnik) se utvrđuju dijagnostički postupci za influencu ptica, u skladu s Pravilnikom o mjerama za suzbijanje i kontrolu influence ptica ("Službeni glasnik BiH", broj 35/10).

(2) Dijagnostički postupci za influencu ptica opisani su u Prilogu ovog Priručnika i čine njegov sastavni dio.

Član 2. (Stupanje na snagu)

Ovaj Priručnik stupa na snagu danom donošenja i objavljuje se u "Službenom glasniku BiH".

Broj 02-2-02-2-1209-1/10.
5. augusta 2010. godine
Sarajevo

Direktor
Doc. dr. **Drago N. Nedić**, s. r.

PRILOG

POGLAVLJE I. Uvod, ciljevi i pojmovi Priručnika

1. Radi osiguranja ujednačenih postupaka dijagnostike influence ptica, Dijagnostički priručnik za influencu ptica (u daljnjem tekstu: Dijagnostički priručnik) određuje:

(a) smjernice i minimalne zahtjeve za dijagnostičke postupke, način uzorkovanja i kriterije za procjenu rezultata laboratorijskih testova u cilju postavljanja ispravne dijagnoze influence ptica;

(b) laboratorijske testove koji se koriste za dijagnozu influence ptica i laboratorijske tehnike koje se koriste za gensko tipiziranje izolata virusa influence ptica;

(c) minimalne biosigurnosne zahtjeve i standarde kvaliteta koje dijagnostičke laboratorije moraju provoditi i minimalne biosigurnosne zahtjeve za prijevoz uzoraka.

2. Dijagnostički priručnik je namijenjen nadležnim organima odgovornim za kontrolu influence ptica i sadržava načela i primjene laboratorijskih testova, procjenu rezultata testova te laboratorijske tehnike.

3. Za potrebe Dijagnostičkog priručnika, osim pojmova iz člana 2. Pravilnika o mjerama za suzbijanje i kontrolu influence ptica ("Službeni glasnik BiH", broj 35/10), primjenjuje se i pojam: "dijagnostički uzorak", koji označava bilo koji materijal porijeklom od životinja, uključujući cijelu lešinu koja se prevozi za dijagnostičke ili istraživačke svrhe, osim živih zaraženih životinja.

4. Potvrda influence ptica kod peradi i drugih ptica koje se drže u zatočeništvu mora biti u skladu s postupcima, načinima uzorkovanja i kriterijima za procjenu rezultata laboratorijskih testova kako je određeno u ovom Dijagnostičkom priručniku i mora se zasnivati na jednom ili više kriterija, kako slijedi:

(a) nalaz infektivnog virusa, antigena ili specifičnog genskog materijala u uzorcima tkiva, organa, krvi ili izlučevina peradi ili drugih ptica;

(b) nalaz kliničkih znakova i postmortalnih oštećenja specifičnih za bolest kod navedenih ptica;

(c) dokaz specifičnih antitijela u uzorcima krvi navedenih ptica.

5. Potvrda infekcije sisara visokopatogenim ili niskopatogenim virusom influence A podtip H5 ili H7 porijeklom od ptica, mora se zasnivati na jednom ili više kriterija, kako slijedi:

(a) nalaz infektivnog virusa influence ptica, antigena ili specifičnog genskog materijala u uzorcima tkiva, organa, krvi ili izlučevina sisara;

(b) dokaz specifičnih antitijela za influencu ptica u uzorcima krvi sisara.

6. Postupci, načini uzorkovanja i kriteriji za procjenu rezultata laboratorijskih testova moraju biti:

(a) u skladu s postupcima koji su određeni u ovom Dijagnostičkom priručniku; ili

(b) odobreni od strane Ureda za veterinarstvo Bosne i Hercegovine (u daljnjem tekstu: Ured), a uz uslov da:

1) je zadovoljavajuća osjetljivost i specifičnost odobrenog laboratorijskog testa dokazana kroz uporedno testiranje koje je organizirala referentna laboratorija za influencu ptica OIE-a / Evropske zajednice (u daljnjem tekstu: referentna laboratorija OIE-a / EU);

ili

2) kad procjena određenog laboratorijskog testa nije provedena kroz uporedno testiranje koje je organizirano od strane referentne laboratorije OIE-a / Evropske zajednice, osjetljivost i specifičnost odobrenog laboratorijskog testa validirana je od strane referentne laboratorije, a rezultati validacije dokazuju da test odgovara svrsi za koju je namijenjen. Rezultati navedene validacije moraju biti dostavljeni referentnoj laboratoriji OIE-a / Evropske zajednice.

POGLAVLJE II.

Opis influence ptica s naglaskom na diferencijalnu dijagnozu

1. Etiologija i virulencija

1.1. Influenca ptica je visoko kontagiozna virusna zaraza uzrokovana virusima iz porodice Orthomyxoviridae, rod influenzavirus A. Virusi influence A su jedini ortomiksovirusi za koje je poznato da zaražavaju ptice. Utvrđeno je da su mnoge vrste ptica osjetljive na zaražavanje virusima influence A. Vodene ptice su glavni rezervoar takvih virusa, ali veliki broj izolata niske patogenosti je izdvojen iz kokoši i ćurana kao glavnih vrsta peradi od privrednog značaja, pogođenih s ovom bolešću.

1.2. Virusi influence A dijele zajedničke antigene nukleoproteina i proteina matriksa, ali su razvrstani u podtipove na osnovu antigenske srodnosti površinskih glikoproteina hemaglutinina i neuraminidaze. Do danas je poznato 16 podtipova hemaglutinina (H1-H16) i 9 podtipova neuraminidaze (N1-N9). Svaki virus influence ima jedan antigen hemaglutinina i jedan antigen neuraminidaze, koji mogu doći u bilo kojoj kombinaciji.

1.3. Virusi influence A podijeljeni su u dvije grupe na osnovu njihove sposobnosti da uzrokuju bolest kod prijemčive peradi:

(a) virusi visokopatogene influence ptica (u daljnjem tekstu: VPIP) uzrokuju vrlo tešku bolest koju karakterizira generalizirana infekcija zaražene peradi i koja može imati za posljedicu visoku stopu mortaliteta (do 100%); i

(b) virusi niskopatogene influence ptica (u daljnjem tekstu: NPIP) uzrokuju blagu, pretežno dišnu bolest peradi, osim ako nije došlo do pogoršanja bolesti usljed sekundarnih infekcija ili drugih faktora.

1.4. Divlje ptice, naročito migratorne vodene ptice, vrlo su važni rezervoari virusa influence A, što je utvrđeno izdvajanjem gotovo svih mogućih kombinacija podtipova hemaglutinina i neuraminidaze iz divljih ptica. Iz divljih ptica su izdvojeni samo virusi NPIP, osim u slučajevima prijenosa virusa visokopatogene influence sa zaražene domaće peradi na divlje ptice.

1.5. Primarni unos virusa influence u peradarske farme najvjerovatnije potiče od direktnog ili indirektnog kontakta s divljim pticama.

1.6. Postoji mogućnost da virusi NPIP uneseni s divljih ptica u uzgoje domaće peradi cirkuliraju neotkriveni, jer obično ne izazivaju ili izazivaju blage kliničke znakove.

1.7. Nakon unosa u uzgoje domaće peradi virusi NPIP podtipova H5 i H7 mogu mutirati u viruse VPIP. Do danas je poznato da samo virusi podtipova H5 i H7 mogu uzrokovati VPIP.

1.8. Premda se čini da je nekoliko mehanizama odgovorno za mutaciju virusa NPIP u viruse VPIP, faktori koji dovode do te mutacije nisu poznati. Čini se da u nekim slučajevima mutacija nastaje ubrzo nakon primarnog unosa virusa NPIP iz divljih ptica u uzgoje domaće peradi, dok su u drugim slučajevima virusi NPIP cirkulirali između peradi mjesecima prije takve mutacije. Zbog toga je nemoguće predvidjeti da li će i kada takva mutacija nastupiti. Međutim, može se zaključiti da ukoliko je cirkulacija virusa NPIP učestalija, rizik od mutacije u viruse VPIP je veći.

1.9. Vrijeme inkubacije teško je procijeniti i ono vjerovatno varira ovisno o soju virusa i domaćinu, a obično se navodi trajanje inkubacije od 5 do 6 dana, iako raspon inkubacije kod pojedinih jedinki vjerovatno iznosi od nekoliko sati do približno 7 dana.

2. Klinički znakovi kod ptica zaraženih virusom VPIP

2.1. Klinički znakovi su vrlo različiti i ovise o faktorima kao što su virulencija infektivnog virusa, pogođena vrsta, dob, spol, druge prisutne bolesti, okoliš.

2.2. Rani znakovi bolesti mogu uključiti inapetencu, smanjeno uzimanje vode i hrane i relativno nisku stopu smrtnosti. Alternativno, bolest se u jatu može iznenada pojaviti i veliki broj ptica može uginuti bez ikakvih znakova bolesti ili s minimalnim znakovima potištenosti, inapetence,

nakostriješenog perja i temperature. Generalno, klinički znakovi bolesti jače su izraženi kod ptica koje duže prežive. Vrijeme kad se razvijaju klinički znakovi ovisi o virusu, domaćinu i početnoj infektivnoj dozi i načinom držanja. Virus se širi sporije kod kafazno držanih nesilica ili ptica koje se drže na otvorenom u poređenju s nastambama u kojima se drže brojleri.

2.3. Nesilice zaražene virusom VPIP u početku mogu nositi jaja s mekom ljuskom, ali nesenje ubrzo prestaje. Bolesne ptice često sjede ili stoje u polusvjesnom stanju s glavom koja dotiče pod. Krijeste i podbradci su edematozni i cijanotični i na vrhovima mogu imati tačkasta krvarenja. Učestao je profuzni vodenasti proljev i ptice su jako žedne. Disanje može biti otežano i može se vidjeti pojačano suženje. Na dijelovima kože koji nisu pokriveni perjem mogu se vidjeti hemoragije. Stopa smrtnosti u jatima varira od 50 do 100%.

2.4. Znakovi VPIP kod brojlera često su manje uočljivi nego kod druge peradi i obično uključuju jaku potištenost inapetencu, a značajan porast smrtnosti može biti prvi uočeni znak abnormalnosti. Otok glave i vrata i neurološki znakovi kao što su tortikolis i ataksija također se mogu uočiti.

2.5. VPIP kod ćurana je slična u onoj kod domaćih ptica, ali se čini da su kod ćurki neki virusi VPIP virulentniji od drugih virusa VPIP.

2.6. Kod gusaka zaraženih virusom VPIP znakovi potištenosti, inapetence i diareje slični su onima kod nesilica, iako često praćeni otećenim sinusima. Mlađe ptice mogu pokazivati neurološke znakove.

2.7. Patke zaražene virusom VPIP ne moraju pokazivati kliničke znakove, ali je za neke sojeve objavljeno da uzrokuju kliničke znakove jednake onima kod gusaka, s određenom stopom smrtnosti.

2.8. Pri infekcijama nojeva virusima VPIP i NPIP klinički znakovi mogu izostati. U slučaju izbijanja VPIP, kakva je bila ona u Italiji 1999. i 2000. godine, biserke i japanske prepelice, pokazale su se osjetljivim na infekciju, s kliničkim znakovima i stopom smrtnosti kao u slučaju bolesti kod kokoši ili ćurki. U određenim eksperimentalnim studijama, uočeno je da su prepelice otpornije na neke sojeve virusa VPIP. Za sve ptice, prisustvo antitijela za isti H podtip, koja su posljedica vakcinacije ili prirodne infekcije, može značiti da infekcija virusom VPIP neće izazvati vidljive kliničke znakove bolesti.

3. *Postmortalne promjene kod ptica zaraženih virusom VPIP*

3.1. Ptice koje perakutno ugibaju mogu pokazivati minimalne patološke promjene uključujući dehidraciju i kongestiju unutrašnjih organa i mišića.

3.2. Kod ptica koje uginu nakon produženog kliničkog toka bolesti, tačkasta krvarenja pojavljuju se po cijelom tijelu, naročito po grkljanu, dušniku, žljezdanom želucu i epikardijalnom masnom tkivu, te na serozama uz prsnu kost. Prisutan je jaki potkožni edem naročito oko glave i skočnog zgloba. Lešina može biti dehidrirana. @ute ili sive nekrotične promjene (foci) mogu se naći na slezeni, jetri, bubrezima i plućima. Vazdušne vrećice mogu sadržavati iscjedak. Slezena može biti povećana i hemoragična.

3.3. Influenca ptica histološki se karakterizira oštećenjem krvnih sudova s posljedičnim edemom, krvarenjima i perivaskularnim promjenama naročito na miokardu, slezeni, plućima, mozgu, gušterači i podbratku. Nakrotične promjene nalaze se na plućima, jetri i bubrezima. Gliozna, vaskularna proliferacija i degeneracija neurona može se naći u mozgu.

4. *Diferencijalna dijagnoza*

4.1. U postavljanju diferencijalne dijagnoze za VPIP u obzir se naročito moraju uzeti slijedeće bolesti:

(a) druge bolesti koje uzrokuju iznenadnu visoku smrtnost, kao što su:

- 1) Njukastlska bolest (eng. Newcastle disease);
- 2) Zarazni laringotraheitis;
- 3) kuga pataka (engl. duck plague);
- 4) akutna trovanja;

(b) druge bolesti koje uzrokuju otok krijeste i podbratka, kao što su:

- 1) akutna kolera peradi i druge septihemijske bolesti;
- 2) bakterijski celulitis krijeste i podbratka.

5. Klinički znakovi kod ptica zaraženih virusima NPIP

5.1. Jačina bolesti koju uzrokuju virusi NPIP, jako je ovisna o:

- (a) soju virusa;
- (b) vrsti i starosti domaćina;
- (c) imunološkom statusu domaćina u odnosu na virus i naročito prisustvu drugih infektivnih uzročnika, kao što su:

- 1) *Pasteurella spp.*,
- 2) virusi Njukastlske bolesti (uključujući vakcinalne sojeve),
- 3) ptičji pneumovirus, virus zaraznog bronhitisa,
- 4) *E. coli*,
- 5) *Mycoplasma spp.*,

(c) stanja oslabljenog imuniteta;

(d) faktorima iz okoliša (kao što su višak amonijaka, prašina, visoke ili niske temperature).

5.2. U krajnjem slučaju, klinički znakovi bolesti mogu biti inaparentni ili blagi, izazivajući samo blage respiratorne znakove ili probleme u proizvodnji jaja kod nesilica. S druge strane, infekcije virusima NPIP mogu biti povezane i s jakim kliničkim znakovima bolesti, naročito kod ćurki, obično s krkljanjem, kašljem, otokom infraorbitalnih sinusa i febrilnim stanjem povezanim s gubitkom apetita i visokom stopom smrtnosti.

5.3. NPIP se može zamijeniti ili zakomplicirati s mnogobrojnim drugim bolestima praćenim s dišnim ili probavnim simptomima. Na influencu ptica se mora posumnjati pri svakom izbijanju bolesti kod peradi, koja traje uprkos primjeni preventivnih ili terapijskih mjera za druge bolesti.

6. Klinički znakovi kod ptica držanih u zatočeništvu

6.1. Klinički znakovi vrlo su različiti te kao i kod peradi variraju od inaparentnih do jakih s posljedičnom visokom stopom smrtnosti.

6.2. Zbog raznolikosti vrsta koje se drže zajedno, razlike u prijemčivosti, različitim količinama izlučenog virusa i često relativno sporim prijenosom zbog niske stope kontakta i niske gustoće populacije, infekcija se među pticama držanim u zatočeništvu širi sporije.

POGLAVLJE III.

Smjernice u slučaju sumnje na influencu ptica na farmi

1. Zbog raznolikosti kliničkih znakova i kod NPIP i kod VPIP uspostava jasnih smjernica za postavljanje sumnje nije moguća. Iznenadna visoka smrtnost peradi sa ili bez bilo kojeg odgovarajućeg kliničkog znaka navedenog u Poglavlju II. ovog Dodatka mora biti istražena preko uzoraka dostavljenih u laboratoriju na pretragu, dok je u odsustvu visoke smrtnosti daleko teže posumnjati ili isključiti prisustvo influence ptica.

2. Kako je brza dijagnoza VPIP ili NPIP prouzrokovane podtipovima H5 i H7 najvažnija u ranoj kontroli i iskorjenjivanju, influenza ptica se uvijek mora uzeti u obzir u diferencijalnoj dijagnozi dišnih problema, problema s proizvodnjom jaja i povećanim uginućem peradi, te se odgovarajući uzorci moraju dostaviti na laboratorijsko pretraživanje.

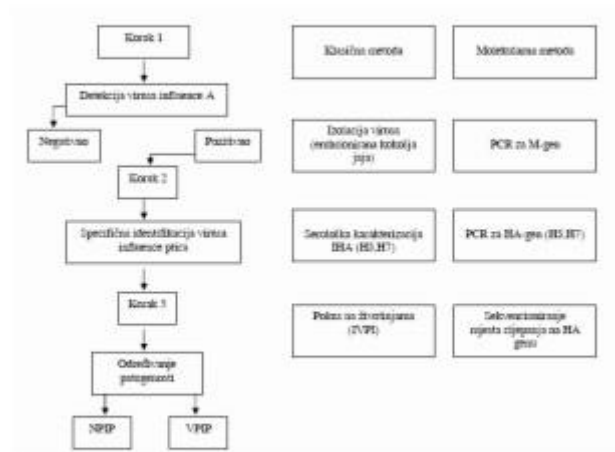
*Šematski prikaz dijagnostičkih postupaka
za potvrdu influence ptica*

POGLAVLJE IV.

Opći postupci za prikupljanje i prijevoz uzoraka

1. Pravilnik o mjerama za suzbijanje i kontrolu influence ptica ("Službeni glasnik BiH", broj 35/10) i ovaj Dijagnostički priručnik

1.1. Kada se odredbe Pravilnika o mjerama za suzbijanje i kontrolu influence ptica ("Službeni glasnik BiH", broj 35/10) (u daljnjem tekstu: Pravilnik) odnose na Dijagnostički priručnik, mora se provesti istraživanje, uzorkovanje i postupci nadziranja u skladu sa ovim Poglavljem.



2. Postupci koji se moraju provoditi u slučaju sumnje na izbijanje influence ptica

2.1. Kad nadležni veterinarski inspektor, na osnovu kliničkih znakova, postavi sumnju na izbijanje influence ptica ili kada rezultat bilo kojeg laboratorijskog testa za influencu ptica nije negativan, Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH mora osigurati da se provede pretraživanje u skladu sa ovim Poglavljem i članom 7. Pravilnika, s tim da istraživanje mora biti provedeno u cijelosti, prije nego što se isključi prisustvo bolesti.

3. Interpretacija virusološkog testiranja

3.1. Ured, uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH, može utvrditi da se prisustvo virusa influence ptica može isključiti kada je u skladu sa ovim Poglavljem dostavljen odgovarajući broj bolesnih ili uginulih ptica i briseva dušnika/ždrijela ili kloake, za otkrivanje virusa influence ptica ili njegovog genoma i kada su dobijeni negativni rezultati korištenjem jedne od specificiranih metoda za dokaz virusa u skladu sa Poglavljem V. ili VI. ovog Priloga ili odobrene od Ureda u skladu s Poglavljem I. tačkom 6. podtačkom (b) ovog Priloga.

4. Standardni set uzoraka za virusološko i serološko pretraživanje

4.1. Prilikom istraživanja farme sumnjive na prisustvo virusa influence ptica, standardni set uzoraka za virusološko i serološko pretraživanje u skladu s podtačkama (a) i (b) ove tačke (standardni uzorci), mora biti uzet i dostavljen direktno u laboratoriju na virusološko i serološko testiranje.

(a) Standardni set uzoraka za virusološko testiranje je:

- 1) najmanje 5 uginulih/bolesnih ptica, ako ih ima; i/ili
- 2) najmanje 20 brisova dušnika/ždrijela i 20 brisova kloake.

Lešine moraju biti svježe od izrazito bolesnih ili moribundnih ptica koje su usmrćene na human način.

Brisevi moraju biti uzeti od onoliko ptica na način određen alinejama prvom i drugom ove podtačke ili od svih ptica na sumnjivoj farmi ako se na njoj drži manji broj ptica. Uzorci se moraju uzimati od ptica koje pokazuju kliničke znakove bolesti.

Brisevi kloake moraju biti prekriveni fecesom (optimalno 1g). Ako iz bilo kojeg razloga nije prikladno uzeti bris kloake od živih ptica, kao uzorak može poslužiti pažljivo prikupljen svježi feces. Briseve dušnika/ždrijela, najpraktičnije je prikupiti iz usne šupljine.

Čim su poznata svojstva umnožavanja virusa, Ured, ovisno o tome da li se virus bolje umnožava u dišnom li probavnom traktu i uzimajući u obzir pogođenu vrstu, može odlučiti o odabiru ili briseva dušnika/ždrijela ili briseva kloake, što je prikladnije nego uzimanje svih vrsta briseva.

(b) Standardni set uzoraka za serološko testiranje predstavlja najmanje 20 uzoraka krvi.

Uzorci moraju biti uzeti od onoliko ptica kako je određeno ovom podtačkom ili od svih ptica na sumnjivoj farmi ako se na njoj drži manji broj ptica. Uzorci se moraju uzimati od bolesnih ptica ili onih koje su se naizgled oporavile.

Ured može odlučiti da nije potrebno uzeti standardne uzorke u potpunosti, nego se može uzeti samo dio standardnog uzorka.

5. Prijevoz uzoraka

5.1. Posebnu pažnju treba posvetiti pohrani i prijevozu uzoraka u laboratoriji za testiranje.

5.2. Brisevi moraju biti odmah ohlađeni ledom ili ulošcima sa smrznutim gelom i dostavljeni u laboratoriju što je prije moguće. Uzorci ne smiju biti zamrznuti, osim ako je to krajnje neophodno. Ako se ne može garantirati brzi prijevoz u laboratoriju unutar 24 sata, uzorke treba odmah smrznuti, pohraniti i zatim prevesti na suhom ledu.

5.3. Dodatno, ali ne kao zamjena za hlađenje, brisevi moraju biti stavljeni u antibiotski ili specifični transportni medij za virus na 4°C na način da su potpuno uronjeni. U nedostatku takvog medija briseve treba vratiti u epruvetu i suhe dostaviti u laboratoriju za testiranje.

5.4. Pohrana i prijevoz uzoraka mogu biti pod uticajem različitih faktora, zbog toga odabrani način prijevoza mora biti odgovarajući za tu svrhu.

6. Antibiotski medij

6.1. Antibiotski medij na koji se odnosi tačka 5. ovog Poglavlja mora se bazirati na puferiranom fiziološkom rastvoru s pH 7,0 do 7,4 (provjerenom nakon dodatka antibiotika).

6.2. Proteinski medij, kao što je moždano-srčani bujon ili hranilište s triptozom u tris puferu može dodatno zaštititi virus naročito tokom prijevoza. Upotrijebljeni antibiotici i njihove koncentracije mogu varirati kako bi bili prilagođeni lokalnim uslovima u njihovoj dostupnosti.

6.3. Za uzorke fecesa mogu biti potrebne vrlo visoke koncentracije antibiotika, a odgovarajuće koncentracije su: 10000 IJ/ml penicilina, 10 mg/ml streptomcina, 0,25 mg/ml gentamicina i 5000 IJ/ml nistatina. Navedene koncentracije mogu biti smanjene do 5 puta za tkiva i briseve dušnika.

6.4. Ako je potrebno kontrolirati *Chlamydophilu*, treba dodati 0,05 do 0,1 mg/ml oksitetraciklina.

7. Moždano-srčani bujon

7.1. Rastvor se mora pripremiti u vodi i sadržavati 15 vol postotaka praha za moždano-srčani bujon prije sterilizacije (autoklaviranjem pri 121/15 minuta). Nakon sterilizacije, antibiotici moraju biti dodati na slijedeći način: 10000 IJ/ml penicilina G, 20 µg amfotericina B i 10000 µg/ml gentamicina. Mediji moraju biti pohranjeni na 4°C i to najduže 2 mjeseca.

8. Postupci koji se provode u skladu s odgovarajućim odredbama Pravilnika

A. SUMNJA NA IZBIJANJE BOLESTI

8.1. Član 7. stav 1. Pravilnika - Mjere koje se primjenjuju na farmama u slučaju sumnje na influencu ptica

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu na kojoj se sumnja na izbijanje influence ptica, mora narediti provođenje slijedećeg:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ukoliko na imanju takve evidencije postoje. Podaci o dnevnim uginućima, dnevnoj proizvodnji jaja i uzimanju hrane i/ili vode tokom perioda od jedne sedmice prije početka kliničkih znakova influence ptica do dana pregleda farme od strane nadležnog veterinarskog inspektora, moraju biti navedeni u izvještaju nadležnog veterinarskog inspektora;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;
- (c) Standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice, osim ako Ured, uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH, smatra da sumnja na izbijanje influence ptica može biti isključena na osnovu kliničkog pregleda u skladu s podtačkama (a) i (b) ove tačke;
- (d) Neovisno o negativnim rezultatima testiranja standardnih uzoraka i obzirom na lokalne faktore, u svakoj proizvodnoj jedinici mora se provesti klinički pregled peradi prije ukidanja službenog nadziranja.

8.2. Član 10. stav 3. Pravilnika - Dodatne mjere na osnovu epidemiološkog istraživanja

Standardni uzorci moraju se uzeti od usmrćene peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, iz svake proizvodne jedinice.

B. VISOKOPATOGENA INFLUENCA PTICA

8.3. Član 11. stav 4. Pravilnika - Mjere koje se primjenjuju u slučaju peradi izvaljene iz jaja sakupljenih s farme na kojoj je potvrđeno izbijanje influence ptica

Kad nadležni veterinarski inspektor pregleda farme na kojima se nalazi perad koja je izvaljena iz jaja prikupljenih tokom perioda inkubacije, a na farmi na kojoj je VPIP potvrđena, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi. Podaci o dnevnim uginućima i uzimanju hrane i/ili vode tokom perioda od jedne sedmice prije početka kliničkih znakova VPIP do dana pregleda farme od strane nadležnog veterinarskog inspektora, moraju biti navedeni u izvještaju nadležnog veterinarskog inspektora;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici i klinički pregled peradi, a posebno onih koje izgledaju bolesno ili nemaju očekivani prirast;
- (c) standardni uzorci moraju biti uzeti od peradi u starosti od 2 do 3 sedmice;
- (d) Službeno nadziranje farmi može biti ukinuto nakon provedbe kliničkog pregleda peradi starije od 21 dan i negativnih rezultata testiranja standardnih uzoraka.

8.4. Član 13. stav 2. tačka (b) Pravilnika - Odstupanja za određene farme

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu na kojoj su dopuštena odstupanja od člana 11. stav 2. tačke (a) Pravilnika, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ukoliko takve evidencije postoje;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;

(c) Umjesto standardnih uzoraka, 21 dan nakon dana zadnjeg pozitivnog nalaza za VPIP iz svake proizvodne jedinice i u razmacima od 21 dan, moraju se uzeti slijedeći uzorci za laboratorijsko testiranje:

1) uzorci bilo koje uginule peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu nađenih u vrijeme uzorkovanja;

2) kad je moguće, brisevi dušnika/ždrijela i kloake od najmanje 60 komada peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu ili od sve peradi i ptica ako ih je na farmi manje od 60; u slučaju malih, egzotičnih ili onih koje nisu naučene na hvatanje ili ako manipulacija može biti opasna za ljude, moraju biti prikupljeni uzorci svježeg fecesa.

Na osnovu rezultata procjene rizika, Ured, uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH, može odobriti odstupanja od veličine uzorka određenog u alinejama prvoj i drugoj ove podtačke;

(d) Uzorkovanje iz podtačke (c) ove tačke i laboratorijsko testiranje navedenih uzoraka mora se nastaviti dok dva uzastopna laboratorijska testiranja provedena u razmaku od 21 dan, nisu dala negativne rezultate.

8.5. Član 15. stav 1. i 3. Pravilnika - Mjere koje se provode na kontaktnim farmama

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava kontaktnu farmu, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

(a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ukoliko takve evidencije postoje. Podaci o dnevnim uginućima i uzimanju hrane i/ili vode tokom perioda od jedne sedmice prije kontakta sa jatom koje je sumnjivo da je zaraženo virusom influence ptica do dana pregleda farme od strane nadležnog veterinarskog inspektora, moraju biti navedeni u izvještaju nadležnog veterinarskog inspektora o provedenoj kontroli na farmi;

(b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;

(c) Ako postoje klinički znaci ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu ili indikacije o povećanom dnevnom uginuću (> 3 puta od uobičajenog dnevnog uginuća u jatu) ili pad u dnevnoj proizvodnji jaja (> 5%) ili smanjeni dnevni unos hrane i/ili vode (> 5%), standardni uzorci se moraju odmah uzeti iz svake proizvodne jedinice;

(d) Ako nisu prisutni znakovi koji se navode u podtačkama (b) i (c) ove tačke, standardni uzorci se moraju uzeti 21 dan nakon datuma zadnjeg sumnjivog kontakta s inficiranom farmom ili kada su perad ili druge ptice koje se drže u zatočeništvu usmrćene.

8.6. Član 18. tačke (b) i (c) Pravilnika - Popis peradi i kontrola od strane nadležnog veterinarskog inspektora i nadziranje na farmama u zaraženoj zoni

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava komercijalnu farmu, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

(a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi. Ako postoje indikacije o povećanom dnevnom uginuću (> 3 puta od uobičajenog dnevnog uginuća u jatu) ili pad u dnevnoj proizvodnji jaja (> 5%) ili smanjeni dnevni unos hrane i/ili vode (> 5%), standardni uzorci se moraju uzeti iz svake proizvodne jedinice;

(b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;

(c) Gdje su vrste peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu kod kojih se ne očekuju jasni klinički znakovi bolesti ili u slučaju vakciniranih ptica, Ured u saradnji s nadležnim organima može odlučiti na osnovu rezultata procjene rizika da standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice;

(d) Na osnovu rezultata procjene rizika, Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH može odlučiti o dodatnom službenom nadziranju koje uključuje klinički pregled

i uzorkovanje za laboratorijsko testiranje, na ciljanim farmama, kompartmentima ili vrstama proizvodnje.

8.7. Član 19. tačka (f) Pravilnika - Mjere koje se provode na farmama u zaraženom području
Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu na kojoj je došlo do povećanog obolijevanja, uginuća ili su utvrđene promjene u podacima o proizvodnji, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

(a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi. Ako postoje indikacije o povećanom dnevnom uginuću (> 3 puta od uobičajenog dnevnog uginuća u jatu) ili pad u dnevnoj proizvodnji jaja (> 5%) ili smanjeni dnevni unos hrane i/ili vode (> 5%), standardni uzorci se moraju uzeti iz svake proizvodne jedinice;

(b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno.

8.8. Član 23. tačka (b) Pravilnika - Odstupanje kod direktnog prijevoza peradi na neodložno klanje

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu kojoj je odobreno odstupanje u skladu s članom 22. Pravilnika, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

(a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;

(b) Klinički pregled, unutar 24 sata prije prijevoza peradi, u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;

(c) Na osnovu rezultata procjene rizika od strane Ureda uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH, umjesto standardnih uzoraka, mora se unutar 48 sati prije prijevoza peradi, uzeti najmanje 60 briseva dušnika/ždrijela i/ili 60 briseva kloake iz svake proizvodne jedinice iz koje se perad šalje na klanje.

8.9. Član 25. tačka (b) Pravilnika - Odstupanje kod direktnog prijevoza pilenki pred pronesak
Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu kojoj je odobreno odstupanje u skladu sa članom 22. Pravilnika, prije direktnog prijevoza, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

(a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;

(b) Klinički pregled, unutar 24 sata prije prijevoza peradi, u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;

(c) Na osnovu rezultata procjene rizika od strane Ureda uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH, umjesto standardnih uzoraka, mora se unutar 48 sati prije premještanja peradi, uzeti najmanje 60 briseva dušnika/ždrijela i/ili 60 briseva kloake iz svake proizvodne jedinice iz koje se perad šalje na klanje.

8.10. Član 26. stav 1. tačka (a) Pravilnika - Odstupanje kod direktnog prijevoza rasplodnih i konzumnih jaja

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu s rasplodnim jatom kojoj je odobreno odstupanje u skladu s članom 22. Pravilnika, prije direktnog prijevoza rasplodnih jaja, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

(a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;

(b) Klinički pregled, u svakoj proizvodnoj jedinici svakih 15 dana;

(c) Standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice.

8.11. Član 29. stav 1. Pravilnika - Trajanje mjera

Mjere koje se provode u zaraženoj zoni u skladu s Poglavljem IV. Dijelom 3. Pravilnika ne smiju se ukinuti prije isteka 21 dana od dana preliminarnog čišćenja i dezinfekcije zaraženih farmi, uz uslov da su:

- (a) Sve komercijalne farme koje se nalaze u zaraženoj zoni pregledane od strane nadležnog veterinarskog inspektora i sve kontrole, klinički pregledi i laboratorijski testovi u skladu s tačkom 8.6. podtačkama (a), (b) i (c) i tačkom 8.7. ovog Poglavlja, dali negativan rezultat;
- (b) Sve nekomercijalne farme u zaraženoj zoni pregledane od strane nadležnog veterinarskog inspektora, a provedena klinička i laboratorijska pretraživanja nisu upućivala na sumnju na zarazu virusom influence ptica;
- (c) Rezultati dodatnog službenog nadziranja, provedenog u skladu s tačkom 8.6. podtačkom (d) ovog Poglavlja, negativni.

8.12. Član 30. tačka (g) Pravilnika - Mjere koje se primjenjuju na ugroženom području

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu na kojoj je došlo do povećanog morbiditeta, uginuća ili su utvrđene promjene u podacima o proizvodnji, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;
- (c) Standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice.

8.13. Član 36. Pravilnika - Istraživanje u slučaju sumnje na prisustvo VPIP u klaonicama i u prijevoznim sredstvima

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu s koje potiču ptice u klaonici ili u prijevoznom sredstvu, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ukoliko takve evidencije postoje;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, uzimajući u obzir informacije od nadležnog veterinarskog inspektora na klaonici koji mu mora dati podatke o prethodnim kontrolama i rezultatima ante i post mortem pretraga;
- (c) Standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice, osim ako Ured u saradnji sa nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta BiH smatra da sumnja na izbijanje VPIP može biti isključena na osnovu veterinarskog pregleda u skladu s podtačkama (a) i (b) ove tačke;
- (d) Osim standardnih uzoraka, dodatno se moraju uzeti uzorci od najmanje 5 bolesnih, uginulih ili u klaonici zaklanih ptica s patološkim promjenama i dostaviti na laboratorijsko testiranje.

8.14. Član 37. stav 1. Pravilnika - Mjere koje se provode na klaonici

Nakon provođenja istraživanja navedenog u tački 8.13. ovog Poglavlja i uz uslov da su rezultati laboratorijskih testova negativni i da nema kliničke sumnje na prisustvo VPIP na farmi porijekla i na klaonici, službeni nadzor može se ukinuti.

8.15. Član 38. stav 1. i 2. Pravilnika - Mjere koje se provode na graničnim veterinarskim prijelazima ili prijevoznim sredstvima

8.15.1. Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava perad ili druge ptice koje se drže u zatočeništvu, a koje su premještene s graničnog veterinarskog prijelaza ili prijevoznog sredstva zbog sumnje ili potvrde VPIP i drže se u izolaciji, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu svih relevantnih dokumenata i evidencije, ako takvi postoje;
- (b) Klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a nalaze se u izolaciji kao i klinički pregled ostale peradi i drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a nalazi se u izolaciji, posebno onih koji izgledaju bolesno;
- (c) Standardni uzorci moraju biti uzeti od peradi i ostalih ptica koje se drže u zatočeništvu, iz različitih transportnih kutija i kafeza.

8.15.2. Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu porijekla u slučaju kada je perad i ostale ptice koje se drže u zatočeništvu zaklana, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ukoliko takve evidencije postoje;

- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, uzimajući u obzir informacije od nadležnog veterinarskog inspektora na klaonici koji mu mora dati podatke o prethodnim kontrolama i rezultatima ante i post mortem pretraga;
- (c) Standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice, osim ako Ured uz saglasnost s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta BiH smatra da sumnja na izbijanje VPIP može biti isključena na osnovu veterinarskog pregleda u skladu s podtačkama (a) i (b) ove tačke;
- (d) Osim standardnih uzoraka navedenih u podtački (c) ove tačke, dodatno se moraju uzeti uzorci od najmanje 5 bolesnih, uginulih ili u klaonici zaklanih ptica s patološkim promjenama i dostaviti na laboratorijsko testiranje;
- (e) Ukoliko su rezultati laboratorijskog testiranja uzoraka navedenih u podtačkama (c) i (d) ove tačke negativni i ukoliko nema kliničke sumnje na VPIP na farmi porijekla i u klaonici, službeni se nadzor može ukinuti.

C. NISKO PATOGENA INFLUENCA PTICA (NPIP)

8.16. Član 40. stav 6. tačke (b) i (h) Pravilnika - Mjere koje se provode na farmama gdje je potvrđeno izbijanje NPIP

Kada nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu prije prijevoza peradi na klaonicu ili farmu na kojoj se nalazi perad koja je izvaljena iz jaja prikupljenih tokom perioda inkubacije, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu;
- (c) Standardni uzorci moraju biti uzeti od ptica iz svake proizvodne jedinice iz koje se šalju na klanje unutar 48 sati prije slanja peradi u klaonicu;
- (d) Standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice od peradi koja je izvaljena iz jaja prikupljenih tokom perioda inkubacije.

8.17. Član 41. stav 2. tačka (b) Pravilnika - Odstupanje za određene farme od mjera koje se provode kad je izbijanje NPIP potvrđeno

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu na kojoj je dopušteno odstupanje od člana 40. stava 2. i stava 5. tačke (b) Pravilnika, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ukoliko takve evidencije postoje;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, u pravilnim intervalima, uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;
- (c) Umjesto standardnih uzoraka, 21 dan nakon dana zadnjeg pozitivnog nalaza za NPIP iz svake proizvodne jedinice i u razmacima od 21 dan, moraju se uzeti slijedeći uzorci za laboratorijsko testiranje:

1) uzorci bilo koje uginule peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu nađenih u vrijeme uzorkovanja;

2) kad je moguće, brisovi dušnika/ždrijela i kloake od najmanje 60 komada peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu ili od sve peradi i ptica ako ih je na farmi manje od 60; u slučaju malih, egzotičnih ili onih koje nisu naučene na hvatanje ili ako manipulacija može biti opasna za ljude, moraju biti prikupljeni uzorci svježeg fecesa.

Na osnovu rezultata procjene rizika, Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH može odobriti odstupanje od veličine uzorka određenog u alinejama prvoj i drugoj ove podtačke;

(d) uzorkovanje iz podtačke (c) ove tačke i laboratorijsko testiranje navedenih uzoraka mora se nastaviti dok dva uzastopna laboratorijska testiranja provedena u razmaku od 21 dan nisu dala negativne rezultate.

8.18. Član 43. stav 1. i 3. Pravilnika - Mjere koje se primjenjuju na kontaktnim farmama

Kada nadležni veterinarski inspektor pregledava kontaktnu farmu, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ukoliko takve evidencije postoje;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;
- (c) Standardni uzorci moraju biti uzeti iz svake proizvodne jedinice ili kada je perad ili druge ptice koje se drže u zatočeništvu, usmrćena.

8.19. Član 45. stav 1. tačka (b) Pravilnika - Mjere koje se primjenjuju u zonama pod ograničenjem

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu u zoni pod ograničenjem, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;
- (b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;
- (c) Standardni uzorci moraju se uzeti u svakoj proizvodnoj jedinici;
- (d) Na osnovu rezultata procjene rizika, Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH može odlučiti o dodatnom službenom nadziranju koje uključuje klinički pregled i uzorkovanje za laboratorijsko testiranje, na ciljanim farmama, kompartmentima ili vrstama proizvodnje.

8.20. Član 46. tačke (a) i (b) Pravilnika - Trajanje mjera

Mjere koje se provode u zoni pod ograničenjem u skladu s Poglavljem V. Dijelom 3. Pravilnika ne smiju se ukinuti prije isteka 21 dana od dana preliminarnog čišćenja i dezinfekcije zaraženih farmi, nakon provedenog usmrćivanja peradi na farmi ili ne ranije od 42 dana nakon datuma potvrđivanja NPIP, uz uslov da:

- (a) su sve komercijalne farme koje se nalaze u zoni pod ograničenjem pregledane od strane nadležnog veterinarskog inspektora i da su sva laboratorijska testiranja uzoraka u skladu s tačkom 8.13. podtačkama (c) i (d) ovog Poglavlja, provedena i dostupna;
- (b) su dostupni rezultati svih dodatnih kliničkih pretraga i laboratorijskog testiranja koji mogu uključiti nekomercijalne farme, radi određivanja rizika od širenja NPIP;
- (c) Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH, na osnovu rezultata procjene rizika i uzimajući u obzir epidemiološku situaciju i rezultate laboratorijskih testiranja određenih u podtačkama (a) i (b) ove tačke, da je rizik od širenja NPIP zanemariv. Na osnovu te procjene može se zaključiti da u slučaju pozitivnog serološkog i negativnog virološkog rezultata, ograničenja mogu biti ukinuta.

D. MJERE ZA SPRJEČAVANJE ŠIRENJA PTIČIJIH VIRUSA INFLUENCE NA DRUGE VRSTE

8.21. Član 48. st.1. i 6. Pravilnika - Laboratorijski testovi i druge mjere koje se odnose na svinje i druge vrste

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava farmu na kojoj se drže svinje, nakon potvrde influence ptica mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi, ako takva evidencija postoji;

(b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled svinja, a posebno onih koje izgledaju bolesno;

(c) Brisevi nosa/ždrijela od najmanje 60 svinja iz svake proizvodne jedinice ili od svih svinja u proizvodnim jedinicama gdje je manje od 60 svinja, moraju se uzeti prije ili na dan usmrćivanja zaražene peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu. Najmanje 60 uzoraka krvi mora biti uzeto od svinja u periodu od 2 do 4 sedmice nakon usmrćivanja peradi. Uzorci moraju biti prikupljeni na način da se najmanje jedan uzorak dobije od grupe svinja koje su u direktnom kontaktu;

(d) Premještanje svinja na druge farme može se odobriti ako je najmanje 60 briseva nosa/ždrijela i 60 uzoraka krvi svinja, iz svake proizvodne jedinice, 14 dana nakon datuma pozitivnog nalaza na influencu ptica, dalo negativan rezultat.

Premještanje svinja na klaonicu može se odobriti ako je najmanje 60 briseva nosa/ždrijela, iz svake proizvodne jedinice, 14 dana nakon datuma pozitivnog nalaza na influencu ptica, dalo negativan rezultat.

U slučaju sumnjivog ili pozitivnog laboratorijskog nalaza, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se isključilo zaražavanje ili prijenos influence ptica među svinjama;

(e) Uzeti uzorci za laboratorijsko testiranje moraju biti uzeti kada nadležni veterinarski inspektor posumnja da su drugi domaći sisari na farmi, naročito oni u kojih je utvrđena osjetljivost na viruse influence ptica, podtipova H5 i H7, mogli biti u kontaktu sa zaraženom peradi ili drugim pticama koje se drže u zatočeništvu.

E. PONOVRNO NASELJAVANJE

8.22. Član 51. stav 3. tačke (b) i (c) Pravilnika - Ponovno naseljavanje gazdinstava

Kad nadležni veterinarski inspektor pregledava komercijalnu farmu na kojoj je perad ponovno naseljena, mora narediti provođenje slijedećih mjera:

(a) Kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;

(b) Klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, a posebno onih koje izgledaju bolesno;

(c) Umjesto standardnih uzoraka, iz svake proizvodne jedinice moraju biti uzeti slijedeći uzorci:

1) najmanje 20 uzoraka krvi odmah po useljavanju peradi, osim u slučaju jednodnevne peradi; ukoliko je potrebno, takvo se uzorkovanje može provesti na farmi porijekla peradi prije premještanja na farmu na kojoj se perad useljava;

2) uzorci uginule peradi ili brisevi uzeti s lešina najviše 10 uginulih ptica sedmično, u periodu od 21 dan od datuma ponovnog useljavanja;

(d) Ukoliko je farma prethodno bila zaraženo VPIP, 20 briseva dušnika/ždrijela i 20 briseva kloake, također moraju biti uzeti od vodene peradi (patke/guske) iz svake proizvodne jedinice, ukoliko je odgovarajuće, tokom treće sedmice nakon ponovnog useljavanja;

(e) Ukoliko je farma prethodno bila zaraženo NPIP, 20 briseva dušnika/ždrijela i 20 briseva kloake i 20 uzoraka krvi mora biti uzeto iz svake proizvodne jedinice.

F. VAKCINACIJA

8.23. Član 58. stav 2. tačka (i) Pravilnika - Preventivna vakcinacija peradi ili drugih ptica koja se drže u zatočeništvu

Laboratorijski testovi u skladu sa Poglavljem IX. Pravilnika, moraju se provesti na vakciniranoj peradi ili drugim pticama koje se drže u zatočeništvu koristeći odobrene DIVA testove, kada je poznat divlji virus.

Kada se koriste sentinel ptice, iste moraju biti prisutne u svakom vakciniranom jatuu, klinički pregledane i testirane korištenjem inhibicije hemaglutinacije (IHA). U tu svrhu 20 uzoraka krvi od nevakciniranih sentinel ptica mora biti uzeto najmanje svakih 60 dana iz svake vakcinirane farne.

8.24. Prilog IX. Pravilnika - Zahtjevi za premještanje peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu i proizvoda od peradi, koji se primjenjuju u odnosu na hitnu vakcinaciju
Stroge mjere praćenja moraju se primijeniti u odnosu na premještanje žive peradi i drugih ptica koje se drže u zatočeništvu i njihovih jaja u svrhu smanjenja rizika od daljeg širenja influence ptica.

U tu svrhu, na početku kampanje hitne vakcinacije iste mjere praćenja moraju se primijeniti u odnosu na premještanje žive peradi i drugih ptica koje se drže u zatočeništvu i njihovih jaja, kako bi se smanjio rizik od daljnjeg širenja influence ptica unutar i izvan područja vakcinacije.

8.24.1. Prije prvog premještanja jaja za valenje i konzumnih jaja unutar i izvan područja vakcinacije, i nakon toga najmanje svakih 30 dana, nadležni veterinarski inspektor mora provesti slijedeće mjere:

- a) klinički pregled nevakcinirane rasplodne ili konzumne peradi iz svake proizvodne jedinice, uključujući procjenu historije bolesti i kliničke preglede peradi, a posebno one koja izgleda bolesno, standardni uzorci moraju biti uzeti od peradi iz svake proizvodne jedinice; ili
- b) klinički pregled vakcinirane rasplodne ili konzumne peradi iz svake proizvodne jedinice, uključujući procjenu historije bolesti i kliničke preglede sentinel ptica prisutnih u tom jatuu, s tim da standardni uzorci moraju biti uzeti od tih sentinel ptica.

8.24.2. Za premještanje žive vakcinirane peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, na druge farne ili radi premještanja žive vakcinirane peradi unutar i izvan područja vakcinacije, nadležni veterinarski inspektor mora narediti provođenje slijedećih mjera:

- (a) kontrolu evidencije o proizvodnji i zdravlju na farmi;
- (b) klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici uključujući procjenu historije bolesti i klinički pregled peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu, unutar 72 sata prije otpreme, s naročitom pažnjom na sentinel ptice;
- (c) kada rezultati kontrola, kliničkih pregleda i pretraživanja iz podtački (a) i (b) ove tačke nisu zadovoljavajući, standardni uzorci moraju biti uzeti od sentinel ptica, a u slučaju kad su rezultati zadovoljavajući, slijedeći uzorci moraju biti uzeti od:
 - 1) vakcinirane peradi ili drugih ptica koje se drže u zatočeništvu: najmanje 20 briseva dušnika/ždrijela, 20 briseva kloake i 20 uzoraka krvi za korištenje odgovarajućeg DIVA testa, unutar 72 sata prije vremena otpreme; i
 - 2) sentinel ptica: 20 briseva dušnika/ždrijela, 20 briseva kloake i 20 uzoraka krvi za serološko testiranje koristeći IHA test prije otpreme.

POGLAVLJE V.

Dijagnostički virusološki testovi i procjena rezultata

1. Do razvoja molekularnih testova, izdvajanje virusa inokulacijom u embrioniranim kokošijim jajima smatrano je najosjetljivijim dijagnostičkim testom za influencu ptica i važnim za kasniju identifikaciju i karakterizaciju virusa. Najvažniji koraci navedeni su u ovom Poglavlju.

2. Obrada uzoraka

2.1. Ako su dostavljeni brisevi suhi treba ih staviti u dovoljnu količinu rastvora antibiotika, kako bi se osiguralo potpuno uranjanje. Uzorci mogu biti pulirani u grupe od po pet, uz uslov da su uzeti od iste vrste, a u isto vrijeme i iz iste epidemiološke jedinice.

2.2. Lešine dostavljene u laboratoriju moraju biti pretražene post-mortem i moraju biti uzeti uzorci slijedećih organa: feces, crijevni sadržaj, mozak, dušnik, pluća, jetra, slezena i ostali

vidno promijenjeni organi. Ovi organi i tkiva mogu biti pulirani, ali je neophodna odvojena obrada fecesa.

2.3. Uzorci fecesa i organa moraju biti homogenizirani (u zatvorenom homogenizatoru ili upotrebom tarionika, tučka i sterilnog pijeska) u rastvoru antibiotika tako da se dobije 10 do 20 volumnih postotaka suspenzije u rastvoru antibiotika.

2.4. Uronjeni brisevi i suspenzije moraju biti ostavljeni tokom približno 2 sata na sobnoj temperaturi (ili kroz duži period na 4°C) i zatim pročišćeni i centrifugirani (npr. 800 do 1000 x g. tokom 10 minuta).

3. Izolacija virusa u embrioniranim kokošjim jajima

3.1. Pročišćeni supernatant mora biti inokuliran u količini od 0,1 do 0,2 ml u alantoisnu šupljinu svakog od najmanje 4 embrionirana kokošja jaja, koja su do inokulacije inkubirana 9 do 11 dana. Najbolje da su jaja dobijena iz jata slobodnog od specifičnih patogena (SPF), ali kada to nije praktično mogu se koristiti jaja dobijena iz jata slobodnog od antitijela za virus influence ptica (SAN).

3.2. Inokulirana jaja moraju biti inkubirana na 37°C i svakodnevno prosvjetljavana. Jaja sa uginulim ili ugibajućim embrijima i sva preostala jaja, 6 dana nakon inokulacije, moraju biti ohlađena na 4°C i alantoamnijska tekućina mora biti testirana na hemaglutinacijsku aktivnost. Ukoliko nema hemaglutinacije, ovaj postupak treba ponoviti s nerazrijeđenom alantoamnijskom tekućinom. Ako se hemaglutinacija detektira, bakteriološkom pretragom se mora isključiti prisustvo bakterija. Ako su bakterije prisutne tekućinu se može profiltrirati kroz membranski filter s porama od 450 nm, uz dodavanje antibiotika u tekućinu i inokuliranje u embrionirana jaja, kako je gore navedeno.

3.3. Kako bi se ubrzala dijagnoza, neke laboratorije koriste dvije trodnevne pasaže ili dvodnevnu i četverodnevnu pasažu, a objavljeni su i uporedivi rezultati s dvije šesto-dnevne pasaže, ali ovo još nije u potpunosti evaluirano.

3.4. Pozitivne tekućine moraju biti testirane na odsutnost bakterija. Ako su bakterije prisutne, tekućina se može profiltrirati kroz membranski filter s porama od 450 nm, kako bi se uklonile bakterije i ponovo pasirati u jajima nakon dodatka više antibiotika.

4. Diferencijalna dijagnoza

(a) Preliminarno razlikovanje

Kako je važno da mjere kontrole koje su usmjerene na ograničavanje širenja virusa influence ptica budu implementirane što je prije moguće, svaka ovlaštena laboratorija koja je izolirala hemaglutinirajući virus mora utvrditi da li se radi o virusu influence A, podtipa H5 ili H7 ili virusu njukastlske bolesti. Hemaglutinirajuće tekućine moraju biti podvrgnute testu inhibicije hemaglutinacije u skladu s Poglavljem VIII. ovog Dijagnostičkog priručnika. Inhibicija hemaglutinacije kao u titru unutar 2 do 3 log₂, s poliklonskim antiserumima specifičnim za H5 ili H7 podtipove influence A, može poslužiti kao preliminarna identifikacija na osnovu koje se mogu uvesti privremene mjere kontrole.

(b) Potvrдна identifikacija

Budući da postoji 16 podtipova hemaglutinina i 9 podtipova neuraminidaze virusa influence i varijacije unutar svakog od njih, nije praktično ni ekonomično da svaka referentna laboratorija posjeduje antiserume koji omogućavaju potpunu identifikaciju podtipova za izolate influence. Međutim svaka referentna laboratorija najmanje mora:

- 1) potvrditi da je izolat virus influence A upotrebom imunodifuzijskog testa, za identifikaciju grupno-specifičnog antigena;
- 2) determinirati da li je izolat podtipa H5 ili H7, a pozitivna identifikacija zahtijeva provedbu mjera kontrole za NPIP podtipova H5 i H7;
- 3) odmah poslati sve izolate VPIP i sve H5 i H7 izolate u Referentnu laboratoriju OIE-a / Evropske zajednice na potvrdu i punu karakterizaciju, osim ako je odobreno odstupanje u skladu s podtačkom (d) ove tačke.

U laboratorijama s odgovarajućim uslovima, također je poželjno provesti intravenski patogeni indeks patogenosti kod šest sedmica starih pilića u skladu sa Poglavljem VII. ovog Dodatka. Intravenski indeksi patogenosti koji su veći od 1,2 ukazuju na prisustvo virusa koji zahtjeva potpunu provedbu mjera kontrole za VPIP.

Referentna laboratorija također mora razmotriti uvođenje ekspertize i opreme koja omogućava određivanje slijeda nukleotida u genu hemaglutinina kako bi se odredilo da li su prisutne višestruko-zastupljene bazične aminokiseline na mjestu cijepanja hemaglutininskog prekursora za sve NPIP podtipova H5 ili H7.

Referentna laboratorija OIE-a / Evropske zajednice vrši prijem svih hemaglutinirajućih virusa iz referentnih laboratorija za daljnja antigenska i genska istraživanja, kako bi se omogućilo bolje razumijevanje epidemiologije bolesti.

Uz navedene poslove i obaveze, referentna laboratorija OIE-a / Evropske zajednice, provodi potpuno antigensko tipiziranje svih zaprimljenih virusa. Za viruse podtipova H5 i H7 koji nemaju intravenske indekse patogenosti veće od 1,2, treba odmah biti provedeno određivanje slijeda nukleotida u genu hemaglutinina, kako bi se utvrdilo da li su na mjestu cijepanja prekursora hemaglutininskog proteina prisutne višestruko zastupljene bazične aminokiseline, a referentna laboratorija i nadležni organ u zemlji porijekla uzorka mora o istome biti obaviješten čim su rezultati testiranja dostupni, tako da mjere kontrole za VPIP mogu u potpunosti biti primijenjene.

Uzimajući u obzir promjenu epidemiološke situacije u odnosu na VPIP/NPIP i uz dogovor s referentnom laboratorijom OIE-a / Evropske zajednice, odstupanje može biti dopušteno laboratorijama s potpunim kapacitetom za brzu karakterizaciju virusa da pošalju manji broj tih virusa nakon pregleda podataka i da za referentnu laboratoriju OIE-a / Evropske zajednice napravi odgovarajući odabir izolata. Ovo odstupanje može biti dozvoljeno samo kada podaci mogu biti brzo obrađeni od strane referentne laboratorije zemlje porijekla i dostavljeni referentnoj laboratoriji OIE-a / Evropske zajednice.

POGLAVLJE VI.

Molekularni testovi i procjena rezultata

1. Pojam VPIP omogućava molekularnu identifikaciju faktora virulencije i potvrđuje upotrebu molekularnih tehnika u dijagnosticanju influence ptica. U novije vrijeme došlo je do razvoja u području njihove primjene za otkrivanje i karakterizaciju virusa influence ptica direktno iz kliničkih uzoraka zaraženih ptica. Konvencionalne tehnike RT-PCR primijenjene na kliničkim uzorcima, s dobro definiranim početnicama (primers), mogu omogućiti brzo otkrivanje i identifikaciju podtipa (barem H5 i H7), a produkt PCR amplifikacije se može upotrijebiti za određivanje slijeda nukleotida, jer je dokazana njegova važna primjena u brzom otkrivanju novih izbijanja bolesti, nakon što su primarno zaraženi objekti otkriveni, a virus karakteriziran. RT-PCR "u stvarnom vremenu" (Real Time RT PCR - rRT-PCR), korištenjem početnica i fluorescentnih proba omogućavaju još bržu i osjetljiviju dijagnozu detekcijom virusa influence ptica i određivanjem podtipova H5 ili H7 u kliničkim uzorcima.

2. Važan problem vezani za sisteme RT-PCR i rRT-PCR je da su do danas različite laboratorije razvile različite sisteme koji, iako zakoniti, nisu bili validirani, a ni testirani na većem broju uzoraka u različitim laboratorijama. Referentna laboratorija OIE-a / Evropske zajednice i određene referentne laboratorije zemalja porijekla bavili su se ovim problemom u okviru projekta ŠEU AVIFLUJ koji je finansirala Evropska unija, kako bi proizveli ratificirane protokole za konvencionalne RT-PCR i rRT-PCR, koje bi mogli prihvatiti druge nacionalne referentne laboratorije. Ako se testni parametri, kao što su trajanje pojedinih ciklusa i vrijeme prijelaza među ciklusima (ramp time) razlikuju od preporučenih u specificiranim protokolima,

prije primjene se mora dokazati njihova prikladnost za tu namjenu u skladu sa Poglavljem I. tačkom 6. ovog Dijagnostičkog priručnika.

3. Standardni protokoli za ove molekularne testove i njihovu validaciju kako ih primjenjuje referentna laboratorija OIE-a / Evropske zajednice, mogu se naći na slijedećoj web stranici: <http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

POGLAVLJE VII.

Testovi patogenosti in vivo i procjena rezultata

Virulencija za piliće, virusa influence A izoliranih iz ptica, mora biti procijenjena testom za određivanje indeksa intravenske patogenosti (IVPI), koji treba provesti na slijedeći način:

(a) Svježa infektivna alantoisna tečnost sa HA titrom $> 1/16$ (> 24 ili $> \log 24$, kad je izražen kao recipročna vrijednost) iz najniže raspoložive pasaže, po mogućnosti iz prve izolacije bez ikakve selekcije, razrjeđuje se na $1/10$ u sterilnom izotoničnom fiziološkom rastvoru;

(b) 0,1 ml razrijeđenog virusa intravenozno se inokulira u svaki od deset SPF ili SAN pilića starih šest sedmica;

(c) Ptice se pregledavaju tokom 10 dana, svaka 24 sata. Pri svakom se pregledu ptica ocjenjuje sa 0 ako je njeno stanje normalno, sa 1 ako je bolesna, sa 2 ako je jako bolesna i sa 3 ako je mrtva. Ocjenjivanje ptice kao bolesne ili jako bolesne subjektivna je klinička procjena.

Uobičajeno, "bolesne" ptice pokazuju jedan od slijedećih znakova, a "jako bolesne" više slijedećih znakova: poteškoće s disanjem, iscrpljenost, proljev, cijanozu izložene kože ili podbradka, edem prednjega dijela glave i/ili glave, živčane poremećaje. Uginule ptice moraju biti ocijenjene sa 3 u svakom slijedećem dnevnom pregledu, nakon što su uginule.

Zbog dobrobiti životinja, kada su ptice toliko bolesne da ne mogu jesti i piti, moraju se usmrtniti na humani način i moraju se upisati kao uginule kod slijedećeg posmatranja, jer će ionako uginuti unutar 24 sata. Ovaj je pristup prihvatljiv i za akreditacijske organe;

(d) IVPI srednji je rezultat po ptici za posmatranje tokom 10 dana. Indeks 3,00 znači da su sve ptice uginule unutar 24 sata, indeks 0,00 znači da nijedna ptica nije pokazala nijedan klinički znak tokom 10-dnevnog posmatranja.

Jednostavna metoda za bilježenje rezultata i izračun indeksa patogenosti, prikazani su u sljedećem primjeru:

Bilješke:

10 ptica posmatranih tokom 10 dana = 100 posmatranja

Indeks = srednji rezultat po ptici, po posmatranju = $246/100 = 2,46$

Svaki virus influence A, koji je bez obzira na podtip u testu IVPI pokazao vrijednost veću od 1,2 smatra se virusom VPIP.

POGLAVLJE VIII.

Serološki testovi i procjena rezultata

Preporučena metoda kojom se potvrđuje prisustvo virusa influence A je dokaz antigena nukleoproteina ili matriksa koji su zajednički svim virusima influence A.

Navedeno je moguće napraviti imunodifuzijskim testom, koji uključuje preparate koncentriranih virusa ili ekstrakte iz zaraženih korioalantoisnih membrana.

Preporučene metode koje se koriste za serološke testove za otkrivanje antitijela za virus influence ptica su test hemaglutinacije (HA) i test inhibicije hemaglutinacije (HI).

Poglavlje 2.7.12. Priručnika o dijagnostičkim testovima i cjepivima za kopnene životinje Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE), sadržava detaljne informacije o laboratorijskim tehnikama i procjeni rezultata.

Standardni protokoli za serološke testove i procjenu njihovih rezultata koje primjenjuje referentni laboratorij OIE-a / Evropske zajednice, mogu se naći na slijedećoj web stranici: <http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

POGLAVLJE IX.

Sistemi praćenja povezani sa vakcinacijom

1. Pravilnik i Dijagnostički priručnik

1.1. Poglavlje IX. Dijelovi 2. i 3. Pravilnika, propisuju upotrebu hitne i preventivne vakcinacije pod određenim uslovima. Jedan od tih uslova je da se primjenjuje strategija "DIVA" (*engl. Differentiating Infected from Vaccinated Animals* - Strategija razlikovanja zaraženih od vakciniranih životinja).

1.2. Vakcinacija mora biti namijenjena sprječavaju zaraze i daljeg širenja virusa među jatima. Postoji neosporan dokaz da vakcinacija povećava količinu virusa potrebnog za zaražavanje ptica i smanjuje količinu izlučenog virusa. Međutim, ptice nakon vakcinacije mogu biti zaražene, neće razviti kliničke znakove, ali će izlučivati virus. Zato podtipovi virusa VPIP H5 i H7 neko vrijeme mogu neopaženo kružiti unutar jata sa suboptimalnim nivoom otpornosti, na isti način na koji kruže virusi NPIP unutar nevakciniranog jata. Zato je neophodno da se prepoznaju virus-pozitivna vakcinirana jata, koja su se zarazila divljim virusom, kako bi se mogle provesti druge mjere kontrole, kao što je usmrćivanje (*engl. stamping-out*).

2. Korištenje "sentinel" ptica za praćenje zaraze

2.1. Na nivou jata, najjednostavnije je redovno praćenje tzv. sentinel ptica koje nisu bile vakcinirane, a koje se nalaze u vakciniranom jatu, međutim taj pristup uzrokuje poteškoće povezane s upravljanjem, posebno u odnosu na identifikaciju sentinel ptica, a naročito u velikim jatima. Pri primjeni te metode mora se osigurati dodir između sentinel ptica i vakciniranih ptica.

3. Laboratorijski test DIVA za praćenje zaraze

3.1. Kao druga mogućnost ili dopuna na vakciniranim pticama se može provoditi testiranje na izloženost divljem virusu upotrebom laboratorijskih testova DIVA. Zadnjih godina razvijeno je više testnih sistema koji omogućavaju otkrivanje izloženosti vakciniranih ptica divljem virusu. Metoda koja se dokazala efikasnom je upotreba vakcina koje sadrže virus istog podtipa hemaglutinina (H), ali različitu neuraminidazu (N) od prevladavajućega divljeg virusa. Antitijela na N divljega virusa djeluju kao prirodni markeri zaraze.

3.2. Navedeni sistem se primjenjivao u Italiji 2000. godine, nakon ponovne pojave virusa NPIP podtipa H7N1. Kako bi se dopunile neposredne mjere kontrole, primijenila se DIVA strategija upotrebom vakcine koja je sadržavala podtip H7N3 za borbu protiv terenske zaraze s virusom podtipa H7N1. Vakcinirane ptice koje su bile izložene divljem virusu, diferencirane su serološkim testom za otkrivanje specifičnih anti-N1 antitijela. Ista strategija bila je upotrijebljena za nadzor NPIP koji je u Italiji 2002. i 2003.god. prouzrokovao virus podtipa H7N3 i to vakcinom podtipa H7N1 i serološkim testom za otkrivanje specifičnih anti-N3 antitijela. U oba slučaja, vakcinacija usmrćivanjem, uz pomoć strategije DIVA rezultirala je iskorjenjivanjem divljeg virusa.

3.4. Poteškoće s ovim sistemom nastaju ako se pojavi divlji virus koji sadrži isti antigen N kao postojeći divlji virus, ali koji ima drugi podtip H, a ne H5 ili H7, ili ako podtipovi s istim antigenima N već kruže terenom. Naročito su patke poznate kao kliconoše više od jednog podtipa. Postojala je također potreba da se razvije prikladan test koji bi omogućio rutinsko praćenje jata za antitijela neuraminidaze. U Italiji su razvili i upotrebljavali "ad hoc" serološki test, koji se bazira na indirektnoj imuno-fluorescenciji, upotrebom rekombinantnog bakulovirusa s ekspresijom antigena N proteina. Razvojem ELISA testova u ovu svrhu, serološko razlikovanje će imati širu i jednostavniju primjenu.

3.5. Upotreba vakcina koje sadrže samo HA, kao što su rekombinantne vektorske vakcine, omogućava primjenu klasičnih testova AGID ili testova ELISA, koji se baziraju na

nukleoproteinu, nestrukturinom proteinu ili proteinima matriksa za otkrivanje zaraze kod vakciniranih ptica.

3.6. Za inaktivirane vakcine opisan je test koji otkriva antitijela za nestrukturane virusne proteine, koji nastaju samo za vrijeme prirodne infekcije. Takav sistem treba još validirati na terenu, međutim ima ograničenja, jer pri prirodnoj zarazi jata bilo kojim virusom influence, neovisno o podtipu, nastaju antitijela za nestrukturane proteine.

3.7. Razvoj brzih i osjetljivih metoda za otkrivanje virusa, naročito onih koji se lako automatiziraju kao što je metoda rRT-PCR, znači da ih je moguće upotrebljavati za jednostavno i redovno testiranje velikog broja uzoraka vakciniranih ptica na prisustvo divljeg virusa. Otkrivanje uzročnika bit će, međutim, ograničeno na kratak period u akutnoj fazi zaraze i neće se moći koristiti za donošenje zaključka da jato u prošlosti nije bilo izloženo virusu. Ovaj pristup je najprikladniji za testiranje vakciniranih ptica prije njihovog premještanja, kao dokaz da su slobodne od aktivne infekcije.

3.8. Broj uzoraka koji se trebaju testirati metodama od izbora, mora omogućiti isključivanje zaraze virusom influence ptica, ako je prevalencija u jatu veća od 15%, uz nivo pouzdanosti od 95%.

Klinički znakovi	Dan poslije inokulacije										Ukupan rezultat	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Normalni	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$12 \times 0 = 0$
Bolesni	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	$6 \times 1 = 6$
Jako bolesni	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	$6 \times 2 = 12$
Mrtvi	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	10	$76 \times 3 = 228$
												Ukupno =246

POGLAVLJE X. Strategije za dijagnozu IP

U skladu s Dodatkom IV. Pravilnika, Odluke o primjenjivanju mjera na posebnim područjima ili na kontaktnim farmama i težina tih mjera može se u znatnoj mjeri razlikovati, ovisno o veličini rizika. Isto tako, tražena dijagnostička potvrda bolesti se vjerovatno usklađuje s prevladavajućim stanjem, veličinom opasnosti i stepenom rizika. Ured, uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikt BiH, mora odlučiti o dijagnostičkom dokazu uzimajući u obzir brzinu provedbe mjera kontrole i iskorjenjivanja bolesti, te moguće posljedice pogrešne dijagnoze. Pri takvim procjenama je potrebno istovremeno uzeti u obzir mnoge faktore, a neke je situacije moguće i predvidjeti.

Stanje bolesti	Mogući problem	Dijagnostički kriteriji
Bez specifičnih znakova, bez službene sumnje	Izolirana farma	Provesti brzo otkrivanje na osnovu tehnike RT-PCR za M gen. Prema potrebi diferencijalna dijagnoza.
Prva sumnja na izbijanje bolesti	Izolirana farma	Provesti potpuno dijagnostičko testiranje, izolaciju i karakterizaciju virusa.
Prva sumnja na izbijanje bolesti	Farma na području s velikom gustoćom peradi	Provesti potpuno dijagnostičko testiranje, izoliranje i karakterizaciju virusa, ali se pritom fokusirati na metode brzog otkrivanja i metode karakterizacije, naročito one koje se zasnivaju na RT-PCR i sekvencioniranju ¹ .
Druga i svaka slijedeća sumnja na izbijanje bolesti	Izolirane farme, epidemiološki povezane s prvom sumnjom na izbijanje bolesti	Fokusirati se na metode brzog otkrivanja i metode karakterizacije, naročito one koje se baziraju na RT-PCR i sekvencioniranju ¹
Druga i svaka slijedeća sumnja na izbijanje bolesti	Farme na području s velikom gustoćom peradi ili s mnogo epidemioloških veza	Pouzdati se u metode brzog otkrivanja, koje najranije pružaju dokaz o prisutnosti bilo kojeg virusa influence ¹ ptica.
Višestruke sumnje na izbijanje bolesti ili brzo širenje bolesti, uključujući nadziranje	Bez brzog djelovanja neće biti moguće zaustaviti širenje bolesti	Osloniti se na metode brzog otkrivanja, koje najranije pružaju dokaz o prisutnosti bilo kojeg virusa influence ¹ ptica.
¹ Za to je potrebno provesti cjelovito uzorkovanje, a uzorke uskladištiti za kasniju procjenu.		

POGLAVLJE XI.

Dijagnoza zaraze virusima influence ptica

kod svinja i drugih sisara

1. *Influenca ptica kod svinja*

Virusi influence ptica lako se prenose na svinje i premda je umnožavanje u većini slučajeva relativno ograničeno, postoji mogućnost prijenosa bolesti sa zaraženih svinja na perad i druge osjetljive životinje. Do danas nema terenskih dokaza da zaražene svinje prenose viruse influence ptica podtipova H5 i H7.

Iskustvo stečeno za vrijeme izbijanja bolesti u Holandiji 2003. godine pokazalo je da svinje zaražene virusom podtipa H7N7 nisu pokazivale kliničke znakove, koji bi se mogli pripisati zarazi virusom H7N7, te nije bilo prijava bolesnih svinja za vrijeme izbijanja bolesti H5N1 u Aziji i drugdje.

Zato se pri utvrđivanju jesu li svinje zaražene ne može pouzdati u kliničke znakove, iako se klinički znakovi zbog zaraze svinja drugim virusima influence ptičijega porijekla mogu

pojaviti, nakon što se virus prilagodi domaćinu. Dijagnoza zaraze virusom influence ptica kod svinja u suštini je slična dijagnozi za ptičije vrste i bazira se na izolaciji virusa molekularnim tehnikama i otkrivanju specifičnih antitijela upotrebom testa inhibicije hemaglutinacije. Postoje određene razlike i nijedan test nije u potpunosti validiran za potvrđivanje zaraze virusima influence ptica kod svinja.

2. *Uzorci za izolaciju virusa*

Zaraze virusom influence ptica obično su kod svinja ograničene na dišni sistem i uzorci se moraju uzeti iz tkiva dišnog sistema i, ako je to prikladno, briseva ždrijela ili nosa, po mogućnosti od svinja koje pokazuju znakove bolesti. Ti uzorci i brisevi mogu se obrađivati za izolaciju virusa ili molekularnu detekciju virusa, korištenjem istih tehnika koje su naprijed u tekstu opisane za uzorke ptica. Međutim, pri upotrebi PCR tehnika potrebno je uključiti odgovarajuće kontrole, kako bi se osiguralo da sastojci u uzorcima svinja ne inhibiraju amplifikaciju.

3. *Inokulacija i inkubacija jaja*

Za izoliranje virusa influence kod sisara u embrioniranim kokošijim jajima starim od 9 do 11 dana, uobičajena je praksa inokulirati svako jaje preko alantoične šupljine u amnijsku šupljinu. Međutim, pri testiranju svinja koje su bile u dodiru s virusima influence ptica, kad je virus imao malo mogućnosti za adaptaciju, inokulacija alantoične šupljine vjerovatno je dovoljna.

Pri izolaciji virusa influence A kod sisara preporučena inkubacijska temperatura je 35 °C, iako za viruse koji su se slabo prilagodili svinjama 37 °C neće štetiti izolaciji virusa.

4. *Test na specifična antitijela u testovima inhibicije hemaglutinacije (IHA)*

Izolacija virusa ili molekularna detekcija vjerovatno su najosjetljivije za određivanje zaraze virusom influence ptica kod svinja. Međutim, serološki odgovor kod svinja opažen je i bez izolacije ili detekcije virusa. Testovi IHA za svinjske serume zahtijevaju određene modifikacije testa koji se koristi za serume ptica u skladu s navedenim u Poglavlju VIII. ovog Priloga.

Svinjski serumi poznati su po osobinama nespecifične inhibicije u testovima IHA i zato se, kako bi se to spriječilo, svaki primjerak seruma mora tretirati receptorom koji uništava enzime (RDE). Potrebno je upotrijebiti sljedeću metodu:

- (a) u 100 µl svinjskoga seruma dodati 400 µl RDE (radna koncentracija) i temeljno promiješati;
- (b) Inkubirati jedan sat na 37 °C;
- (c) Potom inkubirati 30 minuta na 56 °C;
- (d) Uzorke hladiti na 4 °C barem 15 minuta;
- (e) Dodati 10 µl 30-postotnih eritrocita pilića i dobro promiješati;
- (f) Inkubirati preko noći na 4 °C. Druga je mogućnost, ako je uzorke potrebno upotrijebiti još isti dan, uzorke inkubirati jedan sat na 37 °C i pet minuta centrifugirati na 300 x g.

Obrađeni serum potom se koristi u IHA testovima, kako je opisano za serume ptica, početno razrjeđivanje je 1:10. Potrebno je upotrijebiti seriju seruma svinja s poznatim sero-negativnim statusom u pogledu influence ptica, kako bi se procijenila specifičnost testa IHA za upotrijebljeni soj virusa (vidi upotrebu soja virusa za serologiju, dobijenog kod izbijanja bolesti u skladu s Poglavljem VIII. ovog Dodatka). Za vrijeme izbijanja bolesti u Holandiji 2003. godine u IHA testu, u kojem se koristio serum svinja koje su odabrane neovisno o izbijanju bolesti, nađeno je do 2,6% nespecifičnih reaktora.

5. *Uzorkovanje svinja*

Posebno na farmama na kojima se drže i svinje i perad, u zajedničkim ili odvojenim prostorijama, svinje su u opasnosti da se zaraze influencom ptica direktno ili indirektno, dodiranjem s peradi ili proizvodima od peradi. Kako bi se isključila takva infekcija, potrebno je uzeti briseve ždrijela ili nosa i uzorke krvi u skladu s postupcima iz tačke 8.21. Poglavlja IV. ovog Priloga.

Uzorke je potrebno uzeti od svinja koje pokazuju kliničke znakove bolesti. Međutim, kada su klinički znakovi odsutni uzorci se mogu uzeti nasumično iz različitih dijelova prostora. Ako su dostupni za laboratorijsko ispitivanje, brisevi se moraju testirati brzim molekularnim testovima i/ili izolacijom virusa. Metode RT-PCR treba na odgovarajući način potvrditi i njihova osjetljivost mora biti najmanje jednaka osjetljivosti izolacije virusa influence A u jajima.

Dvije do četiri sedmice nakon usmrćivanje peradi zaražene influencom ptica, potrebno je uzeti barem 60 uzoraka krvi svinja, na način da se barem neki uzorci uzmu iz grupa svinja u međusobnom neposrednom kontaktu. Uzorke je potrebno testirati testom IHA upotrebom virusa koji je izoliran pri izbijanju bolesti kod peradi. Uzorke iz akutne faze bolesti i faze oporavka treba testirati istim testom. Pozitivni uzorci mogu se potvrditi neutralizacijom virusa i/ili Western blot analizom.

Kad je rezultat nekog od ovih testova pozitivan, potrebno je provesti epidemiološko istraživanje na svim farmama svinja koje se nalaze unutar zaraženog područja, bez obzira na to da li se radi o farmama na kojima se drže samo svinje ili / i druge vrsta životinja.

6. Virusi influence ptica kod drugih sisara, osim svinja

Potrebno je provesti pretrage ostalih sisara osim svinja koji su osjetljivi na influencu ptica, uključujući mačke. Posebno vezano za VPIP H5N1, pri testiranju mačaka potrebno je obaviti slijedeće pretrage:

a) patoanatomske promjene, povezane s umnožavanjem virusa, koncentriraju se u plućima i jetri, te je stoga uzorke za virološke pretrage potrebno uzeti od tih organa uginulih životinja. U živih životinja, za detekciju virusa potrebno je uzeti briseve dušnika/ždrijela. Osim toga, odvojeno se mogu uzeti brisevi fecesa;

b) uzorke krvi koji se pregledavaju analizama IHA potrebno je obraditi na temperaturi od 56 °C, tokom 30 minuta, a RDE obrada može se izostaviti.

POGLAVLJE XII.

Minimalni sigurnosni zahtjevi za prijevoz uzoraka

1. Za prijevoz uzoraka kod kojih je potvrđena prisutnost patogena ili postoji sumnja na njihovu prisutnost, vrijede strogi nacionalni i međunarodni propisi, kojih se potrebno stalno pridržavati. Izolati virusa ne klasificiraju se kao dijagnostički uzorci, iako moraju biti pakirani u skladu sa međunarodnim standardima.

Upute date u ovom Poglavlju odnose se na zračni prijevoz, iako se slično pakiranje mora koristiti i kod kopnenog i pomorskog prijevoza uzoraka.

2. Pakiranje dijagnostičkih uzoraka za prijevoz

Dijagnostičkim uzorcima, koji se prevoze u skladu s propisima IATA, dodijeljen je identifikacijski broj UN 2184, 2900 ili 3373, kako je prikladno.

Dok pošiljka ne stigne do primatelja za nju je odgovoran pošiljatelj, a ne prijevozna kompanija.

3. Prvi sloj ambalaže

(a) Primarna posuda (posude) mora (moraju) biti nepropusna (nepropusne), npr. zatvarači na zavrtnj moraju se zabrtviti parafilnom ili ljepljivom trakom ili se moraju poduzeti slične mjere zaštite.

(b) Ako je primarnih posuda više, moraju se zamotati pojedinačno, kako bi se spriječilo razbijanje.

(c) Kad se određuje količina dijagnostičkih uzoraka koji se prevoze, potrebno je voditi računa o transportnom mediju za viruse.

(d) Primarna posuda (posude) ne smije (smiju) sadržavati više od 500 ml ili 500 g. Ukupan sadržaj primarne posude dijagnostički je uzorak.

4. Drugi sloj ambalaže

- (a) Za drugi sloj ambalaže potrebno je upotrijebiti dovoljno upijajućeg materijala, koji u slučaju curenja ili oštećenja primarne ambalaže može upiti čitav sadržaj iz svih primarnih posuda.
- (b) Drugi sloj ambalaže mora biti u skladu s IATA zahtjevima za pakiranje dijagnostičkih uzoraka, uključujući postupak testa s padom s visine 1,2 m. Kako su zahtjevi za ambalažu za pakiranje zaraznog materijala strožiji od zahtjeva za pakiranje dijagnostičkih uzoraka iz uputa za pakiranje 602 IATA, može se također koristiti.
- (c) Ambalaža za zarazni materijal mora na vanjskoj strani sadržavati tražene specifikacijske oznake (UN u krugu): kao što je: "UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450"
- (d) Drugi sloj ambalaže mora biti nepropustan. Potrebno se pridržavati uputa za pakiranje koje je priložio proizvođač ambalaže ili koja druga ovlaštena strana.
- (e) Najmanje ukupne vanjske dimenzije drugog sloja ambalaže moraju iznositi barem 100 mm.
- (f) Drugi sloj ambalaže mora biti dovoljno velik za slanje dokumenta, kao što je zračni tovarni list.

5. Vanjski sloj ambalaže

- (a) Vanjski sloj ambalaže ne smije sadržavati više od 4 l ili 4 kg.
- (b) Ako je potrebno, izvan drugog sloja ambalaže stavlja se suhi ili mokri led. Ako se koristi suhi led, ambalaža mora osigurati oslobađanje ugljičnog dioksida i ne dopustiti nastajanje pritiska koji bi mogao oštetiti ambalažu. Ako se koristi moker led, ambalaža mora biti nepropusna.

Sva ambalaža i zračni tovarni list moraju biti označeni na slijedeći način:

"UN 3373 DIAGNOSTIC SPECIMEN
PACKED IN COMPLIANCE WITH
IATA PACKING INSTRUCTION 650"

- (c) Između drugog sloja ambalaže i vanjskog sloja potrebno je priložiti detaljan popis cijelog sadržaja.
- (d) Vanjski sloj ambalaže potrebno je staviti u hermetički zatvorenu plastičnu vreću kako bi se zaštitio od vlage.
- (e) Deklaracija prijevoznika o opasnom teretu nije potrebna.

POGLAVLJE XIII.

Slanje virusa i uzoraka u referentnu laboratoriju

OIE-a/ Evropske zajednice

1. Uzorci koje se šalju u referentnu laboratoriju OIE-a / Evropske zajednice moraju biti u skladu sa preporukama za prijevoz opasnih patogenih supstanci unutar i zakonodavstvom koje je na snazi u državi u kojoj se nalazi laboratorija.

2. Slanje virusa i drugih materijala u referentnu laboratoriju OIE-a / Evropske zajednice.

(a) Sve materijale potrebno je zapakirati u skladu s uputama iz ovog Poglavlja.

(b) Vanjski sloj ambalaže mora biti označen kako slijedi:

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

(c) Potrebno je unijeti jedan od brojeva dozvole. Laboratorije koje šalju uzorke moraju osigurati da se koriste brojevi dozvole koji su trenutno na snazi.

(d) Uz pošiljku mora biti priloženo pismo sa što više podataka o izolatu, kao što su npr. vrsta i starost, područje/država izolacije, podaci o anamnezi.

(e) Paketi se šalju zračnim poštanskim ili teretnim prijevozom.

Ako se paketi šalju zračnim teretnim prijevozom, prije dolaska materijala, referentnoj laboratoriji potrebno je telefaksom, telefonom ili elektronskom poštom javiti broj zračnoga tovarnog lista.

Paketi koji se šalju teretnim zračnim prijevozom, moraju biti jasno označeni slijedećim riječima:

"CARE OF TRANSGLOBAL" kako bi se osigurala brza obrada na aerodromu.

POGLAVLJE XIV.

Minimalni sigurnosni zahtjevi u dijagnostičkoj laboratoriji za influencu ptica

1. Sigurnosni zahtjevi u dijagnostičkim laboratorijama koje rade s virusima influence ptica moraju obuhvatati postupke za sprječavanje nekontroliranog širenja virusa kao prijetnje za zdravlje životinja i radi zaštite ljudi zaposlenih u laboratoriji (i onih izvan njega) od svih rizika od izbijanja zoonoza.

Minimalni sigurnosni zahtjevi za laboratorije propisani su odredbama posebnim propisima koji reguliraju ovu oblast. Osim toga, u osnovnim BiH normama (BAS) opisani su i predviđeni operativni aspekti. Za rad laboratorija za dijagnostičke svrhe postoje dodatne preporuke, kao što je dobra laboratorijska praksa.

2. Propisi koji se odnose na rad laboratorija i sigurnost:

- Odluka o uslovima koje moraju ispunjavati ovalštene dijagnostičke veterinarske laboratorije ("Službeni glasnik BiH", br. 25/04, 16/05 i 43/09);
- Odluka o određivanju ovlaštenih laboratorija u Bosni i Hercegovini ("Službeni glasnik BiH", br. 68/05 i 90/05);
- Zakon o zaštiti na radu ("Službene novine FBiH", broj 6/98);
- Zakon o zaštiti na radu ("Službeni glasnik RS", broj 1/08);
- Zakon o zaštiti na radu Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BD BiH", br. 31/05 i 35/05)

Ako se dijagnostika obavlja lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i kloniranjem produkata PCR u bakterijskom plazmidu za razmnožavanje, kao za sekvencioniranje DNK, osim propisa iz alineja prve i druge ove tačke, primjenjuju se odredbe posebnih propisa kojima je regulirana ova oblast.

3. Osim propisa navedenih u ovom Poglavlju potrebno je provoditi i prihvaćene norme (BAS EN):

BAS EN 12128 Biotehnologija. Laboratorije za istraživanje razvoja i analize. Nivo kontaminacije mikrobioloških laboratorija, rizičnih prostora i zahtjevi fizičke sigurnosti.

BAS EN 12738 Biotehnologija. Laboratorije za istraživanje razvoja i analize. Vodič za držanje životinja koje su inokulirane mikroorganizmima za vrijeme eksperimenta.

BAS EN 12740 Biotehnologija. Laboratorije za istraživanje razvoja i analize. Uputa za rukovanje, inaktiviranje i testiranje otpadaka.

BAS EN 12741 Biotehnologija. Laboratoriji za istraživanje razvoja i analize. Upute za rad biotehnoških laboratorija.

Za rad i upravljanje laboratorijom primjenjuju se slijedeći uslovi:

4. Zahtjevi za laboratorije (nivoa sigurnosti od 1. do 4.)

U skladu s gore navedenim propisima i prihvaćenim evropskim normama: BAS EN 12128; BAS EN 12740 i BAS EN 12741.

Sigurnosne mjere	Nivo sigurnosti			
	1	2	3	4
Laboratorijski prostor: izoliran	ne	da	da	da
Laboratorije, odvojene vratima	ne	da	da	da
Kontrolni prozor za posmatranje bez potrebe otvaranja vrata	po izboru	po izboru	po izboru	da
Mogućnost pranja ruku (za osoblje)	da	da	da	da
Mogućnost dezinfekcija (ruku)	po izboru	da	da	da
Ograničen pristup	ne	da	da	da
Posebne mjere za nadzor širenja aerosola	ne	da	da	da
		da što više smanjiti	da spriječiti	da spriječiti
Na vratima znak za biološku opasnost	ne	da	da	da
Tuš	ne	ne	po izboru	da
Ispiranje očiju	da	da	da	da
Laboratorija: moguće je hermetički zatvoriti za fumigaciju	ne	ne	da	da
Površine otporne na vodu, kiseline, baze, otapala, sredstva za dezinfekciju i dekontaminaciju, jednostavne za	da (radna površina)	da (radna površina)	da (radna površina, pod)	da (radna površina, pod)

čišćenje				
Ulaz u laboratoriju kroz zračnu barijeru (<i>airlock</i>)	ne	ne	po izboru	da
Podpritisak u laboratoriji	ne	ne	po izboru	da
Izlazni i ulazni zrak iz laboratorije filtriran kroz filter HEPA	ne	ne	da (izlazni zrak)	da
Autoklav	na lokaciji	u zgradi	u laboratoriji	u laboratoriji, s vratima na oba kraja
Zaštitna odjeća	primjerena zaštitna odjeća	primjerena zaštitna odjeća	primjerena zaštitna odjeća (obuća po izboru)	potpuno presvlačenje odjeće i obuće
Rukavice	ne	po izboru	da	da
Efikasan nadzor vektora (npr. za glodare i insekte)	po izboru	da	da	da
Sigurna pohrana biološkog agensa	da	da	da	da
Laboratorije imaju vlastitu opremu	ne	ne	Preporučuje se	da

Postoje dodatne norme koje se bave upravljanjem i ustrojem laboratorija.

Potrebno je poštovati i druge nacionalne i međunarodne propise i preporuke. WHO je na svojoj web stranici objavio svoj priručnik *Laboratory Biosafety Manual* (3. izdanje): http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/.

5. Mjere sigurnosti koje se odnose na zdravlje životinja

Upute vezane za sigurno rukovanje virusom influence ptica, dala je Svjetska organizacija za zdravlje životinja (OIE) u Poglavlju 1.4.5. Kodeksa o zdravlju kopnenih životinja 2005. VPIP se smatra patogenom 4. grupe u skladu sa OIE-om.

6. Mjere sigurnosti koje se odnose na zdravlje ljudi

Laboratorije koje rade s virusima influence ptica moraju neprestano imati na umu da su to barem potencijalno humani patogeni i rad laboratorija organizirati tako da se izbjegne zaraza zaposlenih u laboratoriji i onemogućiti izlazak virusa iz laboratorije.

Upute za rukovanje s uzorcima za koje postoji sumnja na prisustvo virusa influence ptica a, mogu se naći na web stranici Svjetske zdravstvene organizacije (WHO): http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/