

Na osnovu člana 4. stav (2) Pravilnika o mjerama za otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje klasične svinjske kuge ("Službeni glasnik BiH", broj 38/10), direktor Ureda za veterinarstvo Bosne i Hercegovine donio je

DIJAGNOSTIČKI PRIRUČNIK ZA KLASIČNU SVINJSKU KUGU

Član 1. (Predmet)

Dijagnostičkim priručnikom za klasičnu svinjsku kugu (u daljem tekstu: Priručnik) utvrđuju se dijagnostički postupci, način uzorkovanja i faktori za procjenu laboratorijskih metoda koje se preporučuju u dijagnosticiranju klasične svinjske kuge, opisani u Prilogu ovog Priručnika, koji je njegov sastavni dio.

Član 2. (Potvrda prisutnosti)

Potvrda prisutnosti klasične svinjske kuge, koja se utvrđuje u skladu s Pravilnikom o mjerama za otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje klasične svinjske kuge, mora se zasnivati na:

- a) kliničkim znakovima i *post mortalnom* nalazu;
- b) otkrivanju virusa, virusnih antigena ili genoma u uzorcima tkiva, organa, krvi ili tjelesnih izlučevina svinja;
- c) postojanju specifične reakcije antitijela u uzorku krvi, u skladu s dijagnostičkim postupcima, metodama uzimanja uzoraka i faktorima za ocjenjivanje rezultata testova utvrđenim u Prilogu ovog Priručnika.

Član 3. (Laboratorije)

(1) Laboratorija ovlaštena za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge može primijeniti modifikacije laboratorijskih testova koji su opisani u Prilogu iz člana 1. ovog Priručnika ili druge testove pod uslovom da imaju jednaku osjetljivost i specifičnost kao u njemu opisani testovi.

(2) Osjetljivost i specifičnost modificiranih ili drugih testova iz stava (1) ovog člana procjenjuje se u okviru provođenja periodičnih uporednih testiranja, koje za klasičnu svinjsku kugu organizira Referentna laboratorija OIE/EU za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge (u daljnjem tekstu: referentna laboratorija OIE/EU).

(3) Referentna laboratorija OIE/EU za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge je Institute of Virology, Hannover Veterinary School Bünteweg 17, 30559 Hannover, Njemačka Tel.: (49.511) 953.88.40, Fax: (49.511) 953.88.98.

Član 4. (Stupanje na snagu)

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

Broj 02-2-02-2-1227-2/10
5. augusta 2010. godine
Sarajevo
Direktor
Doc. dr. **Drago N. Nedić**, s. r.

PRILOG

POGLAVLJE I. Uvod, ciljevi i definicije Priručnika

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

- a) daju smjernice i minimalni uslovi koje moraju zadovoljavati dijagnostički postupci, metode uzimanja uzoraka te mjerila za ocjenjivanje rezultata kliničkog i *post-mortalnog* pretraživanja te laboratorijskih testova za postavljanje dijagnoze KSK;
- b) određuju minimalni bio-sigurnosni uslovi i norme kvaliteta kojih se treba pridržavati u laboratorijama za dijagnosticiranje KSK te prilikom prijevoza uzoraka;
- c) određuju laboratorijski testovi koji će se koristiti za dijagnosticiranje KSK i laboratorijske tehnike za genetsku tipizaciju izolata virusa KSK.

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

3. Za potrebe ovog Priručnika, osim definicija navedenih u članu 2. Pravilnika o mjerama za otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje KSK ("Službeni glasnik BiH", broj 38/10), (u daljnjem tekstu: Pravilnik), primjenjuju se sljedeći pojmovi:

- a) "sumnjivo gazdinstvo" označava svinjogojsko gazdinstvo na kojem se za jednu ili više svinja sumnja da su zaražene virusom KSK ili gazdinstvo u kontaktu s njim, u smislu definicije iz člana 2. tačke f. Pravilnika;
- b) "singleton reaktori" označavaju sve svinje koje su nakon serološkog pretraživanja dobile pozitivne rezultate, a da se zna da nisu bile u kontaktu s virusom KSK i da ne postoje dokazi da se zaraza s njih proširila na svinje koje su bile u kontaktu s njima;
- c) "epidemiološka podjedinica" ili "podjedinica" označava nastambu, mjesto ili prostor na kojem se grupe svinja s gazdinstva drže na takav način da često dolaze u direktan ili indirektan međusobni kontakt, ali se drže odvojeno od drugih svinja s istog gazdinstva;
- d) "svinje koje su bile u kontaktu sa zaraženim svinjama" označava svinje koje su tokom zadnjih 21 dan na gazdinstvu bile u direktnom dodiru s jednom ili više svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom KSK.

POGLAVLJE II.

Opis KSK s naglaskom na diferencijalnu dijagnostiku

A. UVOD

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

2. Virus KSK srazmjerno je stabilan u sekretima i ekskretima zaraženih svinja, lešinama, svježem mesu i proizvodima od mesa svinja. Inaktiviraju ga deterdženti, otapala za masti, proteaze i uobičajeni dezinficijensi.

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

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

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

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

B. AKUTNI TOK

1. Akutni tok KSK najčešće se javlja kod odbijene prasadi i tovljenika. Prvi znakovi su: prestanak uzimanja hrane, tromost, povišena tjelesna temperatura, sljepljeni kapci, otečeni limfni čvorovi, teškoće kod disanja (apnea, dispnea), opstipacija nakon koje slijedi dijareja. Tipična krvarenja na koži obično se uočavaju na uškama, repu, truhu i s unutrašnje strane nogu tokom druge i treće sedmice bolesti, a traju do uginuća. Ponekad se javljaju i neurološki znakovi poput oduzetosti stražnjih nogu, teturanja i grčeva. Stalno je prisutna vrućica. Tjelesna temperatura uglavnom je viša od 40°C, ali kod odraslih svinja ne mora prijeći 39,5°C.

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

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

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

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

C. HRONIČNI TOK

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

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

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

D. PRENATALNI OBLIK I ZAKAŠNJELA POJAVA KSK

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

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

POGLAVLJE III.

Glavni kriteriji prema kojima se neko gazdinstvo može smatrati sumnjivim na zarazu virusom klasične svinjske kuge Odluka o tome da se neko gazdinstvo smatra sumnjivim na KSK donosi se na osnovu sljedećih nalaza, mjerila i razloga:

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

- vrućica s pojačanim pobolom i smrtnošću;
- vrućica sa sindromom krvarenja;
- vrućica s neurološkim simptomima;
- vrućica nepoznatog porijekla kod koje liječenje antibioticima nije uspjelo poboljšati zdravstveno stanje;
- pobačaji i povećani problemi plodnosti tokom zadnja tri mjeseca;
- urođeno drhtanje prašćića (kongenitalni tremor);
- hronično bolesne životinje;
- mlade životinje zaostale u razvoju (kržljave);
- petehijalna i ekhimotična krvarenja, posebno na limfnim orovima, bubrezima, slezeni, mokraćnom mjehuru i grkljanu;
- infarkti ili hematomi, naročito na slezeni;
- butoni na debelom crijevu u hroničnim slučajevima, naročito pored ileo-cekalnog spoja;

b) epidemioloških istraživanja. Glavni epidemiološki podaci koje treba razmotriti su:

- jesu li svinje bile u direktnom ili indirektnom kontaktu sa svinjogojskim gazdinstvom za koje je dokazano da je zaraženo KSK;
- je li gazdinstvo isporučilo svinje za koje se naknadno pokazalo da su zaražene KSK;
- jesu li krmače umjetno oplodene sjemenom koje potiče od nerasta sumnjivih na KSK;
- je li bilo direktnih ili indirektnih dodira svinja iz populacije u kojoj se pojavila KSK s divljim svinjama;
- drže li se svinje na otvorenom u području u kojem su divlje svinje zaražene KSK;
- jesu li svinje hranjene napojem i postoji li sumnja da se s tim napojem nije postupalo na način da se inaktivira virus KSK;

- je li postojala mogućnost izlaganja virusu KSK (npr. preko lica i prijevoznih sredstava koji su ulazili na gazdinstvo);
- c) nalaza serološkoga pretraživanja. Glavni laboratorijski nalazi koje treba uzeti u obzir su:
- nalaz specifičnih antitijela nastalih nakon neopažene infekcije virusom KSK ili cijepljenja;
 - unakrsna reakcija između antitijela na virus KSK i na druge pestivirusne;
 - otkrivanje tzv. singleton reaktora.

POGLAVLJE IV. Postupci provjere i uzimanja uzoraka

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

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

Bez obzira jesu li usvojene mjere iz člana 4. stava 2. Pravilnika na gazdinstvu gdje se sumnja na pojavu KSK, smjernice i postupci iz tačke A ovog Poglavlja moraju se primijeniti i u slučajevima kada se diferencijalno dijagnostički sumnja na KSK. Tu su svrstani i slučajevi gdje klinički znakovi i epidemiološki podaci o toku bolesti kod svinja ukazuju na malu vjerovatnost pojave KSK.

U svim ostalim slučajevima kad se sumnja da su jedna ili više svinja zaražene virusom KSK, na dotičnom sumnjivom gazdinstvu usvojit će se mjere iz člana 4. stava 2. Pravilnika.

U slučaju sumnje na KSK u klaonici, prijevoznom sredstvu, sajmu ili drugom mjestu primjenjivat će se smjernice i postupci utvrđeni podtačkama od 2. do 7. tačke A. ovog Poglavlja.

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

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

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

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

Ukoliko pregledom sumnjivog gazdinstva nisu nađene svinje ili grupe svinja navedenih u prethodnom stavu ove podtačke, nadležni veterinarski inspektor, ne dovodeći u pitanje ostale mjere koje se primjenjuju na dotičnom gazdinstvu u skladu s Pravilnikom i uzimajući u obzir epidemiološku situaciju, mora narediti provedbu:

- dodatnih pregleda na dotičnom gazdinstvu u skladu s podtačkom 3. ove tačke; ili
- uzimanje uzoraka krvi svinja s dotičnog gazdinstva za laboratorijsku pretragu. U tom se slučaju kao smjernice koriste postupci uzimanja uzoraka opisani u podtački 5. ove tačke i tački F. podtački 2. ovog Poglavlja; ili
- mjera iz člana 4. stava 2. Pravilnika, ili
- isključiti sumnju na KSK.

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

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

Međutim, ako se radi o:

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

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

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

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

- u podjedinici u kojoj su se držale uginule svinje ili svinje na umoru obavezno treba obaviti klinički pregled u skladu s podtačkom 3. te uzeti uzorke krvi u skladu s podtačkom 5. ove tačke, a
- mogu se obaviti i pregledi *post mortem* na 3 do 4 svinje koje su bile u dodiru sa zaraženim svinjama.

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

Preporučuje se da to budu uzorci od nedavno uginulih svinja.

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

- poduzimanje potrebnih mjera predostrožnosti i higijenskih mjera radi sprječavanja širenja bolesti i
- da svinje, ako se radi o svinjama na umoru, budu usmrćene na human način.

5. Ako se na sumnjivom gazdinstvu otkriju daljnji klinički znakovi ili bolesne promjene koji bi mogli ukazivati na KSK, ali Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH ocijeni da ti nalazi nisu dovoljni da se potvrdi epidemija KSK te da stoga treba provesti laboratorijske testove, tada od sumnjivih svinja i od drugih svinja u svakoj od podjedinica u kojima se drže sumnjive svinje, u skladu s postupcima utvrđenim u nastavku, treba uzeti uzorke krvi za serološku pretragu.

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

Međutim, ako se radi o:

- rasplodnim krmačama, minimalni broj krmača kojima se uzimaju uzorci mora s 95%-tnom sigurnošću omogućiti otkrivanje prevalencije od 5%,
- središtima za sakupljanje sjemena, uzorke krvi treba uzeti od svih rasplodnih nerasta,

broj uzoraka koji se uzima za virološke testove mora biti u skladu s uputama Ureda, koji mora voditi računa o raspoloživosti dijagnostičkih testova, osjetljivosti testova koji će se koristiti i o postojećem epidemiološkom stanju.

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

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

b. ako su seropozitivne svinje krmače koje doje prasad, svoj prasadu treba uzeti uzorke krvi i podvrgnuti ih pregledu na virus KSK, virusni antigen ili genom virusa kako se navodi u Poglavlju

VI. ovog Dijagnostičkog priručnika. Uzorci krvi moraju se uzeti i krmačama te ih uputiti na daljnje serološko pretraživanje.

7. Ako nakon obavljenih pregleda na sumnjivom gazdinstvu nisu otkriveni klinički znakovi koji ukazuju na prisutnost virusa KSK, ali Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH ocijeni da treba provesti daljnje laboratorijsko pretraživanje kako bi se KSK isključila, prilikom uzimanja uzoraka krvi kao smjernice će se upotrijebiti postupci utvrđeni u podtački 5. ove tačke.

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

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

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

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

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

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

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

2. Uzorci se prvenstveno uzimaju od:

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

Uzorci tih svinja uzimaju se u skladu s uputama Ureda, koji mora voditi računa o postojećem epidemiološkom stanju. U tom slučaju, kao smjernice se koriste postupci uzimanja uzoraka utvrđeni u trećem i četvrtom podstavu ove podtačke.

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

Međutim, ako se radi o:

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

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

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

1. Ne dovodeći u pitanje odredbe člana 11. stav 1. tačke f) podstava drugog Pravilnika, da bi se u skladu s članom 10. stavom 3. Pravilnika, odobrilo preseljenje svinja s gazdinstava smještenih u zaraženom i ugroženom području, klinički pregled koji obavlja nadležni veterinarski inspektor mora:

- biti obavljen u vremenu od najviše 24 sata prije preseljenja svinja,
- biti u skladu s odredbama tačke A. podtačke 2. ovog Poglavlja.

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

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

Međutim, ukoliko se radi o:

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

treba pregledati sve neraste koji se sele.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Kad se svinje na gazdinstvo dovode, u skladu s članom 13. stavom 2. tačkom a) ili stavom 2. tačkom b), ili članom 19. stavom 8. tačkom c) Pravilnika, primjenjuje se sljedeći postupak uzimanja uzoraka:

- ako se na gazdinstvo dovode *sentinel* svinje, uzorci krvi moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja da se, s 95%-tnom sigurnošću, omogući otkrivanje 10 %-tne seroprevalencije u svakoj pojedinoj podjedinici na gazdinstvu;
- ukoliko se obavlja obnova cjelokupne populacije, uzorci krvi za serološke testove moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja da se, s 95%-tnom sigurnošću, omogući otkrivanje 20% seroprevalencije u svakoj pojedinoj podjedinici na gazdinstvu.

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

2. Nadležni veterinarski inspektor će po dovođenju svinja osigurati da, u slučaju pojave kakve bolesti ili uginuća svinja na gazdinstvu iz nepoznatih razloga, dotične svinje odmah budu pretražene na KSK. Ove odredbe primjenjuju se do ukidanja ograničenja iz člana 13. stava 2. tačke a) podstava 2. i člana 19. stava 8. tačke c) Pravilnika, na dotičnom gazdinstvu.

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

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

- treba provesti ispitivanje u skladu s postupcima utvrđenim tačkom A. podtačkama 2. i 3. ovog Poglavlja;
- uzorci krvi za serološke testove moraju se uzeti u skladu s podtačkom 2. ove tačke.

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

Međutim, ako se radi o:

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

uzorke krvi treba uzeti od svih nerasta.

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

1. Da bi se u ugroženom području mogla ukinuti ograničenja iz člana 11. Pravilnika na gazdinstvima u tom području treba obaviti klinički pregled u skladu s postupcima utvrđenima pod tačkom A. podtačkom 2. ovog Poglavlja.

Osim toga, uzorke krvi za serološko pretraživanje treba uzeti:

- na svim gazdinstvima na kojima se drže svinje u starosti od dva do osam mjeseci,
- kad nadležni veterinarski inspektor ocijeni da se KSK mogla neopaženo proširiti među rasplodnim krmačama,
- na svim ostalim gazdinstvima za koje Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta BiH ocijeni da je s njih potrebno uzeti uzorke,
- u svim centrima za sakupljanje sjemena.

2. Kad se na gazdinstvima smještenim u ugroženom području provode serološka pretraživanja, broj uzoraka uzet na tim gazdinstvima mora biti u skladu s tačkom F. podtačkom 2. ovog Poglavlja. Međutim, ako nadležni veterinarski inspektor prosudi da se KSK neopaženo mogla proširiti među rasplodnim krmačama, uzorke treba uzeti samo u podjedinicama u kojima se drže te životinje.

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

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

2. Ako nema podataka o gustoći i veličini populacije treba utvrditi geografsko područje na kojem će se uzimati uzorci, vodeći pri tom računa o stalnoj prisutnosti divljih svinja i postojanju prirodnih i umjetnih prepreka koje su u stanju spriječiti velika i stalna kretanja životinja. Ako takvih okolnosti nema ili se radi o velikim područjima, preporučuje se da se za uzimanje uzoraka odrede područja ne veća od 200 km², na kojima obično živi između 400 i 1000 divljih svinja.

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

Preporučuje se također da:

- u područjima u kojima je lov učestaliji i lovi se redovno ili se u njima kao mjera nadzora nad bolestima obavlja selektivni izlov, otprilike 50% životinja čiji se uzorci uzimaju bude iz starosne grupe od tri mjeseca do godine dana, 35% od jedne do dvije godine, a 15% starije od 2 godine,
- u područjima u kojima se rijetko lovi ili se uopće ne lovi, uzorci budu uzeti od barem 32 životinje iz svake od tri starosne grupe,
- se uzimanje uzoraka obavi u kratkom vremenu, po mogućnosti ne dužem od mjesec dana,
- se starost životinja od kojih su uzeti uzorci odredi prema izraslim zubima.

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

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

5. Svi uzorci koji se upućuju u laboratorije moraju biti praćeni upitnikom iz člana 16. stava 4. tačke 1) Pravilnika.

POGLAVLJE V.

Opći postupci i mjerila za uzimanje i prijevoz uzoraka

A. OPĆI POSTUPCI I MJERILA

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

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

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

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

Ako se radi o svinjama koje se drže na gazdinstvu, treba dati i jasne podatke o starosti, kategoriji i gazdinstvu porijekla svinja kojima su uzorci uzeti. Potrebno je za svaku svinju od koje se uzima uzorak zabilježiti njeno mjesto na gazdinstvu i njenu jedinstvenu identifikacijsku oznaku.

B. SAKUPLJANJE UZORAKA ZA VIROLOŠKE TESTOVE

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

2. Uzorci nezgrušane ili zgrušane krvi moraju se sakupiti od svinja koje pokazuju znakove vrućice ili druge znakove bolesti u skladu s uputama Ureda.

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

C. PRIJEVOZ UZORAKA

1. Uzorci se:

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

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

3. Prijemna laboratorija mora unaprijed biti obaviještena o vremenu i načinu stizanja uzoraka.

4. U zračnom prijevozu uzoraka koji se prevoze u Referentnu laboratoriju OIE/EU, paket mora biti označen u skladu s propisima Međunarodnog udruženja za prijevoz uzoraka avionom (IATA-e).

POGLAVLJE VI.

Provedba virološkog pretraživanja i procjena rezultata

A. OTKRIVANJE VIRUSNOG ANTIGENA

1. Imunofluorescentni test (imunofluorescencija)

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

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

2. ELISA za otkrivanje antigena

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

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

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

B. IZOLACIJA VIRUSA

1. Izolacija virusa zasniva se na uzgoju virusa iz suspenzije organa porijeklom od sumnjivih svinja na prikladnoj ćelijskoj kulturi. Ukoliko se u uzorku nalazi virus KSK on će se na ćelijama umnožiti u tolikoj mjeri da će se moći otkriti imuno-bojenjem zaraženih ćelija konjugiranim antitijelima. Za diferencijalnu dijagnozu obzirom na druge pestiviruse potrebna su specifična antitijela za virus KSK.
2. Najbolji uzorak za izolaciju virusa KSK su leukociti, plazma ili cjelovita krv dobijena iz nezgrušanog krvnog uzorka ili od organa navedenih u tački A. podtački 1. ovog Poglavlja.
3. Izolacija virusa prikladnija je za ispitivanje uzoraka malog broja životinja nego za masovan nadzor. Postupak izolacije virusa zahtijeva intenzivan rad i potrebna su barem tri dana da se dobiju rezultati. Postoji mogućnost da će trebati i dvije dodatne pasaže virusa za otkrivanje virusa koji se u uzorku nalazi u vrlo niskom titru. Ispitivanje tako može potrajati i desetak dana prije nego se dobije konačni rezultat. Uzorci koji se raspadaju mogu za ćelijsku kulturu biti citotoksični te tako ograničiti njeno korištenje.
4. Metoda izolacije virusa preporučuje se također ako je KSK prethodno potvrđena drugim metodama. Treba je koristiti kao referentni test za potvrdu prethodnih pozitivnih rezultata ELISA-e za otkrivanje antigena, PCR-a i imunofluorescencije. Izolati virusa KSK uzgojeni na ovaj način korisni su za daljnje dijagnostičke postupke, uključujući i genetsku tipizaciju izolata i molekularnu epidemiologiju.
5. Svi izolati virusa KSK iz svih primarnih epidemija, primarni slučajevi među divljim svinjama ili slučajevi u klaonicama ili prijevoznim sredstvima moraju se genetski tipizirati u nacionalnoj referentnoj laboratoriji ili Referentnoj laboratoriji OIE/EU u skladu s tačkom E ovog Poglavlja. Izolati virusa mogu biti poslani u Referentnu laboratoriju OIE/EU za sakupljanje virusa.

C. OTKRIVANJE VIRUSNOG GENOMA

1. Za otkrivanje virusnog genoma u uzorcima krvi, tkiva i organa primjenjuje se lančana reakcija polimerazom (PCR). Odsječci virusne RNK prevode se u DNK oblik koji se uz pomoć PCR-a umnožavaju do količine koju je moguće otkriti. Obzirom na to da ovaj test otkriva prisutnost genomskih odsječaka, PCR može biti pozitivan iako cjeloviti virus nije prisutan u uzorku (npr. u raspadnutim tkivima ili na uzorcima svinja koje se oporavljaju).
2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) se može upotrijebiti na manjem broju pomno odabranih uzoraka uzetih od sumnjivih životinja ili iz materijala pobačenih plodova. Na lešinama divljih svinja to može biti jedna od odabranih metoda ako se materijal raspada, a zbog citotoksičnosti više nije moguća izolacija virusa.
3. Materijal prikladan za dijagnozu PCR-om su leukociti, plazma ili nezgrušani krvni uzorak, te organi navedeni u tački A. podtački 1. ovog Poglavlja.
4. PCR se može provesti u roku od 48 sati. Zahtijeva odgovarajuću laboratorijsku opremu, zasebne prostorije i vješto osoblje. Metoda je vrlo osjetljiva, ali pri njenom provođenju može doći i do kontaminacije uzoraka, što rezultira lažno pozitivnim reakcijama. Zbog toga je neophodan strogi nadzor i visoka kvaliteta provedbe. Ovisno o primjeni različitih početnica, mogu se otkriti i drugi pripadnici roda *Pestivirus* što zahtijeva primjenu dodatnih diferencijalnih testova.

D. OCJENA REZULTATA VIROLOŠKIH PRETRAŽIVANJA

1. Virološka pretraživanja su neophodna za potvrdu prisutnosti virusa KSK. Izolaciju virusa treba smatrati referentnim virološkim testom i treba je, prema potrebi, koristiti kao potvrdni test. Naročito se preporučuje ako pozitivni rezultati testova FAT, ELISA ili PCR nisu praćeni uočavanjem kliničkih znakova ili patoanatomskih promjena uzrokovanih KSK i u slučaju bilo kojih drugih sumnji. Međutim, primarno izbijanje KSK može se potvrditi ako su kod svinja utvrđeni klinički znakovi i patoanatomske promjene, a da su najmanje dva testa za otkrivanje antigena i genoma dala pozitivne rezultate.

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

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

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

E. GENETSKA TIPIZACIJA IZOLATA VIRUSA KSK

1. Genetska tipizacija izolata virusa KSK postiže se određivanjem nukleotidnih sljedova pojedinih odsječaka genoma virusa KSK, tj. tačno određenih dijelova unutar 5. nekodirajuće regije i/ili gena koji kodira za glikoprotein E2. Sličnost ovih sljedova sa sljedovima ranije dobijenih virusnih izolata može ukazivati na porijeklo epidemije tj. je li ona uzrokovana novim ili već poznatim sojem virusa. To može poduprijeti ili opovrgnuti postavke o putevima prijenosa na koje je ukazalo epidemiološko istraživanje.

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

2. Ako genetsku tipizaciju nije moguće u kratkom roku obaviti u nekoj od nacionalnih laboratorija ili u bilo kojoj laboratoriji ovlaštenoj za dijagnosticiranje KSK, izvorni uzorak virusnoga izolata treba što prije poslati na tipizaciju u Referentnu laboratoriju OIE/EU.

Podatke koje o tipizaciji i sljedovima izolata virusa KSK imaju na raspolaganju laboratorije ovlaštene za dijagnosticiranje KSK treba prosljediti Referentnoj laboratoriji OIE/EU kako bi ih tamo unijeli u svoje postojeće baze podataka.

POGLAVLJE VII.

Provedba serološkog pretraživanja i procjena rezultata

A. OSNOVNA NAČELA I DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST

1. Kod svinja zaraženih virusom KSK, antitijela se mogu utvrditi u uzorcima seruma dvije do tri sedmice nakon infekcija. Kod svinja koje su bolest preboljele, specifična antitijela mogu se utvrditi tokom nekoliko sljedećih godina ili čak do uginuća. Antitijela se povremeno mogu utvrditi u završnom stadiju bolesti. Kod nekih svinja s hroničnim oblikom KSK, antitijela se mogu utvrditi krajem prvog mjeseca od infekcije.

Svinje inficirane *in utero* mogu biti imuno-snošljive prema virusu KSK te stoga ne proizvode specifična antitijela. Ipak, tokom nekoliko prvih dana života kod njih se mogu utvrditi antitijela porijeklom od majke. Poluživot majčinih antitijela kod zdrave, neviremične prasadi je oko dvije sedmice. Pronađu li se kod prasadi starijih od tri mjeseca, vrlo je malo vjerovatno da su antitijela KSK porijeklom od majke.

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

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

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

B. PREPORUČENI SEROLOŠKI TESTOVI

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

Kvalitet i efikasnost serološkog pretraživanja treba se provjeravati učešćem ovlaštenih dijagnostičkih veterinarskih laboratorija u među-laboratorijskim uporednim testiranjima koje povremeno organizira Referentna laboratorija OIE/EU.

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

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

Nakon inkubacije mješavina se nasaduje na prikladne ćelijske kulture i inkubira tri do pet dana. Nakon inkubacije ćelije se fiksiraju, a reakcija se očitava nakon dodavanja konjugiranih antitijela. U tu svrhu koriste se antitijela obilježena peroksidazom ili fluoresceinom.

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

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

Kad se VNT koristi za otkrivanje antitijela na virus VP/BSG primjenjuju se već navedena načela, a provode se za dobijanje diferencijalne dijagnoze KSK.

4. Sojevi pestivirusa koji se koriste za neutralizacijske testove moraju biti usklađeni s preporukama Referentne laboratorije OIE/EU.

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

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

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

6. Referentne laboratorije obavezno obavljaju nadzor kvaliteta osjetljivosti i specifičnosti svake serije ELISA kompleta, koristeći pri tom referentne serume koji su pripremljeni u Referentnoj laboratoriji OIE/EU. To su:

- serumi svinja u ranom stadiju zaraze virusom KSK (prije nego protekne 21 dan od početka zaraze);
- serumi svinja u rekonvalescenciji (po isteku 21 dana od početka zaraze);
- serumi svinja zaraženih pestivirusima preživača.

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

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

7. Smatra se da je osjetljivost ELISA-e manja nego osjetljivost VNT te se ona preporučuje kao brzi test za provjeru prisutnosti zaraze na nivou krda. ELISA ne zahtijeva tako specijalizirane pogone, a zahvaljujući automatiziranim sistemima, provodi se znatno brže nego VNT. ELISA mora osigurati prepoznavanje svih zaraza KSK u stadiju oporavka, a treba biti maksimalno oslobođena smetnji nastalih unakrsnom reakcijom s pestivirusima preživara.

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

1. Ne dovodeći u pitanje odredbe člana 4. stava 3. tačke a) ili člana 7. stava 2. Pravilnika, u slučaju otkrivanja neutralizacijskog titra virusa KSK jednakog ili višeg od 10 ND50 u uzorcima seruma prikupljenih od jedne ili više svinja ili dobijanja pozitivnog rezultata testa ELISA u uzorcima seruma uzetih od neke grupe svinja, na dotičnom gazdinstvu treba odmah primijeniti mjere iz člana 4. stava 2. Pravilnika ili ako se one već primjenjuju, treba nastaviti s njihovom primjenom.

Već sakupljene uzorke s tog gazdinstva treba pretražiti VNT-om uporednom titracijom neutralizacijskih antitijela za virus KSK i pestiviruse preživara.

2. Pokažu li uporedni testovi nalaz antitijela za pestiviruse preživara, a izostanak ili značajno niži titar antitijela (niži od trostruko) za virus KSK, treba odbaciti sumnje na KSK, osim ako ne postoje drugi razlozi koji traže nastavak primjene mjera iz člana 4. stava 2. Pravilnika na dotičnom gazdinstvu.

3. Pokažu li uporedni testovi neutralizacijski titar virusa jednak ili viši od 10 ND50 kod više od jedne svinje, a taj je titar jednak ili viši nego titri za druge pestiviruse, nadležni veterinarski inspektor mora potvrditi prisutnost virusa KSK, uz uslov da su na dotičnom gazdinstvu pronađeni i epidemiološki dokazi te bolesti.

4. Ne dovodeći u pitanje odredbe člana 4. stava 3. Pravilnika, ukoliko nisu pronađeni epidemiološki dokazi bolesti ili ako su rezultati ranije provedenih testova nedorečeni, nadležni veterinarski inspektor mora osigurati da se na dotičnom gazdinstvu:

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

5. Ukoliko, međutim, daljnje provjere i testovi iz podtačke 4. ove tačke ne dopuste da se isključi mogućnost prisutnosti KSK na gazdinstvu se, nakon što su protekle barem dvije sedmice od prethodnih provjera, provodi dodatno uzimanje uzoraka za serološko pretraživanje.

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

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

POGLAVLJE VIII.

Razlikovni testovi u slučaju provedbe hitnog cijepljenja

A. OSNOVNA NAČELA

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

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

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

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

B. SMJERNICE ZA KORIŠTENJA RAZLIKOVNOG TESTA U ODNOSU NA HITNO CIJEPLJENJE MARKIRANIM CJEPIVOM NA SVINJOGOJSKIM GAZDINSTVIMA NA KOJA SE ODNOSI ČLAN 19. PRAVILNIKA.

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

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

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

Pojedinosti postupaka uzimanja uzoraka i pretraživanja će biti utvrđene planom provedbe hitnog cijepljenja koji će biti dostavljen relevantnim nadležnim organima u skladu s članom 19. stavom 3. Pravilnika.

POGLAVLJE IX.

Minimalni sigurnosni uslovi za laboratorije za dijagnosticiranje KSK

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

2. Dodatne uslove utvrđene u Tablici 1. moraju ispuniti sve laboratorije u kojima se obavljaju postupci koji uključuju i umnožavanje virusa.

3. Uslove utvrđene Tablicom 2. ovog Poglavlja moraju ispuniti sve laboratorije u kojima se provode pokusi s virusom KSK na životinjama.

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

Svaka pojedina ampula u kojoj je pohranjen virus KSK mora se jasno označiti, te treba voditi detaljne evidencije o zalihama virusa zajedno s datumima i rezultatima izvršenih provjera kvaliteta. Evidencija

virusa pridodatih zalihi treba sadržavati pojedinosti o izvoru, a evidencija se mora voditi i o virusima koji su poslani drugim laboratorijama.

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

Tablica 1.- NAČELA BIOLOŠKOG OKRUŽENJA PRIKLADNOG ZA
DIJAGNOSTIČKE LABORATORIJE

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

Tablica 2. - BIOSIGURNOSNI USLOVI PROSTORIJA ZA POKUSNE ŽIVOTINJE

	Uslovi
Opći uslovi	<p>Prozračivanje s nadziranim pritiskom.</p> <p>Dvostruko HEPA filtriranje izduvnog zraka.</p> <p>Oprema za potpuno raskuživanje /dezinfekciju na kraju pokusa.</p> <p>Sve otpadne vode obrađene radi inaktiviranja virusa KSK (hemijskom ili toplinskom obradom).</p>
Odijevanje u laboratoriji	<p>Potpuno presvlačenje po ulasku.</p> <p>Rukavice za jednokratnu upotrebu za sva rukovanja.</p> <p>Prije uklanjanja iz jedinice odjeća se sterilizira ili se pere u samoj jedinici.</p>
Nadzor osoblja	<p>Ulazak u jedinicu dozvoljen samo obučenom osoblju koje ima dozvolu za ulaz.</p> <p>Potpuno tuširanje po izlasku iz jedinice.</p> <p>Po napuštanju jedinice osoblju je 48 sati zabranjeno približavanje svinjama.</p>
Oprema	<p>Sva oprema potrebna za postupke sa životinjama mora biti dostupna u samoj jedinici.</p> <p>Sav materijal mora se prije uklanjanja iz jedinice sterilizirati ili, ako se radi o uzorcima životinja, dvostruko omotati nepropusnim spremnikom čija je površina dezinficirana radi prijevoza u laboratoriju za dijagnosticiranje KSK.</p>
Životinje	<p>Sve životinje zaklane prije napuštanja jedinice, moraju biti pregledane <i>post mortem</i> unutar bio-sigurnosnog područja, a trupla po završetku pregleda spaljena.</p>