

URED ZA VETERINARSTVO BOSNE I HERCEGOVINE

Na osnovu člana 4. stav (2) Pravilnika o mjerama za nadzor afričke svinjske kuge ("Službeni glasnik BiH", broj 15/11), direktor Ureda za veterinarstvo Bosne i Hercegovine donio je

DIJAGNOSTIČKI PRIRUČNIK ZA AFRIČKU SVINJSKU KUGU

Član 1.
(Predmet)

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

Član 2.
(Potvrda prisutnosti)

Potvrda prisutnosti afričke svinjske kuge, koja se utvrđuje u skladu s Pravilnikom o mjerama za nadzor afričke svinjske kuge ("Službeni glasnik BiH", broj 15/11), (u daljnjem tekstu: Pravilnik), mora se zasnivati na:

- kliničkim znakovima i *post mortem* nalazu;
- otkrivanju virusa, virusnih antigena ili genoma u uzorcima tkiva, organa, krvi ili tjelesnih izlučevina svinja;
- 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)

- Laboratorija ovlaštena za dijagnosticiranje afričke 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.
- Osjetljivost i specifičnost modificiranih ili drugih testova iz stava (1) ovog člana procjenjuje se u okviru provođenja periodičnih uporednih testiranja, koje za afričku svinjsku kugu organizira Referentna laboratorija OIE/EU za dijagnosticiranje afričke svinjske kuge (u daljnjem tekstu: Referentna laboratorija OIE/EU).
- Referentna laboratorija OIE/EU za dijagnosticiranje afričke svinjske kuge je Centro de Investigación en Sanidad Animal, 28130 Valdeolmos, Madrid, Španija.

Član 4.
(Stupanje na snagu)

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

Broj 02-7-02-2-205-3/11

Direktor

5. jula 2011. godine

Doc. dr. **Drago N. Nedić**, s. r.

PRILOG

DIJAGNOSTIČKI PRIRUČNIK ZA AFRIČKU SVINJSKU KUGU

Poglavlje I.

Uvod, ciljevi i definicije

- Kako bi se osigurali ujednačeni postupci dijagnosticiranja afričke svinjske kuge (u daljnjem tekstu "ASK") ovim Priručnikom se:
 - daju smjernice i minimalni uslovi koje moraju zadovoljavati dijagnostički postupci, metode uzorkovanja te kriteriji za ocjenjivanje rezultata kliničkih i postmortem pregleda te laboratorijskih testova za ispravnu dijagnozu ASK-a;
 - određuju minimalni biosigurnosni uslovi i standardi kvaliteta kojih se treba pridržavati u laboratorijima za dijagnosticiranje ASK-a te prilikom prijevoza uzoraka;

- određuju laboratorijski testovi koji se koriste za dijagnosticiranje ASK-a i laboratorijske tehnike koje se koriste za genetsku tipizaciju izolata virusa ASK-a.
- Ovaj Priručnik je namijenjen prvenstveno nadležnim organima odgovornim za nadzor ASK-a. Stoga je naglasak na načelima i primjenama laboratorijskih testova te ocjenjivanju njihovih rezultata, a ne na detaljnim laboratorijskim tehnikama.
- U smislu ovog Priručnika, osim definicija navedenih u članu 2. Pravilnika, primjenjuju se sljedeće definicije:
 - sumnjivo gazdinstvo* označava svinjogojско gazdinstvo na kojem se za jednu ili više svinja sumnja da su zaražene virusom ASK-a, ili kontaktno gazdinstvo kako je definirano u članu 2. tački (j) Pravilnika;
 - epidemiološka podjedinica* ili *podjedinica* označava zgradu, mjesto ili obližnji prostor na kojem se grupe svinja s gazdinstva drže na takav način da često dolaze u direktan ili indirektan međusobni kontakt, ali se istovremeno drže odvojeno od drugih svinja s istog gazdinstva;
 - svinje u kontaktu* su svinje koje su tokom posljednjih 21 dan na gazdinstvu bile u direktnom kontaktu s jednom ili više svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom ASK-a.

Poglavlje II.

Opis ASK-a s naglaskom na diferencijalnoj dijagnozi

A. UVOD

- Uzročnik ASK-a je DNA virus s ovojnicom koji spada u rod Asfivirusa iz porodice Asfarviridae. Sojevi virusa ASK-a razlikuju se po virulenciji, iako se ne mogu identificirati različiti serotipovi.
- Virus ASK-a je vrlo stabilan u izlučevinama zaraženih svinja, u trupovima i svježem mesu svinja te u nekim proizvodima od mesa svinja. Kako bi se osiguralo njegovo inaktiviranje u okolišu, moraju se koristiti odgovarajući dezinficijensi.
- Glavni prirodni put zaraze svinja je oronazalni, direktnim ili indirektnim kontaktom sa zaraženim svinjama ili hranjenjem hranom koja je kontaminirana virusom. Međutim, u onim područjima u kojima postoje vektori, prijenos putem tih vektora ima vrlo važnu ulogu u postojanosti i širenju virusa. ASF se također može širiti indirektnim kontaktom s kontaminiranim materijalima i ugrizom insekata koji mehanički prenose virus ASF-a. Moguća je i zaraza putem sjemeni zaraženih nerasta.
- Period inkubacije kod pojedinih životinja iznosi oko pet do 15 dana, ali u uslovima na terenu klinički simptomi na gazdinstvu mogu postati vidljivi tek nekoliko sedmica nakon uvođenja virusa, pa i duže ako se radi o slabim sojevima virusa.
- Javlja se akutni, subakutni i hronični oblici ASK-a, a razlika zavisi uglavnom od virulencije virusa.
- Kod svinja koje se nakon zaraze klinički oporave, viremija traje 40 do 60 dana, i te svinje postaju prijenosnici virusa. Virus ASK-a se kod svinja prijenosnika izolira do šest mjeseci nakon zaraze.

B. AKUTNI OBLIK

- Prvi klinički znak bolesti je obično visoka tjelesna temperatura (viša od 40°C), koja je praćena depresijom, gubitkom apetita, brzim i teškim disanjem te izlučevinama iz nosa i očiju. Svinje pokazuju nekoordinirane pokrete i stiskaju se jedna uz drugu. Krmače mogu pobaciti u svim stepenima trudnoće. Kod nekih svinja može doći do povraćanja i opstipacije, dok se kod nekih može razviti krvavi proljev. Postaju vidljiva potkožna područja kongestije ili krvarenja, posebno na ekstremitetima i ušima. Prije smrti može doći do kome, koja se javlja jedan do sedam dana nakon razvoja kliničkih znakova. Stopa pobola i smrtnosti unutar gazdinstva može biti 100%.

Postmortem nalazi pokazuju tipičan hemoragijski sindrom s općom kongestijom trupa, krvavom tekućinom u prsnoj i trbušnoj šupljini, povećanom tamnom slezenom, hemoragičnim limfnim čvorovima koji nalikuju ugrušcima krvi, posebno bubrežni i gastrohepatični limfni čvorovi, petehijalnom hemoragijom u bubrežima (kortikalnim i medularnim piramidama i bubrežnoj nakapnici), abdominalnoj seroziji, želučanoj i crijevnoj sluznici i srcu (epikard i endokard), hidrotoraksom i petehijalnim krvarenjem pleure.

2. Akutni oblik klasične svinjske kuge obično dovodi do kliničke i patološke slike koja je vrlo slična kao kod afričke svinjske kuge. Kada su prisutna, krvarenja na koži i ušima se prilično lako otkrivaju i navode na sumnju na akutnu klasičnu ili afričku svinjsku kugu. Malo je drugih bolesti koje dovode do sličnih promjena.

Na akutni oblik ASK-a treba također posumnjati i kod sumnje na: crveni vjetar, reproduksijski i respiratorni sindrom svinja, otrovanje kumarinom, hemoragijsku purpuru, sindrom kržljivosti odbite prasadi, sindrom dermatitisa i nefropatije svinja, infekcije salmonelom ili Pasteurellom te bilo koje probavne ili respiratorne sindrome praćene povišenom tjelesnom temperaturom kod kojih svinje ne reagiraju na liječenje antibioticima.

C. SUBAKUTNI OBLICI

Subakutni oblici su učestaliji u endemskim područjima. Za subakutnu infekciju je karakteristična promjenjiva povišena temperatura, depresija i pneumonija. Smrt može uslijediti radi prestanka rada srca. Oštećenja kod subakutnih oblika su slična onima kod akutnog oblika, ali su blaža. Karakteristična oštećenja su velika krvarenja u limfnim čvorovima, bubrežima i slezeni, kongestija i edem pluća te u nekim slučajevima intersticijska pneumonija.

D. HRONIČNI OBLICI

Hronični oblici ove bolesti su rijetki. Kod hroničnih oblika može se zapaziti sekundarna bakterijska infekcija. Budući da su klinički znaci hroničnog ASK-a prilično nespecifični, za postavljanje diferencijalne dijagnoze potrebno je razmotriti mnoge druge bolesti. Povišena tjelesna temperatura nije nužno prisutna kod svake životinje, ali se na zaraženom gazdinstvu može uvijek otkriti kod nekoliko svinja.

Klinički simptomi hroničnog ASK-a mogu uključivati respiratorne probleme, pobačaje, artritis, hronične kožne čireve ili nekroze, koji ne nalikuju tipičnoj kliničkoj slici zaraze virusom ASK-a. Oštećenja mogu biti minimalna ili ih uopće nema. Patohistološki nalazi su karakterizirani povećanim limfnim čvorovima i slezenom, pleuritisom i fibrinoznim perikarditisom, te infiltriranim pneumonitisom. Također su opisane žarišne kazeozne nekroze i mineralizacija pluća.

Poglavlje III.

Smjernice za glavne kriterije prema kojima se neko gazdinstvo može smatrati sumnjivim na zarazu afričkom svinjskom kugom

1. Odluka o tome da se neko gazdinstvo smatra sumnjivim donosi se na osnovu slijedećih nalaza, kriterija i razloga:
 - a) klinički i patološki nalazi na svinjama. Glavni klinički i patološki nalazi koje treba razmotriti su:
 - povišena tjelesna temperatura s pobolom i smrtnošću svinja svih starosti,
 - povišena tjelesna temperatura s hemoragijskim sindromom; petehijalna i ehimozna krvarenja, posebno u limfnim čvorovima, bubrežima, slezeni (koja je povećana i tamna, posebno kod akutnih oblika) i mokraćnom mjehuru te ulceracije na žučnom mjehuru;
 - b) epidemiološki nalazi. Glavni epidemiološki nalazi koje treba razmotriti su:
 - gdje su svinje bile u direktnom ili indirektnom kontaktu sa svinjogojkim gazdinstvom za koje je dokazano da je zaraženo virusom ASK-a,

- gdje je gazdinstvo isporučilo svinje za koje se naknadno pokazalo da su zaražene virusom ASK-a,
 - gdje su krmače bile umjetno oplodene sjemenom koje potiče iz sumnjivog izvora,
 - gdje je bilo direktnog ili indirektnog kontakta s divljim svinjama u populaciji u kojoj se pojavila ASK,
 - gdje se svinje drže na otvorenom u području u kojem su divlje svinje zaražene virusom ASK-a;
 - gdje se svinje hrane napojem i postoji sumnja da se tim napojem nije postupalo na takav način da se inaktivira virus ASK-a;
 - gdje je postojala mogućnost izlaganja, na primjer preko lica koja dolaze na gazdinstvo, prijevoznih sredstava i sl. koja dolaze iz gazdinstva za koje postoji sumnja da je zaraženo virusom ASK-a,
 - gdje se na području gazdinstva pojavljuju vektori.
2. U svakom slučaju, gazdinstvo se mora smatrati sumnjivim ukoliko se radi kliničkih ili patoloških nalaza pojavi sumnja na klasičnu svinjsku kugu na gazdinstvu ali klinička, epidemiološka i laboratorijska istraživanja nisu potvrdila ovu bolest niti su utvrdila izvore ili uzročnike druge bolesti na predmetnom gazdinstvu.

Poglavlje IV.

Postupci provjere i uzimanja uzoraka

A. SMJERNICE I POSTUPCI ZA KLINIČKI PREGLED I UZIMANJE UZORAKA SVINJA SA SUMNJVIM GAZDINSTAVOM

1. Nadležni veterinarski inspektor mora narediti obavljanje odgovarajućih kliničkih pregleda, uzimanje uzoraka i laboratorijske pretrage kako bi se potvrdila ili isključila ASK, u skladu sa smjernicama i postupcima utvrđenim u tačkama 2. do 6.

Bez obzira jesu li na predmetnom gazdinstvu usvojene mjere iz člana 4. stava (2) Pravilnika, ove smjernice i postupci se moraju primijeniti također i u slučajevima bolesti kada se diferencijalno dijagnostički sumnja na ASK. Tu se svrstavaju i slučajevi kada klinički znakovi i epidemiološki podaci o toku bolesti kod svinja ukazuju na malu vjerovatnost pojave ASK-a.

U svim ostalim slučajevima, kad se sumnja da su jedna ili više svinja zaražene virusom ASK-a, na dotičnom sumnjivom gazdinstvu usvajaju se mjere iz člana 4. stava (2) Pravilnika.

U slučaju sumnje na ASK kod svinja u klaonici ili u prijevoznom sredstvu, također se primjenjuju smjernice i postupci utvrđeni tačkama 2. do 6., *mutatis mutandis*.

2. Kada nadležni veterinarski inspektor posjeti sumnjivo gazdinstvo kako bi potvrdio ili isključio ASK:

- mora provjeriti podatke o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu, ukoliko takvi podaci postoje; mora pregledati sve podjedinice na gazdinstvu kako bi se odabrale svinje koje će biti klinički pregledane.

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

- bolesne ili anoreksične svinje,
- svinje koje su nedavno dovedene na gazdinstvo iz potvrđenih područja izbijanja bolesti ili iz drugih sumnjivih izvora,
- svinje koje su se držale u podjedinicama koje su nedavno posjetila lica koja su nedavno bila u bliskom kontaktu sa svinjama zaraženim ili sumnjivim na ASK ili lica za koja je utvrđeno da su imala druge posebno rizične kontakte s potencijalnim izvorom virusa ASK-a,
- svinje koje su već uzorkovane i serološki testirane na ASK, u slučaju kada rezultati tih pretraga ne omogućavaju isključivanje ASK-a, i svinje koje su bile u kontaktu sa zaraženim svinjama,
- svinje koje su nedavno preboljele bolest.

Ukoliko pregledom sumnjivog gazdinstva nisu nađene svinje ili grupe svinja navedene u gornjem podstavu, nadležni veterinarski inspektor, ne dovodeći u pitanje ostale mjere koje se mogu primijeniti na dotičnome gazdinstvu u skladu s Pravilnikom i uzimajući u obzir epidemiološku situaciju:

- naređuje i nadzire provedbu daljnjih pregleda na dotičnom gazdinstvu u skladu s tačkom 3., ili
 - naređuje i nadzire uzimanje uzoraka krvi svinja s dotičnog gazdinstva za laboratorijske testove (u tom se slučaju kao smjernice koriste postupci uzimanja uzoraka utvrđeni u tački 5. i u odjeljku F stavu (2), ili
 - naređuje i nadzire provedbu mjera utvrđenih članom 4. stavom (2) Pravilnika, do daljnjih istraživanja na predmetnom gazdinstvu, ili
 - isključuje sumnju na ASK.
3. Kod pozivanja na ovaj stav, na predmetnom se gazdinstvu mora obaviti klinički pregled na slučajno odabranim svinjama iz podjedinica za koje je utvrđeno ili se sumnja da postoji opasnost da je u njih unesen virus ASK-a.
- Minimalni broj svinja koje treba pregledati mora s 95%-tnom sigurnošću omogućiti otkrivanje povišene tjelesne temperature, ako je povišena tjelesna temperatura prisutna kod 10% jedinki u tim podjedinicama.
4. Ako se na sumnjivom gazdinstvu otkriju uginule svinje ili svinje na umoru, moraju se obaviti postmortem pregledi, po mogućnosti na najmanje pet takvih svinja, a naročito na svinjama:
- koje su prije uginuća pokazivale vrlo očigledne znakove bolesti,
 - koje imaju visoku tjelesnu temperaturu,
 - koje su uginule nedavno.

Ako takvi pregledi ne pokažu oštećenja koja ukazuju na prisutnost ASK-a, ali se smatra da je zbog epidemiološke situacije potrebno provesti daljnja istraživanja:

- u podjedinici u kojoj su se držale uginule svinje ili svinje na umoru mora se obaviti klinički pregled kako je utvrđeno u tački 3. te se moraju uzeti uzorci krvi kako je utvrđeno u tački 5., i
- mogu se obaviti postmortem pregledi na tri do četiri svinje koje su bile u kontaktu s uginulim ili umirućim svinjama, posebno ako te svinje pokazuju kliničke znakove.

Bez obzira na prisutnost ili izostanak lezija koje ukazuju na ASK, od svinja podvrgnutih postmortem pregledu moraju se uzeti uzorci organa ili tkiva radi obavljanja viroloških testova u skladu s Poglavljem V. dijelom B. tačkom 1. Preporučljivo je da to budu uzorci od nedavno uginulih svinja.

Pri obavljanju postmortem pregleda, nadležni veterinarski inspektor naređuje i nadzire:

- 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, u skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja pri klanju ili usmrćivanju ("Službeni glasnik BiH", br. 46/10).
5. Ukoliko se na sumnjivom gazdinstvu otkriju daljnji klinički znakovi ili lezije koji bi mogli ukazivati na ASK, ali Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine smatra da ti nalazi nisu dovoljni da se potvrdi izbijanje ASK-a 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 treba uzeti uzorke krvi za laboratorijske testove, u skladu sa slijedećim postupcima:
- (a) minimalni broj uzoraka koji se uzimaju za serološke testove mora s 95%-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 10% seroprevalencije u predmetnoj podjedinici;

- (b) broj uzoraka koji se uzima za virološke testove mora biti u skladu s uputama Ureda koji mora voditi računa o rasponu testova koji se mogu izvesti, o osjetljivosti laboratorijskih testova koji se koriste i o postojećoj epidemiološkoj situaciji.

6. Ukoliko se nakon obavljenih pregleda na sumnjivom gazdinstvu ne otkriju klinički znakovi ili lezije koji ukazuju na ASK, ali Ured uz saglasnost nadležnih organa entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine smatra da su potrebni daljnji laboratorijski testovi kako bi se ASK isključila, kao smjernice se upotrebljavaju postupci uzorkovanja utvrđeni u tački 5.

B. POSTUPCI UZORKOVANJA NA GAZDINSTVU PRI USMRĆIVANJU SVINJA NAKON ŠTO JE BOLEST POTVRĐENA

1. U svrhu utvrđivanja načina na koji je virus ASK-a unesen na zaraženo gazdinstvo i utvrđivanja vremena koje je proteklo od njegovog unošenja, pri usmrćivanju svinja na gazdinstvu, nakon što je izbijanje bolesti potvrđeno u skladu s članom 5. stavom (1) tačkom a) Pravilnika, od svinja se radi obavljanja seroloških testova moraju nasumično uzeti uzorci krvi.

2. Minimalni broj svinja čiji se uzorci uzimaju mora s 95%-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 10% seroprevalencije u svakoj podjedinici gazdinstva.

Uzorci za virološke testove moraju se također uzimati u skladu s uputama Ureda, koji mora voditi računa o rasponu testova koji se mogu izvesti, o osjetljivosti laboratorijskih testova koji će se koristiti i o epidemiološkoj situaciji.

Na onim područjima na kojima je dokazana prisutnost vektora zaraženih virusom ASK-a, mora se također uzeti u obzir odgovarajuće sakupljanje krpelja za virološke testove, u skladu s uputama nadležnog organa i Prilogom III. Pravilnika.

3. Međutim, u slučaju sekundarnih izbijanja, nadležni veterinarski inspektor može odlučiti da odstupi od tačaka 1. i 2. te odrediti druge postupke uzorkovanja, uzimajući u obzir već raspoložive epidemiološke podatke o ishodištu i načinima na koji je virus unesen na gazdinstvo i o mogućnostima širenja bolesti s tog gazdinstva.

C. POSTUPCI UZORKOVANJA PRI USMRĆIVANJU SVINJA U OKVIRU PREVENTIVNIH MJERA NA SUMNJIVOM GAZDINSTVU

1. Radi potvrde ili isključivanja ASK-a i radi prikupljanja dodatnih epidemioloških informacija, pri usmrćivanju svinja u okviru preventivne mjere na sumnjivom gazdinstvu u skladu s odredbama člana 4. stava (3) tačke a) ili člana 7. stavova (3) i (4) Pravilnika, moraju se, u skladu s postupkom utvrđenim tačkom 2., uzeti uzorci krvi za serološke testove te uzorci krvi za virološke testove.

2. Uzorkovanje se prvenstveno odnosi na:

- svinje koje pokazuju znakove ili postmortem lezije koje upućuju na ASK te svinje koje su bile u kontaktu s tim svinjama;
- druge svinje koje su mogle biti u rizičnim kontaktima sa zaraženim ili sumnjivim svinjama ili onima za koje se sumnja da su kontaminirane virusom ASK-a. Uzimanje uzoraka od ovih svinja mora biti u skladu s uputama Ureda, pri čemu ona mora uvažavati epidemiološku situaciju.

Osim toga, svinje porijeklom iz svake od podjedinica na gazdinstvu, od kojih se uzimaju uzorci, moraju se odabrati metodom slučajnoga odabira. U tom slučaju, minimalan broj uzoraka koji se uzimaju za serološke testove mora s 95%-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 10%-tne seroprevalencije u predmetnoj podjedinici.

Vrsta uzoraka koji se uzimaju za virološke testove i vrsta testa koji se koristi moraju biti u skladu s uputama Ureda koja mora voditi računa o rasponu testova koji se mogu primijeniti, o osjetljivosti tih testova te o epidemiološkoj situaciji.

D. POSTUPCI PROVJERE I UZORKOVANJA PRIJE DAVANJA ODOBRENJA ZA PRESELJENJE SVINJA IZ GAZDINSTAVA SMJEŠTENIH U ZARAŽENIM I UGROŽENIM PODRUČJIMA, I U SLUČAJU KLANJA ILI USMRĆIVANJA TIH SVINJA (ČLANOVI 10. I 11. PRAVILNIKA)

1. Kako bi se u skladu s članom 10. stavom (3) Pravilnika odobrilo preseljenje svinja s gazdinstava smještenih u zaštićenim ili nadziranim zonama, klinički pregled koji naređuje i nadzire nadležni veterinarski inspektor mora:
 - biti obavljen unutar perioda od 24 sata prije preseljenja svinja,
 - biti u skladu s odredbama tačke A. stava 2.
2. Ako se radi o svinjama koje treba preseliti na drugo gazdinstvo, osim ispitivanja koje treba provesti u skladu s tačkom 1., u svim podjedinicama gazdinstva u kojima se drže svinje koje se sele potrebno je provesti klinički pregled svinja, uključujući mjerenje tjelesne temperature određenom broju svinja.

Minimalni broj svinja koje treba provjeriti mora s 95%-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje povišene tjelesne temperature u tim podjedinicama, ako je ona prisutna kod 10% svinja.
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 tačkom 1., 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 pouzdanošću omogućiti otkrivanje povišene tjelesne temperature u tim podjedinicama, ako je ona prisutna kod 20% svinja.
4. Kod usmrćivanja ili klanja svinja iz tačke 3., potrebno je od svinja koje potiču iz svake od podjedinica iz kojih se svinje sele, uzeti uzorke krvi za provedbu seroloških pretraživanja ili uzorke krvi ili organa, kao što su tonzile, slezena ili limfni čvorovi za provedbu viroloških testova.

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

Vrsta uzoraka koji se uzimaju za virološke testove i vrsta testa koji se koriste moraju biti u skladu s uputama Ureda koji mora voditi računa o rasponu testova koji se mogu primijeniti, o osjetljivosti tih testova te o epidemiološkoj situaciji.
5. Međutim, ukoliko se pri klanju ili usmrćivanju svinja otkriju klinički znakovi ili postmortem lezije koje ukazuju na ASK, odstupajući od tačke 4., primjenjuju se odredbe za uzorkovanje utvrđene u odjeljku C.
6. Odstupanja predviđena u članu 10. stavu (5) i članu 11. stavu (4) Pravilnika mogu se odobriti ukoliko nadležni organi entiteta i Brčko Distrikta BiH u saradnji s Uredom odrede da se šema intenzivnog uzorkovanja i testiranja primijeni također i na grupe svinja koje se provjeravaju i uzrokuju u skladu s tačkama 2., 3. i 4. U okviru te šeme minimalan broj uzoraka krvi koji treba uzeti mora s 95%-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 5%-tne seroprevalencije u dotičnoj grupi svinja.

E. POSTUPCI PROVJERE I UZORKOVANJA NA GAZDINSTVU PRI OBNOVI POPULACIJE

1. Kad se svinje ponovo dovode na gazdinstvo u skladu s članom 13. stavom (3) Pravilnika, primjenjuju se slijedeći postupci uzorkovanja:
 - uzorci krvi se uzimaju najranije 45 dana nakon ponovnog dovođenja svinja,
 - ako se na gazdinstvo dovode sentinel svinje, uzorci krvi moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja da

se s 95%-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 10%-tne seroprevalencije u svakoj podjedinici na gazdinstvu;

- ukoliko se obavlja obnova cjelokupne populacije, uzorci krvi za serološke testove moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja kako bi se 95%-tnom pouzdanošću omogućilo otkrivanje 20% seroprevalencije u svakoj podjedinici na gazdinstvu.
2. Kad se svinje ponovo dovode na gazdinstvo u skladu s članom 13. stavom (4) Pravilnika, primjenjuju se slijedeći postupci uzorkovanja:
 - uzorci krvi se uzimaju najranije 45 dana nakon ponovnog dovođenja svinja,
 - ako se na gazdinstvo dovode sentinel svinje, uzorci krvi moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja kako bi se 95%-tnom pouzdanošću omogućilo otkrivanje 5%-tne seroprevalencije u svakoj podjedinici na gazdinstvu;
 - ukoliko se obavlja obnova cjelokupne populacije, uzorci krvi za serološke testove moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja kako bi se 95%-tnom pouzdanošću omogućilo otkrivanje 10% seroprevalencije u svakoj podjedinici na gazdinstvu.

Zatim se postupak utvrđen u trećoj alineji gore, mora ponoviti najranije 60 dana nakon potpune obnove populacije.

3. Nakon svakog ponovnog dovođenja svinja, nadležni veterinarski inspektor mora narediti da se u slučaju bilo kakve bolesti ili smrti svinja na gazdinstvu radi nepoznatog razloga, dotične svinje odmah testiraju na ASK.

Ove se odredbe primjenjuju sve dok se za dotično gazdinstvo ne ukinu ograničenja kretanja svinja iz člana 13. stava (3) tačaka a) i b) i stava (4) Pravilnika.

F. POSTUPCI UZORKOVANJA NA GAZDINSTVIMA U ZARAŽENOM PODRUČJU PRIJE UKIDANJA OGRANIČENJA

1. Kako bi se u zaraženom području omogućilo ukidanje mjera iz člana 10. Pravilnika, na svim gazdinstvima u tom području:
 - treba provesti klinički pregled u skladu s postupcima utvrđenim u odjeljku A stavovima 2. i 3.
 - moraju se uzeti uzorci krvi za serološke testove u skladu s tačkom 2.
2. Minimalni broj uzoraka koji treba uzeti mora omogućiti da se 95%-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 10%-tne seroprevalencije kod svinja u svakoj podjedinici na gazdinstvu.

Međutim, odstupanja predviđena u članu 10. stavu (5) i članu 11. stavu (4) Pravilnika mogu se odobriti samo ukoliko nadležni organi entiteta i Brčko Distrikta BiH u saradnji s Uredom odrede da broj uzetih uzoraka krvi s 95%-tnom pouzdanošću omogućava otkrivanje 5%-tne seroprevalencije u svakoj podjedinici gazdinstva.

G. POSTUPCI UZORKOVANJA NA GAZDINSTVIMA U UGROŽENOM PODRUČJU PRIJE UKIDANJA OGRANIČENJA

1. Da bi se u ugroženom području mogle ukinuti mjere iz člana 11. Pravilnika, moraju se na svim gazdinstvima u toj zoni obaviti klinički pregled u skladu s postupcima utvrđenim odjeljkom A. stavom 2.

Osim toga, moraju se uzeti uzorci krvi za serološke testove od svinja:

 - na svim ostalim gazdinstvima za koje nadležni veterinarski inspektor smatra da je u njima potrebno uzorkovanje,
 - u svim centrima za sakupljanje sjemenja.
2. Kad se uzimanje uzoraka krvi za serološke testove provodi na gazdinstvima smještenim u ugroženom području, broj uzoraka krvi koji se moraju uzeti na tim gazdinstvima mora biti u skladu s odjeljkom F stavom 2., prvom rečenicom.

Međutim, odstupanja predviđena članom 10. stavom (5) i članom 11. stavom (4) Pravilnika mogu se odobriti samo ukoliko nadležni organi entiteta i Brčko Distrikta BiH u saradnji s Uredom odrede da se uzorci krvi za serološke testove uzmu na svakom gazdinstvu u toj zoni. Minimalan broj uzetih uzoraka krvi mora s 95%-tnom pouzdanošću omogućavati otkrivanje 5%-tne seroprevalencije u svakoj podjedinici gazdinstva.

H. POSTUPCI SEROLOŠKOGA NADZORA I UZORKOVANJA U PODRUČJIMA NA KOJIMA SE SUMNJA U POJAVU AFRIČKE SVINJSKE KUGE ILI JE AFRIČKA SVINJSKA KUGA POTVRĐENA KOD DIVLJIH SVINJA

1. U slučaju serološkog nadzora divljih svinja u područjima u kojima je potvrđena afrička svinjska kuga ili se na nju sumnja, treba prethodno utvrditi veličinu i geografsko područje ciljane populacije od koje će se uzimati uzorci kako bi se odredio broj uzoraka koje treba uzeti. Veličina uzorka određuje se prema procijenjenom broju živih životinja, a ne prema broju ustrijeljenih životinja.
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 djelotvorno sprječavaju velika i stalna kretanja životinja. Ako takvih okolnosti nema ili se radi o velikim područjima, preporučuje se da se za uzimanje uzoraka odrede područja veličine od oko 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 pouzdanošću omogućiti otkrivanje 5%-tne seroprevalencije. U tu je svrhu potrebno uzeti uzorke od najmanje 56 životinja sa svakog utvrđenog područja.
4. Uzimanje uzoraka od divljih svinja koje su ustrijeljene ili su pronađene uginule, za potrebe viroloških testova, obavlja se na način utvrđen u Poglavlju V. Odjeljku B. stavu 1. Ukoliko se smatra da je potreban virološki nadzor ustrijeljenih divljih svinja, on se provodi prvenstveno na životinjama starosti do jedne godine.
5. Svi uzorci koji se upućuju u laboratoriju moraju biti praćeni upitnikom iz člana 16. stava (4) tačke h) Pravilnika.

Poglavlje V.

Opći postupci i kriteriji za prikupljanje i prijevoz uzoraka

A. OPĆI POSTUPCI I KRITERIJI

1. Prije obavljanja uzorkovanja na sumnjivom gazdinstvu, mora se pripremiti nacrt tog gazdinstva te se moraju utvrditi 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. Svi se uzorci šalju u laboratoriju, praćeni odgovarajućim obrascima, u skladu sa zahtjevima koje određuje Ured. Ti obrasci moraju sadržavati historijske podatke o svinjama od kojih su uzeti uzorci te zapažene kliničke znakove ili post-mortem lezije.
Ako se radi o svinjama koje se drže na gazdinstvu, treba dati jasne podatke o starosti, kategoriji i gazdinstvu porijekla svinja od kojih su uzeti uzorci. Preporučuje se da se za svaku svinju od koje se uzima uzorak zabilježi njezino mjesto na gazdinstvu zajedno s njenom jedinstvenom identifikacijskom oznakom.

B. PRIKUPLJANJE UZORAKA ZA VIROLOŠKE TESTOVE

1. Za otkrivanje virusa, antigena ili genoma ASK-a kod uginulih ili eutanaziranih svinja, najprikladniji uzorci su

tkiva tonzila, limfnih čvorova (gastrohepatalnih, bubrežnih, submandibularnih i retrofaringealnih) slezene, bubrega i pluća. U slučaju lešina u raspadu, primjeren uzorak je cijela duga ili prsna kost.

2. Uzorci nezgružane i/ili zgružane krvi moraju se uzeti od svinja koje pokazuju znakove povišene tjelesne temperature ili druge znakove bolesti u skladu s uputama Ureda.

C. PRIJEVOZ UZORAKA

1. Preporučuje se da se svi uzorci:
 - pravilno označe,
 - prevoze i pohrane u nepropusnim spremnicima,
 - drže na hladnom na temperaturi hladnjaka, međutim, ukoliko se očekuje da će uzorci stići u laboratoriju za više od 48 sati, treba od laboratorije zatražiti upute u pogledu najprikladnijih temperaturnih uslova tokom prijevoza,
 - isporučiti laboratoriji što je brže moguće,
 - drže u pakiranju u kojem se za održavanje niske temperature koriste ledeni ulošci ili suhi led,
 - da se uzorci tkiva i organa smjeste u zasebne, zapečaćene i propisno označene plastične vrećice. One se zatim smještaju u veće spremnike i oblože dovoljnom količinom upijajućeg materijala za zaštitu od oštećenja i za upijanje u slučaju curenja,
 - kad god je to moguće, da ih odgovorno lice preveze direktno u laboratoriju kako bi se osigurao brz i pouzdan prijevoz.
2. Vanjska strana paketa mora biti označena adresom odredišne laboratorije i mora biti vidljivo istaknuta slijedeća poruka: "Životinjski patološki materijal; pokvarljivo; lomljivo; ne otvarati izvan laboratorije za ASF."
3. Odgovorno lice u prijemnoj laboratoriji mora biti pravovremeno obaviješteno o vremenu stizanja uzoraka.
4. Za zračni prijevoz uzoraka u Referentnu laboratoriju OIE/EU za ASK, paket mora biti označen u skladu s propisima IATA-e.

Poglavlje VI.

Načela i upotreba viroloških testova i ocjena njihovih rezultata

A. OTKRIVANJE VIRUSNOG ANTIGENA

1. Direktni imunofluorescentni test (DIFT)
Načelo ovog testa je mikroskopsko otkrivanje virusnog antigena u brisevima ili tankim kriostatским rezovima tkiva svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom ASK-a. Intracelularni antigeni se otkrivaju upotrebom specifičnih antitijela konjugiranih s fluorescein izotiocijanatom (FIT). U citoplazmi zaraženih ćelija pojavljuju se fluorescentna inkluzijska tjelešca ili zrnca.

Prikladni organi su bubrezi, slezena i razni limfni čvorovi. Kod divljih svinja bi se također mogao upotrijebiti razmaz ćelija koštane srži, ako njihovi organi nisu dostupni ili se raspadaju.

Test se može izvesti u roku od dva sata. Budući da se uzorci organa mogu dobiti samo od mrtvih životinja, njegova je primjena za analitičke svrhe ograničena.

Ovaj je test vrlo osjetljiv za slučajeve akutne afričke svinjske kuge. Za subakutne ili hronične oblike, osjetljivost DIFT-a je samo oko 40%, vjerovatno radi prisutnosti kompleksa antigena-antitijela koji blokiraju reakciju s ASK konjugiranim antitijelima. Pouzdanost rezultata testa može biti ograničena radi dvojbenog bojenja, posebno ako nedostaje potrebno iskustvo u obavljanju ovog testa ili ako se testirani organi raspadaju.

2. ELISA za otkrivanje antigena

Virusni antigeni se također mogu otkriti upotrebom ELISA tehnike, ali ova se tehnika preporučuje samo za akutne oblike bolesti zbog svoje niske osjetljivosti kada su prisutni kompleksi antigena-antitijela. Osjetljivost ELISA-e za otkrivanje antigena mora biti dovoljno visoka kako bi dala pozitivan rezultat kod životinja koje pokazuju kliničke znakove akutnog ASK-a. U

svakom slučaju, preporučuje se da se ovaj test koristi samo kao test 'stada' zajedno s drugim virološkim testovima.

B. IZOLACIJA VIRUSA I IDENTIFIKACIJA POMOĆU HEMADSORPCIJSKOG TESTA (HAD)

1. Izolacija virusa zasniva se na inokulaciji materijala uzorka u prijemčive primarne ćelijske kulture tkiva organa svinja, monocite i makrofage. Najbolji uzorci za izolaciju virusa ASK-a su cjelovita krv i leukociti dobijeni iz nekoaguliranih uzoraka krvi ili organa navedenih u odjeljku A stavu 1. Ako je virus ASK-a prisutan u uzorku, on će se razmnožiti u ćelijama te će se u zaraženim ćelijama razviti karakterističan citopatološki efekt.
2. Metoda HAD se preporučuje za identifikaciju izolata virusa ASK-a radi njene visoke osjetljivosti i specifičnosti. HAD se zasniva na sposobnosti virusa ASK-a da se razmnožava u mikrofagima svinje i izaziva hemadsorpciju u prisutnosti eritrocita svinje. Oko zaraženih mikrofaga stvara se karakteristična 'rozeta' eritrocita. Međutim, manji broj divljih sojeva virusa ASK-a ne izaziva hemadsorpciju, ali oni proizvode citopatološki efekt. Ovi se sojevi mogu specifično identificirati upotrebom DIF testa na sedimentima ćelijskih kultura ili pomoću PCR-a.
3. Izolacija virusa je primjerenija za ispitivanje uzoraka malog broja životinja nego za masovan nadzor. Postupak izolacije virusa zahtijeva intenzivan rad i potrebna su jedan do tri dana da se dobiju rezultati. Postoji mogućnost da će za otkrivanje malih količina virusa u uzorku trebati dvije dodatne pasaže virusa. Ispitivanje tako može potrajati i desetak dana prije nego što se dobije konačni rezultat. Uzorci koji se raspadaju mogu za ćelijsku kulturu biti citotoksični, pa je njihova upotreba ograničena.
4. Izolacija virusa i identifikacija pomoću HAD-a preporučuje se kao referentni test za potvrđivanje pozitivnih rezultata prethodno obavljenih testova ELISA, PCR ili DIFT. Ova se metoda također preporučuje kada je ASK već potvrđen nekom drugom metodom, posebno u slučajevima primarnog izbijanja ili slučaja ASK-a.

Virusi ASK-a izolirani u mikrofagima svinje mogu se upotrijebiti za karakterizaciju virusa i molekularnu epidemiologiju.

5. Svi izolati virusa ASK-a iz svih primarnih izbijanja, iz primarnih slučajeva među divljim svinjama ili iz slučajeva u klaonicama ili u prijevoznim sredstvima moraju se genetski karakterizirati u referentnoj laboratoriji u Bosni i Hercegovini ili u referentnoj laboratoriji OIE/EU, u skladu s odjeljkom E.
U svakom slučaju, ovi se izolati virusa mogu poslati u Referentnu laboratoriju OIE/EU za sakupljanje virusa.

C. OTKRIVANJE VIRUSNOG GENOMA

1. Za otkrivanje virusnog genoma u uzorcima krvi, seruma, tkiva ili organa primjenjuje se polimerazno lančana reakcija (PCR). Mali djelići virusnog DNA umnožavaju se uz pomoć PCR-a do količine koju je moguće otkriti. Upotrebom starter-molekule iz visoko očuvanih regija genoma može se otkriti široki raspon izolata koji pripadaju svim poznatim genotipovima virusa, uključujući nehemadosrbirajuće viruse i izolate niske virulencije. Budući da se ovim testom otkriva samo genomski slijed virusa, PCR može biti pozitivan čak i kad se izolacijom virusa ne otkrije nikakav infektivni virus (npr. u raspadnutim tkivima ili na uzorcima svinja koje se oporavljaju ili svinja koje su se oporavile i postale klinički normalne).
2. PCR se može upotrijebiti na ograničenom broju pomno odabranih uzoraka uzetih od sumnjivih životinja. Ova se metoda preporučuje za uzorke organa koji su citotoksični, pa stoga nije moguća izolacija virusa (na primjer, uzorci od divljih svinja).
3. Materijal prikladan za dijagnozu PCR-om su organi opisani za izolaciju virusa i serum. PCR-om se mogu analizirati i homogenati krpelja.

4. PCR se može obaviti u jednom radnom danu. Zahtijeva odgovarajuću laboratorijsku opremu, zasebne prostorije i osposobljeno osoblje. Prednost je što se infektivni virus ne mora umnožavati u laboratoriji. PCR je vrlo osjetljiva metoda, ali pri njenom provođenju može lako doći do kontaminacije, što rezultira lažno pozitivnim rezultatima. Stoga su bitni strogi postupci nadzora kvaliteta.

D. PREPORUČENI VIROLOŠKI TESTOVI I OCJENA REZULTATA

Virološki testovi su bitni za potvrđivanje ASK-a.

Izolaciju virusa i HAD treba smatrati referentnim virološkim testovima i treba ih, prema potrebi, upotrebljavati kao potvrđne testove. Njihova se upotreba posebno preporučuje kada pozitivni rezultati DIF-a ili PCR-a nisu praćeni uočavanjem kliničkih znakova ili lezija uzrokovanih bolešću i u svim drugim sumnjivim slučajevima.

Međutim, primarno izbijanje ASK-a se može potvrditi ako su kod svinja utvrđeni klinički znakovi ili lezije uzrokovane bolešću i ako su najmanje dva posebna testa za otkrivanje antigena, genoma ili antitijela dala pozitivne rezultate na uzorcima uzetim od iste sumnjive svinje.

Sekundarno izbijanje ASK-a može se potvrditi ako su osim epidemiološke poveznice s potvrđenim izbijanjem ili slučajem kod predmetnih svinja otkriveni klinički znakovi ili lezije uzrokovane bolešću, a testovi za otkrivanje antigena, genoma ili antitijela su dali pozitivan rezultat. Primarni slučaj ASK-a kod divljih svinja može se potvrditi izolacijom virusa ili ako su najmanje dva testa za otkrivanje antigena, genoma ili antitijela dala pozitivne rezultate. Daljnji slučajevi ASK-a kod divljih svinja, za koje postoji epidemiološka poveznica s ranije potvrđenim slučajevima, mogu se potvrditi ako je test za otkrivanje antigena, genoma ili antitijela dao pozitivan rezultat.

E. GENETSKA KARAKTERIZACIJA IZOLATA VIRUSA ASK-a

1. Genetska karakterizacija izolata virusa ASK-a postiže se utvrđivanjem uzoraka restrikcijskih enzima i nukleotidnih sljedova pojedinih dijelova genoma virusa. Sličnost ovih restrikcijskih uzoraka ili sljedova sa sljedovima dobijenim iz ranijih izolata virusa može pokazivati da li su izbijanja bolesti uzrokovana virusima koji slijede evropski ili afrički molekularni model.

Genetska karakterizacija izolata virusa ASK-a je izuzetno važna za poboljšanje postojećeg znanja o molekularnoj epidemiologiji ASK-a i o genetskim varijacijama virusa. Molekularni podaci omogućavaju klasifikaciju novih izolata i pružaju informacije o njihovom mogućem porijeklu.

2. Ako molekularnu karakterizaciju virusa nije moguće u kratkom roku obaviti u referentnoj laboratoriji ili u bilo kojoj drugoj laboratoriji ovlaštenoj za dijagnosticiranje ASK-a, tada se izvorni uzorak ili izolat virusa mora što prije poslati na molekularnu karakterizaciju u Referentnu laboratoriju OIE/EU.

Podaci dobijeni analizom restrikcijskih enzima i sljedova izolata virusa ASK-a kojima raspolažu laboratorije ovlaštene za dijagnosticiranje ASK-a moraju se prosljediti Referentnoj laboratoriji OIE/EU kako bi bili uneseni u postojeće baze podataka ove laboratorije.

Poglavlje VII.

Načela i upotreba seroloških testova i ocjena njihovih rezultata

A. OSNOVNA NAČELA I DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST

1. Utvrđivanje antitijela specifičnih za ASK preporučuje se kod subakutnih i hroničnih oblika, kao i za programe opsežnog testiranja i iskorjenjivanja ASK-a, iz više razloga:
 - (i.) antitijela se kod zaražene svinje brzo stvaraju. Kod tih svinja se antitijela obično mogu otkriti u uzorcima seruma od sedam do deset dana nakon infekcije;

- (ii.) ne postoji cjepivo protiv ASK-a- To znači da stvaranje antitijela specifičnih za ASK uzrokuje samo infekcija virusom ASK-a;
- (iii.) dugotrajna reakcija stvaranja antitijela. Kod svinja koje su preboljele ovu bolest, specifična antitijela mogu se u visokim nivoima otkriti tokom nekoliko sljedećih mjeseci, a kod nekih od tih svinja i doživotno.
- Tokom prvih sedmica života, kod prasadi se mogu naći antitijela specifična za ASK porijeklom od majke. Poluživot majčinih antitijela kod prasadi iznosi oko tri sedmice. Ako se ustanove kod prasadi starije od tri mjeseca, vrlo je malo vjerovatno da su ta antitijela ASK-a porijeklom od majke.
2. Utvrđivanje antitijela protiv virusa ASK-a u serumu ili plazmi iz dostavljenih organa provodi se kao pomoć pri dijagnosticiranju ASK-a na sumnjivim gazdinstvima za određivanje datuma unošenja zaraze u slučaju potvrđenog izbijanja i za potrebe praćenja i nadzora.
- Mjesto na gazdinstvu na kojem se nalaze seropozitivne svinje može ponuditi vrijedne informacije o tome kako i gdje je virus ASK-a ušao na gazdinstvo.
- Međutim, u okviru istraživanja koja se provode u slučaju sumnje na ASK ili potvrđenog ASK-a, u skladu s članom 8. Pravilnika, mora se provesti precizna procjena rezultata seroloških testova, uzevši u obzir sve kliničke, virološke i epidemiološke nalaze.
- B. PREPORUČENI SEROLOŠKI TESTOVI**
1. Testovi izbora za serološko potvrđivanje dijagnoze ASK-a su ELISA, indirektni imunofluorescentni test (IIFT) i imunobloting test (IB).
- Kvalitet i djelotvornost serološke dijagnostike, koju izvide ovlaštene dijagnostičke laboratorije, treba redovno provjeravati u okviru međulaboratorijskog uporednog testiranja koje periodično organizira Referentna laboratorija OIE/EU.
2. ELISA je najpouzdaniji i najkorisniji test za velika serološka istraživanja. Temelji se na otkrivanju antitijela protiv virusa ASK-a, koji se vežu na virusne proteine, koji se vezuju na čvrstu podlogu dodavanjem proteina A konjugiranog s enzimom, koji proizvodi vidljivu reakciju boje pri reakciji s odgovarajućim supstratom.
3. Ovlaštene dijagnostičke laboratorije moraju redovno obavljati nadzor kvaliteta osjetljivosti i specifičnosti svake serije ELISA reagensa, koristeći pri tom paletu referentnih seruma koji su pripremljeni u Referentnoj laboratoriji OIE/EU. Oni uključuju:
- serume svinja u ranom stepenu zaraze virusom ASK-a (manje od 17 dana od početka zaraze),
 - serume svinja u rekonvalescenciji (više od 17 dana nakon zaraze).
- Test ELISA koji se upotrebljava za serološko dijagnosticiranje ASK-a mora otkrivati sve referentne serume dobijene od svinja koje se oporavljaju. Svi rezultati dobijeni referentnim serumima moraju biti ponovljivi.

- Preporučuje se također otkrivanje svih pozitivnih seruma iz ranih stadija. Rezultati dobijeni referentnim serumima, uzetim od svinja u ranoj fazi zaraze, pokazatelj su osjetljivosti testa ELISA.
4. IIFT je brza tehnika s visokom osjetljivošću i specifičnošću za otkrivanje antitijela ASK-a iz seruma ili iz tkivnog eksudata. Temelji se na otkrivanju antitijela ASK-a koja se vežu na monosloj MS ćelija zaraženih prilagođenim virusom ASK-a. Reakcija antitijela i antigena otkriva se proteinom A, obilježenim fluorescinom. Pozitivni uzorci pokazuju specifičnu fluorescenciju u blizini jezgre zaraženih ćelija. Kombinirana upotreba testova DIFT i IIFT za testiranje organa, krvi i eksudata, uzetih od životinja koje pokazuju kliničke znakove ASK-a, može omogućiti brzo i pouzdano potvrđivanje bolesti.
5. IB test je visoko specifična i osjetljiva metoda koja se zasniva na upotrebi nitroceluloznih traka koje sadrže virusne proteine kao antigene. Specifična reakcija antitijela i antigena otkriva se dodavanjem konjugata proteina A-peroksidaze i odgovarajućeg supstrata. Vrlo je koristan za testiranje seruma koji primjenom ELISA-e nisu dali sigurne rezultate.

Poglavlje VIII.

Minimalni sigurnosni uslovi za laboratorije za ASK

1. Minimalne uslove utvrđene u Tabeli 1. moraju ispunjavati sve laboratorije u kojima se virus ASK-a razmnožava u ćelijskim kulturama. Međutim, postmortem pregledi, priprema uzoraka za DIFT ili PCR i serologija kod koje se koriste inaktivirani antigeni, mogu se izvoditi na nižem nivou kontrole kontaminacije, uz uslov da su ispunjeni osnovni uslovi iz Tabele 1., da se primjenjuju osnovna higijenska načela te da se nakon rada obavi dezinfekcija sa sigurnim odlaganjem lešina, tkiva i seruma.
2. Uslove utvrđene Tabelom 2. moraju ispunjavati sve laboratorije u kojima se životinje cijepu virusom ASK-a.
3. Sve zalihe virusa ASK-a moraju se držati sigurno pohranjene, bilo duboko zamrznute ili biofilizirane. Svaka pojedina ampula mora se jasno označiti te treba voditi opsežne evidencije o zalihama virusa zajedno s datumima i rezultatima provedenih provjera kvaliteta. Također treba voditi evidenciju virusa pridodanih zalihi koja mora sadržavati pojedinosti o izvoru, a evidencija se mora voditi i o virusima koji su izdati drugim laboratorijima.
4. Preporučuje se da se biosigurnosna jedinica za rad s virusom ASK-a dodatno osigura okolnim prostorijama u kojima se ne rukuje virusom ASK-a. Te druge prostorije moraju biti na raspolaganju za pripremanje staklenog posuđa i medija, za održavanje i pripremu nezaraženih ćelijskih kultura, za obradu seruma i seroloških testova (osim metoda koje koriste žive viruse ASK-a), te za upravo i uredske poslove.

Tabela 1.

Načela biološkog okruženja prikladnog za dijagnostičke laboratorije

	Minimalni uslovi	Dodatni uslovi
Opće okruženje	Normalan atmosferski pritisak. Namjenske prostorije čija je upotreba ograničena na određene postupke.	Normalan atmosferski pritisak. Jedna HEPA filtracija izduvnog zraka. Namjenske prostorije koje se koriste isključivo za postupke dijagnosticiranja klasične svinjske kuge ili ASK-a. Obrada potencijalno kontaminiranih otpadnih voda kako bi se inaktivirao virus ASK-a (toplinski ili hemijski)
Laboratorijska radna odjeća	Namjenska kuta koja se koristi samo u jedinici za rad s virusima ASK-a. Rukavice za jednokratnu upotrebu za svako rukovanje sa zaraženim materijalom. Prije iznošenja iz jedinice kuta se sterilizira ili se pere na visokoj temperaturi u samoj jedinici	Potpuno presvlačenje prije ulaska. Laboratorijska odjeća se koristi samo u jedinici za rad s virusom ASK-a. Rukavice za jednokratnu upotrebu za svako rukovanje sa zaraženim materijalom. Prije iznošenja iz jedinice odjeća se sterilizira ili se pere na visokoj temperaturi u samoj jedinici.
Nadzor osoblja	Ulazak u jedinicu dozvoljen je samo obučenom osoblju koje ima dozvolu za ulaz. Pri odlasku iz jedinice, ruke se peru i dezinficiraju. Nakon napuštanja jedinice, osoblju je 48 sati zabranjen ulazak u prostorije u kojima se nalaze svinje.	Ulazak u jedinicu dozvoljen je samo obučenom osoblju koje ima dozvolu za ulaz. Pri odlasku iz jedinice, ruke se peru i dezinficiraju. Nakon napuštanja jedinice, osoblju je 48 sati zabranjen ulazak u prostorije u kojima se nalaze svinje.

Oprema	Biološki sigurnosni ured (klasa I. ili II.) koji se koristi za sva rukovanja živim virusima. Ured treba imati dvostruko HEPA filtriranje izduvnog zraka. Sva oprema potrebna za laboratorijske postupke mora biti dostupna unutar namjenskih laboratorijskih prostorija.
--------	--

Tabela 2.

Biosigurnosni uslovi za prostorije za ogledne životinje

	Uslovi
Opće okruženje	Ventilacija kontrolirana negativnim pritiskom. Jedno HEPA filtriranje izduvnog zraka. Oprema za potpunu dekontaminaciju ili fumigaciju na kraju ogleda. Sve otpadne vode i čvrsti otpad obrađuju se radi inaktiviranja virusa ASK-a (toplinski/spaljivanjem ili hemijski).
Laboratorijska odjeća	Potpuno presvlačenje pri ulasku. Prije iznošenja iz jedinice, odjeća se sterilizira ili se pere na visokoj temperaturi u samoj jedinici.
Nadzor osoblja	Ulazak u jedinicu dozvoljen samo obučenom osoblju koje ima dozvolu za ulaz. Odjeća se ostavlja unutar prostorija prije tuširanja. Potpuno tuširanje pri izlasku iz jedinice. Nakon napuštanja jedinice, osoblju je 48 sati zabranjen ulazak u prostorije u kojima se nalaze svinje.
Oprema	Sva oprema potrebna za postupke sa životinjama mora biti dostupna u samoj jedinici. Sav materijal mora se prije iznošenja iz jedinice sterilizirati ili, ako se radi o uzorcima životinja, dvostruko omotati u nepropusni spremnik čija je površina dezinficirana radi prijevoza u laboratoriju za ASK.
Životinje	Sve životinje se moraju zaklati prije napuštanja jedinice, postmortem pregledi se moraju obaviti unutar biosigurnosnog područja, a trupla se po završetku pregleda moraju spaliti.