Ovaj je dokument samo dokumentacijska pomoć za čiji sadržaj institucije ne preuzimaju odgovornost.

►B

ODLUKA KOMISIJE 2002/106/EZ

od 1. veljače 2002.

o odobravanju Dijagnostičkog priručnika u kojem se utvrđuju dijagnostički postupci, metode uzorkovanja i mjerila za ocjenjivanje laboratorijskih testova za potvrdu prisutnosti klasične svinjske kuge

(priopćena pod brojem dokumenta C(2002) 381)

(Tekst značajan za EGP)

(2002/106/EZ)

(SL L 39, 9.2.2002., str. 71)

Promijenila:

		Službeni list		
		br.	stranica	datum
►M1	Odluka Komisije 2003/859/EZ od 5. prosinca 2003.	L 324	55	11.12.2003

▼B

ODLUKA KOMISIJE 2002/106/EZ

od 1. veljače 2002.

o odobravanju Dijagnostičkog priručnika u kojem se utvrđuju dijagnostički postupci, metode uzorkovanja i mjerila za ocjenjivanje laboratorijskih testova za potvrdu prisutnosti klasične svinjske kuge

(priopćena pod brojem dokumenta C(2002) 381)

(Tekst značajan za EGP)

(2002/106/EZ)

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske ekonomske zajednice,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 2001/89/EZ od 23. listopada 2001. o mjerama Zajednice za kontrolu klasične svinjske kuge ([1]), a posebno njezin članak 17. stavak 3. i članak 29. stavak 1.,

budući da:

(1) Na razini Zajednice treba utvrditi dijagnostičke postupke, metode uzorkovanja i mjerila za ocjenu rezultata laboratorijskih testova za potvrdu prisutnosti klasične svinjske kuge.

(2) Prilog IV. Direktivi 2001/89/EZ utvrđuje radnje i zadaće referentnog laboratorija Zajednice u odnosu na klasičnu svinjsku kugu kako bi, u savjetovanju s Komisijom, uskladio metode koje države članice koriste za postavljanje dijagnoze te bolesti; te radnje i zadaće uključuju i organiziranje periodičnih usporednih testova i opskrbu standardnim reagensima na razini Zajednice.

(3) Virus klasične svinjske kuge ne smatra se opasnim za zdravlje ljudi.

(4) Nedavno su razvijeni laboratorijski testovi kako bi se osiguralo brzo postavljanje dijagnoze klasične svinjske kuge.

(5) Iskustvo u kontroliranju klasične svinjske kuge, stečeno posljednjih godina, omogućilo je određivanje najprikladnijih metoda uzorkovanja i mjerila za ocjenjivanje rezultata laboratorijskih testova radi postavljanja pravilne dijagnoze te bolesti u različitim situacijama.

(6) Mjere predviđene ovom Odlukom u skladu su s mišljenjem Stalnog veterinarskoga odbora,

DONIJELA JE OVU ODLUKU:

Članak 1.

1. Države članice moraju osigurati da se potvrda nazočnosti klasične svinjske kuge temelji na:

a) kliničkim znakovima i *post mortem* nalazu;

([1]) SL L 316, 1.12.2001., str. 5.

▼B

b) otkrivanju virusa, virusnih antigena ili genoma u uzorcima tkiva, organa, krvi ili tjelesnih izlučevina svinja;

c) postojanju specifične reakcije protutijela u krvnom uzorku,

u skladu s postupcima, metodama uzimanja uzoraka i mjerilima za ocjenjivanje rezultata testova utvrđenim u Priručniku priloženom ovoj Odluci.

2. Nacionalni dijagnostički laboratoriji iz točke 1. Priloga III Direktivi 2001/89/EZ mogu izmijeniti laboratorijske testove iz Priručnika priloženog ovoj Odluci ili se mogu upotrijebiti različiti testovi, pod uvjetom da je njima moguće prikazati jednaku osjetljivost i specifičnost.

Osjetljivost i specifičnost takvih izmijenjenih ili različitih testova ocjenjuju se u okviru periodičnih usporednih testova koje za klasičnu svinjsku kugu organizira referentni laboratorij Zajednice za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge.

Članak 2.

Prilozi I. i IV. Direktivi Vijeća 80/217/EEZ od 22. siječnja 1980. o uvođenju mjera Zajednice za kontrolu klasične svinjske kuge ([1]), kako je zadnje izmijenjena Aktom o pristupanju Republike Austrije, Republike Finske i Kraljevine Švedske, stavljaju se izvan snage.

Članak 3.

Ova se Odluka primjenjuje od 1. studenoga 2002.

Članak 4.

Ova je Odluka upućena državama članicama.

([1]) SL L 47, 21.2.1980., str. 11.

▼B

PRILOG

PRIRUČNIK ZA DIJAGNOZU KLASIČNE SVINJSKE KUGE

POGLAVLJE I.

Uvod, ciljevi i definicije

1. Kako bi se osigurali ujednačeni postupci dijagnoze klasične svinjske kuge, ovim se Priručnikom:

   a) daju smjernice i najmanji uvjeti dijagnostičkih postupaka, metode uzorkovanja te mjerila za ocjenjivanje rezultata kliničkih i *post mortem* ispitivanja i laboratorijskih testova za postavljanje pravilne dijagnoze klasične svinjske kuge ([1]);

   b) određuju najmanji bio-sigurnosni uvjeti i norme kakvoće kojih se treba pridržavati u laboratorijima za postavljanje dijagnoze klasične svinjske kuge i prilikom prijevoza uzoraka;

   c) određuju laboratorijski testovi koji će se koristiti za dijagnozu klasične svinjske kuge i laboratorijske tehnike za genetsku tipizaciju virusnih izolata klasične svinjske kuge.

2. Ovaj je Priručnik namijenjen prvenstveno nadležnim tijelima odgovornim za kontrolu klasične svinjske kuge. Naglasak je stoga na načelima i primjeni laboratorijskih testova i ocjenjivanju njihovih rezultata, a ne na pojedinostima laboratorijskih tehnika.

3. Za potrebe ovog Priručnika, osim definicija navedenih u članku 2. Direktive 2001/89/EZ, primjenjuju se sljedeće definicije:

   a) „sumnjivo gospodarstvo” znači svinjogojsko gospodarstvo na kojem se za jednu ili više svinja sumnja da su zaražene virusom klasične svinjske kuge ili kontaktno gospodarstvo, kako je određeno u članku 2. točki (v) Direktive 2001/89/EZ;

   b) „nespecifični reaktori” znači sve svinje koje su imale pozitivne rezultate seroloških testova na klasičnu svinjsku kugu, za koje se zna da nisu bile u dodiru s virusom klasične svinjske kuge i nema dokaza širenja zaraze na ostale svinje u kontaktu ([2]);

   c) „epidemiološka podjedinica” ili „podjedinica” znači zgrada, mjesto ili prostor na kojem se skupine svinja s gospodarstva drže na takav način da često dolaze u izravan ili neizravan međusoban kontakt, ali su istodobno odvojene od ostalih svinja s istog gospodarstva;

   d) „svinje u kontaktu” znači svinje koje su tijekom zadnjih 21 dana na gospodarstvu živjele u izravnom kontaktu s jednom ili više svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom klasične svinjske kuge.

POGLAVLJE II.

Opis klasične svinjske kuge s naglaskom na diferencijalnu dijagnostiku

A. **Uvod**

1. Uzročnik klasične svinjske kuge je RNK virus u ovojnici koji pripada pestivirusima porodice flavivirusa (Flaviviradae). Taj virus srodan je pestivirusima preživača koji su uzročnici BVDV-a (virusnog proljeva goveda) i tzv. borderske bolesti (BB). Ova srodnost ima i ozbiljne dijagnostičke posljedice, jer je moguća pojava unakrsnih reakcija, što može dovesti do lažnih pozitivnih rezultata laboratorijskih testova.

([1]) Prilikom odlučivanja o broju uzoraka koji se moraju uzeti za neko laboratorijsko ispitivanje također se mora uzeti u obzir osjetljivost testova. Broj životinja čiji uzorci će se uzimati mora biti veći od broja navedenog u ovom Priručniku ako osjetljivost testa koji će se upotrijebiti nije osobito visoka.

([2]) Nespecifični reaktori mogu imati titar virusnih neutralizacijskih protutijela u rasponu od graničnih (što je češće slučaj) do snažno pozitivnih. Prilikom ponovnog uzimanja uzorka pojedinačne oboljele životinje mogu iskazati smanjen ili stalan titar. Općenito promatrano, samo nekoliko svinja u krdu mogu prouzročiti takve lažne/pozitivne reakcije.

▼B

2. Virus klasične svinjske kuge razmjerno je stabilan u sekretima i ekskretima zaraženih svinja, svinjskim lešinama, svježem svinjskom mesu i proizvodima od svinjetine. Lako ga inaktiviraju deterdženti, otapala masti, proteaze i uobičajeni dezinficijensi.

3. Glavni prirodni putovi zaraze su oro-nazalni putovi, bilo izravnim ili neizravnim doticajem sa zaraženim svinjama, ili tovljenje hranom zaraženom virusom. U područjima gusto nastanjenim svinjama virus se lako širi među susjednim svinjogojskim gospodarstvima. Moguća je i zaraza putem sjemena zaraženih nerastova.

4. Inkubacija kod pojedinačnih životinja traje od sedam do deset dana, no u terenskim uvjetima moguće je da se na gospodarstvima simptomi pokažu tek dva do četiri tjedna od ulaska virusa u krdo, ili čak duže, ako se radi o odraslim rasplodnim svinjama ili o infekciji slabo virulentnim sojevima virusa.

5. Klinički znakovi klasične svinjske kuge mogu biti iznimno promjenjivi i moguće ih je zamijeniti s mnogim drugim bolestima. Ozbiljnost simptoma uglavnom ovisi o starosti životinje i o virulenciji virusa. Obično su teže pogođene mlade životinje od starijih. Kod starijih rasplodnih svinja tijek zaraze često je blag ili čak subklinički.

6. Razlikujemo akutni, kronični i prenatalni tijek klasične svinjske kuge.

B. **Akutni tijek**

1. Odbijena prasad i tovljenici najčešće pokazuju akutni tijek klasične svinjske kuge. Početni znakovi su: prestanak uzimanja hrane, tromost, vrućica, slijepljeni kapci, otečeni limfni čvorovi, teškoće kod disanja, zatvor nakon kojeg slijedi proljev.

   Tipična krvarenja na koži obično se uočavaju na ušima, repu, trbuhu i s unutarnje strane udova tijekom drugog i trećeg tjedna zaraze i traju do uginuća. Često se prepoznaju i neurološki znakovi, poput oduzetosti stražnjih udova, teturanja i grčeva.

   Stalno je prisutna vrućica. Tjelesna temperatura uglavnom je viša od 40 °C, no kod odraslih svinja ne mora prijeći 39,5 °C.

2. Klasična svinjska kuga izaziva tešku leukopeniju i imunosupresiju, što često dovodi do sekundarnih crijevnih i dišnih upala. Znakovi tih sekundarnih upala mogu prikriti ili preklopiti najučestalije znakove klasične svinjske kuge te dovesti poljoprivrednika ili veterinara u zabludu.

   Uginuće obično nastupa unutar mjesec dana. Ponekad dolazi i do oporavka i proizvodnje protutijela, i to najčešće kod odraslih rasplodnih životinja koje nisu pokazivale kliničke znakove teškog oboljenja. Protutijela na klasičnu svinjsku kugu mogu se utvrditi počevši od 2. i 3. tjedna nakon nastupanja zaraze.

3. Patološke promjene koje se uočavaju prilikom *post mortem* pregleda najčešće su na limfnim čvorovima i bubrezima. Limfni čvorovi su edematozni i hemoragični. Krvarenja bubrega mogu varirati od jedva vidljivih petehijalnih do ekhimotičnih hemoragija. Slična krvarenja uočavaju se i u mokraćnom mjehuru, grkljanu, na epiglotisu i srcu, te su ponekad proširena na serozama prsne i trbušne šupljine. Čest je negnojni encefalitis. Također su, kao posljedica sekundarnih infekcija, vidljive i patološke promjene što može dovesti veterinara u zabludu. Patognomonične promjene na slezeni smatraju se patološkim promjenama, ali se rijetko javljaju.

4. Općenito gledano, klinička i patološka slika akutnog tijeka afričke svinjske kuge vrlo je slična onom klasične svinjske kuge. Ako postoje, krvarenja na koži i ušima lako se uočavaju i upućuju na sumnju u akutnu afričku svinjsku kugu. Malo je drugih bolesti koje izazivaju slične promjene.

▼B

Na akutnu klasičnu svinjsku kugu mora se posumnjati i u slučaju kad postoji sumnja na vrbanac, reproduktivni i respiratorni sindrom svinja (RRSS), otrovanje kumarinom, purpurno krvarenje, sindrom kržljavosti odbite, sidrom dermatititsa i nefropatije svinja, infekciju salmonelom ili pasterelom ili na bilo koje druge sindrome u području trbušne šupljine ili na dišnim organima praćene povišenom tjelesnom temperaturom koji ne reagiraju na liječenje antibioticima.

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

C. **Kronični tijek**

1. Kronični tijek zaraze nastupa kad svinje nisu u stanju razviti odgovarajući imunosni odgovor na virus klasične svinjske kuge. Početni znakovi kronične zaraze slični su onima kod akutnoga oblika. Kasnije su prisutni pretežito nespecifični znakovi, npr. intermitentna vrućica, kronični enteritis i slabljenje životinja. Nema uobičajenog krvarenja na koži.

   Takve svinje kliničke znakove mogu pokazivati tijekom tri mjeseca prije ugibanja. Virus klasične svinjske kuge prenosi se bez prestanka, od pojave kliničkih znakova pa do smrti. U uzorcima seruma privremeno se mogu otkriti protutijela.

2. Patološke promjene nisu tako uobičajene, posebno se ne mogu uočiti krvarenja iz organa i seroze. Kod životinja s kroničnim proljevom, česte su lezije na ileumu, ileocekalnom području i rektumu.

3. Budući da su klinički znakovi kronične klasične svinjske kuge razmjerno nespecifični, za postavljanje diferencijalne dijagnoze potrebno je razmotriti mnoge druge bolesti. Vrućica se ne pojavljuje nužno kod svih oboljelih životinja, ali se barem kod nekih svinja na zaraženom gospodarstvu može uočiti.

D. **Prenatalni tijek i zakašnjela pojava znakova bolesti**

1. Virus klasične svinjske kuge u stanju je proći kroz posteljicu suprasnih krmača i zaraziti plodove, ali se kod krmača bolest često pokazuje u subkliničkom obliku.

   Ishod zaraze ploda kroz posteljicu uvelike ovisi o stupnju suprasnosti i virulenciji virusa. Zaraza u ranim stadijima trudnoće može završiti pobačajima ili prasenjem mrtvorođene prasadi, mumifikacijom ili malformacijom ploda. Sve to dovodi do smanjenja indeksa prasenja na gospodarstvu.

   Zaraza krmača do 90 dana suprasnosti može dovesti do prasenja trajno zarazne prasadi koja prilikom prasenja ne pokazuje kliničke znakove bolesti, a ugiba nakon nekoliko mjeseci. Moguće je da oni nakon rođenja sporije rastu, kopne ili povremeno pokazuje znakove kongenitalnog tremora. Ovakav se tijek zaraze naziva „zakašnjelom pojavom znakova klasične svinjske kuge”. Takva prasad može imati ključnu ulogu u širenju bolesti i preživljavanju virusa u nekoj svinjskoj populaciji, budući da izlučuje virus sve do ugibanja.

2. Prepoznavanje klasične svinjske kuge može biti posebno teško na gospodarstvima svinja za rasplod zato što tijek bolesti može biti vrlo blag i može ga se zamijeniti s mnogim drugim patološkim stanjima. Smanjenu plodnost i pobačaje može prouzročiti virus klasične svinjske kuge jednako kao i zaraza parvovirusom, RRSS, leptospiroza i bolest Aujeszkoga (lat. *Morbus Aujeszky*). Patološki je nemoguće razlikovati materijal pobačen zbog zaraze klasičnom svinjskom kugom od onoga pobačenog zbog nekoga drugog uzročnika.

   Ako postoji sumnja na neku zaraznu bolest reproduktivnog sustava, potrebno je odmah provesti pretrage na klasičnu svinjsku kugu kad god se dotično gospodarstvo može smatrati ugroženim. (npr. zbog smještaja gospodarstva u području u kojem se klasična svinjska kuga pojavljuje kod divljih svinja), a u svakom slučaju, čim je moguće isključiti uobičajenije zarazne bolesti reproduktivnog sustava.

▼B

POGLAVLJE III.

Smjernice s glavnim mjerilima prema kojima se neko gospodarstvo može smatrati sumnjivim na zarazu klasičnom svinjskom kugom

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

a) kliničkih i patoloških nalaza na svinjama. Glavni klinički i patološki nalazi koji se moraju razmotriti su:

   — vrućica s pojačanim pobolom i smrtnošću,

   — vrućica sa sindromom krvarenja,

   — vrućica s neurološkim simptomima,

   — vrućica nepoznatog podrijetla kod koje liječenje antibioticima nije uspjelo poboljšati zdravstveno stanje,

   — pobačaji i pojačani problemi vezani uz plodnost tijekom zadnja tri mjeseca,

   — kongenitalni tremor praščića,

   — kronično bolesne životinje,

   — mlade životinje zaostale u razvoju (kržljave),

   — petehijalna i ekhimotična krvarenja, posebno na limfnim čvorovima, bubrezima, slezeni, mokraćnom mjehuru i grkljanu,

   — infarkti ili krvni ugrušci (hematomi) na slezeni,

   — buton na debelom crijevu u kroničnim slučajevima, posebno pored ileocekalnog spoja;

b) epidemioloških nalaza. Glavni epidemiološki nalazi koji se moraju razmotriti su:

   — jesu li svinje bile u izravnom ili neizravnom kontaktu sa svinjogojskim gospodarstvom za koje je dokazano da je zaraženo klasičnom svinjskom kugom,

   — je li gospodarstvo isporučilo svinje za koje se naknadno pokazalo da su zaražene klasičnom svinjskom kugom,

   — jesu li su krmače umjetno oplođene sjemenom koje potječe od sumnjivog izvora,

   — je li bilo izravnih ili neizravnih kontakata s divljim svinjama iz populacije u kojoj se pojavljuje klasična svinjska kuga,

   — drže li se svinje na otvorenom u području u kojem su divlje svinje zaražene klasičnom svinjskom kugom,

   — jesu li svinje hranjene napojem, a postoji sumnja da se s tim napojem nije postupalo na način kojim se inaktivira virus klasične svinjske kuge,

   — je li moglo doći do izlaganja, npr. zbog toga što su neke osobe ili prijevozna sredstva ulazili u gospodarstvo itd;

c) nalaza koji se odnose na rezultate seroloških testova. Glavni laboratorijski nalazi koji se moraju uzeti u obzir su:

   — serološka reakcija prouzročena neopaženom zarazom virusom klasične svinjske kuge ili cijepljenjem ([1]),

   — međusobna reakcija između protutijela na klasičnu svinjsku kugu i na druge pestiviruse ([2]),

   — otkrivanje pojedinačnih nespecifičnih reaktora ([3]).

([1]) Ako su svinje cijepljene protiv klasične svinjske kuge konvencionalnim cjepivom, njihov nalaz može pokazati da su seropozitivne zbog samog cjepiva ili zbog latentne zaraze cijepljenih životinja.

([2]) U određenim uvjetima do 10 % svinja u jednome krdu može imati protutijela na pestiviruse preživača, uzročnike virusnog goveđeg proljeva i tzv. borderske bolesti. Na primjer, ako su svinje bile u izravnom dodiru s govedima ili ovcama zaraženima virusom BVD-a ili BD-a, ili ako su svinje bile u dodiru s materijalima zaraženim pestivirusima preživača.

([3]) U svim serološkim testovima koji se danas koriste za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge manji dio seruma daje lažne/pozitivne rezultate zbog nedostatne specifičnosti sustava testova ili zbog seruma uzetih od pojedinačnih oboljelih životinja.

▼B

POGLAVLJE IV.

Postupci provjere i uzimanja uzoraka

A. **Smjernice i postupci za klinički pregled i uzorkovanje svinja sa sumnjivih gospodarstava**

1. Države članice moraju osigurati provođenje odgovarajućih pregleda, uzorkovanja i laboratorijskih pretraga na sumnjivim gospodarstvima kako bi potvrdile ili isključile nazočnost klasične svinjske kuge u skladu sa smjernicama i postupcima utvrđenima u podstavcima od 2. do 7.

   Bez obzira jesu li usvojene mjere iz članka 4. stavka 2. Direktive 2001/89/EZ na dotičnom gospodarstvu, te se smjernice i postupci moraju također primjenjivati u slučajevima oboljenja kadgod se u diferencijalnoj dijagnozi bude razmatrala mogućnost klasične svinjske kuge. Tu spadaju i slučajevi kod kojih klinički znakovi i epidemiološki tijek bolesti koji se kod svinja promatraju, ukazuju tek na malu vjerojatnost da se radi o klasičnoj svinjskoj kugi.

   U svim ostalim slučajevima kad se sumnja da su jedna ili više svinja zaražene virusom klasične svinjske kuge, na dotičnom sumnjivom gospodarstvu moraju se usvojiti mjere iz članka 4. stavka 2. Direktive 2001/89/EZ.

   U slučaju sumnje na klasičnu svinjsku kugu u klaonici ili prijevoznom sredstvu, primjenjuju se *mutatis mutandi* smjernice i postupci utvrđeni podstavcima od 2. do 7.

2. Kad službeni veterinar posjećuje sumnjivo gospodarstvo kako bi potvrdio ili isključio klasičnu svinjsku kugu:

   — mora provjeriti registar proizvodnje i evidenciju o zdravstvenom stanju, ako su takve evidencije dostupne,

   — mora pregledati sve podjedinice na gospodarstvu radi odabira svinja koje će se klinički pregledati.

   Klinički pregled mora također uključivati mjerenje tjelesne temperature i mora se prvenstveno odnositi na sljedeće svinje ili skupine svinja:

   — bolesne i svinje koje slabije uzimaju hranu,

   — svinje koje su u rekonvalescenciji od kakve bolesti,

   — svinje koje su nedavno dovedene iz područja potvrđenih epidemija ili sa sumnjivih mjesta,

   — svinje koje su se držale u podjedinicama koje su u skorije vrijeme posjetili vanjski posjetitelji koji su nedavno bili u kontaktu sa svinjama za koje se sumnja da su zaražene, ili jesu zaražene, klasičnom svinjskom kugom ili za koje je utvrđeno da su imale druge izrazito rizične dodire s potencijalnim izvorom virusa klasične svinjske kuge,

   — svinje od kojih je već uzet uzorak i izvršeno serološko testiranje na klasičnu svinjsku kugu, ako rezultati tih testova ne dopuštaju da se isključi mogućnost klasične svinjske kuge, i svinje u kontaktu.

   Ako pregled sumnjivoga gospodarstva nije ukazao na nazočnost svinja ili skupina svinja iz gornjeg podstavka, nadležno tijelo mora, ne dovodeći u pitanje ostale mjere koje se primjenjuju na dotičnome gospodarstvu, u skladu s Direktivom 2001/89/EZ i uzimajući u obzir epidemiološku situaciju:

   — izvršiti dodatne preglede na dotičnome gospodarstvu u skladu s podstavkom 3. u nastavku, ili

   — osigurati uzimanje uzoraka krvi svinja s dotičnoga gospodarstva radi provedbe laboratorijskih testova. U tom se slučaju kao smjernice koriste postupci uzorkovanja utvrđeni podstavcima 5. i F.2, ili

▼B

— usvojiti ili zadržati mjere utvrđene u članku 4. stavku 2. Direktive 2001/89/EZ, ovisno o daljnjim pretragama na dotičnom gospodarstvu, ili

— isključiti mogućnost da se radi o klasičnoj svinjskoj kugi.

3. Kod upućivanja na ovaj stavak, klinički pregled na dotičnom gospodarstvu mora se provoditi na nasumično odabranim svinjama iz podjedinica za koje je utvrđeno ili se sumnja da postoji opasnost da je u njih unesen virus klasične svinjske kuge.

Najmanji broj svinja koji se mora pregledati mora omogućiti otkrivanje povišene tjelesne temperature s 95 %-tnom pouzdanošću, ako je ona prisutna kod 10 % jedinki u tim podjedinicama.

Međutim, ako se radi o:

— rasplodnim krmačama, najmanji broj pregledanih krmača mora omogućiti otkrivanje povišene tjelesne temperature s 95 %-tnom pouzdanošću, ako se ona pojavljuje kod 5 % jedinki,

— centrima za sakupljanje sjemena, mora se pregledati sve rasplodne neraste.

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

— su prije ugibanja pokazivale ili pokazuju očigledne znakove bolesti,

— imaju vrućicu,

— su uginule nedavno.

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

— u podjedinici, u kojoj su se držale uginule svinje ili svinje na umoru, obvezno se mora obaviti klinički pregled u skladu s podstavkom 3. te uzorkovati krv u skladu s podstavkom 5., i

— mogu se obaviti i pregledi *post mortem* na 3 do 4 svinje u kontaktu.

Bez obzira na prisutnost ili izostanak bolesnih promjena koje ukazuju na klasičnu svinjsku kugu, obavezno se mora, radi obavljanja viroloških testova u skladu s poglavljem V. odjeljkom B. podstavkom 1., od svinja podvrgnutih pregledu *post mortem*, uzeti uzorke organa ili tkiva. Preporuča se da to budu uzorci od nedavno uginulih svinja.

Prilikom obavljanja pregleda *post mortem* nadležno tijelo mora osigurati:

— poduzimanje potrebnih mjera predostrožnosti i higijenskih mjera radi sprečavanja širenja bolesti, i

— da svinje, ako se radi o svinjama na umoru, budu usmrćene na human način u skladu s Direktivom Vijeća 93/119/EEZ.

5. Ako se na sumnjivom gospodarstvu otkriju daljnji klinički znakovi ili bolesne promjene koji bi mogli ukazivati na klasičnu svinjsku kugu, a nadležno tijelo ocijeni da ti nalazi nisu dostatni da se potvrdi epidemija klasične svinjske kuge te da se stoga mora provesti laboratorijske testove, tada se od sumnjivih svinja i od drugih svinja u svakoj od podjedinica u kojima se drže sumnjive svinje, u skladu s postupcima utvrđenima u nastavku, moraju uzeti uzorci krvi za serološku pretragu.

Najmanji broj uzoraka koji se uzimaju za serološke testove mora s 95 %-tnom sigurnošću omogućiti otkrivanje 10 %-tne seroprevalencije (protutijela/prokuženosti) u dotičnoj podjedinici.

▼B

Međutim, ako se radi o:

— rasplodnim krmačama, najmanji broj krmača kojima se uzimaju uzorci mora s 95 %-tnom pouzdanošću ([1]) omogućiti otkrivanje 5 %-tne seroprevalencije,

— centrima za sakupljanje sjemena, uzorci krvi moraju se uzeti od svih rasplodnih nerasta.

Broj uzoraka koji se uzima za virološke testove mora biti usklađen s naputcima nadležnog tijela, koji moraju voditi računa o rasponu testova koje je moguće obaviti, o osjetljivosti laboratorijskih testova koji će se koristiti i o postojećem epidemiološkom stanju.

6. Ako je sumnja u prisutnost klasične svinjske kuge na dotičnom gospodarstvu povezana s rezultatima ranijih seroloških testova, osim uzimanja uzoraka krvi svinja navedenih u stavku 2., drugom podstavku, petoj alineji, primjenjuje se i sljedeći postupak:

a) ako su seropozitivne svinje ujedno i bređe krmače, neke od njih, po mogućnosti najmanje tri, eutanazirat će se i podvrgnuti pregledu *post mortem*. Prije nego se krmače usmrte moraju im se uzeti uzorci krvi za daljnje serološke testove. Fetusi se podvrgavaju pregledu na virus klasične svinjske kuge, virusni antigen ili genom virusa u skladu s poglavljem VI. radi otkrivanja intrauterine infekcije;

b) ako su seropozitivne svinje krmače koje doje prasad, svoj prasadi moraju se uzeti uzorci krvi i podvrgnuti ih pregledu na virus klasične svinjske kuge, virusni antigen ili gemom virusa kako se navodi u poglavlju VI. Uzorci krvi moraju se uzeti i krmačama te ih uputiti na daljnje serološke testove.

7. Ako nakon obavljenih pregleda na sumnjivom gospodarstvu nisu otkriveni klinički znakovi koji ukazuju na prisutnost klasične svinjske kuge, a nadležno tijelo ocijeni da treba provesti daljnje laboratorijske testove kako bi se klasična svinjska kuga isključila, prilikom uzimanja uzoraka krvi kao smjernice će se upotrijebiti postupci utvrđeni u podstavku 5.

B. **Postupci uzimanja uzoraka na gospodarstvu prilikom usmrćivanja svinja nakon što je bolest potvrđena**

1. U svrhu utvrđivanja načina na koji je virus klasične svinjske kuge unesen na zaraženo gospodarstvo i vremena koje je proteklo od njegovog unošenja, prilikom ubijanja svinja na imanju, nakon što je izbijanje bolesti potvrđeno u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) Direktive 2001/89/EZ, svinjama se radi obavljanja seroloških testova moraju nasumično uzeti uzorci krvi.

2. Najmanji broj svinja čiji se uzorci uzimaju mora biti dovoljan da se kod svinja u svim podjedinicama na gospodarstvu s 95 %-tnom pouzdanošću otkrije 10 %-tna seroprevalencija ([2]).

Uzorci za virološke testove mogu se uzimati i u skladu s uputama nadležnog tijela u kojima treba voditi računa o rasponu testova koje je moguće provesti, o osjetljivosti laboratorijskih testova koji će se koristiti kao i postojećoj epidemiološkoj situaciji.

3. Međutim, u slučaju sekundarnih epidemija, nadležno tijelo može odlučiti odstupiti od podstavaka 1. i 2. te odrediti *ad hoc* postupke uzorkovanja, pri čemu treba voditi računa o već raspoloživim epidemiološkim podacima na izvorištu, o načinima na koji je virus unesen u gospodarstvo i o mogućnostima da se bolest s njega raširi.

([1]) U nekim slučajevima, npr. kad se sumnja na nazočnost klasične svinjske kuge na gospodarstvu s ograničenim brojem mladih svinja, postotak zaraženih krmača može biti vrlo malen. U tom se slučaju moraju uzeti uzorci od većeg broja krmača.

([2]) Ako je, međutim, primijenjeno odstupanje predviđeno člankom 6. stavkom 1. Direktive 2001/89/EZ, uzimanje uzoraka mora se odnositi na one podjedinice na gospodarstvu u kojima su svinje bile usmrćene, ne dovodeći u pitanje nastavak pregleda i uzimanja uzoraka koje će se vršiti na ostatku svinja na gospodarstvu u skladu s naputcima nadležnog tijela.

▼B

C. **Postupci uzimanja uzoraka od svinja usmrćenih u okviru preventivnih mjera na sumnjivom gospodarstvu**

1. Radi potvrde ili odbacivanja nazočnosti klasične svinjske kuge i radi stjecanja novih epidemioloških podataka, kad se svinje na sumnjivome gospodarstvu usmrćuju u okviru preventivne mjere u skladu s odredbama članka 4. stavka 3. točke (a) ili članka 7. stavka 2. Direktive 2001/89/EZ, moraju se, u skladu s postupkom utvrđenim podstavkom 2., radi seroloških testova uzeti uzorci krvi, te radi viroloških testova uzorci krvi i krajnika.

2. Uzorci se prvenstveno uzimaju od:

— svinja koje pokazuju bolesne promjene *post mortem* što upućuje na nazočnost klasične svinjske kuge te od svinja u kontaktu,

— drugih svinja koje su mogle biti u rizičnom doticaju sa zaraženim svinjama ili onima za koje se sumnja da su zaražene virusom klasične svinjske kuge, ili svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom klasične svinjske kuge.

Uzorci tih svinja uzimaju se u skladu s naputcima nadležnog tijela, a oni moraju voditi računa o postojećem epidemiološkom stanju. U tom slučaju, kao smjernice se koriste postupci uzimanja uzoraka utvrđeni u drugom, trećem i četvrtom podstavku nastavka.

Nadalje, svinjama podrijetlom iz svake od podjedinica na gospodarstvu moraju se nasumično uzeti uzorci ([1]). U tom slučaju, minimalan broj uzoraka koji se uzimaju za serološke testove mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 10 %-tne seroprevalencije u dotičnoj podjedinici.

Međutim, ako se radi o:

— rasplodnim krmačama, najmanji broj krmača od kojih se uzimaju uzorci mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 5 %-tne seroprevalencije ([2]),

— centru za sakupljanje sjemena, uzorci krvi moraju se uzeti od svih nerasta.

Vrsta uzoraka koji se uzimaju za virološke testove i vrsta testa koji se koristi moraju biti u skladu s uputama nadležnog tijela, a oni moraju voditi računa o rasponu testova koje je moguće izvesti, o osjetljivosti tih testova, te o postojećoj epidemiološkoj situaciji.

D. **Postupci provjere i uzorkovanja prije izdavanja odobrenja za preseljenje svinja iz gospodarstava smještenih u zaraženom ili ugroženom području i u slučaju da su te svinje zaklane ili usmrćene**

1. Ne dovodeći u pitanje odredbe drugog podstavka članka 11. stavka 1. točke (f) Direktive 2001/89/EZ, kako bi se u skladu s člankom 10. stavkom 3. navedene Direktive odobrilo preseljenje svinja s gospodarstava smještenih u zaraženom ili ugroženom području, klinički pregled koji vrši ovlašteni veterinar mora:

— biti obavljen unutar roka od 24 sata prije preseljenja svinja,

— biti u skladu s odredbama odjeljka A podstavka 2.

([1]) Ako je, međutim, nadležno tijelo ograničilo primjenu preventivnog usmrćivanja samo na dio gospodarstva na kojem se drže svinje za koje se sumnja sa su zaražene virusom klasične svinjske kuge, u skladu s člankom 4. stavkom 3. točkom (a) Direktive 2001/89/EZ uzimanje uzoraka mora se odnositi na one pod-jedinice na gospodarstvu na kojima je primijenjena ta mjera, ne dovodeći u pitanje nastavak pregleda i uzimanja uzoraka koje će se vršiti na ostatku svinja na gospodarstvu u skladu s naputcima nadležnog tijela.

([2]) U nekim slučajevima, npr. kad se sumnja u nazočnost virusa klasične svinjske kuge među ograničenim brojem mladih svinja na gospodarstvu, dio zaraženih krmača može biti vrlo malen. U tom je slučaju potrebno uzeti uzorke većeg broja krmača.

▼B

2. Ako se radi o svinjama koje treba preseliti na drugo gospodarstvo, povrh ispitivanja koje treba provesti u skladu s podstavkom 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 dijelu populacije svinja.

   Najmanji broj svinja koji se mora provjeriti mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje vrućice u tim podjedinicama, ako je ona prisutna kod 10 % populacije svinja.

   Međutim, ako se radi o:

   — rasplodnim krmačama, najmanji broj svinja koji se mora pregledati mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 5 %-tne prevalencije u podjedinici u kojoj se drže svinje koje će se seliti,

   — nerastima, moraju se pregledati svi nerasti koji se sele.

3. Ako se radi o svinjama koje treba preseliti u klaonicu, u pogon za preradu ili na druga mjesta na kojima će biti usmrćene ili zaklane, povrh ispitivanja koja se vrše u skladu s podstavkom 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 dijelu populacije svinja.

   Najmanji broj svinja koji se mora provjeriti mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje vrućice ako se ona u dotičnim pod-jedinicama pojavljuje s 20 %-tnom prevalencijom.

   Međutim, ako se radi o rasplodnim krmačama i nerastima, najmanji broj svinja koje treba pregledati mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje vrućice ako se ona, u podjedinici u kojoj se drže svinje koje treba seliti, pojavljuje s 5 %-tnom prevalencijom.

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

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

   Međutim, ako se radi o rasplodnim krmačama ili nerastima, najmanji broj svinja čiji se uzorci moraju uzeti mora s 95 %-tnom pouzdanošću 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, u skladu su s naputcima nadležnog tijela u kojima se mora voditi računa o rasponu testova koje je moguće provesti, o osjetljivosti tih testova te o postojećoj epidemiološkoj situaciji.

5. Ako su, međutim, klinički znakovi i bolesne promjene *post mortem* koji ukazuju na nazočnost klasične svinjske kuge otkriveni nakon što su svinje zaklane ili usmrćene, odstupajući od podstavka 4., primjenjuju se odredbe odjeljka C.

E. **Postupci provjere i uzimanja uzoraka na gospodarstvu prilikom obnove populacije**

1. Kad se svinje na gospodarstvo ponovno dovode u skladu s člankom 13. stavkom 2. točkom a) ili stavkom 2. točkom b) članka 19. stavka 8., ili s drugim podstavkom točkom b) Direktive 2001/89/EZ, primjenjuje se sljedeći postupak uzimanja uzoraka:

   — ako se na gospodarstvo dovode pokusne svinje, uzorci krvi moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja da se s 95 %-tnom pouzdanošću omogući otkrivanje 10 %-tne seroprevalencije u svakoj pojedinoj podjedinici na gospodarstvu,

▼B

— ako se vrši obnova cjelokupne populacije, uzorci krvi za serološke testove moraju se nasumično uzeti od dovoljnog broja svinja da se s 95 %-tnom pouzdanošću omogući otkrivanje 20 %-tne seroprevalencije u svakoj pojedinoj podjedinici na gospodarstvu.

U slučaju rasplodnih krmača i nerasta, međutim, broj uzoraka koji se moraju uzeti mora biti takav da s 95 %-tnom pouzdanošću omogući otkrivanje 10 %-tne seroprevalencije.

2. Nadležno tijelo mora po dovođenju svinja osigurati da, u slučaju pojave kakve bolesti ili uginuća svinja na gospodarstvu iz nepoznatih razloga, dotične svinje odmah budu testirane na klasičnu svinjsku kugu. Ove se odredbe primjenjuju do ukidanja ograničenja iz drugog podstavka članka 13. stavka 2. točke (a) i druge rečenice drugog podstavka točke (b), članka 19. stavka 8. Direktive 2001/89/EZ na dotičnom gospodarstvu.

F. **Postupci uzorkovanja na gospodarstvima na zaraženom području prije ukidanja ograničenja**

1. Kako bi se na zaraženim područjima omogućilo ukidanje ograničenja iz članka 10. Direktive 2001/89/EZ, u svim gospodarstvima u tom pojasu:

— mora se provesti ispitivanje u skladu s postupcima utvrđenim u odjeljku A podstavcima 2. i 3.,

— uzorci krvi za serološke testove moraju se uzeti kako je utvrđeno u podstavku 2.

2. Najmanji broj uzoraka koji se moraju uzeti mora omogućiti da se s 95 %-tnom pouzdanošću omogući otkrivanje 10 %-tne seroprevalencije kod svinja u svim podjedinicama na gospodarstvu.

Međutim, ako se radi o:

— rasplodnim krmačama, najmanji broj uzoraka koji se moraju uzeti mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 5 %-tne seroprevalencije,

— centru za sakupljanje sjemena, uzorci krvi moraju se uzeti od svih nerasta.

G. **Postupci uzorkovanja na gospodarstvima na ugroženom području prije ukidanja ograničenja**

1. Da bi se na ugroženom području mogla ukinuti ograničenja iz članka 11. Direktive 2001789/EZ na gospodarstvima, na tom području mora se obaviti klinički pregled u skladu s postupcima utvrđenima u odjeljku A podstavku 2.

Od svinja se, osim toga, moraju uzeti uzorci krvi za serološke testove:

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

— kad god nadležno tijelo ocijeni da se klasična svinjska kuga mogla neopaženo proširiti među rasplodnim krmačama,

— na svim ostalim gospodarstvima za koje nadležno tijelo ocijeni da je s njih potrebno uzeti uzorke,

— u svim centrima za sakupljanje sjemena.

2. Kad god se na gospodarstvima smještenim u nadziranom pojasu provode serološki testovi, broj uzoraka uzet na tim gospodarstvima mora biti u skladu s odjeljkom F. podstavkom 2. Međutim, ako nadležno tijelo prosudi da bi se klasična svinjska kuga neopaženo mogla proširiti među rasplodnim krmačama, uzorke je moguće uzeti samo u podjedinicama u kojima se drže te životinje.

▼B

H. **Postupci seroloških pretraživanja i uzorkovanja u područjima za koja se sumnja na pojavu klasične svinjske kuge ili je ona potvrđena kod divljih svinja**

1. U slučaju seroloških pretraživanja divljih svinja u područjima u kojima je potvrđena klasična svinjska kuga, ili se na nju sumnja, veličina i zemljopisno područje ciljane populacije od koje će se uzimati uzorci mora se utvrditi prethodno radi određivanja točnog broja uzoraka koji će se uzimati. Veličina uzorka određuje se prema procijenjenom broju živih životinja, a ne prema broju ustrijeljenih.

2. Ako nema podataka o gustoći i veličini populacije, mora se odrediti zemljopisno područje na kojem će se uzimati uzorci, vodeći pri tom računa o stalnoj nazočnosti divljih svinja i postojanju prirodnih i umjetnih prepreka koje su u stanju spriječiti velika i stalna kretanja životinja. Ako takvih okolnosti nema ili se radi o velikim područjima, preporuča se da se za uzimanje uzoraka odrede područja od najviše 200 km^2, na kojima obično živi između 400 i 1 000 divljih svinja.

3. Ne dovodeći u pitanje odredbe članka 15. stavka 2. točke (c) Direktive 2001/89/EZ najmanji broj svinja, od kojih je potrebno uzeti uzorak unutar za to određenoga područja, mora s 95 %-tnom pouzdanošću omogućiti otkrivanje 5 %-tne seroprevalencije. U tu je svrhu potrebno uzeti uzorke barem 59 životinja sa svakog utvrđenog područja.

   Preporuča se također da:

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

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

   — se uzimanje uzoraka izvrši u kratkom vremenu, po mogućnosti ne duljem od mjeseca 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 virusoloških testova, vrši se na način utvrđen u poglavlju V odjeljku B podstavku 1.

   Ocijeni li se da je potrebno provesti virusološku pretragu ustrijeljenih divljih svinja, ona se mora provesti na životinjama između tri mjeseca i godine dana starosti.

5. Svi uzorci koji se upućuju u laboratorije moraju biti popraćeni upitnikom iz članka 16. stavka 3. podstavka 1. Direktive 2001/89/EZ.

POGLAVLJE V.

Opći postupci i mjerila za sakupljanje i prijevoz uzoraka

A. **Opći postupci i mjerila**

1. Prije nego na sumnjivom gospodarstvu počne uzorkovanje, mora se pripremiti nacrt gospodarstva i odrediti njegove epidemiološke podjedinice.

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

▼B

3. Ne dovodeći u pitanje poglavlje IV. odjeljak A. podstavak 5. b, uzorci za serološko testiranje ne smiju se uzimati od prasadi mlađe od osam tjedana.

4. Svi uzorci moraju se poslati u laboratorij praćeni odgovarajućim obrascima, u skladu s uvjetima koje odredi nadležno tijelo. Ti obrasci moraju sadržavati pojedinosti o životu svinja čiji su uzorci uzeti, o kliničkim znakovima ili uočenim bolesnim promjenama *post mortem*.

   Ako se radi o svinjama koje se drže na gospodarstvima, mora se dati i jasne podatke o starosti, kategoriji i gospodarstvu podrijetla svinja kojima su uzorci uzeti. Preporuča se da se za svaku svinju od koje se uzima uzorak zabilježe njezino mjesto na gospodarstvu i njezina jedinstvena identifikacijska oznaka.

B. **Uzorkovanje za virološke testove**

1. Za otkrivanje virusa, antigena i genoma klasične svinjske kuge kod uginulih ili eutanaziranih svinja najprikladniji su uzorci tkiva krajnika, slezene i bubrega. Preporuča se, osim toga, prikupljanje po dva uzorka drugih limfnih tkiva kao što su retrofaringealni parotidni, mandibularni i mezenterijalni limfni čvorovi i uzorak vitog tankog crijeva. U slučaju trupala u raspadu, cijela duga ili prsna kost može poslužiti kao odabrani uzorak.

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

3. Za bolesne životinje preporučuju se virološki testovi. Njihova je vrijednost obično ograničena ako se koriste za promatranje životinja koje ne pokazuju kliničke znakove. Međutim, ako je cilj opsežnih radnji uzimanja uzoraka otkriti virus klasične svinjske kuge dok su svinje još u razdoblju inkubacije, najprikladniji uzorci su krajnici.

C. **Prijevoz uzoraka**

1. Preporuča se da se uzorci:

   — prevoze i pohranjuju u nepropusnim spremnicima,

   — ne zamrzavaju, nego pohrane na temperaturi hladnjaka,

   — isporuče laboratoriju u najkraćem roku,

   — drže u paketu u kojemu se za hlađenje koriste ledeni ulošci umjesto vlažnog leda,

   — tkiva i organa smjeste 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 sprečava curenje,

   — kad god je to moguće, izravno prevezu u laboratorij kako bi se osigurao brz i pouzdan prijevoz, te da to čini kompetentno osoblje.

2. Vanjska strana paketa mora se označiti adresom laboratorija odredišta, a mora istaknuti i sljedeću poruku: životinjski patološki materijal; pokvarljivo; lomljivo; ne otvarati izvan laboratorija za klasičnu svinjsku kugu.

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

4. U zračnom prijevozu uzoraka koji se iz država članice, osim Njemačke, ili trećih zemalja prevoze u referentni laboratorij Zajednice ([1]), paket mora biti označen u skladu s propisima IATA-e.

([1]) Referentni laboratorij Zajednice za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge ima neograničenu dozvolu zaprimati dijagnostičke uzorke i izolate virusa klasične svinjske kuge. Taj laboratorij može zatražiti da preslika uvozne dozvole prije prijevoza bude u privitku u omotnici zakvačenoj za paket izvana.

▼B

POGLAVLJE VI.

Načela i korištenje viroloških testova i ocjena njihovih rezultata

A. **Otkrivanje virusnog antigena**

1. *Imunofluorescentni test (imunofluorescencija, FAT)*

Načelo ovog testa je otkrivanje virusnog antigena u kriostatskim rezovima organskog tkiva svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom klasične svinjske kuge. Virusni antigen otkriva se protutijelom konjugiranim fluoresceinizotiocianatom. Pozitivan rezultat trebao bi se potvrditi ponavljanjem bojenja tkiva specifičnim monoklonskim protutijelom.

Prikladni organi su krajnici, bubrezi, slezena, razni limfni čvorovi i vito tanko crijevo. Obrisak stanica koštane srži također se može iskoristiti kod divljih svinja ako navedeni organi nisu dostupni ili se raspadaju.

Test se može provesti u jednom danu. Budući da se uzorci organa mogu dobiti samo s uginulih životinja, njegova je primjena kod selekcije ograničena. Pouzdanost rezultata testova može osujetiti nevješto bojenje, posebno ako nema znatnog 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 klasične svinjske kuge daje pozitivan rezultat.

Korištenje ELISA-e za otkrivanje antigena preporuča se na uzorcima životinja koje pokazuju kliničke znakove ili patološke znakove bolesti. Nije prikladna za ispitivanja pojedinačnih životinja. Primjereni uzorci su leukociti, serum, nezgrušana krv, kao i suspenzije organa navedenih u podstavku 1. uzetih od svinja za koje se sumnja da su zaražene virusom klasične svinjske kuge ([1]).

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

B. **Izolacija virusa**

1. Izolacija virusa temelji se na uzgoju materijala uzorka na prijemljivoj staničnoj kulturi svinjskog podrijetla. Pojavi li se virus klasične svinjske kuge na tom uzorku, on će se na stanicama umnožiti u tolikoj mjeri da će ga se moći otkriti imuno-bojenjem zaraženih stanica konjugiranim protutijelima. Za diferencijalnu dijagnozu obzirom na druge pestiviruse potrebna su specifična protutijela za virus klasične svinjske kuge.

2. Najbolji uzorak za izolaciju virusa klasične svinjske kuge su leukociti, plazma ili cjelovita krv dobivena iz nezgrušanog krvnog uzorka, ili od organa navedenih u odjeljku A. podstavku 1.

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

([1]) U prodaji je dostupno nekoliko ELISA kompleta za otkrivanje antigena klasične svinjske kuge, koji su potvrđeni za različite tipove uzoraka.

▼B

4. Metoda izolacije virusa preporuča se također ako je klasična svinjska kuga prethodno potvrđena drugim metodama. Mora se koristiti kao referentni test za potvrdu prethodnih pozitivnih rezultata ELISA-e za otkrivanje antigena, PCR-a, imunofluorescencije ili metode neizravnim bojenjem peroksidazom.

   Izolati virusa klasične svinjske kuge dobiveni na ovaj način korisni su za karakterizaciju virusa, uključujući i genetsku tipizaciju i molekularnu epidemiologiju.

5. Svi izolati virusa klasične svinjske kuge iz svih primarnih epidemija, primarni slučajevi među divljim svinjama ili slučajevi u klaonicama ili prijevoznim sredstvima moraju se genetski tipizirati u nacionalnom referentnom laboratoriju države članice ili u nekom drugom laboratoriju koji je odobrila ili dotična država članica ili referentni laboratorij Zajednice u skladu s odjeljkom E.

   U svakom slučaju, ti izolati virusa moraju se bez odlaganja poslati u referentni laboratorij Zajednice za sakupljanje virusa.

C. **Otkrivanje virusnoga genoma**

1. Za otkrivanje virusnoga 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 umnožava do količine koju je moguće otkriti. Obzirom da ovaj test otkriva samo genomski slijed virusa, PCR može biti pozitivan iako zarazni virus nije prisutan (npr. u raspadnutim tkivima ili na uzorcima svinja koje se oporavljaju).

2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) može se upotrijebiti na manjem broju pomno odabranih uzoraka uzetih od sumnjivih životinja ili s materijala pobačenih plodova. Na lešinama divljih veprova 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 organi opisani u izolaciji virusa ili nezgrušana krv.

4. PCR se može provesti u roku od 48 sati. Zahtijeva odgovarajuću laboratorijsku opremu, zasebne prostorije i vješto osoblje. Prednost metode je u tome što zarazne čestice virusa ne treba replicirati u laboratoriju. Metoda je visoko osjetljiva, ali lako dolazi do kontaminacije uzoraka, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata. Zbog toga su neophodni postupci strogog nadzora kvalitete izvedbe. Neke metode su više usmjerene na otkrivanje pestivirusa nego na virus klasične svinjske kuge, što zahtijeva dodatne testove provjere, kao što je nizanje proizvoda lančane reakcije polimeraze (PCR-a).

D. **Ocjena rezultata virooloških testova**

1. Virološki testovi neophodni su za potvrdu prisutnosti klasične svinjske kuge.

   Izolacija virusa mora se smatrati referentnim virološkim testom i mora se, prema potrebi, rabiti kao potvrdni test. Osobito se preporuča ako pozitivni rezultati testova FAT, ELISA ili PCR nisu popraćeni uočavanjem kliničkih znakova ili bolesnih promjena prouzročenih oboljenjem, i u slučaju bilo kojih drugih sumnji.

   Međutim, primarno izbijanje klasične svinjske kuge može se potvrditi ako su kod svinja u pitanju otkriveni klinički znakovi i patoanatomske promjene, a barem su dva testa za otkrivanje antigena i genoma dala pozitivne rezultate.

   Sekundarno izbijanje klasične svinjske kuge može se potvrditi ako su osim epidemiološke poveznice s potvrđenom epidemijom ili potvrđenim slučajem kod dotičnih svinja otkriveni klinički znakovi ili bolesne promjene, a testovi za otkrivanje antigena ili genoma su dali pozitivan rezultat.

▼B

Primarni slučaj klasične svinjske kuge kod divljih svinja može se potvrditi nakon što su provedeni test izolacije virusa ili barem dva testa za otkrivanje antigena ili genoma dali pozitivne rezultate. Dodatni slučajevi klasične svinjske kuge 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 za otkrivanje genoma ili antigena na klasičnu svinjsku kugu u izvedbi dotičnog testa morala su biti korištena protutijela i početnice (eng. primers), specifične za virus klasične svinjske kuge. Ako upotrijebljeni test nije bio specifičan za virus klasične svinjske kuge, nego samo za pestiviruse, mora ga se ponoviti uz korištenje reagensa specifičnog za virus klasične svinjske kuge.

E. **Genetska tipizacija izolata virusa klasične svinjske kuge**

1. Genetska tipizacija izolata virusa klasične svinjske kuge postiže se određivanjem nukleotidnih sljedova pojedinih odsječaka genoma virusa klasične svinjske kuge, tj. točno određenih dijelova 5. nekodirajuće regije i/ili gena koji kodira za glikoprotein E2. Sličnost ovih sljedova sa sljedovima ranije dobivenih virusnih izolata može reći nešto o tome jesu li epidemije prouzročili neki novi ili već poznati sojevi. To može poduprijeti ili opovrgnuti pretpostavku na koju su o putovima prijenosa ukazali epidemiološki tragovi.

Genetska tipizacija izolata virusa klasične svinjske kuge od iznimnog je značaja za određivanje izvora bolesti. Međutim, visoka genetska srodnost između virusa prikupljenih u različitim epidemijama nije apsolutan dokaz izravne epidemiološke povezanosti.

2. Ako virusnu tipizaciju nije moguće u kratkom roku obaviti u nekom od nacionalnih laboratorija ili u bilo kojem laboratoriju ovlaštenom za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge, izvorni se uzorak virusnog izolata mora što prije poslati na tipizaciju u referentni laboratorij Zajednice.

Podaci koje o tipizaciji i sljedovima izolata virusa klasične svinjske kuge imaju na raspolaganju laboratoriji ovlašteni za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge moraju se proslijediti referentnom laboratoriju Zajednice kako bi ih tamo unijeli u svoje postojeće baze podataka.

Podaci pohranjeni u toj bazi podataka moraju biti dostupni svim nacionalnim referentnim laboratorijima država članica. Međutim, za potrebe objavljivanja u znanstvenim časopisima, ako to dotični laboratorij zatraži, referentni laboratorij Zajednice mora zajamčiti povjerljivost tih podataka do njihovog objavljivanja.

POGLAVLJE VII.

Načela i korištenje seroloških testova i procjena njihovih rezultata

A. **Temeljna načela i dijagnostička vrijednost**

1. Kod svinja zaraženih virusom klasične svinjske kuge, protutijela se obično otkrivaju u uzorcima seruma dva do tri tjedna nakon infekcija. Kod svinja koje su bolest preboljele, zaštitna neutralizirajuća protutijela mogu se otkrivati tijekom nekoliko sljedećih godina ili čak do uginuća. Protutijela se povremeno mogu uočiti u završnom stadiju smrtno oboljelih životinja. Kod nekih svinja s kroničnim oblikom klasične svinjske kuge, protutijela se mogu uočiti tijekom nekoliko dana krajem prvoga mjeseca od početka infekcije.

Svinje zaražene *in utero* mogu biti imuno-snošljive prema homolognom virusu klasične svinjske kuge iste građe te stoga ne proizvoditi specifična protutijela. Ipak, tijekom nekoliko prvih dana života kod njih se mogu otkriti protutijela podrijetlom od majke. Poluživot majčinih protutijela u zdrave, neviremične prasadi je oko dva tjedna. Pronađu li se kod prasadi od tri mjeseca, vrlo je malo vjerojatno da su protutijela klasične svinjske kuge podrijetlom od majke.

▼B

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

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

   Ipak, u okviru ispitivanja koje će se u skladu s člankom 8. Direktive 2001/89/EZ provesti u slučaju sumnje na prisutnost klasične svinjske kuge ili, ako je ona već potvrđena, moraju se pomno ocijeniti rezultati seroloških testova, vodeći pritom računa o cjelokupnim kliničkim, virološkim i epidemiološkim nalazima.

B. **Preporučeni serološki testovi**

1. Najbolji odabir testova za postavljanje serološke dijagnoze klasične svinjske kuge su virus-neutralizacijski test (VNT) i ELISA.

   Kakvoća i djelotvornost serološke dijagnoze koju obavljaju nacionalni laboratoriji mora se stalno provjeravati u okviru međulaboratorijskih usporednih testova koje povremeno organizira referentni laboratorij Zajednice.

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

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

   Nakon inkubacije, mješavina se nasađuje na prikladne stanične kulture i inkubira tri do pet dana. Po isteku tog inkubacijskog razdoblja, stanice se fiksiraju i svako umnožavanje virusa u zaraženim stanicama uočava se uz pomoć imunološkog sustava označivanja. Kao potvrda se mogu upotrijebiti bilo pokus neutralizacijskim protutijelom povezanim s peroksidazom (NPLA) ili neutralizacija imunofluorescencijom (NIF).

   Rezultati VNT-a izražavaju se kao recipročna vrijednost početnog razrijeđenog seruma u kojoj polovica cijepljenih staničnih kultura (mjerilo 50 %) ne pokaže virusno umnožavanje (nema posebnih imunoloških oznaka). Procjenjuje se točka između dva stupnja razrjeđenja. Sustav konačnog razrjeđenja temelji se na stvarnome razrjeđenju seruma za vrijeme neutralizacijske reakcije, tj. nakon dodavanja virusa, ali prije dodavanja stanične otopine.

3. VNT je najosjetljiviji i najpouzdaniji test za otkrivanje protutijela na virus klasične svinjske kuge. Zbog toga se preporuča za individualna i mnoštvena serološka ispitivanja. Međutim, ovim je testom moguće otkriti i međusobno neutralizirajuća protutijela specifična za slučajeve svinja zaraženih pestivirusima preživača.

   Kad se test VNT koristi za otkrivanje protutijela na virus VP/BSG, primjenjuju se već navedena načela, a provode se za dobivanje diferencijalne dijagnoze klasične svinjske kuge.

4. Sojevi pestivirusa koji se koriste za neutralizacijske testove moraju biti usklađeni s preporukom referentnog laboratorija Zajednice.

▼B

5. Razvijeno je nekoliko tehnika ELISA-e za otkrivanje klasične svinjske kuge, koje koriste monoklonska protutijela, koja se dijele u dvije vrste: kompetitivna ili blokirajuća ELISA i nekompetitivna ELISA.

   Kompetitivna ili blokirajuća ELISA najčešće primjenjuje monoklonska protutijela. Sadrži li uzorak seruma protutijela na klasični virus, to će onemogućiti vezivanje odabranih monoklonskih protutijela konjugiranih peroksidazom za virusni antigen, a rezultat će biti smanjeni signal prebojenja.

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

6. Nacionalni laboratoriji moraju obavezno vršiti nadzor kakvoće osjetljivosti i specifičnosti svake serije testa ELISA, koristeći pri tom popis referentnih seruma koji je priredio referentni laboratorij Zajednice. Taj popis obuhvaća:

   — serume svinja u ranom stupnju zaraze virusom klasične svinjske kuge (prije nego protekne 21 dan od početka zaraze),

   — serume svinja u rekonvalescenciji (po isteku 21 dana od početka zaraze),

   — serume svinja zaraženih pestivirusima preživača.

   ELISA komplet koji se mora upotrijebiti za postavljanje serološke dijagnoze klasične svinjske kuge mora prepoznavati sve referentne serume dobivene od svinja koje se oporavljaju. Svi rezultati dobiveni na referentnim serumima moraju biti ponovljivi. Preporuča se nadalje da imaju mogućnost otkrivanja svih pozitivnih seruma uzetih u ranom stupnju i da imaju što manje unakrsnih reakcija sa serumima svinja zaraženih pestivirusima preživača.

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

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

   Test ELISA mora osigurati prepoznavanje svih zaraza klasičnom svinjskom kugom u stadiju oporavka, a mora ga se maksimalno osloboditi smetnji nastalih zbog unakrsne reakcije protutijela na pestiviruse preživača.

C. **Tumačenje seroloških rezultata i diferencijalnih dijagnoza infekcijama uzrokovanih pestivirusima preživača (BVDV i BDV)**

1. Ne dovodeći u pitanje odredbe članka 4. stavka 3. točke (a) ili članka 7. stavka 2. Direktive 2001/89/EZ, u slučaju otkrivanja neutralizacijskog titra virusa klasične svinjske kuge jednakog ili višeg od 10 ND_{50} u uzorcima seruma prikupljenih od jedne ili više svinja, ili dobivanja pozitivnog rezultata testa ELISA u uzrocima seruma uzetih od neke skupine svinja, na dotičnom gospodarstvu moraju se odmah primijeniti mjere iz članka 4. stavka 2. Direktive 2001/89/EZ ili, ako se one već primjenjuju, mora se nastaviti s njihovom primjenom.

   Već sakupljeni uzorci s tog gospodarstva moraju se ponovno testirati VNT-om s usporednom titracijom neutralizacijskih protutijela na virus klasične svinjske kuge i pestiviruse preživača.

2. Pokažu li usporedni testovi protutijela na pestiviruse preživača, a izostanak ili očigledno manje titara protutijela (niži od trostruko) na virus klasične svinjske kuge, mora se odbaciti sumnja na klasičnu svinjsku kugu, osim ako ne postoje drugi razlozi koji traže nastavak primjene mjera iz članka 4. stavka 2. Direktive 2001/89/EZ na dotičnom gospodarstvu.

▼B

3. Pokažu li usporedni testovi neutralizacijski titar virusa kod više od jedne svinje jednak ili viši od 10 ND_{50}, a taj je titar jednak ili viši nego titri na druge pestiviruse, nadležno tijelo se mora pobrinuti da se potvrdi prisutnost klasične svinjske kuge, pod uvjetom da su na dotičnom gospodarstvu pronađeni i epidemiološki dokazi te bolesti.

4. Ne dovodeći u pitanje odredbe članka 4. stavka 3. Direktive 2001/89/EZ, ako nisu pronađeni epidemiološki dokazi bolesti ili ako su rezultati ranije provedenih testova nedorečeni, nadležno tijelo mora osigurati da se na dotičnom gospodarstvu:

— nastavi primjena mjera iz članka 4. stavka 2. Direktive 2001/89/EZ,

— što prije, u skladu s poglavljem IV., provedu daljnja ispitivanja radi potvrde ili odbacivanja prisutnosti klasične svinjske kuge.

5. Ako, međutim, daljnje provjere i testovi iz podstavka 4. ne dopuste da se isključi mogućnost prisutnosti klasične svinjske kuge, na gospodarstvu se, nakon što su protekla barem dva tjedna od prethodnih provjera, provodi dodatno uzimanje uzoraka za serološko testiranje.

U okviru tog dodatnog uzimanja uzoraka, ponovno se uzimaju i testiraju uzorci istih svinja kao i ranije radi usporednog serološkog testiranja s prethodno prikupljenim uzorcima, kako bi se otkrila sero-konverzija virusa klasične svinjske kuge ili pestivirusa preživača, ako ona postoji.

Ako ni te dodatne provjere i testovi ne omoguće potvrdu prisutnosti klasične svinjske kuge, mjere iz članka 4. Direktive 2001/89/EZ mogu se ukinuti.

▼M1

POGLAVLJE VIII.

Razlikovni testovi u slučaju potrebe za žurnim postupkom cijepljenja

A. **Osnovna načela**

1. Razlikovni serološki test ELISA (razlikovni test) dostupan je i može uspješno razlikovati svinje cijepljene cjepivom markerom koje potiče protutijela samo na glikoprotein E2 virusa klasične svinjske kuge, od svinja zaraženih divljom vrstom virusa klasične svinjske kuge. Ovaj test smišljen je tako da otkrije protutijela na E^{rns} glikoprotein virusa klasične svinjske kuge. Temelji se na načelu da nezaražene životinje cijepljene cjepivima markerima proizvode samo protutijela na glikoprotein E2 virusa klasične svinjske kuge, dok životinje zaražene virusom iz prirode reagiraju i proizvode i protutijela na virusne antigene.

Taj razlikovni test osjetljiv je i specifičan ([1]). Međutim, i svinje koje su se zarazile pestivirusima različitim od virusa klasične svinjske kuge, poput virusa BVD-a (eng. Bovine viral diarrhoea) ili virusa BD-a (eng. Border disease), također će reagirati E^{rns}-pozitivno. Uz to, osjetljivost testa nije idealna jer neke životinje cijepljene cjepivom markerom, a nakon tog zaražene, mogu i ne reagirati E^{rns}-pozitivno.

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

([1]) U skladu s rezultatima istraživanja koji je proveo Referentni laboratorij Zajednice za dijagnostiku klasične svinjske kuge i nacionalni laboratoriji za dijagnostiku klasične svinjske kuge, osjetljivost tog razlikovnog testa je oko 94 %, a njegova specifičnost oko 98 %.

▼M1

2. Razlikovni test je imunosni pokus kojim se blokira enzim u tekućoj fazi. Uzorci, koji se testiraju, inkubiraju se na mikrotitar pločicama prethodno presvučenim monoklonalnim protu-Erns protutijelima zajedno s točno definiranom količinom E^{rns} antigena. Svako protutijelo specifično na E^{rns} veže se na definiranu količinu E^{rns} antigena u otopini te se stvara kompleks protutijelo/antigen koji reagira s protu-E^{rns} protutijelima na mikrotitar pločici. Nakon što se pločice operu kako bi se s njih uklonio materijal koji se nije vezao, na njih se dodaje peroksidaza s oznakom protu-E^{rns} konjugata, koja se veže na E^{rns} antigen udružen u spoj a protutijelom koje je presvuklo površinu mikrotitar pločice. Nevezani konjugat uklanja se pranjem, a dodaje se supstrat koji sadrži kromogen. Stupnjevi boje koja nastaje recipročno su proporcionalni količini protutijela specifičnih na Erns prisutan u uzorku. Ako uzorak sadrži protutijela (negativan uzorak), veći dio definirane količine Erns antigena koji je dodan može se vezati na protu-E^{rns} protutijela na površini pločice te se vidjeti snažna reakcija bojom. Rezultat se dobiva usporedbom optičke gustoće (OD) u posudama u kojima se nalaze uzorci s posudama u kojima se nalaze negativni i pozitivni kontrolni sadržaj.

B. **Smjernice za korištenja razlikovnog testa u sklopu postupka cijepljenja cjepivom markerom na svinjogojskim gospodarstvima u okviru članka 19. Direktive 2001/89/EZ**

Razlikovni test zamišljen je tako da provjeri postojanje ili izostanak kolanja virusa klasične svinjske kuge u populaciji svinja cijepljenih cjepivom markerom. Raspoloživi podaci ukazuju na to da ga se u te svrhe može uspješno koristiti na razini krda, ali da se ne može pouzdano isključiti mogućnost da su pojedine svinje zaražene virusom klasične svinjske kuge. Posebno bi specifičnost razlikovnog testa mogla biti nedovoljno pouzdana u prepoznavanju svinja cijepljenih marker cjepivom od zaraženih svinja, ako se radi o populaciji odraslih svinja. U slučaju dvojbenih rezultata dotične svinje moraju se zaklati ili usmrtiti na human način u skladu s Direktivom 93/119/EZ, a njihovi organi moraju se testirati na virus klasične svinjske kuge. Za to su najprikladniji testovi izolacije virusa i PCR (lančana reakcija polimeraze).

Sve ovo treba imati na umu prilikom osmišljavanja strategije provedbe žurnoga cijepljenja marker cjepivom te prilikom tumačenja rezultata ispitivanja na virus klasične svinjske kuge u populaciji svinja cijepljenih marker cjepivom.

Postupak uzimanja uzoraka i testiranja cijepljene populacije prije ukidanja ograničenja koja se imaju primijeniti u cijepljenome području u skladu s člankom 19. Direktive 2001/89/EZ trebali bi ovisiti o starosti cijepljenih svinja, kategoriji svinja (tovljenici/za klanje, rasplodne) i razini željene sigurnosti obzirom na kolanje virusa u populaciji.

Pojedinosti postupaka uzimanja uzoraka i testiranja će, dakle, biti utvrđene planom provedbe žurnoga cijepljenja koji će se Komisiji podnijeti u skladu s člankom 19. stavkom 3. Direktive 2001/89/EZ.

▼B

POGLAVLJE IX.

Najmanji sigurnosni uvjeti za laboratorije za dijagnosticiranje klasične svinjske kuge

1. Najmanji uvjeti utvrđeni u tablici 1. moraju se ispuniti u svim laboratorijima u kojima se rukuje virusom klasične svinjske kuge, čak i malom količinom potrebnom za testove izolacije i neutralizacije virusa. Međutim, *post mortalni* pregledi, priprema uzoraka za imunofluorescenciju i serologiju kod kojih se koristi inaktivirani antigen, mogu se vršiti u blažim uvjetima u zatvorenom prostoru, pod uvjetom da se primjenjuju osnovna higijenska načela i poslijeoperativna dezinfekcija sa sigurnim odlaganjem tkiva i seruma.

▼B

2. Dodatne uvjete utvrđene u tablici 1. moraju ispuniti svi laboratoriji u kojima se vrše postupci koji uključuju i ekstenzivno umnažanje virusa.

3. Uvjete u tablici 2. moraju ispuniti svi laboratoriji u kojima se provode pokusi s virusom klasične svinjske kuge na životinjama.

4. U svakom slučaju, sve zalihe virusa klasične svinjske kuge moraju se držati sigurno pohranjene, bilo duboko zamrznute ili liofilizirane. Preporuča se da se zamrzivači i hladnjaci ne koriste za druge viruse osim virusa klasične svinjske kuge, ili za druge materijale koji nisu povezani s dijagnozom klasične svinjske kuge. Svaka pojedina ampula mora se jasno označiti te se moraju voditi opsežne evidencije o zalihama virusa, zajedno s datumima i rezultatima izvršenih provjera kakvoće. Ako se vodi evidencija virusa pridodanih zalihi, ona mora sadržavati pojedinosti o izvoru, kao i o virusima izdanim drugim laboratorijima.

5. Preporuča se da se bio-sigurna jedinica za rad s virusom klasične svinjske kuge dodatno osigura područjima u kojima se ne rukuje virusom klasične svinjske kuge. Ta bi druga područja trebala biti na raspolaganju za pripremanje staklenog posuđa i sredstava, za održavanje i pripremu nezaraženih staničnih kultura, za pripremu seruma i serološka testiranja (osim metoda koje koriste živi virus klasične svinjske kuge) te za upravu i uredske poslove.

Tablica 1.

Načela biološkog okruženja prikladnog za dijagnostičke laboratorije

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

▼B

Tablica 2.

Biosigurnosni uvjeti prostorija za pokusne životinje

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