

NAČIN DIJAGNOSTIKOVANJA AVIJARNE INFLUENCE

ODJELJAK A
Avrijarna influenza

A. Etiologija i virulencija

- (1) Avrijarna influenza je visoko kontagiozno virusna zaraza koju uzrokuju virusi iz porodice *Orthomyxoviridae*, genus *influenzavirus*, virusi influence A jedini su ortomiksovirusi koji mogu zaraziti ptice.
- (2) Pojedine vrste ptica su prijemčive na zarazu virusom influence A, a glavni izvor virusa su vodene ptice, iako je većina izolata niske patogenosti izdvojena iz kokošaka i čurki.
Virusi influence A imaju zajedničke antigene nukleoproteina i proteine matriksa i svrstavaju u podtipove na osnovu antigenske srodnosti površinskih glikoproteina hemaglutinina (HA) i neuraminidaze (NA) i ima 16 podtipova HA (H1-H16) i devet podtipova NA (N1-N9), svaki virus influence A u svakoj kombinaciji, ima po jedan antigen HA i po jedan antigen NA.
- (3) Virusi influence A podjeljeni su u dvije grupe na osnovu svoje sposobnosti uzrokovanja bolesti kod prijemčive živine:
 - virusi VPAI koji uzrokuju vrlo tešku bolest, za koju je karakteristična opšta infekcija zaražene živine, koja može uzrokovati vrlo visoku stopu mortaliteta jata (do 100 %); i
 - virusi NPAI koji kod živine uzrokuju blagu, u prvom redu respiratornu bolest, osim ako nema pogoršanja bolesti zbog sekundarnih infekcija ili drugih činioca.
- (4) Divlje ptice, a posebno migratorne vodene ptice, imaju vrlo važnu ulogu kao izvor virusa influence A, što dokazuje izolacija gotovo svih kombinacija podtipova HA i NA kod divljih ptica, a po pravilu se kod divljih ptica otkrivaju samo virusi NPAI, osim u slučaju prenošenja VPAI sa zaražene živine.

B. Klinički simptomi kod ptica zaraženih virusom VPAI

Klinički simptomi kod ptica zaraženim virusom su vrlo različiti i zavise od virulencije infektivnog virusa, pogođene vrste, starosti, pola, drugih prisutnih bolesti i okoline.

Rani simptomi uključuju gubitak apetita, smanjeno uzimanje vode i relativno nisku stopu smrtnosti, a bolest se u jatu može pojaviti naglo i prouzrokovati smrt velikog broja ptica bez prethodnih znakova, ili sa minimalnim simptomima potištenosti, gubitka apetita, nakostriješenog perja i groznice.

Klinički znaci su izraženiji što duže ptice prežive.

Vrijeme potrebno za razvoj znakova zavisi od virusa, domaćina i početnoj zaraznoj dozi i načinu držanja.

Virus se širi sporije među kokama nosiljama koje se drži u kavezima i među pticama koje se drže na otvorenom u odnosu na u objekte u kojima se drže brojleri.

Koke nosilje, zaražene virusom VPAI, mogu u početku snositi jaja sa mekom ljuskom i brzo prestaje nošenje.

Bolesne ptice često sjede ili stoje u polusvjesnom stanju sa glavama koje dotiču tlo, krešte i podbradnjaci su cijanotični i edematozni i mogu imati tačkasta krvarenja na vrhovima, a često se javlja profuzni vodenasti proliv.

Disanje može biti otežano, a primjećuje se i pojačano suzenje, a na površini kože bez perja mogu se vidjeti hemoragije, a stepen smrtnosti u jatu varira između 50 i 100 %.

Kod brojlera simptomi VPAI često su manje uočljivi nego kod ostale živine i obično uključuju izrazitu potištenost, gubitak apetita, a kao prvi znak abnormalnosti može se primjetiti izrazito povećanje smrtnosti, a može se uočiti i otok glave i vrata te neurološki znaci, kao što su tortikolis i ataksija.

Kod čurki zaraza virusom VPAI slična je zarazi kod druge domaće živine, s tim što su virusi VPAI kod čurki virulentniji od drugih.

Kod gusaka zaraženih virusom VPAI simptomi potištenosti, gubitka apetita i dijareja slični su simptomima kod koka nosilja i često praćeni otečenim sinusima, a mlađe guske mogu da pokazuju neurološke simptome

Patke zaražene virusom VPAI ne moraju pokazivati kliničke simptome, iako se za neke sojeve navodi da uzrokuju slične znakove kao kod gusaka sa određenom stopom smrtnosti.

Nojevi zaraženi virusom VPAI i NPAI uglavnom ne pokazuju kliničke znake bolesti.

C. Postmortalna oštećenja kod ptica zaraženih virusom VPAI

Ptice koje uginu perakutno, mogu da pokazuju minimalne patološke promjene, koje uključuju dehidraciju i kongestiju unutrašnjih organa i mišića.

Kod ptica koje uginu nakon produženog kliničkog toka, po cijelom se tijelu pojavljuju tačkasta krvarenja, naročito u grkljanu, dušniku, žljezdanom želucu i epikardijalnom masnom tkivu i na serozama uz grudnu kost, a prisutni su jaki potkožni edemi, posebno oko glave i skočnog zgloba, na slezini, jetri, bubrezima i plućima mogu biti prisutne žute ili sive nekrotične promjene (foci), u vazdušnim kesama je prisutan iscjedak, slezina može biti povećana i hemoragična, a leš može biti dehidriran.

Influenca ptica histološki se karakteriše oštećenjem krvnih sudova sa edemom, krvarenjem i perivaskularnim promjenama, posebno na miokardu, slezini, plućima, mozgu, gušterači i podbratku, u plućima, jetri i bubrezima prisutne su nekrotične promjene, u mozgu se mogu naći gliozna, vaskularna proliferacija i degeneracija neurona.

D. Diferencijalna dijagnoza

Kod diferencijalne dijagnoze VPAI naročito se uzimaju u obzir:

- a) druge bolesti koje uzrokuju iznenadnu visoku smrtnost:
 - Njukastl bolest;
 - zarazni laringotraheitis;
 - kuga pataka;
 - akutna trovanja;
- b) druge bolesti koje uzrokuju otok krešte i podbradnjaka, a naročito:
 - akutna kolera živine i druge septikemijske bolesti;
 - bakterijski celulitis krešte i podbradka.

E. Klinički simptomi kod ptica zaraženih virusima NPAI

Na ozbiljnost bolesti uzrokovanih virusima NPAI znatno utiče:

- a) soj virusa;
- b) vrsta i starost domaćina;
- c) imunološki status domaćina u odnosu na virus, a posebno prisutnost drugih infektivnih uzročnika, kao što su:

- *Pasterela spp.*;
- virusi Njukastl bolesti (uključujući vakcinalne sojeve);
- ptičji pneumovirus, virus zaraznog bronhitisa;
- *E. coli*;
- *Mycoplasma spp.*;
- d) stanja oslabljenog imuniteta;
- e) činioci okoline (kao što je višak amonijaka, prašina, visoka ili niska temperatura).

Klinički simptomi bolesti mogu biti inaparentni ili blagi i prouzrokovati samo blage respiratorne simptome ili probleme u proizvodnji jaja kod koka nosilja, a infekcije virusima NPAI mogu biti povezane i sa ozbiljnim kliničkim znacima bolesti, posebno kod čurki, obično sa krkljanjem, kašljanjem, otokom infraorbitalnih sinusa i ferbilnim stanjem povezanim sa gubitkom apetita i visokom stopom smrtnosti. NPAI se može zamijeniti ili sekundarno iskomplikovati mnogim bolestima praćenim respiratornim ili digestivnim simptomima, a na pojavu bolesti se sumnja kod svakog izbijanja bolesti živine koja ne prestaje uprkos primjeni preventivnih ili terapijskih mjera.

F. Klinički simptomi kod drugih ptica

Klinički znaci kod drugih ptica mogu biti vrlo raznoliki i varirati od inaparentnih do jakih, sa visokom stopom smrtnosti.

Infekcija se kod drugih ptica koje se drže zatvorene širi sporije zbog raznolikosti vrsta koje se drže zajedno sa razlikom u prijemčivosti, različitih količina izlučenog virusa i često relativno sporog prenosa zbog niske stope kontakta među pticama i srazmjerno niske gustine populacije.

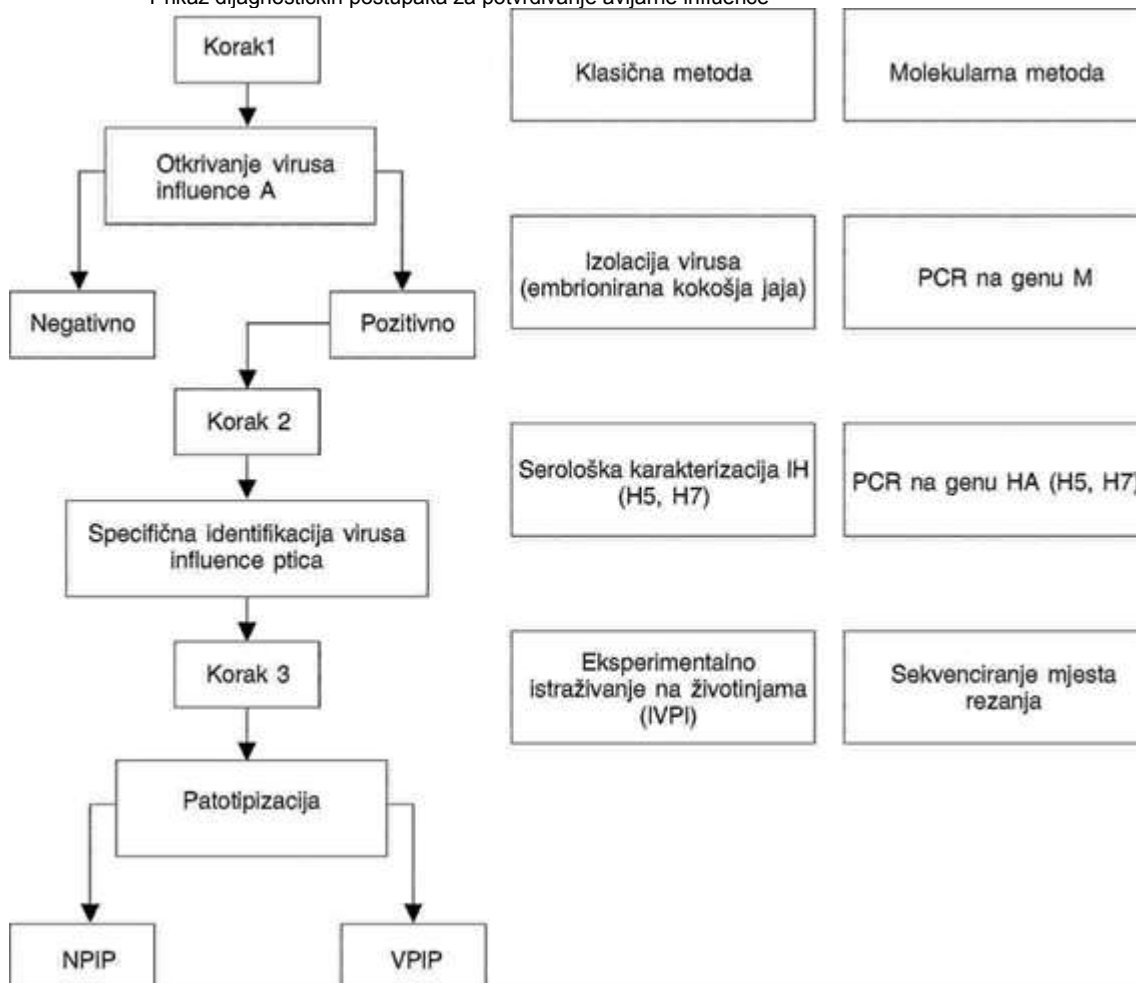
ODJELJAK B

Smjernice koje se uzimaju obzir u slučaju sumnje na avrijarnu influencu na gazdinstvu

Iznenadna visoka smrtnost sa ili bez bilo kakvih odgovarajućih kliničkih simptoma ispituje se dostavljanjem uzoraka za laboratorijsko ispitivanje.

Brza dijagnoza NPAI i VPAI prouzrokovane podtipovima H5 i H7 je veoma važna u ranoj kontroli i iskorjenjivanju pa je u skladu sa diferencijalnom dijagnostikom respiratornih smetnji, problema sa razvojem jaja i povećanom smrtnošću živine opravdano posumnjati na avijarnu influencu i uzeti i dostaviti odgovarajuće uzorke na laboratorijsko ispitivanje.

Prikaz dijagnostičkih postupaka za potvrđivanje avijarne influence



ODJELJAK C
Postupci za prikupljanje i prevoz uzoraka

A. Postupci koje treba sprovoditi u slučaju sumnje na izbijanje avijarne influence

(1) U slučaju sumnje na avijarnu influencu ili dobijanja laboratorijskih rezultata koji nijesu negativni, sprovode se odgovarajući pregledi, uzimanje i laboratorijsko ispitivanje u skladu sa članom 4 ovog pravilnika i ovim prilogom, a nakon dobijanja negativnog kliničkog odnosno laboratorijskog ispitivanja, može se isključiti sumnja na izbijanje avijarne influence.

(2) Sumnja na prisustvo virusa avijane influence može se isključiti kada je dostavljen odgovarajući broj bolesnih ili uginulih ptica i briseva dušnika/ždrijela ili kloake za otkrivanje tog virusa ili njegovog genoma i kada su dobijeni negativni rezultati korišćenjem jedne od specifičnih metoda za otkrivanje virusa iz ovog priloga.

(3) Na gazdinstvu za koje se sumnja da je zaraženo virusom avijarne influence uzima se dovoljan broj uzoraka za virološko ili serološko laboratorijsko ispitivanje (u daljem tekstu: standardni set uzoraka) i dostavlja u laboratoriju na virološko i serološko laboratorijsko ispitivanje.

Standardni set uzoraka za virološko testiranje uključuje:

- najmanje pet bolesnih/uginulih ptica, ako ih ima; i/ili
- najmanje 20 briseva dušnika/ždrijela i 20 briseva kloake.

Uzorkuju se leševi ptica koje su uginule nedavno ili ptica koje su teško bolesne ili u fazi uginuća i koje su usmrćene na human način. Brisevi se naročito uzimaju od ptica koje pokazuju kliničke simptome bolesti, a na sumnjivom gazdinstvu na kojem je prisutno manje ptica, od svih ptica.

Brisevi kloake moraju biti prekriveni fecesom (optimalno 1 g), a ako nije moguće uzimati bris kloake od živih ptica, uzimaju se uzorci svježeg fecesa.

Brisevi dušnika/ždrijela uzimaju se iz usne šupljine.

(4) Standardni set uzoraka za serološko ispitivanje uključuje najmanje 20 uzoraka krvi.

Uzorci se naročito uzimaju od ptica za koje se sumnja da su bolesne ili da su ozdravile.

(5) Prevoz uzoraka

Uzete briseve treba ohladiti ledom ili ulošcima sa smrznutim gelom i odmah dostaviti u laboratoriju.

Uzorci se ne smiju zamrzavati, osim u slučaju ako se ne može obaviti brz prevoz u laboratoriju u okviru 24 sata, uzorci se odmah zamrzavaju i prevoze u suvom ledu.

Nakon uzorkovanja, brisevi se smještaju u antibiotski ili specifični transportni medijum za virus na 4°C, tako da su u cijelosti uronjeni, a u nedostatku tog medijuma, brisevi se moraju vratiti u epruvete suvi i dostaviti u laboratoriju na testiranje.

(6) Antibiotski medijum

Antibiotski medijum se priprema na bazi puferizovanog fosfatnog rastvora (phosphate-buffered saline) pH 7,0 – 7,4 (provjerenoj nakon dodavanja antibiotika).

Proteinski medijum, kao što je moždano-srčani bujon (brain-heart-infusion medium) ili tris puferizovana triptaza (tris-buffered tryptose), virusu može dati dodatnu stabilnost, posebno za vrijeme prevoza, a upotrijebljeni antibiotici i njihove koncentracije mogu varirati obzirom na lokalne uslove i dostupnost.

Za uzorke fecesa mogu se koristiti visoke koncentracije antibiotika: 10 000 IJ/ml penicilina, 10 mg/ml streptomcina, 0,25 mg/ml gentamicina i 5 000 IJ/ml nistatina, koje se mogu smanjiti do pet puta za tkiva i briseve dušnika.

U slučaju ispitivanja *Chlamydothile* dodaje se 0,05-0,1 mg/ml oksitetraciklina.

(7) Moždano-srčani bujon priprema se u vodi i treba da sadrži 15 % m/v praška za moždano-srčani bujon prije sterilizacije (autoklaviranjem pri 121°C/15 minuta), a nakon sterilizacije dodaju se antibiotici na sljedeći način: 10 000 IJ/ml penicilina G, 20 µg amfotericina B i 1 000 µg/ml gentamicina.

Medijumi se mogu uskladištiti na 4 °C najduže dva mjeseca.

B. Sumnja na izbijanje bolsti: postupci provjere i uzimanja uzoraka sa gazdinstava sumnjivih na avijarnu influencu

Da bi se potvrdila ili isključila avijarna influenza, u skladu sa članom 4 ovog pravilnika, službeni veterinar na sumnjivom gazdinstvu:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu, ako postoje evidencije o dnevnim uginućima, dnevnoj proizvodnji jaja, uzimanju hrane i/ili vode u periodu koje počinje nedelju dana prije pojave kliničkih znakova avijarne influence i završava danom kada je službeni veterinar pregledao gazdinstvo;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;
- naređuje uzimanje standardnog seta uzoraka iz svake proizvodne jedinice ako na osnovu al. 1 i 2 ove tačke nije isključena sumnja na avijarnu influencu;
- u slučaju negativnih laboratorijskih rezultata, prije ukidanja službenog nadzora, vrši još jedan klinički pregled živine ili drugih ptica u svakoj proizvodnoj jedinici.

C. Mjere koje se sprovode na gazdinstvima na kojima je potvrđeno izbijanje VPAI

(1) Prilikom pregleda gazdinstva na kojem se nalazi živina živine koja se izlegla iz jaja sakupljenih na gazdinstvu tokom perioda inkubacije na gazdinstvu na kojem je potvrđena VPAI, u skladu sa članom 8 stav 1 tačka 3 ovog pravilnika, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu, ako postoje evidencije o dnevnim uginućima, dnevnoj proizvodnji jaja, uzimanju hrane i/ili vode u periodu koje počinje nedelju dana prije pojave kliničkih znakova avijarne influence i završava danom kada je službeni veterinar pregledao gazdinstvo;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno ili nemaju očekivani prirast;
- naređuje uzimanje standardnog seta uzoraka od živine stare dvije do tri nedelje;
- ukida službeni nadzor nakon kliničkog pregleda živine starije od 21 dana i negativnih rezultata testiranja standardnih uzoraka.

(2) Za sprovođenje daljeg nadzora nekomercijalnog gazdinstva, cirkusa, zoološkog vrta, prodavnice kućnih ljubimaca, rezervata ili parka prirode, ograđenog prostora u kojima se drži živina i druge ptice za potrebe naučno istraživačkog rada ili radi očuvanja ugroženih vrsta ptica, registrovane odgajivačnice rijetkih rasa živine ili drugih ptica, na kojem je potvrđena VPAI, u skladu sa članom 8 stav 1 tačka 3 ovog pravilnika, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu, ako postoje;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica,

- posebno onih koje izgledaju bolesno;
- naređuje uzimanje, 21. dan nakon posljednjeg pozitivnog nalaza za VPAI u razmacima od 21 dan iz svake proizvodne jedinice:

- a) uzoraka sve uginule živine i ostalih ptica prisutnih u trenutku uzorkovanja;
- b) ako je moguće briseve dušnika/ždrijela i briseve kloake od najmanje 60 primjeraka živine ili drugih ptica, ili sve živine i ptica kad ih je na gazdinstvu manje od 60; ili, ako su ptice male, egzotične ili ako nijesu naučene da se njima rukuje ili bi rukovanje sa njima za ljude bilo opasno, sakupljanje uzoraka svježeg fecesa.

Uzorkovanje iz alineje 3 ove podtačke i laboratorijsko ispitivanje uzoraka vrši se dok se ne dobiju dva uzastopna negativna laboratorijska rezultata u razmaku od barem 21 dan.

- (3) Prilikom pregleda kontaktnog gazdinstva u skladu sa članom 11 st. 1 i 3, službeni veterinar:
 - vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu, ako postoje evidencije o dnevnim uginućima, dnevnoj proizvodnji jaja, uzimanju hrane i/ili vode u periodu koje počinje nedelju dana prije pojave kliničkih znakova avijarne influence i završava danom kada je službeni veterinar pregledao gazdinstvo;
 - vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;
 - ako se kod živine ili drugih ptica koje se drže zatvorene pojave klinički znaci ili indikacije o povećanom dnevnom uginuću (> 3 puta uobičajene stope uginuća u jatu) ili pad u dnevnoj proizvodnji jaja (> 5 %) ili smanjenom dnevnom unosu hrane i/ili vode (> 5 %), odmah se uzimaju standardni uzorci iz svake proizvodne jedinice;
 - ako nema znakova iz alineje 2 i 3 ove podtačke, naređuje uzimanje standardnih uzoraka 21. dan od datuma zadnjeg sumnjivog kontakta sa inficiranim gazdinstvom ili od kada su živina i druge ptice usmrćene.
- (4) Prilikom pregleda komercijalnih gazdinstava u zaraženom području u skladu sa članom 14 st. 2 i 3, službeni veterinar:
 - vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
 - ako postoje indikacije o povećanom dnevnom uginuću (> 3 puta uobičajene stope uginuća u jatu) ili pad u dnevnoj proizvodnji jaja (> 5 %) ili smanjenom dnevnom unosu hrane i/ili vode (> 5 %), naređuje uzimanje standardnih uzoraka iz svake proizvodne jedinice;
 - vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;
 - kad se od vrsta živine ili drugih ptica ne očekuje da jasno pokazuju kliničke znake bolesti ili u slučaju vakcinisane živine i ptica, na osnovu rezultata procjene rizika, naređuje uzimanje standardnih uzoraka iz svake proizvodne jedinice;

Na osnovu rezultata procjene rizika, može se vršiti dodatni službeni nadzor sa kliničkim pregledima i uzorkovanjem za laboratorijsko testiranje na ciljanim gazdinstvima, kompartmentima i vrstama proizvodnje.

- (5) Prilikom pregleda gazdinstva u zaraženom području na kojem je prijavljeno povećanje oboljevanja ili uginuća ili promjena u podacima o proizvodnji u skladu sa članom 14 tačka 9, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
- ako postoje indikacije o povećanom dnevnom uginuću (> 3 puta uobičajene stope uginuća u jatu) ili pad u dnevnoj proizvodnji jaja (> 5 %) ili smanjenom dnevnom unosu hrane i/ili vode (> 5 %), naređuje uzimanje standardnih uzoraka iz svake proizvodne jedinice;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno.

- (6) Prilikom pregleda gazdinstva radi odobravanja direktnog prevoza živine sa gazdinstva iz zaraženog područja na hitno klanje u klanicu, u skladu sa članom 16 stav 1 tačka 2 ovog pravilnika, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine, posebno onih koje izgledaju bolesno, u periodu od najviše 24 sata prije iznošenja živine;
- naređuje, u skladu sa rezultatima procjene rizika, uzimanje umjesto standardnih uzoraka, najmanje 60 briseva dušnika/ždrijela i/ili briseva kloake od živine iz svake proizvodne jedinice iz koje se živina šalje na klanje, u periodu od najviše 48 sata prije iznošenja živine.

- (7) Prilikom pregleda gazdinstva radi odobravanja direktnog prevoza kokošaka neposredno pred pronos na gazdinstvo ili dio gazdinstva u kojem nema druge živine, na zaraženo ili ugroženo područje skladu sa članom 18 ovog pravilnika, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine, posebno onih koje izgledaju bolesno, u periodu od najviše 24 sata prije iznošenja živine;
- naređuje, u skladu sa rezultatima procjene rizika, uzimanje umjesto standardnih uzoraka najmanje 60 briseva dušnika/ždrijela i/ili briseva kloake od živine iz svake proizvodne jedinice iz koje se živina šalje na klanje, u periodu od najviše 48 sata prije iznošenja živine.

- (8) Prilikom pregleda gazdinstva radi odobravanja direktnog prevoza rasplodnih jaja u skladu sa članom 19 stav 1 tačka 1 podtačka a), službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, svakih 15 dana;
- naređuje uzimanje standardnih uzoraka iz svake proizvodne jedinice.

- (9) Mjere iz čl. 13 do 20 ovog pravilnika koje se sprovode u zaraženom području mogu se ukinuti najranije 21 dan nakon datuma završetka preliminarne čišćenja i dezinfekcije zaraženog gazdinstva (član 21 stav 1), pod uslovom da su:

- sva komercijalna gazdinstva u zaraženom području pregledana od strane službenog veterinar i da su rezultati svih kontrola, kliničkih pregleda kao i laboratorijskih testova iz podtačke 4 al. 1 do 4 i podtačke 5 ove tačke negativni;
- sva nekomercijalna gazdinstva u zaraženom području pregledana od strane službenog veterinar i da klinički pregled i rezultati sprovedenih laboratorijskih testova ne izazivaju sumnju na infekciju avijarnom influencom;
- rezultati svakog dodatnog službenog nadzora koji je sproveden u skladu sa podtačkom 4 stav 2 ove tačke, negativni.

- (10) Prilikom pregleda gazdinstva u ugroženom području na kojem je prijavljeno povećanje oboljevanja ili uginuća ili promjena u podacima o proizvodnji u skladu sa članom 22 stav 1 tačka 7, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;

- naređuje uzimanje standardnih uzoraka iz svake proizvodne jedinice.
- (11) Prilikom pregleda gazdinstva sa kojeg potiče živina ili druge ptice u slučaju sumnje ili potvrđenog prisustva VPAI u klanicama i prevoznim sredstvima, u skladu sa članom 23 ovog pravilnika, službeni veterinar:
 - vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
 - vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, uzimajući u obzir podatke o predhodnim kontrolama i rezultate *ante mortem* i *post mortem* dobijene od službenog veterinara u klanici;
 - naređuje uzimanje standardnog seta uzoraka iz svake proizvodne jedinice u skladu sa al. 1 i 2 ove tačke, ako nije isključena sumnja na avijarnu influencu;
 - naređuje uzorkovanje i dostavljanje na laboratorijsko ispitivanje barem pet bolesnih ptica, uginulih ptica ili ptica zaklanih u klanici sa patološkim promjenama.
 - ukida službeni nadzor nakon završetka ispitivanja ako su dobijeni negativni laboratorijski rezultati iz al. 3 i 4 ove podtačke i ako nema kliničke sumnje na prisustvo VPAI na gazdinstvu porijekla ni u klanici.
- (12) Prilikom pregleda živine ili drugih ptica koje su izolovane zbog sumnje ili potvrde VPAI na graničnim inspekcijskim mjestima ili prevoznim sredstvu u skladu sa članom 25 stav 2 ovog pravilnika, službeni veterinar:
 - vrši provjeru dokumentacije i evidencije;
 - vrši klinički pregled živine i drugih ptica koje su izolovane, kao i ostale živine i drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;
 - naređuje uzimanje standardnih uzoraka živine ili drugih ptica, iz različitih transportnih kutija ili kaveza.
- (13) Prilikom pregleda gazdinstva sa kojeg potiče živina ili druge ptice koje su zaklane zbog sumnje ili potvrde VPAI na graničnim inspekcijskim mjestima ili prevoznim sredstvu u skladu sa članom 25 stav 2 ovog pravilnika, službeni veterinar:
 - vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
 - vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, uzimajući u obzir podatke o predhodnim kontrolama i rezultate *ante mortem* i *post mortem* dobijene od službenog veterinara u klanici;
 - naređuje uzimanje standardnog seta uzoraka iz svake proizvodne jedinice u skladu sa al. 1 i 2 ove tačke, ako nije isključena sumnja na avijarnu influencu;
 - naređuje uzorkovanje i dostavljanje na laboratorijsko ispitivanje barem pet bolesnih ptica, uginulih ptica ili ptica zaklanih u klanici sa patološkim promjenama.
 - ukida službeni nadzor ako su dobijeni negativni laboratorijski rezultati iz al. 3 i 4 ove podtačke i ako nema kliničke sumnje na prisustvo VPAI na gazdinstvu porijekla ni u klanici.

D. Mjere koje se sprovode na gazdinstvima na kojima je potvrđeno izbijanje NPAI

- (1) Prilikom pregleda pronađenih pilića koji su se izlegli iz rasplodnih jaja sakupljenih na gazdinstvu tokom perioda inkubacije na gazdinstvu na kojem je potvrđena NPAI, u skladu sa članom 27 stav 3 tač. 1 i 2 ovog pravilnika, službeni veterinar:
 - vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
 - vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica;
 - naređuje uzimanje standardnog seta uzoraka od živine koja se upućuje na klanje, u periodu od najviše 48 sata prije iznošenja živine;
 - naređuje uzimanje standardnog seta uzoraka od živine koja se je izlegla iz rasplodnih jaja sakupljenih na gazdinstvu tokom perioda inkubacije na gazdinstvu na kojem je potvrđena NPAI.
- (2) Za sprovođenje daljeg nadzora nekomercijalnog gazdinstva, cirkusa, zoološkog vrta, prodavnice kućnih ljubimaca, rezervata ili parka prirode, ograđenog prostora u kojima se drži živina i druge ptice za potrebe naučno istraživačkog rada ili radi očuvanja ugroženih vrsta ptica, registrovane odgajivačnice rijetkih rasa živine ili drugih ptica, na kojem je potvrđena NPAI, u skladu sa članom 28 stav 2 tačka 2 ovog pravilnika primjenjuju se mjere iz tačke H podtačke 2 ovog priloga.
- (3) Prilikom pregleda kontaktnog gazdinstva u skladu sa članom 11 st. 1 i 3, službeni veterinar:
 - vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
 - vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;
 - naređuje uzimanje standardnog seta uzorka usmrćene živine ili drugih ptica, iz svake proizvodne jedinice.
- (4) Prilikom pregleda komercijalnih gazdinstava u području pod ograničenjem u skladu sa članom 31 stav 1 tačka 2 ovog pravilnika, službeni veterinar:
 - vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
 - vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;
 - naređuje uzimanje standardnog seta uzorka živine ili drugih ptica, iz svake proizvodne jedinice.

Na osnovu rezultata procjene rizika, može se vršiti dodatni službeni nadzor sa kliničkim pregledima i uzorkovanjem za laboratorijsko testiranje na ciljanim gazdinstvima, kompartmentima i vrstama proizvodnje.

- (5) Mjere iz člana 31 ovog pravilnika koje se sprovode području pod ograničenjem mogu se ukinuti u skladu sa članom 32, pod uslovom da:
 - su sva komercijalna gazdinstva u području pod ograničenjem pregledana od strane službenog veterinara i da su izvršena laboratorijska ispitivanja u skladu sa podtačkom 11 al. 3 i 4;
 - su rezultati dodatnih kontrola, kliničkih pregleda i laboratorijskih testova, uključujući i nekomercijalna gazdinstva dostupni radi određivanja rizika od širenja NPAI;
 - je rizik od širenja NPAI zanemarljiv, na osnovu procjene rizika, gdje su uključeni i podaci o epizootološkoj situaciji i rezultatima laboratorijskog ispitivanja iz al. 1 i 2 ove podtačke (ako je serološki nalaz pozitivan a virusološki negativan).

E. Laboratorijska testiranja i druge mjere koje se odnose na svinje i druge vrste

Prilikom pregleda svih svinja na gazdinstvu na kojem je potvrđena avijarna influenza živine ili drugih ptica, radi potvrđivanja ili isključivanja zaraze tih svinja virusom avijarne influence u skladu sa članom 33 stav 1, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;

- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled svinja, posebno onih koje izgledaju bolesno;
- naređuje uzimanje briseva dušnika/ždrijela od najmanje 60 svinja iz svake proizvodne jedinice ili od svih svinja u proizvodnoj jedinici kad ih je manje od 60; na dan ili prije izdvajanja zaražene živine ili drugih ptica i dvije do četiri nedelje od dana izdvajanja, uzorkovanje najmanje 60 uzoraka krvi svinja, po mogućnosti iz grupe svinja koje su u direktnom međusobnom kontaktu;
- može odobriti premještanje svinja na druga gazdinstva ako su dobijeni negativni laboratorijski rezultati najmanje 60 briseva nosa/ždrijela i 60 uzoraka krvi svinja iz svake proizvodne jedinice, uzetih 14 dana nakon pozitivnih nalaza avijarne influence kod živine ili drugih ptica na gazdinstvu;
- može odobriti premještanje svinja u klanicu ako su dobijeni negativni laboratorijski rezultati najmanje 60 briseva nosa/ždrijela svinja iz svake proizvodne jedinice, uzetih 14 dana nakon pozitivnih nalaza avijarne influence kod živine ili drugih ptica na gazdinstvu;
- u slučaju sumnjivih ili pozitivnih laboratorijskih rezultata, naređuje dodatna ispitivanja kako bi se isključila zaraza ili prenos Avijarne influence među svinjama;
- u slučaju sumnje da su drugi domaći sisari na gazdinstvima, a posebno oni koji su identifikovani kao prijemčivi na zarazu virusom avijarne influence podtipova H5 i H7, bili u kontaktu sa zaraženom živinom ili drugim pticama, naređuje uzimanje uzoraka za laboratorijsko ispitivanje.

F. Ponovno naseljavanje gazdinstva

Prilikom pregleda komercijalnog gazdinstva koje je ponovno naseljeno svinjama, u skladu sa članom 35 tač. 2 i 3 ovog pravilnika, službeni veterinar:

- vrši provjeru podataka o proizvodnji i zdravstvenom stanju na gazdinstvu;
- vrši klinički pregled u svakoj proizvodnoj jedinici, uključujući procjenu istorije bolesti i klinički pregled živine ili drugih ptica, posebno onih koje izgledaju bolesno;
- naređuje uzimanje uzoraka iz svake proizvodne jedinice:
 - a) najmanje 20 uzoraka krvi odmah po naseljavanju živine na gazdinstvo, osim u slučaju jednodnevnih pilića; ili uzorkovanje na gazdinstvu porijekla živine, prije premještanja na gazdinstvo za ponovno naseljavanje;
 - b) uginule živine ili briseva uzetih sa leševa najviše 10 uginulih ptica svakih nedelju dana, u periodu od 21 dana od datuma ponovnog naseljavanja;
- naređuje uzimanje 20 briseva dušnika/ždrijela i 20 briseva kloake vodenih ptica (patke/guske) iz svake proizvodne jedinice, ako je to potrebno, tokom posljednje nedjelje 21-dnevnog perioda od datuma ponovnog naseljavanja; ako je gazdinstvo bilo prethodno zaraženo VPAI;
- naređuje uzimanje 20 briseva dušnika/ždrijela, 20 briseva kloake i 20 uzoraka krvi iz svake proizvodne jedinice, ako je gazdinstvo bilo prethodno zaraženo NPAI.

G. Vakcinacija živine ili drugih ptica

Kada se primjenjuje preventivna vakcinacija živine ili drugih ptica iz člana 37 stav 1 ovog pravilnika mogu da se sprovede:

- laboratorijska ispitivanja vakcinisane živine ili drugih ptica primjenom DIVA testa za otkrivanje antitijela protiv terenskog soja virusa;
- ispitivanja nevakinisanih sentinel ptice koje moraju biti prisutne u svakom vakcinisanom jatru, klinički pregledane i testirane korišćenjem inhibicije hemaglutinacije (IHA), uzimanjem 20 uzoraka krvi sentinel ptica svakih 60 dana u u svakom vakcinisanom gazdinstvu.

ODJELJAK D

Dijagnostički virološki testovi i procijena rezultata

(1) Obrada uzoraka

Ukoliko su brisevi dostavljeni „suvi“, stavlja se u dovoljnu količinu rastvora antibiotika tako da su potpuno utopljeni.

Uzorci mogu biti objedinjeni u grupe od pet (pulirani), ako su uzeti od iste vrste, u isto vrijeme i iz iste epizootičke jedinice.

Na leševima koji su dostavljeni u laboratoriju obavlja se post mortem pregled i uzimaju uzorci slijedećih organa: fecesa ili sadržaja crijeva, moždanog tkiva, dušnika, pluća, jetre, slezine i ostalih vidno promijenjenih organa, a organi i tkiva mogu se pulirati, osim fekalnog materijala koji se obrađuje odvojeno.

Uzorke fecesa i organa treba homogenizovati (u zatvorenom homogenizatoru ili koristiti tarionik i tučak i sterilni pjesak) u rastvoru antibiotika, tako da se dobije 10–20% m/v suspenzije u rastvoru.

Utopljene briseve i suspenzije treba ostaviti približno dva sata na sobnoj temperaturi (ili duže na 4°C), a zatim pročitati centrifugovanjem (npr. 10 minuta na 800 do 1 000 × g).

(2) Izolacija virusa u kokošijem embrionu

Količina od 0,1 – 0,2 ml očišćenog supernatanta inokulira se u alantoisnu šupljinu svakog od najmanje četiri kokošija embriona, koja su bila inkubirana od devet do 11 dana, a jaja treba da potiču iz jata slobodnog od specifičnih patogena (SPF), a mogu se koristiti jaja iz jata za koje je dokazano da su slobodna od antitijela za virus avijarne influence (negativna antitijela u serumu – SAN).

Inokulirana jaja treba da se drži na 37 °C i svakodnevno prosvjetljavaju.

Jaja sa uginulim ili umirućim embrionima, kao i sva ostala jaja, šest dana nakon inokulacije potrebno je ohladiti na 4°C, a alantoamnijske tečnosti testirati na hemaglutinacijsku aktivnost, a ako se hemaglutinacija ne detektuje, postupak se ponavlja sa nerazrijeđenom alantoamnijskom tečnošću kao inokulumom.

Ako se hemaglutinacija detektuje, bakteriološkim ispitivanjem isključuje se prisutnost bakterija u kulturi.

Ako su bakterije prisutne, tečnosti se mogu profiltrirati kroz membranski filter sa porama od 450nm, u tečnost se dodaju antibiotici, a zatim se ponovno inokuliraju u kokošje embione, što se primjenjuje i u slučaju ponovljenih pasaža, uz dodavanje veće količine antibiotika.

(3) Diferencijalna dijagnoza

a. Preliminarno razlikovanje

Laboratorija koja je izolovala hemaglutinirajući virus utvrđuje da se radi o virusu influence A podtipa H5 ili H7 ili virusu Njukastl bolesti, a pozitivna inhibicija hemaglutinacije dobijena testom inhibicije hemaglutinacije, kao što je titar od 2 do 3 log₂ pozitivne kontrole, sa

poliklonskim antiserumima specifičnim za podtipove H5 ili H7 virusa influence A, može poslužiti kao preliminarna identifikacija koja omogućuje uvođenje privremenih kontrolnih mjera.

b. Potvrдна identifikacija

Laboratorija treba da:

- potvrdi da je izolat virus influence A korišćenjem imunodifuzijskog testa za identifikaciju grupno-specifičnog antigena;
- odredi da li izolat podtipa H5 ili H7; pozitivna identifikacija zahtjeva sprovođenje kontrolnih mjera za podtipove H5 i H7 virusa NPAI;
- preda sve izolate VPAI i sve H5 i H7 izolate referentnoj laboratoriji EU radi potvrđivanja i pune karakterizacije.

Kod pilića starih šest nedjelja sprovodi se IVIP, s tim kada je IVIP veći od 1,2, što ukazuje na prisustvo virusa, sprovode sve mjera za kontrolu VPAI u skladu sa ovim pravilnikom.

c. Dalja tipizacija i karakteriziranje izolata

Svi hemaglutinirajući virusi dostavljaju se referentnoj laboratoriji Evropske unije za avijarnu influencu radi dalje antigenske i genske tipizacije.

Za viruse H5 i H7 koji nemaju intravenske indese patogenosti veće od 1,2 odmah se sprovodi određivanje slijeda nukleotida u genu hemaglutinina, kako bi se utvrdilo ima li na mjestu cijepanja prekursora hemaglutininskog proteina višestruko zastupljenih bazičnih aminokislina.

ODJELJAK E

Molekularni testovi i procjena rezultata

Molekularna identifikacija virusa avijarne influence vrši se upotrebom molekularnih testova za dijagnostiku avijarne influence.

Testovi i procjena rezultata vrše se prema standardnim protokolima Međunarodne organizacije za zdravlje životinja ili referentne laboratorije Evropske unije za avijarnu influencu.

ODJELJAK F

Testovi patogenosti in vivo i procjena rezultata

Virulentnost za piliće virusa influence A izolovanih iz ptica, ispituje se testom za određivanje indeksa intravenske patogenosti (IVPI), koji se vrši na sljedeći način:

- 1) svježa infektivna alantoisna tečnost s titrom HA > 1/16 (> 24 ili > log₂ 4, kad je izražen kao recipročna vrijednost) iz najniže raspoložive pasaže, po mogućnosti iz prve izolacije bez ikakve selekcije, razrjeđuje se na 1/10 u sterilnom izotoničnom fiziološkom rastvoru;
- 2) 0,1 ml razrijeđenog virusa intravenozno se injektira u svaki od deset pilića SPF ili SAN starih šest nedjelja;
- 3) ptice se pregledaju tokom deset dana svaka 24 sata, a pri svakom pregledu ptica ocjenjuje se sa 0 ako je njeno stanje normalno, sa 1 ako je bolesna, sa 2 ako je jako bolesna i sa 3 ako je mrtva, a ocjenjivanje ptice kao bolesne ili jako bolesne subjektivna je klinička procjena.

„Bolesne” ptice obično pokazuju jedan od slijedećih znakova, a „jako bolesne” više slijedećih znakova: poteškoće sa disanjem, iscrpljenost, proliv, cijanozu izložene kože ili podbratka, edem prednjega dijela glave i/ili glave, nervne poremećaje.

Uginule ptice ocjenjuju se sa 3 u svakom sljedećem dnevnom pregledu nakon uginuća.

Ptice koje su bolesne tako da ne mogu jesti i piti i očekuje se njihovo uginuće u narednih 24 sata, treba da se usmrte na humani način.

IVPI srednji je rezultat po ptici za posmatranje tokom 10 dana. Indeks 3,00 znači da su sve ptice uginule u narednih 24 sata, indeks 0,00 znači da nijedna ptica nije pokazala ni jedan klinički znak u periodu desetodnevnog posmatranja.

Bilježenje rezultata i izračunavanje indeksa vrši se na sljedeći način:

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

10 ptica posmatranih tokom 10 dana = 100 posmatranja

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

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

ODJEKLJAK G

Serološki testovi i procjena rezultata

Prisutnost virusa influence A vrši se dokazivanjem antigena nukleoproteina ili matriksa koji su zajednički svim virusima influence A, imunodifuzijskim testom, koji uključuje preparate koncentrisanih virusa ili ekstrakte iz zaraženih hrioalantoisnih membrana.

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

Testovi i procjena rezultata vrše se prema standardnim protokolima Međunarodne organizacije za zdravlje životinja ili referentne laboratorije Evropske unije za avijarnu influencu.

ODJELJAK H

Sistemi praćenja povezani sa vakcinisanjem

(1) Uslovi za hitnu i preventivnu vakcinaciju

Radi sprječavanja zaraze i daljeg širenja virusa među jatima ptica vrši se hitno ili preventivno vakcinisanje.

Vakcinacijom se povećava količina virusa potrebnog da zarazi živinu i druge ptice i smanjuje količina izlučenog virusa.

Podtipovi VPAI H5 i H7 mogu u jatu sa suboptimalnim nivoom imuniteta kružiti na isti način kao i virus NPAI unutar nevakcinisanog jata, pa je posebno važno razlikovati virus-pozitivna vakcinisana jata koja su se zarazila divljim (terenskim) virusom, radi preuzimanja mjera za kontrolu bolesti – usmrćivanje.

(2) Korišćenje sentinel ptica za praćenje zaraze

U jatu se vrši redovno praćenje sentinel ptica koje u vakcinisanom jatu nijesu bile vakcinisane, koje imaju kontakt sa vakcinisanim pticama.

(3) Laboratorijski test DIVA za praćenje zaraze

Za praćenje infekcije ili kao dopuna vakcinaciji na vakcinisanim pticama se može sprovoditi testiranje na izloženost divljem virusu upotrebom laboratorijskih testova DIVA.

Otkrivanje izloženosti vakcinisanih ptica terenskom virusu vrši se primjenom više sistema testiranja, a efikasna metoda je upotreba vakcine koja sadrži virus istog podtipa hemaglutinina (H), ali različitu neuraminidazu (N) od preovlađujućeg divljeg virusa tako da antitijela na N divljeg virusa deluju kao prirodni markeri zaraze.

Upotreba vakcina koja sadrže samo HA, kao što su rekombinantna vektorska vakcina, omogućuje primjenu klasičnih testova AGID ili testova ELISA, koji se zasnivaju na nukloproteinu, nestrukturinom proteinu ili proteinima matriksa za otkrivanje zaraze kod vakcinisanih ptica.

Za inaktivirane vakcine opisan je test koji otkriva antitijela za nestrukturane virusne proteine, koji nastaju samo za vrijeme prirodne infekcije, a taj sistem treba još potvrditi na terenu, međutim ima ograničenja, jer pri prirodnoj zarazi jata bilo kojim virusom influence, nezavisno od podtipa, nastaju antitijela za nestrukturane proteine.

Brze i osjetljive metoda za otkrivanje virusa, posebno one koji se lako automatiziraju, kao što je metoda lančane reakcija polimeraze u realnom vremenu - RT-PCR (*Real Time RT-PCR*), mogu se koristiti za jednostavno i redovno testiranje velikog broja uzoraka vakcinisanih ptica na prisutnost divljeg virusa, u akutnoj fazi zaraze i ne može da se koristi za donošenje zaključka da jato u prošlosti nije bilo izloženo virusu, već za testiranje vakcinisanih ptica prije njihovog premještanja, kao dokaz da su slobodne od akutne infekcije.

Broj uzoraka koji treba testirati sistemima po izboru mora omogućiti isključivanje prevalencije zaraze virusom avijarne influence u jatu veće od 15 % uz stepen pouzdanosti od 95%.

ODJELJAK I

Dijagnoza avijarne influence

Prilikom dijagnostičkog ispitivanja uzimaju se u obzir mnogi činioci i to:

Stanje bolesti	Mogući problem	Dijagnostički kriterijumi
Bez specifičnih znakova, bez službene sumnje.	Izolovano gazdinstvo.	Sprovesti brzo otkrivanje na osnovu tehnike RT-PCR za M gen. Prema potrebi diferencijalna dijagnoza.
Prva sumnja na izbijanje bolesti.	Izolovano gazdinstvo.	Sprovesti cjelovito dijagnostičko testiranje, izolaciju i karakterizaciju virusa.
Prva sumnja na izbijanje bolesti.	Gazdinstvo na području sa velikom gustoćom živine.	Sprovesti cjelovito dijagnostičko testiranje, izolovanje i karakterizaciju virusa, ali se pritom usredsrediti na metode brzog otkrivanja i metode karakterizacije, posebno one koje se zasnivaju na RT-PCR i sekvenciranju ¹ .
Druga i svaka sljedeća sumnja na izbijanje bolesti.	Izolovana gazdinstva, epizootički povezana sa prvom sumnjom na izbijanje bolesti.	Usredsrediti se na metode brzog otkrivanja i metode karakterizacije, posebno one koje se zasnivaju na RT-PCR i sekvenciranju ¹ .
Druga i svaka slijedeća sumnja na izbijanje bolesti.	Gazdinstvo na području sa velikom gustoćom živine ili sa mnogo epizootičkih veza.	Pouzdati se u metode brzog otkrivanja, koje najranije pružaju dokaz o prisutnosti bilo kojeg virusa Avijarne influence ¹ .
Višestruke sumnje na izbijanje bolesti ili brzo širenje bolesti, uključujući nadziranje.	Bez brzog djelovanja neće biti moguće zaustaviti širenje bolesti.	Osloniti se na metode brzog otkrivanja, koje najranije pružaju dokaz o prisutnosti bilo kojeg virusa Avijarne influence ¹ .

ODJELJAK J

Dijagnoza zaraze virusima avijarne influence kod svinja i u drugih sisara

(1) Infekcija virusima avijarne influence kod svinja i drugih sisara

Virusi avijarne influence lako se prenose na svinje, iako je umnožavanje virusa u većini slučajeva relativno ograničeno, postoji mogućnost prenošenja bolesti sa zaraženih svinja na živinu i druge prijemčive životinje.

Nije utvrđeno da zaražene svinje prenose viruse avijarne influence podtipova H5 i H7.

Zaražene svinje uglavnom ne pokazuju kliničke znakove bolesti.

Za laboratorijsku dijagnostiku zaraze virusom avijarne influence kod svinja koriste se metode zasnovane na izolaciji virusa molekularnim tehnikama i otkrivanju specifičnih antitijela upotrebom testova inhibicije hemaglutinacije.

(2) Uzorci za izolaciju avijarne influenza kod svinja

Zaraze virusom Avijarne influence ograničene su na respiratorni sistem i uzorci se uzimaju iz tkiva respiratornog sistema, brisevi ždrijela ili nosa, po mogućnosti od svinja koje pokazuju znakove bolesti.

Ti uzorci i brisevi mogu se obrađivati za izolaciju virusa ili molekularnu detekciju virusa, tehnikama koje se koriste za ispitivanje uzoraka kod ptica.

(3) Inokulacija i inkubacija jaja

Za izolaciju virusa influence kod sisara u embrioniranim kokošjim jajima starim od devet do 11 dana, inokulira se svako jaje preko alantoisne šupljine u amniotsku šupljinu, a pri ispitivanju svinja koje su bile u dodiru sa virusima avijarne influence, kad je virus imao malo mogućnosti za adaptaciju, inokulacija alantoisne šupljine je dovoljna, a pri izolaciji virusa influence A kod sisara inkubacijska temperatura je 35°C.

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

Iako su izolacija virusa i molekularna dijagnostika najosjetljivije metode za dokazivanje zaraze virusom avijarne influence kod svinja, koriste se i testovi IHA za koje se prethodno serum svinja mora tretirati receptorom koji uništava enzime kako bi se izbjegla nespecifična inhibicija, na sljedeći način:

- u 100 µl svinjskog seruma dodajte 400 µl RDE (pripremljeno radno razrijeđenje) i dobro promiješati;
- inkubirati jedan sat na 37°C
- zatim inkubirati 30 minuta na 56°C;
- uzorke hladiti na 4°C najmanje 15 minuta;
- dodati 10 µl 30-postotnih eritrocita pilića i dobro promiješati;
- inkubirati preko noći na 4°C, ili kao druga mogućnost, ako je uzorke potrebno upotrijebiti još isti dan, da se inkubiraju jedan sat na 37°C i pet minuta centrifugiraju na 300 x g.

Obrađeni serum se zatim koristi u testovima IHA, kao za serume ptica, a početno razrjeđivanje je 1:10, upotrebljava se serija seruma od svinja sa poznatim sero-negativnim statusom u pogledu avijarne influence, kako bi se procijenila specifičnost testa IHA za upotrijebljeni soj virusa.

(5) Uzorkovanje svinja

Na gazdinstvima na kojima se drže i svinje i živina, u zajedničkim ili odvojenim prostorijama, svinje su u opasnosti da se zaraze Aviajnom influencom direktno ili indirektno, dodirima sa živinom ili proizvodima od živine, a radi sprječavanja infekcije uzimaju se brisevi ždrijela ili nosa i uzorke krvi, a uzorci se uzimaju od svinja koje pokazuju kliničke znake bolesti, a ako su klinički znaci odsutni, uzorci se uzimaju nasumično iz različitih dijelova prostora.

Brisevi se testiraju brzim molekularnim testovima i/ili izolacijom virusa.

Metode RT-PCR treba na odgovarajući način potvrditi i njihova osjetljivost mora biti barem jednaka onoj izolacije virusa influence A u jajima.

Dvije do četiri nedjelje nakon izdvajanja živine zaražene aviajnom influencom, uzimaju se uzorci najmanje 60 uzoraka krvi svinja, iz skupina svinja koje su u međusobnom neposrednom kontaktu.

Uzorci se testiraju testom IHA upotrebom virusa koji je dobijen pri izbijanju bolesti kod živine. Pozitivni uzorci mogu se potvrditi neutralizacijom i/ili Western blot analizom.

(6) Virusi avijarne influence kod drugih sisara, osim svinja

Ispitivanje drugih sisara osim svinja koje su prijemčivi na avijarnu influencu, uključujući mačke vrši se VPAI H5N1, a pri testiranju mačaka obavljaju se sljedeća ispitivanja:

- patoanatomske promjene, povezane sa umnažanjem virusa, koncentriraju se u plućima i jetri, a uzorci za virološko ispitivanje uzimaju se od tih organa uginulih životinja.

Kod živih životinja, za detekciju virusa uzimaju se brisovi dušnika/ždrijela, a odvojeno se mogu uzeti brisovi fecesa.

Uzorke krvi koji se pregledavaju analizama IHA obrađuju se na temperaturi od 56 °C 30 minuta, a RDE obrada može se izostaviti.

ODJELJAK K

Zahtjevi za prevoz uzoraka

Pakovanje dijagnostičkih uzoraka za prevoz

Dijagnostički uzorci za prevoz pakuju se na sljedeći način:

- prvi sloj ambalaže:
 - primarna
 - primarnu posudu treba zamotati kako bi se spriječilo razbijanje;
 - primarna posuda ne smije da sadrži više od 500ml ili 500g.
- drugi sloj ambalaže: spoljni sloj ambalaže:
 - ne smije sadržati više od 4l ili 4 kg;
 - mora obezbjediti oslobađanje ugljen dioksida i ne smije dopustiti nastajanje pritiska koji bi mogao oštetiti ambalažu, ako se koristi suvi led koji se stavlja oko drugog sloja;
 - mora biti nepropustan ako se koristi mokri led;
 - svaka ambalaža za vazdušni prevoz i vazdušni tovarni list treba da su označeni na sljedeći način:
„UN 3373 DIAGNOSTIC SPECIMEN
PACKED IN COMPLIANCE WITH
IATA PACKING INSTRUCTION 650”
 - između drugog i spoljašnjeg sloja ambalaže dostavlja se detaljan popis cijelog sadržaja;
 - stavlja se u hermetički zatvorenu plastičnu vreću kako bi se zaštitilo od vlage.

ODJELJAK L
Slanje virusa i uzoraka u referentu laboratoriju EU

(1) Uzorci koji se šalju u referentnu laboratoriju EU treba da su u skladu sa preporukama za prevoz opasnih patogenih stvari u EU.

(2) Svi materijali treba da su zapakovani.

- Spoljni sloj ambalaže treba da bude označen:

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

*Unosi se jedan od sljedećih brojeva dozvole:

i. za viruse avijarne influence:	„AHZ/2232/2002/5**”
ii. za tkiva i ostale materijale:	„AHZ/2074C/2004/3**”

Kako se ovi brojevi dozvole sa vremena na vrijeme mijenjaju, laboratorija koja šalje uzorke mora obezbijediti da se koriste brojevi dozvole koji su trenutno na snazi.

Na ambalaži se navodi adresa:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
United Kingdom

Uz pošiljku se u pisanoj formi prilažu podaci o izolatu (npr. vrsta i starost, područje/država izolacije, podaci o anamnezi).

Ako se pošiljka šalje vazdušnim teretnim prevozom, prije dolaska materijala, referentnoj laboratoriji EU broj pošiljke se javlja faksom, telefonom ili elektronskom poštom javiti broj pošiljke.

Pošiljke koji se šalju vazdušnim prevozom, označavaju se:

„CARE OF TRANSGLOBAL” kako bi se obezbijedila brza obrada na aerodromu.

ODJELJAK M
Minimalni bezbjednosni zahtjevi u dijagnostičkoj laboratoriji za avijarnu influencu

Bezbjednosni zahtjevi u dijagnostičkoj laboratoriji su:

Bezbjednosne mjere	Bezbjednosni nivo			
	1	2	3	4
Laboratorijski prostor: izolacija	ne	da	da	da
Laboratorija, odvojeni vratima	ne	da	da	da
Prisutan prozor za posmatranje ili alternativa, koja bi omogućila posmatranje ljudi	po izboru	po izboru	po izboru	da
Prostori za pranje ruku (za osoblje)	da	da	da	da
Prostori za dezinfekciju (ruku)	po izboru	da	da	da
Ograničen pristup	ne	da	da	da
Posebne mjere za nadzor širenja aerosola	ne	da da	da što više smanjiti	spriječiti spriječiti
Na vratima znak za biološku opasnost	ne	da	da	da
Tuš	ne	ne	po izboru	da
Ispiranje očiju	da	da	da	da
Laboratorija: moguće je hermetički zatvoriti za fumigaciju	ne	ne	da	da
Površine otporne na vodu, kiseline, otapala, sredstva za dezinfekciju i dekontaminaciju, jednostavne za čišćenje	da (radna površina)	da (radna površina)	da (radna površina, pod)	da (radna površina, pod)
Ulaz u laboratoriju kroz vazdušnu barijeru (<i>airlock</i>)	ne	ne	po izboru	da
Podpritisak s obzirom na pritisak neposredne okoline	ne	ne	po izboru	da
Izlazni i ulazni vazduh iz laboratorija mora biti filtriran kroz filter HEPA	ne	ne	da (izlazni zrak)	da
Autoklav	na lokaciji	u zgradi	u laboratoriju	u laboratoriju, sa vratima na oba kraja
Zaštitna odjeća	primjerena zaštitna odjeća	primjerena zaštitna odjeća	primjerena zaštitna odjeća (obuća po izboru)	potpuno presvlačenje odjeće
Rukavice	ne	po izboru	da	da
Efikan nadzor vektora (npr. za glodare i insekte)	po izboru	da	da	da
Sigurno skladištenje biološkog agensa	da	da	da	da
Laboratorija ima vlastitu opremu	ne	ne	preporučuje se	da

KRITERIJUMI ZA PROCJENU RIZIKA SPROVOĐENJE MJERA NA KONTAKTNIM GAZDINSTVIMA

OKVIRNI KRITERIJUMI	
ZA DEPOPULACIJU	PROTIV DEPOPULACIJE
Klinički znaci upućuju na prisutnost avrijarne influence na kontaktnim gazdinstvima	Nema kliničkih znakova koji bi upućivali na avijarnu influencu na kontaktnim gazdinstvima ni epizotoloških veza
Visoka prijemчивost pretežnih vrsta živine	Niska prijemчивost pretežnih vrsta živine
Premještanje živine i drugih ptica sa gazdinstva na kojima je potvrđena avrijarna influenza na kontaktna gazdinstva, nakon vjerovatnog unošenja virusa na zaražena gazdinstva	Nema podataka o premještanju živine ili drugih ptica sa gazdinstva na kojima je potvrđena avrijarna influenza na kontaktna gazdinstva, nakon vjerovatnog unošenja virusa na zaražena gazdinstva
Lokacija kontaktnih gazdinstava na području sa velikom gustom živine	Lokacija kontaktnih gazdinstava na području sa niskom gustom živine
Bolest je prisutna neko vrijeme, postoji vjerovatnoća da se virus proširio sa gazdinstva na kojima je potvrđena avrijarna influenza prije nego što su sprovedene mjere za iskorjenjivanje	Bolest je prisutna, ali je širenje virusa sa gazdinstva na kojima je avrijarna influenza potvrđena ograničeno prije nego što su sprovedene mjere za iskorjenjivanje
Lokacija kontaktnih gazdinstava na udaljenosti manjoj od 500 metara ⁽¹⁾ od gazdinstva na kojima je potvrđena avrijarna influenza	Lokacija kontaktnih gazdinstava na udaljenosti većoj od 500 metara ⁽¹⁾ od gazdinstva na kojima je potvrđena avrijarna influenza
Kontaktna gazdinstva povezana su sa nekoliko gazdinstva na kojima je potvrđena avrijarna influenza	Kontaktna gazdinstva nisu povezana sa gazdinstvima na kojima je potvrđena avrijarna influenza
Epidemija nije pod kontrolom, broj gazdinstava na kojima je potvrđena avrijarna influenza se povećava	Epidemija je pod kontrolom
⁽¹⁾ U slučajevima kada je gustina živine vrlo visoka, potrebno je uzeti u obzir veću udaljenost.	

PRILOG 3

NAČIN ČIŠĆENJA I DEZINFEKCIJE NA GAZDINSTVIMA

(1) Čišćenje i dezinfekcija i mjere za deratizaciju i dezinsekciju sprovode se pod službenim nadzorom i u skladu sa sljedećim uputstvima službenog veterinarara:

- 1) dezinficijensi se upotrebljavaju u skladu sa preporukama proizvođača;
- 2) prilikom upotrebe za odmaščivanje i dezinfekciju posebno treba da se poštuju tehnički parametri proizvođača (pritiska, minimalne temperature i potrebnog vremena izlaganja) radi obezbjeđenja njihove efikasnosti;
- 3) dezinficijens se koristi na sljedeći način:
 - a) detaljnim natapanjem dezinficijensom stajnjaka, upotrebljenog stajnjaka i izmeta;
 - b) pranje i čišćenje četkanjem i ribanjem tla, podova, rampi i zidova nakon uklanjanja ili demontiranja opreme ili instalacija, ako je to moguće, kako ne bi ometali efikasnost čišćenja i dezinfekcije;
- 4) ukoliko se za pranje koristi tečno sredstvo za čišćenje pod pritiskom, treba voditi računa da ne dođe do ponovne kontaminacije prethodno očišćenih dijelova;
- 5) posebna pažnja se posvećuje pranju, dezinfekciji ili uništavanju opreme, instalacija, predmeta ili bilo čega što je vjerovatno kontaminirano;
- 6) nakon postupaka dezinfekcije treba izbjegavati ponovnu kontaminaciju;
- 7) čišćenje i dezinfekcija prevoznih sredstava.
- (2) Čišćenje i dezinfekcija zaraženih gazdinstava vrši se na sljedeći način:
 - 1) preliminarno čišćenje i dezinfekcija:
 - a) tokom usmrćivanja živine ili drugih ptica koje se drže zatvorene moraju se preduzeti sve potrebne mjere kako bi se izbjeglo ili svelo na najmanju moguću mjeru širenje virusa avrijarne influence; uključujući postavljanje privremene opreme za dezinfekciju, nabavku zaštitne odjeće, tuševa, dekontaminaciju stare opreme, uređaja i prostorija, i prekid dovoda električne energije u sistem ventilacije;
 - b) leševe usmrćene živine ili drugih ptica koje se drže zatvorene treba poprskati sredstvom za dezinfekciju;
 - c) leševe živine ili drugih ptica koje se drže zatvorene uklanjaju se sa gazdinstva radi neškodljivog uništavanja i prevoze se u zatvorenim, nepropusnim vozilima ili kontejnerima pod službenim nadzorom, na način da se spriječi širenje virusa avrijarne influence;
 - d) nakon uklanjanja živine ili druge ptice koje se drže zatvorene koje su usmrćene radi neškodljivog uništavanja, dijelove gazdinstva u kojima su bili smješteni i svi dijelovi zgrada, dvorišta koji su kontaminirani tokom usmrćivanja ili obdukcije, treba poprskati dezinficijensom;
 - e) tkiva i krv prolivena tokom usmrćivanja ili obdukcije treba temeljno skupiti i ukloniti zajedno sa usmrćenom živinom ili drugim pticama koje se drže zatvorene;
 - f) dezinficijens treba da ostane na površini najmanje 24 sata;
 - 2) završno čišćenje i dezinfekcija:
 - a) đubrivo i korišćeni stajnjak treba ukloniti i obraditi;
 - b) masnoću i prljavštinu sa svih površina treba ukloniti primjenom sredstva za odmaščivanje, a sve površine treba isprati vodom;
 - c) nakon ispiranja hladnom vodom, površine treba još jedanput poprskati dezinficijensom;

- d) nakon sedam dana (od preliminarog ili završnog čišćenja) gazdinstvo treba obraditi sredstvom za odmašćivanje, isprati vodom, poprskati dezinficijensom i ponovno isprati vodom.
- (3) Dezinfekcija kontaminiranog stajnjaka, đubriva i osoke vrši se na sljedeći način:
- 1) đubrivo i korišćeni stajnjak:
 - a) obrađuju se parom pri temperaturi od najmanje 70 °C; ili
 - b) se spaljuju;
 - c) zakopavaju se dovoljno duboko da bi se onemogućio pristup divljih ptica i drugih životinja; ili
 - d) termički se obrađuju, prskaju dezinficijensom i pohranjuju najmanje 42 dana;
 - 2) prostirka se pohranjuje na najmanje 60 dana nakon posljednjeg dodavanja infektivnog materijala.

PRILOG 4

PODACI KOJI SE DOSTAVLJAJU EVROPSKOJ KOMISIJI I DRŽAVAMA ČLANICAMA EVROPSKE UNIJE

- (1) Evropska komisija obavještava se u roku od 24 sata od potvrđivanja svakog primarnog žarišta ili otkrivanja avijarne influence na gazdinstvu, klanicama, prevoznim sredstvima, graničnim inspekcijskim mjestima i ostalim mjestima, objektima za karantin ili centrima za smještaj živine i drugih ptica prilikom uvoza preko sistema za prijavljivanje bolesti životinja (Animal Disease Notification System – ADNS)
- (2) Obavještenje iz stava 1 ovog priloga sadrži:
 - 1) datum prijave;
 - 2) vrijeme prijave;
 - 3) naziv države - podnosioca prijave;
 - 4) naziv bolesti;
 - 5) broj žarišta ili broj pozitivnog laboratorijskog nalaza na avijarnu influencu u klanici ili prevoznom sredstvu;
 - 6) datum postavljanja sumnje na avijarnu influencu;
 - 7) datum potvrđivanja avijarne influence;
 - 8) metode korišćene za potvrđivanje avijarne influence;
 - 9) da li je prisutnost avijarne influence potvrđena na gazdinstvu, u klanici ili prevoznom sredstvu;
 - 10) geografski položaj žarišta ili pozitivnog laboratorijskog nalaza na avijarnu influencu;
 - 11) primijenjene mjere za kontrolu bolesti.
- (3) Pored podataka iz stava 1 ovog priloga, u slučaju primarnog izbijanja avijarne influence ili slučaju pozitivnih nalaza na avijarnu influencu u klanicama ili prevoznim sredstvima, dostavljaju se i podaci o:
 - 1) procijenjenom broju sumnjive živine ili drugih ptica u klanici ili prevoznom sredstvu, prema kategoriji;
 - 2) procijenjenom broju uginule živine ili drugih ptica u klanici ili prevoznom sredstvu, prema kategoriji;
 - 3) procijenjenom broju oboljele živine i drugih ptica, prema starosti (kategoriji) i broju uginule živine i drugih ptica kod kojih je potvrđena avijarna influenza;
 - 4) procijenjenom broju živine ili drugih ptica koje su usmrćene ili zaklane u klanici ili prevoznom sredstvu;
 - 5) procijenjenom broju neškodljivo uklonjene živine i drugih ptica;
 - 6) udaljenosti klanice od najbližeg komercijalnog gazdinstva na kojem se nalazi živina ili druge ptice;
 - 7) lokacija gazdinstva, ili više njih sa kojih potiče zaražena živina ili leševi.
- (4) U slučaju sekundarnog žarišta, podaci iz st. 1 i 2 ovog priloga, dostavljaju se prvog radnog dana u nedelji, za predhodnu nedjelju.
- (5) Pored podataka iz st. 1, 2 i 3 ovog priloga dostavlja se i izvještaj koji sadrži:
 - 1) datum kada je živina ili druge ptice na gazdinstvu, klanici ili prevoznom sredstvu usmrćena ili zaklana, a leševi neškodljivo uklonjeni;
 - 2) sve podatke o mogućem ili utvrđenom izvoru avijarne influence;
 - 3) podatke o mjerama nadzora nad sprovođenjem efikasnih mjera kontrole kretanja životinja;
 - 4) podatke o genotipu virusa koji je uzrokovao izbijanje ili avijarne influence u klanici ili prevoznom sredstvu.
- (6) Kada je živina ili druge ptice usmrćena na kontaktnim gazdinstvima ili na gazdinstvima na kojima su se nalazili živina ili druge ptice za koje se sumnja da su zaražene virusom avijarne influence, izvještaj iz stava 5 ovog priloga sadrži i podatke o:
 - 1) datumu usmrćivanja ili klanja i broju usmrćene ili zaklane živine ili drugih ptica, prema kategorijama, na svakom gazdinstvu;
 - 2) epizootiološkoj povezanosti između izbijanja ili pojave avijarne influence (izvora infekcije) i svakog kontaktnog gazdinstva ili razlozima koji su doveli do sumnje na avijarnu influencu na svakom sumnjivom gazdinstvu.
- (7) Ako živina na kontaktnim gazdinstvima nije usmrćena, navode se razlozi za odstupanje.
- (8) Ako je na osnovu nadzora utvrđena ozbiljna prijetnja za zdravlje, Evropska komisija i države članice Evropske unije se obavještavaju u roku od 24 sata.