

Temeljem članka 15. stavak 2. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini ("Službeni glasnik BiH", broj 34/02), i članka 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH" broj 38/02), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Ureda za veterinarstvo Bosne i Hercegovine, na 26 sjednici održanoj 30. rujna 2003. godine, donijelo je

ODLUKU

O MJERAMA ZA SUZBIJANJE I ISKORJENJIVANJE INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARA

Članak 1.

Ovom odlukom propisuju se mjere za suzbijanje i iskorjenjivanje infekciozne anemije kopitara.

Članak 2.

Testirati se mogu kopitari bilo koje dobi jer su sve starosne dobi podložne infekciji.

Za prvo testiranje određuju se ždrijebad mlada od 6 mjeseci, a testiranje se ponavlja nakon 60 dana.

Članak 3.

Radi provedbe zakonskih mjera sprječavanja, suzbijanja i iskorjenjivanja infekciozne anemije kopitara mora se pretražiti:

1. krv svih kopitara s područja Bosne i Hercegovine, najmanje jednom u pet godina;
2. krv kopitara u priplodnim ergelama, športskim ergelama, pastuharnicama, šumskim i drugim radilištima, u sastavu vojske, jednom godišnje;
3. krv kopitara u svim gojodbama s više od 10 konja, jednom godišnje, a najkasnije do 31. listopada;
4. krv kopitara kada se kupljena životinja uvodi na imanje / u objekt;
5. krv kopitara u zavodima koji proizvode biološke preparate i sjeme za umjetnu oplodnju, dva puta godišnje;
6. krv pastuha prije licenciranja i nakon toga svake godine;
7. krv kopitara prije dovođenja kopitara na hipodrome, sajmove, izložbe, smotre, športska takmičenja i druge javne priredbe, te opasivanja u drugim ergelama;
8. krv kopitara prije stavljanja kopitara u promet (prodaja ili otuđenje na neki drugi način).

Potvrda o obavljenoj pretrazi na infekcioznu anemiju kopitara iz stavka 1. ovoga članka ne smije biti starija od 30 dana.

Članak 4.

Sumnjivim na infekcioznu anemiju kopitara smatraju se kopitari koji su u prethodna tri mjeseca bili u izvornome ili neizravnome dodiru s kopitarima zaraženim tom bolešću.

Kopitari sumnjivi na oboljenje moraju biti podvrgnuti dijagnostičkoj pretrazi iz članka 2. ove odluke, tako da se uzorci njihove krvi pretraže dva puta u razmaku od tri mjeseca.

Treći pregled obavlja se nakon isteka četiri mjeseca od dodira sa oboljelim kopitarima, ako prilikom prethodnih pregleda nije utvrđena pozitivna reakcija.

Smatra se da na oboljenje sumnjivi kopitari nisu zaraženi ako je, nakon druge pretrage iz stavka 2. ovoga članka, rezultat serološke pretrage negativan.

Članak 5.

Svi kopitari sa pozitivnim rezultatom testa moraju biti smješteni u karanten u roku od 24 sata nakon pozitivnog testa da bi se spriječila dalja izloženost drugih kopitara.

Svi kopitari bilo pojedinci ili u krdima u prečniku od dva kilometra od lokacije gdje je pronađena pozitivna životinja moraju biti stavljeni u karanten.

Karantensko područje mora biti udaljeno od svih drugih kopitara najmanje dva kilometra.

Testiranja unutar karantena se ponavljaju sve dok rezultat testa ne bude negativan.

Karanten se zatvara po proteku 60 dana od zadnjeg negativnog nalaza.

Članak 6.

Oboljelima od infektivne anemije kopitara smatraju se kopitari kod kojih je serološka pretraga uzoraka krvi gel-difuzijskim precipitacionim testom (Coggins test) dala pozitivnu reakciju.

Način obavljanja dijagnostičke tehnike nalazi se u Aneksu I koji je sastavni dio ove odluke.

Članak 7.

Serološka pretraga uzoraka krvi kopitara na infektivnu anemiju kopitara može se vršiti samo u referentnim laboratorijima koje će odrediti Ured za veterinarstvo Bosne i Hercegovine.

Članak 8.

Kopitari iz članka 2. ove odluke moraju se označiti tako da im se na prednje lijevo kopito užarenim žigom utisne oznaka u obliku velikog slova "IAK", veličine osam centimetara.

Članak 9.

Radi suzbijanja infektivne anemije kopitara, kopitari kod kojih je serološki utvrđena pozitivna reakcija pri ispitivanju uzoraka krvi moraju se:

1. pri pojavi kliničkih znakova bolesti odmah eutanazirati i neškodljivo ukloniti;
2. ukloniti klanjem, ako nema pojave kliničkih znakova bolesti.

Članak 10.

Klanje zaraženih kopitara iz članka 6. točka 2. ove odluke dopušta se samo u klaonicama koje odredi službeni veterinar.

Članak 11.

Službeni veterinar, na osnovu prijave zarazne bolesti ili sumnje na zaraznu bolest, obavlja epizootiološko ispitivanje i izvješćuje nadležna tijela entiteta i Brčko Distrikta kao i Ured za veterinarstvo Bosne i Hercegovine.

Članak 12.

Kad se utvrdi postojanje infekciozne anemije kopitara ili pri postojanju sumnje na infekcioznu anemiju kopitara u zaraženom i na zarazu sumnjivom dvorištu službeni veterinar će obvezno narediti slijedeće mjere:

1. izdvajanje oboljelih i na bolest sumnjivih kopitara;
2. zabranu ili ograničenje kretanja oboljelih i na bolest sumnjivih kopitara;
3. zabraniti izdavanje svjedodžbi o zdravstvenom stanju i podrijetlu životinje osim u slučaju iz članka 9. točka 2. ove odluke;
4. eutanaziju ili klanje kopitara iz članka 9. točke 2. ove odluke, a prema potrebi i njihovo posebno označavanje;
5. raskužbu i dezinfekciju predmeta, opreme, objekata, prijevoznih sredstava, te drugih mjesta, područja i površina na kojima je boravila zaražena ili na zarazu sumnjiva životinja;
6. redovno suzbijanje prijenosnika zarazne bolesti;
7. osiguranje i održavanje higijenskih uvjeta u objektima za uzgoj životinja;
8. individualni postupak s kopitarima pri liječenju i poduzimanju drugih stručnih zahvata, sukladno načelima asepsa i antiseptika;
9. popis i označavanje oboljelih kopitara.

Članak 13.

Smatra se da je infekciozna anemija kopitara prestala kada od eutanazije, klanja ili uginuća posljednjega oboljelog kopitara i završne raskužbe protekne najmanje tri mjeseca, a svi ostali konji iz stada su, nakon podvrgavanja pretrazi (Coggins test) dva puta u razmaku tri mjeseca, serološki negativni.

Članak 14.

Svi troškovi nastali provođenjem mjera propisanih ovom odlukom nadoknađuju se iz sredstava proračuna Federacije Bosne i Hercegovine, Republike Srpske i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, zavisno na čijem teritoriju su provedene mjere, sukladno članku 46. stavak 1. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini.

Članak 15.

Ova odluka stupa na snagu osmog dana od dana objave u "Službenom glasniku BiH", a objavit će se i u službenim glasilima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine.

VM broj 247/03
30. rujna 2003. godine
Sarajevo

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Adnan Terzić, v. r.

ANEKS I

Dijagnostičke tehnike

Infektivna anemija kopitara (IAK) se pojavljuje širom svijeta. Bolest karakterišu povratne febrilne epizode, trombocitopenija, anemija, rapidni gubitak tjelesne težine i edem nižih dijelova tijela. Ona ima tendenciju da postane neočekivana/ slabo vjerojatna infekcija ako uginuće ne proizide/ rezultira iz jednog od akutnih kliničkih napada. Razdoblje inkubacije je normalno 1-3 tjedna, ali može trajati čak 3 mjeseca. Kod akutnih slučajeva, limfni čvorovi, slezena i jetra su hiperemične i uvećane. Histološki ovi organi su infiltrirani sa gnijezdima nezrelih limfocita i ćelija plazme. Kupferr stanice u jetri često sadržavaju hemosiderin ili eritrocite. Uvećana slezena se može osjetiti pri rektalnom pregledu.

Jednom kad se kopitari inficiraju IAK virusom, njihova krv će najvjerojatnije ostati zarazna do kraja njihovog života. To znači da je taj kopitar virusni nositelj i da može potencijalno prenositi infekciju na druge kopitare. Transmisija se javlja kod prijenosa krvi od zaraženih kopitara. U prirodi, širenje virusa je mnogo vjerojatnije preko prekinutog hranjenja konjskih muha koje sišu krv sa klinički bolesnog konja, a zatim sa prijemčivih konja, ili od upotrebe kontaminiranih igala. Međutim, in utero infekcija fetusa se događa.

Agar gel imunodifuzijski (AGID- Coggins test) testovi i enzimski vezani imunisorbentni pokusi (ELISA) su točni, pouzdani testovi za otkrivanje IAK u kopitara, osim kod životinja u ranim stadijima infekcije i ždrijebadi inficiranih ženki. U drugim rijetkim okolnostima, varljivi rezultati se mogu pojaviti kad je nivo virusa koji cirkulira u krvi tijekom akutne epizode bolesti dostatan da veže raspoloživa antitijela, te ako se inicijalne/početne razine antitijela nikad ne povećaju dovoljno visoko da ih je moguće pronaći. Iako će ELISA pronaći antitijela nešto ranije i u nižim koncentracijama nego AGID test, pozitivni ELISA rezultati se potvrđuju pomoću AGID testa. To je zato što su bili uočeni lažno pozitivni i lažno negativni rezultati s ELISA testom. AGID test također ima prednost razlikovanja između IAK i ne IAK antigen/antitijelo reakcija pomoću linija identiteta.

IAK virus je lentivirus, podfamilija Retrovirida, koje također uključuje medi-visna virus, virus kozjeg artritisa/encefalitisa, virus govede imunodificijencije i virus imunodificijencije kod čovjeka. Slijed uspoređivanja nukleinske kiseline je pokazao izrazitu povezanost.

Identifikacija uzročnika

Izolacija virusa obično nije neophodna da bi se postavila dijagnoza.

Izolacija virusa iz sumnjivih kopitara može se napraviti pomoću ucjepljivanja njihove krvi na leukocitne kulture pripremljene od konja koji nisu inficirani. Bilo koji virus proizveden u kulturama može biti potvrđen otkrivanjem specifičnog IAK antigena pomoću ELISA, imunofluorescentnom analizom, ili ubrizgavanjem u prijemčive kopitare. Izolacija virusa se rijetko pokušava zbog teškoće uzgoja konjskih kultura leukocita.

Kad se egzaktan status infekcije nekog kopitara ne može utvrditi, trebalo bi se primijeniti cijepljenje podložnog kopitara sumnjivom krvlju. U tom slučaju, kopitaru koji je bio prethodno testiran na antitijela i pokazalo se da je negativan, odmah se daje transfuzija krvi od sumnjivog kopitara, a njegov status antitijela i kliničko stanje se nadzire najmanje 45 dana. Obično je 1-25 ml cjelovite krvi date intravenozno dostatno da bi se demonstrirala infekcija, ali u rijetkim slučajevima možda će biti neophodno upotrijebiti veći volumen krvi (250 ml) ili isprane leukocite iz takvog volumena.

Serološki testovi

Agar gel imunodifuzijski test - Coggins test (propisani test za međunarodnu trgovinu).

Precipitacijska/taložna antitijela se rapidno proizvode kao rezultat IAK infekcije, a mogu se otkriti pomoću AGID/Coggins testa. Specifične reakcije su indicirane pomoću taložnih linija između IAK antigena i test seruma i potvrđene su od strane njihovog identiteta s reakcijom između antigena i pozitivnog standardnog seruma. Konji u prva 2-3 tjedana nakon infekcije će obično davati negativne serološke reakcije.

Priprema antigena

Specifični IAK antigen se može pripremiti od slezene akutno inficiranih kopitara, od kulture inficiranog tkiva kopitara, od uporne infekcije pseće stanične linije thymusa, ili od proteina izraženih u bakterijama ili baculovirusu koristeći se rekombiniranom DNA tehnikom. Pripreme od inficiranih kultura daje jednoličniji rezultat nego uporaba ćelija slezene i dopušta bolju standardizaciju reagensa.

Da bi se dobio zadovoljavajući antigen od slezene, kopitar mora biti zaražen s visoko virulentnim svojstvom IAK virusa. Rezultirajuće razdoblje inkubacije bi trebalo biti 5-7 tjedana, a slezena bi trebala biti prikupljena devet dana nakon ucjepljivanja, kad je virus titraže na svom vrhuncu, a prije nego što se proizvede bilo koja pronalaziva količina taložnih antitijela. Nerazrijeđena pulpa slezene se koristi kod imunodifuznog testa kao antigen. Izdvajanje antigena iz slezene sa slanim rastvorom i koncentracijom s amonijevim sulfatom ne daje zadovoljavajući antigen kao odabir slezene s vrlo visokom titražom IAK antigena.

Prema slobodnom izboru, konjski embrionalni bubreg ili dermalne/kožne stanice ili pseće thymus stanice su inficirane sa vrstom/sojem IAK virusa adaptiranog da raste u kulturi tkiva (Američka zbirka tipova kultura). Virus se prikuplja iz kultura taloženjem sa 8% polietilen glikolom ili pravljenjem kuglica pomoću ultracentrifugiranjem. Dijagnostički antigen p26 se oslobađa iz virusa tretmanom sa sredstvom za pranje ili eterom. IAK proteini jezgre virusa, izraženi u bakterijama ili baculovirusu, su komercijalno raspoloživi i pronalaze praktičnu uporabu, kao visoko kvalitetni antigeni za serološku dijagnozu.

P26 je unutarnji strukturni protein virusa koji je šifriran pomoću gag gena. Ovaj gen je stabilan i nisu pronađene nikakve varijacije među sojevima.

Priprema standardnog antiseruma

Poznati pozitivni antiserum se može prikupiti od nekog kopitara koji je prethodno zaražen s IAK virusom. Ovaj serum bi trebao davati jednostruku gustu taložnu liniju koja je specifična za IAK, kao što je demonstrirano reakcijom identiteta sa poznatim standardnim serumom. Vrlo je važno povezivati/usporediti koncentraciju antigena i koncentraciju antitijela kako bi se osigurala optimalna osjetljivost testa. Koncentracija reagensa bi trebale biti usklađene tako da tvore usku taložnu liniju otprilike jednake udaljenosti između dva izvora koji sadrže antigen i serum.

Pokusni postupak

Imunodifuzijske reakcije se izvode u sloju agara u Petri posudama. Za Petri posude koje imaju prečnik od 100 mm, koristi se 15 ml 1% Noble agara. Šest izvora je razmješteno van agara okružujući središnji izvor istog promjera. Izvori imaju promjer od 5,3 mm i razmaknuti su 2,4mm jedan od drugog. Svaki izvor mora sadržavati isti volumen reagensa.

Antigen je postavljen u središnji izvor a standardni antigen je postavljen u izmjenične/svaki drugi/ vanjske izvore. Uzorci seruma za testiranje su smješteni u preostala tri izvora.

Posude se drže na sobnoj temperaturi u vlažnom okolišu.

Nakon 24-48 sati reakcije taloženja se pregledavaju preko uske trake intezivnog, ukošenog/indirektnog svjetla na crnoj podlozi. Referentne linije bi trebale biti vidljive za 24 sata, a za to vrijeme bilo koji test serum koji su snažno pozitivni bi mogli formirati linije identiteta s onim između standardnih reagensa. Slabo pozitivnoj reakciji će možda trebati 48 sati da se formira a indicirana je blagim savijanjem standardne serumske taložne linije između antigen izvora i test serum izvora. Serum s visokim taložnim titražama antitijela mogu formirati šire taložne trake koje imaju tendenciju da budu difuzne/raspršene i da s vremenom izblijede. Njih nije teško prepoznati jer će one disolvirati referentnu liniju na oko pola puta preko njihovog normalnog položaja. Takve reakcije mogu biti potvrđene kao specifične za IAK pomoću razrjeđivanja na 1/2 ili 1/4 prije ponovnog testiranja; ovo zatim daje jasniju/različitiju liniju identiteta. Serum koji nemaju IAK antitijela neće tvoriti taložne linije i neće imati nikakvog djelovanja na reakcijske linije standardnih reagensa.

Interpretacija rezultata: Kopitari koji su u raznim fazama infekcije možda neće davati pozitivnu serološku reakciju kod AGID testa. Takvim životinjama bi trebalo uzeti krv ponovo nakon 1-2 tjedna. Da bi se uspostavila dijagnoza kod mladog ždrijebeta, možda će biti neophodno utvrditi stanje antitijela kod ženke. Ako kobila posjeduje bilo koje IAK antitijelo, tada će se morati dopustiti razdoblje od šest mjeseci ili duže nakon rođenja da

materinsko antitijelo iščezne; ždrijebe se zatim ponovo testira da bi se utvrdilo da li je početna pozitivna reakcija bila zbog materinskih antitijela ili infekcije.

Analiza enzimski vezanog imunosorbenta

Postoje dva ELISA koja su odobrena od strane američkog Ministarstva poljoprivrede za dijagnosticiranje infektivne anemije kopitara: kompetitivni ELISA i sintetski antigen ELISA. Kompetitivni ELISA otkriva antitijela na isti p26 antigen jezgre proteina kao što je korišten u AGID testu. Sintetički antigen ELISA test otkriva antitijela na gp45 (virusni transmembranski protein) antigen. Tipična ELISA protokoli su korišteni u oba testa. ELISA koristi p26 kao antigen u otkrivanju antitijela zbog njegove visoke osjetljivosti i brzine u poređenju s AGID testom.

Pripremanje antigena

IAK virus p-337-EFD soj je uzgojen u konjskoj embrionalnoj dermalnoj liniji stanice (EFD).

Virus je koncentriran pomoću ultrafiltracije i ultracentrifugiranja za 90 minuta na 51.000 g, te je zatim podvrgnut ultracentrifugiranju na 45% saharoznom jastučiću 2 sata na 75.000 g. Virus je prikupljen, razdvojen u TNE tamponu/odbojnik/ kolut na osovini i oblikovan u kuglice pomoću ltracentrifugiranja. Rezultirajuća kuglica je raskinuta /prekinuta tretiranjem s eterom. Ovaj antigen uglavnom sadržava p26 protein.

Izbor standardnog slabo pozitivnog seruma

Serum koji daje slabu taložnu liniju u AGID testu je izabran kao standardni slabi pozitivni serum. ELISA se uskladi tako da standardni serum daje apsorpcijske vrijednosti 0.3 do 0.7.

Pokusni postupak

50 μ g/izvoru p26 antigena se dodaje izvorima ELISA pločica, koje se zatim osuše smrzavanjem preko noći.

ELISA pločice su presvučene s 1% želatinom 1 sat.

50 μ l svakog od test seruma i standardni pozitivni i negativni serumi razvodnjeni 1/800 se dodaju izvorima ELISA pločica, koji se zatim inkubiraju 40 minuta na 37°C.

50 μ l -peroksidaza-obilježeni anti- konjski IgG se dodaje u svaki izvor, a pločice se inkubiraju 20 minuta na temperaturi od 37°C.

50 μ l solucije plavog timola se dodaje svakom izvoru, a pločice se inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperaturi.

Reakcija se zaustavlja dodavanjem 50 μ l 0,5M sumporne kiseline.

Apsorpcijske vrijednosti se očitavaju na 450 nm valnoj dužini. Serum koji daje više vrijednosti od onih po kojima se standardni pozitivni serum ocjenjuje da je pozitivan.

S ovim postupkom, stopa pogrešnih/netačnih-pozitivnih reakcija je niža od 0,3%.

Reagensi za IAK serološke testove kao što su AGID i kompetitivni i sintetički antigen ELISA su komercijalno dostupni od strane nekoliko kompanija. Pozitivni rezultat testa od strane ELISA bi trebao biti ponovo testiran korištenjem AGID testa da bi se potvrdila dijagnoza jer su primijećeni neki lažno pozitivni i lažno negativni rezultati s ELISA. Rezultati također mogu biti potvrđeni pomoću imunoblot tehnike. Standardni antiserum za imunodifuziju, koji sadrži minimalnu količinu antitijela koja bi trebala biti otkrivena od strane laboratorija, je dostupna od OIE referentne laboratorije.
