

Na osnovu člana 15. stav 2. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini ("Službeni glasnik BiH", broj 34/02) i člana 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. septembra 2003. godine donijelo je

ODLUKU
O MJERAMA ZA SUZBIJANJE I ISKORJENJIVANJE
INFEKTIVNE ANEMIJE KOPITARA

Član 1.

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

Član 2.

Testirati se mogu kopitari bilo koje dobi jer su sve starosne dobi podložne infekciji.
Za prvo testiranje određuju se ždrijebad mlađa od 6 mjeseci, a testiranje se ponavlja nakon 60 dana.

Član 3.

Radi provođenja zakonskih mjera sprečavanja, suzbijanja i iskorjenjivanja infektivne 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, sportskim ergelama, pastuharnicama, šumskim i drugim radilištima, u sastavu vojske, jednom godišnje;
 3. krv kopitara u svim uzgojima s više od 10 konja, jednom godišnje, a najkasnije do 31. oktobra;
 4. krv kopitara kada se kupljena životinja uvodi na imanje / u objekat;
 5. krv kopitara u zavodima koji proizvode biološke preparate i sjeme za vještačku 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, sportska 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 infektivnu anemiju kopitara iz stava 1. ovoga člana ne smije biti starija od 30 dana.

Član 4.

Sumnjivim na infektivnu anemiju kopitara smatraju se kopitari koji su u prethodna tri mjeseca bili u direktnom ili indirektnom dodiru s kopitarima zaraženim tom bolesti.

Kopitari sumnjivi na oboljenje moraju biti podvrgnuti dijagnostičkoj pretrazi iz člana 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 stava 2. ovoga člana, rezultat serološke pretrage negativan.

Član 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 2 kilometra od lokacije gdje je pronađena pozitivna životinja moraju biti stavljeni u karanten.

Karantensko područje mora biti udaljeno od svih drugih kopitara 2 kilometra.

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

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

Član 6.

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

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

Član 7.

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

Član 8.

Kopitari iz člana 2. ove odluke moraju se označiti tako da im se na prednje lijevo kopito paljenim žigom utisne oznaka u obliku velikog slova "IAK", veličine 8 cm.

Član 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.

Član 10.

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

Član 11.

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

Član 12.

Kad se utvrdi postojanje infektivne anemije kopitara ili pri postojanju sumnje na infektivnu anemiju kopitara u zaraženom i na zarazu sumnjivom dvorištu službeni veterinar še obavezno 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 uvjerenja o zdravstvenom stanju i porijeklu životinje osim u slučaju iz člana 9. tačka 2. ove odluke,
4. eutanaziju ili klanje kopitara iz člana 9. tačke 2. ove odluke, a prema potrebi i njihovo posebno označavanje,
5. dezinfekciju i dezinsekciju 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, u skladu s načelima asepsa i antiseptice,
9. popis i označavanje oboljelih kopitara.

Član 13.

Smatra se da je infektivna anemija kopitara prestala kada od eutanazije, klanja ili uginuća posljednjeg oboljelog kopitara i završne dezinfekcije protekne najmanje tri mjeseca, a svi ostali konji iz stada su, nakon podvrgavanja pretrazi (Coggins test) 2 puta u razmaku 3 mjeseca, serološki negativni.

Član 14.

Svi troškovi nastali provođenjem mjera propisanih ovom odlukom nadoknađuju se iz sredstava budžeta Federacije BiH, Republike Srpske i Brčko Distrikta, zavisno na čijoj teritoriji su provedene mjere, u skladu sa članom 46. stav 1. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini.

Član 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. septembra 2003. godine
Sarajevo
Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Adnan Terzić, s. 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 sedmice, ali može trajati čak 3 mjeseca. Kod akutnih slučajeva, limfni čvorovi, slezena i jetra su hiperemične i uvećane. Histološki ovi organi su infiltrirani sa gnjezdima nezrelih limfocita i ćelija plazme. Kupferr ćelije 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 najvjerovatnije ostati zarazna do kraja njihovog života. To znači da je taj kopitar virusni nosilac i da može potencijalno prenositi infekciju na druge kopitare. Transmisija se javlja kod prijenosa krvi od zaraženih kopitara. U prirodi, širenje virusa je mnogo vjerovatnije 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 imunosorbentni pokusi (ELISA) su tačni, 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 cirkuliše u krvi tokom akutne epizode bolesti dovoljan da veže raspoloživa antitijela, te ako se inicijalni/početni nivoi 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 goveđe imunodificijencije i virus imunodificijencije kod čovjeka. Redosljed poređenja 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 egzaktno 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 dovoljno 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 prve 2-3 sedmice 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 upotreba 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 sedmica, a slezena bi trebala biti prikupljena 9 dana nakon ucjepljivanja, kad je virus titra`e 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 ćelije ili pseće thymus ćelije 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 upotrebu, kao visoko kvalitetni antigeni za serološku dijagnozu.

P26 je unutrašnji 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 talo`nu 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. Čest 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 centralni 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 serumi 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 izbljede. 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. Serumi 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 sedmice. Da bi se uspostavila dijagnoza kod mladog ždrijeteta. Možda će biti neophodno utvrditi stanje antitijela kod ženke. Ako kobila posjeduje bilo koje IAK antitijelo, tada će se morati dopustiti razdoblje od 6 mjeseci ili duže nakon rođenja da materinsko antitijelo i s`zne; `drijebe se zatim ponovo testira da bi se utvrdilo da li je po~etna 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 ćelije (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 ultracentrifugiranja. Rezultirajuća kuglica je raskinuta /prekinuta tretiranjem s eterom. Ovaj antigen uglavnom sadržava p26 protein.

Izbor standardnog slabo pozitivnog seruma

Serum koji daje slabu talo`nu 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 µg/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 µl 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 µl -peroksidaza-obilježeni anti- konjski IgG se dodaje u svaki izvor, a pločice se inkubiraju 20 minuta na temperaturi od 37°C.

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

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

Apsorpcijske vrijednosti se očitavaju na 450 nm talasnoj 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.