

20131102689

## АГЕНЦИЈА ЗА ХРАНА И ВЕТЕРИНАРСТВО

Врз основа на член 58 став (4) од Законот за ветеринарно здравство („Службен весник на Република Македонија“ бр. 113/07, 24/11, 136/11 и 123/12), директорот на Агенцијата за храна и ветеринарство, донесе

### ПРАВИЛНИК ЗА УСЛОВИ ЗА СТАВАЊЕ ВО ПРОМЕТ НА КОПИТАРИ(\*)

#### Член 1

Со овој правилник се пропишуваат условите за ставање во промет на копитари.

#### Член 2

(1) Поимите утврдени во Законот за ветеринарно здравство и Правилникот за начинот и постапката за увоз и транзит, листа на трети земји од кои е одобрен увоз и транзит, формата и содржината на ветеринарно-здравствениот сертификат или други документи што ја придружуваат пратката со живи животни, аквакултура и производи од животинско потекло, како и начинот и постапката на вршење на проверка и преглед при увоз и транзит на пратка со живи животни, аквакултура и производи од животинско потекло се применуваат и во овој правилник доколку со овој правилник не се поинаку дефинирани.

(2) Регистрирани копитари во смисла на овој правилник се сите копитари кои се регистрирани во книги за матично книговодство и кои се идентификувани со документот за идентификација, издаден од страна на:

а) надлежен орган на Република Македонија за водење на матично книговодство или друг надлежен орган на земјата од каде што животното потекнува, кој води матично книговодство или регистар за таа раса на копитари или

б) меѓународно здружение или организација, која што одгледува коњи за натпреварувања или трки.

#### Член 3

(1) Регистрирани копитари можат да се движат на територијата на Република Македонија или да се испратат во земја-членка на Европската унија доколку ги исполнуваат условите, утврдени во членовите 4 и 5 на овој правилник.

(2) По исклучок од став (1) на овој член условите утврдени во членовите 4 и 5 на овој правилник не треба да бидат исполнети, во однос на движењето на копитари кои што:

- се јаваат или се користат за спортски или рекреативни цели, покрај патишта во близина на границата на Република Македонија,

- учествуваат во културни или слични настани или во активности организирани од страна на субјекти кои се сместени во близина на границата на Република Македонија и

- се наменети за привремено пасење или работа во близина на границата на Република Македонија.

(3) За направените исклучоци од став (2) на овој член директорот на Агенцијата за храна и ветеринарство (во понатамошниот текст: директорот на Агенцијата) ја известува Европската комисија.

---

(\*) Со овој правилник се врши усогласување со Директивата на Советот 2009/156/EЗ од 30 ноември 2009 година за условите на здравствена заштита кои го регулираат движењето и увозот од трети земји на копитари, CELEX бр. 32009L0156;

#### Член 4

(1) Пред движење копитарите треба да бидат прегледани во период од 48 часа пред да бидат натоварени при што не треба да покажуваат клинички знаци на присуство на болест. Во случај на регистрирани копитари, овој преглед, без да е во спротивност со член 6 на овој правилник се прави само при праќање на копитари во земја-членка на Европската унија.

(2) Без оглед на барањата од став (5) на овој член во однос на болести кои што задолжително се пријавуваат, официјалниот ветеринар треба, за време на проверката да утврди, врз основа на изјавите од страна на сопственикот или одгледувачот, дали копитарите биле во контакт со копитари кои што се заболени од некоја инфективна или заразна болест во изминатите 15 дена непосредно пред проверката.

(3) Копитарите не треба да се наменети за колење согласно програмите за сузбивање и искоренување на инфективна или заразна болест.

(4) Копитарите треба да се идентификуваат, и тоа:

а) во случај на регистрирани копитари, со документ за идентификација, утврден во Правилникот за зоотехнички и генеалошки услови за ставање во промет на копитари\*1, кој што треба да потврди дека условите од ставовите (5) и (6) од овој член и член 5 од овој правилник се исполнети. Официјалниот ветеринар треба да внесе нотификација во документот за идентификација за периодот на забраните утврдени во став (5) од овој член или во член 5 од овој правилник дека истиот не е валиден. Документот за идентификација треба, по колењето на регистрираниот коњ, да се врати на органот кој го издал. Согласно член 10-а од Законот за ветеринарно здравство директорот на Агенцијата може да ја пропише постапката за спроведување на одредбите на оваа точка и

б) во случај на копитари наменети за одгледување и размножување согласно Правилникот за начинот и постапката за идентификација и регистрација на копитари.

(5) Покрај барањата утврдени во член 5 од овој правилник, копитарите не треба да потекнуваат од одгледувалиште кое е предмет на некоја од следните забрани:

а) доколку сите животни од видовите коишто се подложни на болеста присутни на одгледувалиштето не се заклани, периодот на забрана за одгледувалиштето на потекло треба да изнесува најмалку:

1) шест месеци, во случај на копитари за кои постои сомнеж дека се изложени на болеста дурина, од датумот на последниот направен или можен контакт со болно животно. Во случај на пастуви забраната трае до кастрирање на животното;

2) шест месеци во случај на сакагија или енцефаломиелитис кај коњи, од денот од кој копитарите кои ја имаат наведената болест се заклани;

3) во случај на инфективна анемија кај копитари, до датумот на кој инфицираните животни се заклани а преостанатите животни покажуваат негативна реакција на два последователни теста на Когинс направени во интервали од три месеци;

4) шест месеци од последниот евидентиран случај, во случај на везикуларен стоматитис;

5) еден месец од последниот евидентиран случај, во случај на беснило и

6) 15 дена од последниот евидентиран случај, во случај на антракс (црн пришт) и

б) доколку сите животни од видовите кои се приемчиви на болести присутни на одгледувалиштето се заклани и просториите дезинфицирани, периодот на забраната е 30 дена од денот на кој животните биле заклани и нештетно отстранети и просториите дезинфицирани, освен во случај на антракс (црн пришт) кога периодот на забрана е 15 дена.

#### Член 5

(1) Доколку Република Македонија не е слободна од Африканска чума кај копитари, може да испраќа копитари во земји-членки на Европската унија од дел на територија за којашто се смета дека е инфициран согласно ставовите (2) и (3) од овој член и доколку се исполнети условите утврдени во став (6) на овој член.

(2) Дел од територијата на Република Македонија се смета за инфициран со Африканска чума кај копитарите, доколку:

а) постои клинички, серолошки (кај невакцинираните животни) и/или епидемиолошки доказ кој го потврдува присуството на Африканската чума кај копитари во последните две години или

б) во последните 12 месеци е спроведена вакцинацијата против Африканската чума кај копитарите.

(3) Делот од територијата од став (2) на овој член кој се смета дека е инфициран со Африканска чума кај копитари треба да се состои најмалку од:

а) зона на заштита со радиус од најмалку 100 km околу секој центар на инфекција и

б) зона на надзор која се простира најмалку 50 km околу зоната на заштита, каде не е спроведена вакцинација во последните 12 месеци.

(4) Контролите и мерките за сузбивање на Африканската чума кај копитари кои треба да се превземаат во однос на териториите и зоните од ставовите (2) и (3) на овој член се уредени со Правилникот за мерки за сузбивање и искоренување на Африканската чума кај копитари во Република Македонија\*<sup>2</sup>.

(5) Сите вакцинирани копитари кои се присутни во заштитната зона треба да се регистрирани и да се означени во согласност со член 6 став (1) точка 4) од Правилникот за мерки за сузбивање и искоренување на Африканската чума кај копитари во Република Македонија\*<sup>-2</sup> Извршената вакцинација треба да биде назначена во документот за идентификација и/или ветеринарно здравствениот сертификат.

(6) Од територијата утврдена во став (3) на овој член, во земји-членки на Европската унија може да бидат испратени само копитари кои ги исполнуваат следниве услови:

а) да се праќаат само во одредени периоди од годината имајќи ја во предвид активноста на инсектите-вектори;

б) не покажат клинички знаци на Африканска чума кај копитари на денот на прегледот од член 4 став (1) на овој правилник;

в) во два наврати се тествани на присуство на Африканска чума кај копитарите согласно Прилог 1 кој е составен дел на овој правилник, со интервали од 21 до 30 дена помеѓу тестовите, при што вториот тест се врши во период од десет дена пред да бидат пратени во земја-членка на Европската унија при што:

1) се добиени негативни резултати, ако не се вакцинирани против Африканската чума кај копитари или

2) доколку се вакцинирани против Африканската чума кај копитари треба да се без евидентирано зголемување на антителата и да не се вакцинирани во претходните два месеци,

г) да се чуваат во карантинска станица за период од најмалку 40 дена пред да бидат испратени и

д) да се заштитени од инсектите-вектори за време престојувањето во карантин и за време на превозот од карантинската станица до местото на испраќање.

#### Член 6

(1) Доколку во земјата-членка на Европската унија се спроведува алтернативен систем за контрола кој обезбедува еднакви гаранции на условите утврдени во член 4 став (5) на овој правилник во однос на движењата на копитарите во рамките на нивната територија,

не се применуваат условите утврдени во член 4 став (1) и член 8 став (2) на овој правилник под услов на реципроцитет.

(2) За направените исклучоци од став (1) на овој член директорот на Агенцијата ја известува Европската комисија.

#### Член 7

(1) Копитарите треба да се превезат, во најкраток можен рок, од одгледувалиштето на потекло или директно или преку одобрен собирен центар до местото на дестинација во средства за превоз или контејнери, кои редовно се чистат и дезинфицираат со одобрени средства за дезинфекција. Превозните средства треба да бидат конструирани на начин со кој се спречува испаѓање на изметот на копитарите, ѓубре или храна за животни за време на превозот. Без да е во спротивност со одредбите од Законот за заштита и благосостојба на животните<sup>\*3</sup>, превозот треба да се врши на начин со кој се обезбедува ефективна заштита на здравјето и благосостојбата на копитарите.

(2) За животните кои се означени со посебна ознака дека се наменети за колење не се применуваат одредбите од член 4 став (5) на овој правилник, доколку во ветеринарно здравствениот сертификат издаден во согласност со Прилог 3 кој е составен дел на овој правилник е наведен предметниот исклучок. Во тој случај, копитарите за колење треба да се превезат директно до назначената кланица и да бидат заклани во рок од пет дена од пристигнувањето во кланицата.

(3) Официјалниот ветеринар треба да го евидентира идентификацискиот број или бројот на документот за идентификација на закланото животно и на барање на надлежниот орган на местото на испраќање да го достави заедно со потврда дека животното е заклано.

#### Член 8

(1) Регистрираните копитари кои ги напуштаат нивните одгледувалишта треба да се придружени со документот за идентификација утврден во член 4 став (4) точка а) од овој правилник и доколку тие се наменети за испраќање до земја-членка на Европската унија треба да се придружени со здравствената потврда дадена во Прилог 2 кој е составен дел на овој правилник.

(2) Копитарите наменети за одгледување, размножување и колење за време на превозот треба да се придружени со ветеринарно здравствен сертификат изготвен согласно Прилог 3 од овој правилник.

(3) Ветеринарно здравствениот сертификат, или во случај на регистрирани копитари здравствената потврда, треба, без да е во спротивност со член 6 од овој правилник, да се изготви 48 часа пред животните да бидат натоварени или не подоцна од последниот работен ден пред товарењето, на македонски и на најмалку еден од официјалните јазици на земјите-членки на испраќање и дестинација. Издадениот документ има важност од десет дена од денот на издавање. Ветеринарно здравствениот сертификат или здравствената потврда треба да се состои од еден лист.

(4) При движење на копитари помеѓу Република Македонија и земјите-членки на Европската унија, копитарите кои не се регистрирани, може да се придружени со еден ветеринарно здравствен сертификат за пратка, наместо со поединечни ветеринарно здравствени сертификати од став (2) на овој член.

#### Член 9

Ветеринарните контроли при движење на живи животни на место на крајна дестинација во однос на нивната организација, мерките кои се преземаат како резултат на контролите

направени на местото на дестинација како и заштитните мерки треба да се вршат согласно Законот за ветеринарно здравство<sup>\*4</sup>.

Член 10  
Одложена примена

Одредбите од членовите 3, 6 став (2) и 8 ќе отпочнат да се применуваат со денот на пристапувањето на Република Македонија во Европската унијата.

Член 11  
Влегување во сила

Овој правилник влегува во сила наредниот ден од денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија“.

Бр. 02-888/8  
31 јули 2013 година  
Скопје

Директор на Агенција  
за храна и ветеринарство,  
**Дејан Рунтевски, с.р.**

### Дијагностицирање на Африканска чума кај копитари

Реагенсите за анализа со ELISA опишани подолу може да се добијат од Референтната лабораторија на Европската унија или референтните лаборатории за Африканска чума кај копитари на Светската здравствена организација за здравствена заштита на животните (OIE).

1. Компетитивна ELISA-тест за откривање на антитела на вирусот на Африканска чума кај копитари (во понатамошниот текст: AHSV) (задолжителен тест)

Компетитивниот ELISA-тест се користи за да се откријат посебни антитела на AHSV во серум од сите видови на копитари. Широкиот спектар на поликлоналниот имун анти вирусен серум (анти-AHSV) од морско прасе (во понатамошниот текст: антисерум од морско прасе) е карактеристичен за одредена серолошка група и со него може да се откријат сите познати серотипови на Африканска чума кај копитари.

Тестот се состои од попречување на реакцијата помеѓу антигенот на AHSV и антисерумот од морско прасе преку примероци од тестиран серум. Антителата на AHSV во примерокот на тестираниот серум се компетитивни на антисерумот од морско прасе што резултира со намалување на очекуваната боја (по додавање на ензимски обележани антитела на морско прасе и супстрат). Серумот може да се испита во единечно разредување од 1 према 5 (метод на едноставно разредување на серум) или може да се титрира (метод на серумска титрација) за да се добијат крајните точки на разредување. Вредностите на инхибиција повисоки од 50% може да се сметаат за позитивни.

Протоколот на тестирање опишан во понатамошниот текст се користи во Регионалната референтна лабораторија за Африканска чума кај копитари во Пирбрајт, Обединетото Кралство.

1.1. Постапка на тестирање

1.1.1. Подготовка на плочите

1.1.1.1. На ELISA-плочките се нанесува екстракт на AHSV антигени добиен од инфицираните клеточни култури и разреден со карбонатен/бикарбонатен пуфер со pH 9,6. ELISA-плочките се инкубираат преку ноќ на 4 °C.

1.1.1.2. Плочките се мијат три пати со потопување и испразнување на дупчиња со фосфатен физиолошки раствор (PBS), со pH од 7,2 до 7,4 и се сушат на апсорбирачка хартија.

1.1.2. Контролни дупчиња

1.1.2.1. Позитивниот контролен серум се титрира во двократни серии на разредување, од 1:5 до 1:640, низ колона 1 на пуферот за блокирање (PBS со состав од 0,05 % (v/v) Tween-20, 5,0 % (w/v) обезмастено млеко во прав (Cadbury's Marvel™) и 1 % (v/v) серум од возрасно говедо) за да добие краен волумен од 50 µl/по дупче.

1.1.2.2. Се додаваат 50 µl негативен контролен серум разреден 1:5 (10 µl серум + 40 µl пуфер за блокирање) на дупчињата А и Б на колона 2.

1.1.2.3. Се додава 100 µl/по дупче на пуфер за блокирање во вдалбнатините В и Г на колона 2 (празна).

1.1.2.4. Се додава 50  $\mu$ l пуфер за блокирање во дупчињата Д, Ѓ, Е и Ж на колона 2 (контрола на морско прасе)

1.1.3. Метод на брз тест

1.1.3.1. Се додава разредување од 1:5 на секој тестиран серум во пуфер за блокирање за да се удвојат садовите од колони 3 до 12 (10  $\mu$ l серум + 40  $\mu$ l пуфер за блокирање).

или

1.1.4. Метод на титрација на серум

1.1.4.1. Се подготвува двојна серија на раствор од секој примерок за тестирање (1:5 до 1:640) во пуфер за блокирање во осум дупчиња на единечни колони (3 до 12).

потоа

1.1.5. Се додава 50  $\mu$ l на антисерум од морско прасе, претходно растворен во пуфер за блокирање, во сите дупчиња освен во дупчињата со слепите проби на ELISA плочата (сите дупчиња сега треба да содржат волумен од 100  $\mu$ l).

1.1.5.1. Се инкубира 1 час на 37 °C на ротирачки уред за мешање течности.

1.1.5.2. Плочите се мијат три пати и се сушат како претходно.

1.1.5.3. Во секој сад се додава 50  $\mu$ l конјугат на антитела на зајак за морско прасе и пероксидаза (HRP) претходно растворен во пуфер за блокирање.

1.1.5.4. Се инкубира 1 час на 37 °C на ротирачки уред за мешање течности.

1.1.5.5. Плочките се мијат три пати и се сушат како претходно.

1.1.6. Хромоген

Растворот хромоген ортофенилдиамин (OPD = ortho-phenyldiamine) се подготвува според упаствата на производителот (0,4 mg/ml во стерилна дестилирана вода) непосредно пред употреба. Се додава супстрат (водород пероксид = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) со цел да се добие конечна концентрација од 0,05 % (v/v) (1:2000 на 30 % раствор на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Се додава 50  $\mu$ l ортофенилдиамин (OPD) раствор во секое дупче и се оставаат садовите 10 минути на собна температура. Реакцијата се прекинува со додавање на 50  $\mu$ l 1M сулфатна киселина (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)/во секое дупче.

1.1.7. Читање

Се чита спектрофотометриски при 492 nm.

1.2. Прикажување на резултати

1.2.1. Со помош на софтверски пакет се испишуваат вредностите на оптичка густина (OD), и инхибиција во проценти (PI) за контролните и тестираните серуми врз основа на средната вредност забележана во четирите контролни дупчиња за секое морско прасе. Податоците изразени како вредности (OD) и (PI) се користат да се оцени дали тестот се извршил во рамките на прифатливи граници. Горните контролни граници (UCL) и долните контролни граници (LCL) за контролите на морско прасе се движат помеѓу OD-вредности 1,4 и 0,4. Крајната титрација на позитивната контрола заснована

на 50 % (PI) треба да биде 1:240 (во распон од 1:120 до 1:480). Сите плочи кои нема да се усогласат со горните критериуми мора да се отфрлат. Во случај титрацијата на позитивниот контролен серум да е поголема од 1:480 а примероците за тестирање се уште се негативни тогаш може да се прифатат негативните примероци за тестирање.

Двојните дупчиња со негативен контролен серум и двојните дупчиња со слепа проба треба да забележат PI-вредности помеѓу + 25 % и – 25 %, и помеѓу + 95 % и + 105 %, Вредностите што не се во рамките на овие граници не ги поништуваат плочите но навестуваат дека се развива боја во позадината.

1.2.2. Дијагностичкиот праг (граничната вредност) за серум за тестирање е 50 % (PI 50 %). Примероците со PI-вредности поголеми од 50 % се сметаат за позитивни. Примероците со PI-вредности пониски од 50 % се сметаат за негативни.

Примероците со PI-вредности над и под прагот за двојните садови се сметаат за нејасни. Тие примероци може повторно да се испитаат преку методот на брз тест преку титрација. Позитивните примероци исто така може да се титрираат за да се добие степенот на позитивност.

Шема за брз тест

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 12	
	+ контрола		тестиран серум									
A	1:5	-контрола	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Б	1:10	-контрола	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
В	1:20	Празна										
Г	1:40	Празна										
Д	1:80	МС-контрола										
Ѓ	1:160	МС-контрола										
Е	1:320	МС-контрола	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ж	1:640	МС-контрола	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

–контрола = негативна контрола.

+ контрола= позитивна контрола.

МС-контрола = контрола на морско прасе

Тест-серум

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ контрола		Тест-серум									
A	1:5	-контрола	1:5									1:5
Б	1:10	-контрола	1:10									1:10
В	1:20	Празна	1:20									1:20



Г	1:40	Празна	1:40									1:40
Д	1:80	МС контрола	- 1:80									1:80
Ѓ	1:160	МС контрола	- 1:160									1:160
Е	1:320	МС контрола	- 1:320									1:320
Ж	1:640	МС контрола	- 1:640									1:640

–контрола = негативна контрола.

+ контрола= позитивна контрола.

МС-контрола = контрола на морско прасе

## 2. Индиректен ELISA-тест за откривање на антитела на вирусот Африканска чума кај копитари (AHSV) (задолжителен тест)

Тестот опишан во понатамошниот текст е во согласност со описот на тестот од Глава 2.1.11 на ОИЕ Прирачник за стандарди за дијагностички тестови и вакцини, четврто издание, 2000 година.

Рекомбинираниот протеин VP7 се користи како антиген за одредување на антитела за вирусот Африканска чума кај копитари со висок индекс на чувствителност и специфичност. Другите предности се што е стабилен и не е заразен.

### 2.1. Постапка на тестирање

#### 2.1.1. Цврста фаза

2.1.1.1. На ELISA плочите се нанесува рекомбиниран AHSV-4 VP7 растворен во карбонатен/бикарбонатен пуфер, pH 9,6. Плочките се инкубираат преку ноќ на температура од 4 °C.

2.1.1.2. Плочите се мијат пет пати со дестилирана вода со содржина на Tween 20 (раствор за миење) од 0,01 % (v/v). Плочите внимателно се тапкаат на апсорбирачки материјал за да се отстранат евентуалните остатоци од растворот за миење.

2.1.1.3. Плочките се блокираат со фосфатен физиолошки раствор (PBS) + 5 % (w/v) обезмастено млеко (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl, 1 час на температура од 37 °C.

2.1.1.4. Се отстранува растворот за блокирање и внимателно плочките се тапкаат на апсорбирачки материјал.

#### 2.1.2. Тестирани примероци

2.1.2.1. Примероците на серум коишто треба да се испитаат и позитивните и негативните контролни серуми се раствораат во однос 1:25 во PBS + 5 % (w/v) обезмастено млеко + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl за секоја вдлабнатина. Се инкубира 1 час на температура од 37 °C.

За титрација се прават серии двократни раствори од 1:25 (100 µl/по дупче), во секоја колона на плочата по еден серум и истото се повторува со позитивните и негативни контролни серуми. Се инкубира 1 час на температура од 37 °C.

2.1.2.2. Плочите се мијат како што е опишано во постапка 2.1.1.2.

#### 2.1.3. Коњугат

2.1.3.1. Се додава 100 µl/по дупче пероксидаза (HRP) конјугиран со анти-коњски гама-глобулин растворен во фосфатен физиолошки раствор (PBS) +5% млеко+0,05% Tween 20, pH 7,2. Се инкубира 1 час на температура 37 °C.

2.1.3.2. Плочите се мијат како што е опишано во постапка 2.1.1.2.

#### 2.1.4. Хромоген/Супстрат

2.1.4.1. Во вдлабнатините се додава по 200  $\mu$ l раствор на хромоген/супстрат (10 ml од 80,6 mM DMAВ (диметил amino-бензалдехид) + 10 ml of 1,56 mM MBTH (3-метил-2-бензо-тиазолин хидразон хидрохлорид) + 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Развојот на бојата се сопира со додавање на 50  $\mu$ l 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по околу 5 до 10 минути (пред да почне да се бои негативната контрола).

Исто така може да се користат други хромогени како ABTS (2,2'-Азино-бис-[3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина]), ТМВ (тетра-метил бензидин), или OPD (орто-фенилдиамин).

2.1.4.2. Плочките се читаат на 600 nm (или 620 nm).

#### 2.2. Толкување на резултатите

2.2.1. Граничната вредност се пресметува со додавање на 0,6 кон вредноста на негативната контрола (0,6 е стандардното отстапување добиено со група од 30 негативни серуми).

2.2.2. Примероците за тестирање кои даваат вредности на апсорпција пониски од граничната вредност се сметаат за негативни.

2.2.3. Примероците за тестирање кои даваат вредности на апсорпција повисоки од граничната вредност + 0,15 се сметаат за позитивни.

2.2.4. Примероците за тестирање кои даваат средни вредности на апсорпција се нејасни и за да се потврди резултатот треба да се примени втора техника.

#### 3. Блокирачки ELISA-тест за откривање на антитела на вирусот Африканска чума кај копитари (AHSV) (задолжителен тест)

Блокирачкиот ELISA тест е креиран да открие посебни антитела на AHSV во серуми од сите чувствителни видови. VP7 е најголемиот, антигенски, вирусен протеин на AHSV и е присутен во двата серо-типови. Бидејќи моноклоналното антитело (Mab) исто така е насочено против VP7, анализата дава висок степен на чувствителност и определеност. Дополнително, рекомбинираниот VP7-антиген е целосно безопасен и затоа гарантира висок степен на безбедност.

Начелото на тестот е прекин на реакцијата помеѓу рекомбинираниот VP7, како антигенот сврзан со плочата ELISA и конјугираното Mab (моноклонално антитело) карактеристично за VP7. Антителото во серумите за тестирање ја блокира реакцијата помеѓу антигенот и Mab резултирајќи со намалување во бојата.

Тестот опишан во понатамошниот текст се спроведува во Референтна лабораторија на Европската унија за Африканска чума кај копитари во Алхете, Шпанија.

#### 3.1. Постапка на тестирање

##### 3.1.1. Плочи ELISA

3.1.1.1. Плочите ELISA се покриваат со рекомбиниран AHSV-4 VP7 растворен во карбонатен/бикарбонатен пуфер, pH 9,6. Плочите се инкубираат преку ноќ на температура 4 °C.

3.1.1.2. Плочите се мијат пет пати со фосфатен физиолошки раствор (PBS) со содржина на Tween 20 (PBST) од 0,05 % (v/v).

3.1.1.3. Плочата се стабилизира со раствор за стабилизирање (со цел да се овозможи долгорочно чување на температура од 4 °C без да се изгуби активноста) и се суши на апсорбирачки материјал.

#### 3.1.2. Примероци за тестирање и контроли

3.1.2.1. За проверка: Се раствораат серумите за тестирање и контролите 1:10 директно на плочата во фосфатно пуферен физиолошки раствор со цел да се добие конечен волумен од 100 µl/сад. Се инкубира 1 час на температура од 37 °C.

3.1.2.2. За титрација : Се подготвуваат двојни серии на раствор на серуми за тестирање и позитивни контроли (100 µl/сад) од 1:10 до 1:1280 во осум дупчиња. Негативната контрола се тестира во раствор 1:10.

#### 3.1.3. Коњугат

Се додава 50 µl/ на дупче од претходно растворена пероксидаза (HRP)-коњугат со моноклонални антитела (специфични за антигенот VP7) на секое дупче и се меша внимателно за да се обезбеди хомогеност. Се инкубира 30 час на температура од 37 °C.

3.1.4. Плочите се мијат пет пати со PBST и се суши како што е опишано погоре.

#### 3.1.5. Хромоген/Супстрат

Се додава 100 µl/по дупче раствор на хромоген/супстрат (1 ml ABTS (2,2'-Азино-бис-[3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина]) 5 mg/ml + 9 ml супстратен пуфер (0,1 M Фосфатно-цитратен пуфер со pH 4 со содржина на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> од 0,03 %) и се инкубира 10 минути при собна температура. Развивањето на бојата се сопира со додавање на 100 µl/сад 2 % (w/v) SDS (натриум додецил сулфат).

#### 3.1.6. Читање

Се чита на 405 nm во ELISA-читач.

#### 3.2. Толкување на резултатите

##### 3.2.1. Валидација на анализите

Тестот е валиден доколку оптичката густина (OD) на негативната контрола (NC) е повисока од 1,0 и OD на позитивната контрола (PC) е пониска од 0,2.

##### 3.2.2. Пресметување на граничната вредност (праг)

Позитивна гранична вредност = NC - ((NC - PC) × 0,3)

Негативна гранична вредност = NC - ((NC - PC) × 0,2)

При што NC е OD на негативната контрола а PC е OD на позитивната контрола.

##### 3.2.3. Толкување на резултатите

Примероците со OD пониска од позитивната гранична вредност треба да се сметаат за позитивни на антителата на AHSV.

Примероците со ODГ повисока од негативната гранична вредност треба да се сметаат за негативни на антителата на AHSV.

Примероците со OD помеѓу овие две вредности треба да се сметаат за нејасни и по две или три недели повторно да се земе примерок од животните.

Здравствена потврда <sup>(а)</sup>

Пасош бр. ....

Јас, долупотпишаниот, потврдувам дека <sup>(б)</sup> животното идентификувано погоре, ги исполнува следните барања:

(а) денес е прегледано и не покажува клинички знаци на болест;

(б) не е наменето за колење во рамките на национална програма за искоренување на инфективна или заразна болест.

(в)

— не доаѓа од територијата или дел од територијата која е предмет на забрана поради Африканската чума кај копитари, или

доаѓа од територијата или дел од територијата која била предмет на забрана поради здравствена заштита на животните и било тестирано со негативен резултат на тестовите предвидени во член 5 став (6) од Правилникот за услови за здравствена заштита при движење на копитари во карантинската станица на ..... меѓу ..... и .....<sup>(в)</sup>

— не е вакцинирано против Африканска чума кај копитарите, или, било вакцинирано против Африканска чума кај копитари на .....<sup>(в)</sup> <sup>(г)</sup>;

(г) не доаѓа од одгледувалиште кое е предмет на забрана поради здравствена заштита на животните, ниту имало контакт со копитари од одгледувалиште кое е предмет на забрана поради здравствена заштита на животните:

— за време од шест месеци, во случај на копитари за кои постои сомнеж дека се изложени на болеста дурина, од датумот на последниот направен или можеен контакт со болно животно. Во случај на пастуви забраната е на сила до кастрирање на животното,

— за време од шест месеци, во случај на сакагија или енцефаломиелитис кај коњи, од денот од кој копитарите кои имаат наведената болест се заклани,

— во случај на инфективна анемија, до датумот на кој инфицираните животни се заклани, преостанатите животни покажуваат негативна реакција на два последователни теста на Когинс направени во интервали од три месеци,

— за време од шест месеци од последниот евидентиран случај, во случај на везикуларен стоматитис,

— за време од еден месец од последниот евидентиран случај, во случај на беснило;

— за време од 15 дена од последниот евидентиран случај, во случај на антракс (црн пришт),

— доколку сите животни од видовите кои се приемчиви на болести присутни на одгледувалиштето се заклани и просториите дезинфицирани, периодот на забрана е 30 дена од денот од кој животните биле убиени и нештетно отстранети и просториите биле дезинфицирани, освен во случај на антракс (црн пришт) кога периодот на забрана е 15 дена;

(д) колку што ми е познато, не било во контакт со копитари кои имаат инфективна или заразна болест во период од 15 дена пред издавање на оваа потврда;

(е) за време на проверката, животното е во состојба да се превезува за предвиденото патување во согласност на одредбите од Законот за заштита и благосостојба на животните односно еквивалентната Регулатива (ЕЗ) Бр. 1/2005 <sup>(д)</sup>

Датум	Место	Печат и потпис на официјалниот ветеринар <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Име и звање со печатни букви.

<sup>(a)</sup> Оваа потврда не е потребна доколку е потпишан билатерален договор во согласност со член 6 од Правилникот за услови за здравствена заштита при движење на копитари

<sup>(b)</sup> Важи за 10 дена.

<sup>(b)</sup> Избриши кое не се применува.

<sup>(1)</sup> Датумот на вакцинација треба да се внесуваат во пасошот

<sup>(d)</sup> Оваа потврда не ги ослободува превозниците од своите обврски во согласност со одредбите кои се на сила во Република Македонија односно Заедницата особено во однос на погодноста на животните да бидат превезени.

## Образец на ветеринарно-здравствен сертификат

Ветеринарно здравствен сертификат за трговија со копитари  
Health Certificate for trade of equidae

Европска Заедница: /European Community:		Ветеринарно здравствен сертификат за внатрешна трговија /Intra trade certificate						
Дел I: Детали за презентираниот патка Part I: Details of consignment presented	I.1. Испраќач /Consignor  Име /Name  Адреса /Address		I.2. Референтен број на сертификатот /Certificate reference number		I.2.a Локален референтен број /Local reference number:			
			I.3. Централен Надлежен Орган /Central Competent Authority					
			I.4. Локален Надлежен Орган /Local Competent Authority					
	I.5. Примач /Consignee  Име /Name  Адреса /Address  Поштенски број /Postal code		I.6. Бр.(еви) на поврзани оригинални сертификати Бр.(еви) на придружни документи /No(s) of related original certificates No(s) of accompanying documents					
			I.7.					
	I.8. Земја на потекло /Country of origin	ИСО код /ISO code	I.9. Подрачје на потекло /Region of origin	Код /Code	I.10. Земја на дестинација /Country of destination	ИСО код /ISO code	I.11. Подрачје на дестинација /Region of destination	Код /Code
	I.12. Место на потекло/Место на собирање /Place of origin/Place of harvest  Одгледувалште <input type="checkbox"/> Собирен центар <input type="checkbox"/> Друго <input type="checkbox"/> /Holding /Assembly centre /Other  Име /Name Број на одобрение /Approval number Адреса /Address Поштенски број /Postal code		I.13. Place of destination  Одгледувалште <input type="checkbox"/> Собирен центар <input type="checkbox"/> Друго <input type="checkbox"/> /Holding /Assembly centre /Other  Име /Name Број на одобрение /Approval number Адреса /Address Поштенски број /Postal code					
	I.14. Место на натовар /Place of loading Поштенски број /Postal code		I.15. Дата и време на поаѓање /Date and time of departure					
	I.16. Средства за транспорт /Means of transport Авион <input type="checkbox"/> Железнички вагон <input type="checkbox"/> /Aeroplane /Railway wagon Средство за патен сообраќај <input type="checkbox"/> /Road vehicle Идентификација: /Identification:		I.17. Transporter  Име /Name Број на одобрение /Approval number Адреса /Address Поштенски број /Postal code Земја-членка /Member state					
	I.18. Опис на стоката /Description of commodity		I.19. Код на стоката (ЦН код) /Commodity code (HS code)					
I.20. Број/Колчество /Number/Quantity		I.21. Број на пакувања /Number of packages						
I.22. Тип на пакување /Type of packaging		I.23. Идентификација на контејнерот/Број на пломба: /Identification of container/Seal number:						
I.24. Пратките се наменети за /Commodities certified for		Расплод <input type="checkbox"/> Регистрирани коњи <input type="checkbox"/> Колење <input type="checkbox"/> Друго <input type="checkbox"/> /Breeding /Registered equide /Slaughter /Other						
I.25. Транзит низ трета земја /Transit through third country Трета земја /Third country Место на излез /Exit point Место на влез /Entry point Број на ВИП /BIP unit No.:		I.26. Транзит низ Земја-членка /Transit through Member state Земја-членка /Member state ИСО код /ISO code Земја-членка /Member state ИСО код /ISO code Земја-членка /Member state ИСО код /ISO code						
I.27. Извоз Export Трета земја /Third country Место на излез /Exit point ИСО код /ISO code Код /Code		I.28. Предвидено време на траење на патувањето /Estimated journey time						
I.29. План на патување /Route plan Да <input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> /Yes /No		I.30. Идентификација на пратката /Identification of the commodities						
Видови (Научно име) /Species (Scientific name)		Систем за идентификација /Identification system category						

Европска заедница /European Community		Регистрирани коњи, копитари за размножување, производство и за колење /Registered equide, equidae for breeding and production equide for slaughter	
Дел II: Сент	II. ИНФОРМАЦИИ ЗА ЗДРАВСТВЕНАТА СОСТОЈБА /HEALTH INFORMATION	II.a. Референтен број на сертификатот /Certificate reference	II.b. Локален референтен број /Local reference number:
	Јас, долу потпишаниот, со ова потврдувам дека животните опишани со овој сертификат: /I, the undersigned, certify that the animal/s described above meet/s the following requirements:		
	II.1 тој/тие се испитувало(ле) денес и не покажало(е) клинички знаци на болест; /it/they has/have been examined today and show/s no clinical sign of disease;		
	II.2 тој/тие не е(се) наменето(и) за колење(а) според национална програма за искоренување на инфективни и заразни болести; /it/they is/are not intended for slaughter under a national programme of contagious or infectious disease eradication;		
или /either(²)	II.3.(²) ако тој/тие не доаѓа(ат) од територијата или дел од територијата на земја-членка, којашто е предмет на ограничувања поради Африканска чума кај копитарите;		
или /or(²)	II.3.(²) ако тоа/тие доаѓа(ат) од територијата или дел од територијата на земја-членка, којашто е предмет на ограничувања поради Африканска чума кај копитарите, останало(е) најмалку 40 дена пред испраќањето во векторски заштитената карантинска станица на ..... и подлегнал(е) на тест за откривање на антитела на вирус на Африканска чума кај копитарите како што е опишано во Прилог I од Правилник за услови за здравствена заштита при движење на копитарите односно еквивалентниот Анекс IV кон Директива 2009/156/E3, спроведен истовремено и за примероци со крв, земен на двапати во интервал од меѓу 21 и 30 дена на ..... (ен it/they come/s from the territory or part of the territory of a Member State, which is the subject of restrictions for reasons of African horse sickness, have remained for at least 40 days prior to dispatch in the vector proved quarantine station of ..... and has/have undergone a test for the detection of antibodies to the African horse sickness virus as described in Annex I of the Book of rules on animal health during movement of equide or equivalent Annex IV to Directive 2009/156/EC carried out simultaneously on blood samples taken on two occasions with an interval of between 21 and 30 days on ..... (insert date) and during the 10 days prior to dispatch on ..... (insert date) или (²) [со негативен резултат кај секој случај ако тоа/тие не било/биле вакцинирани против Африканска чума кај копитарите; /with negative result in each case if it/they was/were not vaccinated against African horse sickness;] или (²) [без зголемување на бројот на антителата, ако тоа/тие било/биле вакцинирани против Африканска чума кај копитарите; /without increase in antibody count, if it/they was/were vaccinated against African horse sickness;]		
или /either (²) II.4. или or(²) II.4.	тој/тие не е/се вакцинирани против Африканска чума кај копитарите; /it/they is/are not vaccinated against African horse sickness;] тој/тие било/биле вакцинирани против Африканска чума кај копитарите на ..... (внеси датум), или (²) [најмалку два месеца пред сертификацијата; или (²) [најмалку два месеци пред влегувањето во карантинската станица; /it/they was/were vaccinated against African horse sickness on ..... (insert date), either (²) [at least two months prior to certification; or(²) [at least two months prior to entry into the quarantine station;] ако тоа/тие не доаѓа/доаѓаат од (а) одгледувалиштето(а), којшто/којшто било/биле подложено(и) на решение(ја) за забрана поради причини за здравјето на животните, кое/кои утврдил(е) најмалку еден од следниве услови: /it/they does/do not come from (a) holding(s) which was/were subject to prohibition order(s) for animal health reasons which laid down at least of one the following conditions; [не сите животни од одгледувалиштето од видовите, коишто се подложни на болестите, споменати во точките од (а) до (е), биле колени понатаму и забраната трае најмалку: (а) во случај на еквиди, подложени на фатена дурина, или (²) [од датумот на последниот вистински или можен контакт со болно животно или со инфицирано животно со <i>Trypanosoma equiperdum</i> ; или (²) [во случај на ждребе, до кастрање на животното;] (б) во случај на сакагија, шест месеци од денот од кој еквидите, коишто ја имаат болеста или подлежат, со позитивен резултат на тест за откривање на патоген причинител <i>Burkholderia mallei</i> или на антитела против тој патоген, биле умиртени или уништени; (в) во случај на енцефаломиелитис од секаков вид, шест месеци од денот од кој еквидите, коишто ја имаат болеста се колат, освен во случај на вирусна инфекција со западнониолска треска, каде што периодот од шест месеци, почнува од денот кога инфицираните еквиди умреле, се отстранил од одгледувалиштето или во целост се излечиле; /not all the animals on the holding of species susceptible to the diseases mentioned in points (a) to (g) hereinafter were slaughtered and the prohibition lasted at least for: (a) In the case of equidae suspected of having contracted dourine, either (²) [six months beginning on the date of the last actual or possible contact with a sick or infected with <i>Trypanosoma equiperdum</i> animal;] or(²) [in the case of a stallion, until the animal is castrated;] (b) in the case of glanders, six months beginning on the day on which the equidae suffering from the disease or subjected with positive result to a test for the detection of the causative pathogen <i>Burkholderia mallei</i> or antibodies to that pathogen, were killed and destroyed; (c) in the case of equine encephalomyelitis of any type, six months beginning on the day on which the equidae suffering from the disease have been slaughtered, except in case of West Nile virus infection where the period of six months begins on the day the infected equidae died, have been removed from the holding or fully recovered; (г) во случај на инфективна анемија, до датумот на кој инфицираните животни се колат, преостанатите животни покажуваат негативна реакција од два тестови на Котинс, спроведени посебно на три месеци; во случај на инфективна анемија, до датумот на кој инфицираните животни се колат, преостанатите животни, покажуваат негативна реакција од два тестови на Котинс, спроведени врз примероци со крв, собрани посебно на три месеци; (d) in case of infectious anaemia, until the date on which, the infected animals having been slaughtered, the remaining animals have shown a negative reaction to a Coggins test carried out on blood samples collected on two occasions three months apart; (д) во случај на везикуларен стоматитис, шест месеци од последниот случај; (е) in the case of vesicular stomatitis, six months from the last case; (ф) во случај на беснило, еден месец од последниот случај; (f) in the case of rabies, one month from the last case; (е) во случај на антракс (при пришт), 12 дена од последниот случај; (g) in the case of anthrax, 15 days from the last case; или (²) [следниве случаи на дурина, сакагија, коњски енцефаломиелитис од сите видови, коњска инфективна анемија, везикуларен стоматитис, антракс (при пришт) или беснило, сите животни на одгледувалиштето од видовите коишто се подложни на предметната болест, се колат или убијат и забраната трае 30 дена, или 15 дена во случај на антракс (при пришт), од денот од кој, по уништувањето на животните, дезинфекцијата на просторите била задоволително завршена; /or (²) following cases of dourine, glanders, equine encephalomyelitis of all types, equine infectious anaemia, vesicular stomatitis, anthrax or rabies all animals on the holding of species susceptible to the disease in question were slaughtered or killed and the prohibition lasted for 30 days, or 15 days in the case of anthrax, beginning on the day on which, following the destruction of the animals, the disinfection of the premises was satisfactorily completed;] II.6. колку што ми е познато, тоа/тие не е(се) во контакт со еквиди, коишто имаат инфективна или заразна болест, 15 дена пред оваа изјава; /I.6. to the best of my knowledge, it/they has/have not been in contact with equidae suffering from an infectious or contagious disease in the 15 days prior to this declaration; II.7. за време на проверката тоа/тие било/биле во состојба да се превезуваат на наменетото патување, во согласност со одредбите од Законот за заштита и благосостојба на животните односно еквивалентната Регулација (ЕЗ) бр. 1/2005 (²). /I.7. at the time of the inspection it/they was/were fit to be transported on the intended journey in accordance with the provisions of Law on animal welfare and protection or equivalent Regulation (EC) No 1/2005 (²).		
Забелешки Notes Дел I Part I	Рамка 1.6: одговара на ЦИТЕС-бројот на одобрувањето во случај на еквиди наведени во Вашингтонската конвенција за заштитените видови и производи од истите. /Box 1.6: shall correspond to the CITES permit number in case of equidae listed in the Washington Convention on protected species and products thereof. Рамка 1.16: Регистарски број (железнички вагони или контейнер и камјони), број на лет (воздухоплов) или име (брод). /Box 1.16: Registration number (railway wagons or container and lorries), flight number (aircraft) or name (ship). Рамка 1.19: Употребува соодветен код на Хармонизираниот систем (ХС) на Светската царинска организација: 01.01.01 или 01.01.06.19 /Box 1.19: Use the appropriate Harmonised System (HS) code of the World Customs Organisation: 01.01.01 or 01.01.06.19 Рамка 1.31: Видови: коњ, магаре, муле, маска, зебра (вклучувајќи ги нивните вкрстувања). /Box 1.31: Species: horse, ass, mule, hinny, zebra (including their crossings). Единствен матичен број како што е наведено во член 3 став (2) точка 4) и Оддел 1A(4) од Прилог I од Правилник за начинот и постапката за идентификација и регистрација на копитарите односно еквивалентниот член 2(2)(г) од и Оддел A(4) на Анекс I кон Регулација (ЕЗ) бр. 504/2008 на Комисијата /Unique life number as described in Article 3(2)(4) and Section 1A(4) of Annex I to the Book of rules on identification of equide or equivalent Article 2(2)(d) of and Section 1A(4) of Annex I to Commission Regulation (EC) No 504/2008.		
Дел II Part II	(²) Информациите во точките од II.1. до II.6. не се бараат, кога постои билатерален договор, во согласност со член 6 од Правилник за услови за здравствена заштита при движење на копитарите односно еквивалентниот член 6 од Директива 2009/156/E3.		

(<sup>1</sup>) The information in points 11.1. to 11.6. Is not required where there is a bilateral agreement in accordance with Article 6 of the Book of rules on health condition for movement of equidae or equivalent Article 6 of Directive 2009/156/EC.  
 (2) Непотребното се пречкртува.  
 (3) Delete whichever does not apply.  
 (4) Оваа изјава не ги иззема превозниците од нивните обврски, во согласност со одредбите на Заедницата во сила, особено во поглед на состојбата на животните што треба да се превезуваат.  
 (5) This statement does not exempt transporters from their obligations in accordance with Community provisions in force in particular regarding the fitness of animals to be transported.  
 — Овој сертификат важи 10 дена.  
 /— This certificate is valid for 10 days  
 — Бојата на печатот и потписот мора да е различна од таа на другите податоци во сертификатот.  
 /— The colour of the stamp and signature must be different from that of the other particulars in the certificate.

Официјален ветеринар  
 /Official veterinarian

Име (со печатни букви):  
 /Name (in Capital)

Квалификација и титула  
 /Qualification and title:

Подрачна единица  
 /Local veterinary unit

Број на подрачната единица  
 /N° of the related LVU

Дата  
 /Date:

Потпис  
 /Signature:

Печат:  
 /Stamp:

\*1 Правилникот за зоотехнички и генеалошки услови за ставање во промет на копитари е предмет на усогласување со Директивата 90/427/ЕЕЗ од 26 јуни 1990 за зоотехнички и генеалошки услови за ставање во промет во Заедницата на копитари, CELEX бр. 31990L0427;

\*2 Правилникот за мерки за сузбивање и искоренување на Африканската чума кај копитари во Република Македонија е усогласен со Директивата на Советот 92/35/ЕЕЗ од 29 април 1992 година, за утврдување на правилата за контрола и мерките за сузбивање на Африканската чума кај копитари, CELEX бр. 31992L0035;

\*3 Законот за заштита и благосостојба на животните е усогласен со Регулативата (ЕЗ) бр. 1/2005 од 22 декември 2004 за заштита на животните за време на превоз и поврзани операции и за измена на Директивата 64/432/ЕЕЗ и 93/119/ЕЗ и Регулативата (ЕЦ) Бр. 1255/97, CELEX бр. 32005R0001;

\*4 Законот за ветеринарно здравство е усогласен со Директивата 90/425/ЕЕЗ од 26 јуни 1990 за ветеринарни и зоотехнички контроли применливи при трговија во Заедницата на живи животни и производи, CELEX бр. 31900L0425;