

PRAVILNIK

O UTVRĐIVANJU MERA ZA RANO OTKRIVANJE, DIJAGNOSTIKU, SPREČAVANJE ŠIRENJA, SUZBIJANJA I ISKORENJVANJA ZARAZNE BOLESTI BRUCELOZA GOVEDA, NAČIN NJIHOVOG SPROVOĐENJA, KAO I NAČIN UTVRĐIVANJA STATUSA GAZDINSTVA SLOBODNOG OD BRUCELOZE GOVEDA

("Sl. glasnik RS", br. 55/2009)

I OSNOVNE ODREDBE

Član 1

Ovim pravilnikom utvrđuju se mere za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanja i iskorenjivanja zarazne bolesti bruceloza goveda, način njihovog sprovođenja, kao i način utvrđivanja statusa gazdinstva slobodnog od bruceloze goveda.

Član 2

Pojedini izrazi upotrebljeni u ovom pravilniku imaju sledeće značenje:

- 1) sumnjivo na brucelozu govedo jeste svako govedo koje pokazuje simptome bruceloze i za koje propisanim dijagnostičkim ispitivanjem nije službeno potvrđeno niti isključeno prisustvo bolesti;
- 2) službena potvrda bruceloze jeste pozitivan rezultat laboratorijskog ispitivanja uzorka krvi životinje zvaničnim testom na brucelozu uzorkovanog na propisan način i ispitanog u akreditovanoj laboratoriji;
- 3) zvanični test na brucelozu jeste bilo koji serološki test opisan u dijagnostičkom ispitivanju na brucelozu;
- 4) stado čini životinja ili grupa životinja koje se drže u gazdinstvu, a ako se u gazdinstvu odvojeno drži više od jednog stada sva stada moraju imati isti zdravstveni status;
- 5) stado goveda tipa B1 jeste stado kod kojeg su prethodni zdravstveni i serološki status i obavljene vakcinacije nepoznati;
- 6) stado goveda tipa B2 jeste stado kod kojeg su prethodni zdravstveni i serološki status i obavljene vakcinacije poznati i u kojima se sprovode propisana ispitivanja kako bi ista postigla status stada goveda tipa B3 ili B4;
- 7) stado goveda tipa B3 jeste stado slobodno od bruceloze goveda ako ispunjava sledeće uslove:
 - da su sve životinje u stadu najmanje poslednjih šest meseci bez kliničkih znakova bruceloze goveda;
 - da su sve životinje starije od 12 meseci ispitane jednim od testova sa negativnim rezultatom, u skladu sa dijagnostičkim ispitivanjem na brucelozu, i to dva serološka ispitivanja u intervalu dužem od tri, a kraćem od 12 meseci, tri testa na uzorcima mleka obavljena u intervalu od tri meseca, a posle najmanje šest nedelja obavljen serološki test;

8) stado goveda tipa B4 jeste stado službeno slobodno od bruceloze goveda ukoliko ispunjava uslove iz tačke 7) ovog člana, kao i sledeće uslove:

- da stado ne sadrži goveda vakcinisana protiv bruceloze;
- da goveda koja se uvode u stado potiču iz stada službeno slobodno od bruceloze goveda;
- da je test serumske aglutinacije kod goveda starijih od 12 meseci pokazao titar na brucelu manji od 30 IJ/ml ili su goveda negativna na svaki drugi test, u skladu sa dijagnostičkim ispitivanjem na brucelozu tokom 30 dana pre ili 30 dana posle uvođenja nove životinje u stado, kada se životinje moraju fizički izolovati od drugih životinja u stadu dok se ne dokaže da su negativne na brucelu;

9) područje ili država službeno slobodna od bruceloze goveda jeste deo teritorije Republike Srbije koji ispunjava uslove za to;

10) područje jeste deo teritorije Republike Srbije površine od najmanje 2000 m² koje je pod nadzorom ministarstva nadležnog za poslove veterinarstva i uključuje područje najmanje jednog upravnog okruga ili grad Beograd.

II MERE RANOG OTKRIVANJA I DIJAGNOSTIKE BRUCELOZE GOVEDA I NAČIN NJIHOVOG SPROVOĐENJA

Član 3

Vlasnik, odnosno držalac životinje obaveštava bez odlaganja veterinara ili veterinarskog inspektora o svakoj promeni zdravstvenog stanja životinje na gazdinstvu i prijavljuje svaki pobačaj životinje.

Govedo sumnjivo na brucelozu jeste govedo koje pokazuje simptome bruceloze i kod kojeg prisustvo brucele nije potvrđeno niti isključeno.

Član 4

U slučaju postavljanja sumnje na prisustvo bruceloze veterinarski inspektor mora odmah narediti uzorkovanje krvi i dijagnostičko ispitivanje, kako bi se potvrdilo ili isključilo prisustvo bruceloze goveda u stadu.

U slučaju sumnje na pojavu zarazne bolesti bruceloza goveda preduzimaju se sledeće mere:

- 1) stavljanje stada pod nadzor;
- 2) zabrana uvođenja u stado ili stavljanje u promet životinje iz stada, osim upućivanja na prinudno klanje;
- 3) odvajanje i izolacija goveda unutar stada sumnjivih na brucelozu;
- 4) zabrana osemenjavanja i pripusta goveda sumnjivih na brucelozu;
- 5) zabrana korišćenja mleka krava sumnjivih na brucelozu.

Izuzetno od stava 2. ovog člana veterinarski inspektor može odobriti stavljanje u promet prethodno kastriranih goveda, ako su iz stada izdvojene sumnjive životinje i pod uslovom da se kastrirana goveda prebace u stada za tov, a zatim upute na klanje.

Mere iz st. 2 i 3 ovog člana primenjuju se dok se u stadu ne isključi službena potvrda bruceloze goveda.

III DIJAGNOSTIČKO ISPITIVANJE NA BRUCELOZU

Član 5

1. Identifikacija uzročnika

Identifikacija uzročnika bruceloze koja se vrši pomoću modifikovanog kiselog (*acid-fast*) ili imunospecifičnog bojenja organizama *Brucella* morfologije u pobačenom materijalu, vaginalnom sekretu ili mleku predstavlja verodostojnu potvrdu bruceloze naročito uz pozitivan nalaz u imunološkim testovima. Metode lančane reakcije polimeraze (PCR) mogu se koristiti kao dodatno dijagnostičko sredstvo za utvrđivanja uzročnika.

Kada je to moguće izvršiće se izolacija *Brucella spp.* primenom jednostavnih ili selektivnih podloga i to kultivacijom iz sekreta, koji potiče iz materice, pobačenih fetusa, sekreta iz vimena ili tkiva kao što su limfni čvorovi i reproduktivni organi mužjaka i ženke.

Posle izolacije uzročnika, vrsta i biovarijet se identifikuju primenom fagolize, odnosno testovima oksidativnog metabolizma, kulturama, biohemijskim i serološkim kriterijumima. Lančana reakcija polimeraze (PCR) može da posluži i kao dodatni metod i kao biotipski metod baziran na nizu sekvenci genoma.

Tehnike i podloge koji se koriste, njihova standardizacija i tumačenje rezultata moraju biti u skladu sa odredbama Priručnika za standarde dijagnostičkih testova i vakcina za kopnene životinje koji je izdala Međunarodna organizacija za zaštitu zdravlja životinja (OIE), šesto izdanje, 2008.g., Poglavlje 2.4.3 (bruceloza goveda), Poglavlje 2.7.2 (bruceloza koza i ovaca) i Poglavlje 2.8.5 (bruceloza svinja).

2. Imunološki testovi

1) Standardi

Kod pripreme svih antigena koji se koriste kod brze serumske aglutinacije (BAB), odnosno Roze Bengal testa (RBT), spore serumske aglutinacije (SAT), reakcije vezivanja komplementa (RVK) i mlečno-prstenaste proba (MPP) mora se koristiti *Brucella abortus biovar 1* soj iz Vejbridža (*Weybridge*) broj 99 ili soj USDA 1119-3.

Standardni referentni serum za BAB, odnosno RBT, SAT, RVK i MPP je referentni standard Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja (OIE), međunarodni referentni standardni serum (OIEISS), ranije poznat kao drugi međunarodni anti-*Brucella abortus* serum Svetske zdravstvene organizacije (ISAbS).

Standardni referentni serumi za imunoenzimsku probu (ELISA testovi) su:

- OIEISS;
- slabo pozitivni standardni ELISA serum OIE-a (OIEELISA_{wp}SS);
- jako pozitivni standardni ELISA serum OIE-a (OIEELISA_{sp}SS);
- negativni standardni ELISA serum OIE-a (OIEELISA_nSS).

Standardni referentni serumi za test fluorescentne polarizacije (FPA) su:

- slabo pozitivni standardni ELISA serum OIE-a (OIEELISA_{wp}SS);
- jako pozitivni standardni ELISA serum OIE-a (OIEELISA_{sp}SS);
- negativni standardni ELISA serum OIE-a (OIEELISA_nSS).

Standardni serumi iz st. 3. i 4. ove podtačke mogu se dobiti u Referentnoj laboratoriji Evropske unije za bruceozu (*Veterinary Laboratories Agency, VLA*), Vejbriđž (*Weybridge*), Velika Britanija.

OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{SP}SS i OIEELISA_NSS su međunarodni primarni standardi od kojih se sekundarni referentni nacionalni standardi za serume (radni standardi) moraju uspostaviti za svaki test iz stava 1. ove podtačke u svakoj državi članici.

2) ELISA testovi ili druga obavezna ispitivanja za utvrđivanje bruceleze goveda u serumu ili mleku

(1) Materijal i reagensi

Korišćene laboratorijskih i dijagnostičkih tehnika i tumačenje dobijenih rezultata mora da bude izvršeno u skladu sa definicijama iz Poglavlja 1.1.4 Priručnika Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja (OIE) za dijagnostička ispitivanja i vakcine za kopnene životinje, šesto izdanje iz 2008.

(2) Standardizacija ispitivanja

Standardizacija procedure ispitivanja za pojedinačne uzorke seruma:

- rastvor 1/150 (1 u 150 rastvora) OIEISS ili 1/2 rastvora OIEELISA_{WP}SS ili 1/16 rastvora OIEELISA_{SP}SS napravljen u negativnom serumu (ili zbirnom negativnom serumu) mora dati pozitivnu reakciju;
- 1/600 rastvor OIEISS ili 1/8 rastvora OIEELISA_{WP}SS ili 1/64 rastvor OIEELISA_{SP}SS napravljen u negativnom serumu (ili zbirnom negativnom serumu) mora dati pozitivnu reakciju;
- OIEELISA_NSS standard mora uvek dati negativnu reakciju.

Standardizacija procesa ispitivanja za zbirne uzorke seruma:

- 1/150 rastvor OIEISS ili 1/2 rastvor OIEELISA_{WP}SS ili 1/16 rastvor OIEELISA_{SP}SS napravljenog u negativnom serumu (ili zbirnom negativnom serumu) i ponovo razređen u negativnom serumu prema broju uzoraka koji čine taj zbirni uzorak mora dati pozitivnu reakciju;
- OIEELISA_NSS mora uvek dati negativnu reakciju;
- test mora da utvrdi infekciju kod jedne životinje u grupi životinja od čijih je seruma i dobijen zbirni uzorak.

Standardizacija procedure ispitivanja zbirnog uzorka mleka ili surutke:

- 1/1 000 rastvora OIEISS ili 1/16 rastvora OIEELISA_{WP}SS ili 1/125 rastvora OIEELISA_{SP}SS napravljen u negativnom serumu (ili u zbirnom uzorku negativnih seruma), a zatim ponovo razređen u odnosu 1/10 u mleku sa negativnim nalazom mora da dà pozitivnu reakciju;
- OIEELISA_NSS razređen u odnosu 1/10 u mleku sa negativnim nalazom mora uvek dati negativnu reakciju;
- test mora da utvrdi infekciju kod jedne životinje u grupi životinja od čijeg je mleka ili surutke i dobijen zbirni uzorak.

U skladu sa uslovima etaloniranja za ELISA test iz st. 2. i 3. podtačke (2) Standardizacija ispitivanja za uzorke krvnog seruma dijagnostička osetljivost ELISA testa treba da bude ista ili veća od BAB, odnosno RBT ili RVK, pri čemu se mora uzeti u obzir epizootiološka situacija na mestu odakle potiču uzorci.

U skladu sa uslovima etaloniranja za ELISA test iz stava 4. podtačke (2) Standardizacija ispitivanja za zbirne uzorke mleka, dijagnostička osetljivost ELISA testa treba da bude ista ili veća od MPP, pri čemu se uzima u obzir ne samo epizootiološka situacija na mestu odakle potiču uzorci, već i prosečni i očekivani ekstremni uslovi uzgoja životinja.

Kada se ELISA test koristi za potrebe sertifikacije ili za utvrđivanje i održavanje statusa stada uzimanje zbirnog uzorka seruma vrši se na način da rezultati ispitivanja bez sumnje ukažu na konkretnu životinju od koje je uzet uzorak da bi postao deo zbirnog uzorka. Svako ispitivanje u cilju potvrđivanja nalaza mora se vršiti na uzorcima seruma uzetim od svake životinje pojedinačno.

ELISA test se može koristiti na uzorku mleka uzetog sa farme koja ima najmanje 30% muznih krava u fazi laktacije. Ukoliko se koristi taj metod, moraju se preduzeti mere kojima se obezbeđuje da se uzorci, koji se uzimaju u cilju vršenja ispitivanja, mogu, bez sumnje, povezati sa konkretnom životinjom od koje mleko potiče. Svako ispitivanje kojim se potvrđuje nalaz mora da se vrši na uzorcima seruma uzetim od svake životinje pojedinačno.

3) Reakcija vezivanja komplemenata (RVK)

Antigen predstavlja suspenziju bakterija u fenol fiziološkom rastvoru [NaCl 0,85% (m/v) i fenolu na 0,5% (v/v)] ili u veronal puferu. Antigeni mogu biti u koncentrovanom obliku pod uslovom da deklaracija na boci sadrži i faktor razređenja. Ovaj antigen se čuva na temperaturi od 4°C i ne sme se zamrzavati.

Inaktivacija seruma vrši se na sledeći način:

- serum goveda: 56 do 60°C u trajanju od 30 do 50 minuta;
- serum svinja: 60°C u trajanju od 30 do 50 minuta.

Da bi se dobila reakcija najvišeg kvaliteta u toku ispitivanja koristi se viša doza koplementa od minimalne za razvijanje potpune hemolize.

Tokom reakcije vezivanja komplemenata svaki put se sprovodi:

- kontrola antikomplementarnog efekta seruma;
- kontrola antigena;
- kontrola senzitivnih crvenih krvnih zrnaca;
- kontrola komplemenata;
- kontrola osetljivosti seruma na početku reakcije;
- kontrola specifičnosti reakcije primenom negativnog seruma.

Izračunavanje rezultata obavlja se na sledeći način:

- OIEISS sadrži 1000 međunarodnih RVK jedinica (ICFTU) po mililitru. Ukoliko se testira OIEISS određenom metodom rezultat se prikazuje kao titar (tj. kao najveći direktni rastvor OIEISS koji daje 50% hemolize, T_{OIEISS}). Rezultati testa za serum korišćeni tokom testa dati su u obliku titra ($T_{TESTSERUM}$) i moraju se izraziti u ICFTU po ml. Da bi se rezultat titra izrazio u ICFTU, faktor (F), koji je neophodan za izražavanje rezultata za jedan nepoznati serum test ($T_{TESTSERUM}$) koji se testira primenom te metode u ICFTU može se dobiti primenom sledeće formule:

$$F = 1\ 000 \times 1/T_{OIEISS}$$

a sadržaj međunarodnih RVK jedinica po mililitru seruma koji se ispituje (ICFTU_{ESTSERUM}) može se izračunati primenom sledeće formule:

$$\text{ICFTU}_{\text{ESTSERUM}} = F \times T_{\text{TESTSERUM}}$$

Serum koji sadrži 20 ili više ICFTU po ml smatra se pozitivnim.

4) Mlečno prstenasta proba (MPP)

Antigen predstavlja rastvor u fenol fiziološkom rastvoru [NaCl 0,85% (m/v) i fenolu na 0,5% (v/v)] bojenim hematoksilinom. Antigen se čuva na temperaturi od 4°C i ne sme se zamrzavati.

Osetljivost antigena mora biti standardizovana u odnosu na OIEISS i to tako da antigen dovodi do pozitivne reakcije u 1/500 razređenom OIEISS u mleku sa negativnim nalazom, dok rastvor od 1/1000 mora biti negativan.

Prstenasta proba vrši se na uzorcima koji su uzeti iz svake kante sa mlekom ili iz sadržaja svake cisterne sa mlekom koja dolazi sa farme.

Uzorci mleka se ne smeju zamrzavati, zagrevati ili snažno bućkati.

Reakcija se dobija upotrebom jedne od sledećih metoda:

- na stubu mleka od najmanje 25 mm visine i na zapremini mleka od 1 ml kojem je dodato ili 0,03 ml ili 0,05 ml jednog od standardizovanih antigena koji su obojeni;
- na stubu mleka od najmanje 25 mm visine, a zapremina mleka od 2 ml kojem je dodato 0,05 ml jednog od standardizovanih antigena koji su obojeni;
- na zapreminu od 8 ml mleka dodaje se 0,08 ml jednog od standardizovanih obojenih antigena.

Ova mešavina mleka i antigena mora se inkubirati na temperaturi od 37°C u toku 60 minuta zajedno sa pozitivnim i negativnim radnim standardima. Naknadnom inkubacijom u trajanju od 16 do 24 časa na temperaturi od 4°C povećava se senzitivnost testa.

Rezultati se tumače tako što se negativnom reakcijom smatra ako je mleko obojeno, a izdvojena mast bez boje, a pozitivnom reakcijom smatra se ako su mleko i izdvojena mast na identičan način obojeni ili je mleko bez boje, a izdvojena mast obojena.

5) Brza serumska aglutinacija (BAB), odnosno Rose Bengal test (RBT)

Antigen predstavlja bakterijsku suspenziju u pufervanom *Brucella* antigen rastvaraču pri pH vrednosti od 3,65 ± 0,05 koji se boji primenom "Bengal" nijanse roza boje. Ovaj antigen se isporučuje spreman za upotrebu i čuva se na 4°C, a ne sme se zamrzavati.

Za pripremu antigena nije od značaja koncentracija bakterijskih ćelija, ali njegova senzitivnost se standardizuje u odnosu na OIEISS i to tako da antigen dovodi do pozitivne reakcije sa rastvorom seruma od 1/45, odnosno do negativne reakcije sa rastvorom seruma od 1/55.

Reakcija se vrši na sledeći način:

- serum (20-30 μl) se pomeša sa istom zapreminom antigena na beloj pločici ili ploči od emajla kako bi se dobila površina od oko 2 cm u prečniku. Ova mešavina se lagano meša tokom četiri minuta na sobnoj temperaturi, a onda se posmatra proces aglutinacije pod dobrim osvetljenjem;

- može se koristiti automatizovan metod, ali mora da bude isto toliko osetljiv i precizan kao i ručni metod.

Svaka vidljiva reakcija smatra se pozitivnom, osim ako ne dođe do preteranog sušenja oko ivica.

Pozitivni i negativni radni standardi treba da budu deo svake serije testova.

6) Spora serumska aglutinacija (SAT)

Ovaj antigen je bakterijska suspenzija u fenol fiziološkom rastvoru [NaCl 0,85% (m/v) i fenola od 0,5% (v/v)].

Formaldehid se ne sme koristiti.

Antigeni mogu biti u koncentrovanom stanju pod uslovom da razređenje koje se koristi bude naznačeno na deklaraciji na bočici.

EDTA se može dodati suspenziji antigena na 5 mM krajnjeg rastvora, koji se koristi za test kako bi se smanjio stepen lažno pozitivnih u testu serumske aglutinacije. Posle toga se pH od 7,2 mora prilagoditi suspenziji antigena.

OIEISS sadrži 1 000 međunarodnih jedinica aglutinacije.

Za pripremu antigena nije od značaja koncentracija bakterijskih ćelija ali njegova osetljivost mora biti standardizovana u odnosu na OIEISS, i to tako da antigen dovede bilo do 50% aglutinacije sa finalnim razređenjem seruma od 1/600 do 1/1000 bilo do 75% aglutinacije sa finalnim razređenjem seruma od 1/500 do 1/750.

Takođe, preporučuje se poređenje reaktivnosti novih i prethodno standardizovanih serija antigena korišćenjem grupe, odnosno panela definisanih seruma.

Ovaj test vrši se bilo korišćenjem epruveta bilo mikrotitar ploča. Mešavina antigena i rastvora seruma se inkubira u trajanju od 16 do 24 časa na temperaturi od 37°C.

Za svaki serum potrebno je pripremiti najmanje tri rastvora. Rastvori sumnjivog seruma se pripremaju tako da se može videti reakcija kada je reč o graničnoj pozitivnoj vrednosti u srednjoj epruveti (ili kod metoda mikrotitar ploče).

Tumačenje rezultata:

- stepen aglutinacije *Brucelle* u serumu mora se izraziti u internacionalnim jedinicama (IJ) po ml;
- serum koji sadrži 30 ili više IJ po ml smatra se pozitivnim.

7) Ispitivanje fluorescentnom polarizacijom (FPA)

FPA vrši se u staklenim epruvetama ili na mikrotitar ploči sa 96 bazenčića. Tehnika koja se koristi, standardizacija iste i tumačenje rezultata moraju biti u skladu sa Poglavljem 2.4.3 (bruceloza goveda) Priručnika Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja za dijagnostičke testove i vakcine za kopnene životinje, šesto izdanje, 2008.

FPA se standardizuje kako bi:

- rezultati OIEELISA_{sp}SS i OIEELISA_{wp}SS bili stalno pozitivni;
- 1/8 rastvor OIEELISA_{wp}SS ili 1/64 rastvor OIEELISA_{sp}SS, koji čine negativni serum (ili zbirni negativni serum) uvek dovodili do negativne reakcije;

- OIEELISA_{SS} uvek dovodio do negativne reakcije.

U svaku seriju testova moraju biti uključeni sledeći testovi: jak pozitivan, slab pozitivan, negativan radni standard seruma (etalonirani prema standardnom serumu ELISA Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja).

3. Dopunski testovi

1) Kožni test na brucelozu (BST)

Uslovi za upotrebu BST su sledeći:

- kožni test na brucelozu se ne koristi kod sertifikacije životinja za promet sa zemljama članicama EU;
- kožni test na brucelozu je jedan od najspecifičnijih testova za utvrđivanje bruceloze kod nevakcinisanih životinja, međutim dijagnoza se ne može postaviti samo na osnovu pozitivnih intradermalnih reakcija;
- goveda koja su tokom ispitivanja negativno reagovala na neki od seroloških testova i pozitivno reagovala na BST smatraju se inficiranim ili postoji sumnja da su inficirani;
- goveda koja su tokom ispitivanja pozitivno reagovala na neki od seroloških testova mogu se podvrgnuti na BST kako bi se potvrdilo tumačenje rezultata seroloških testova, posebno kada u stadima koja su zvanično proglašena slobodna od bruceloze ili stadima goveda slobodna od bruceloze ne može isključiti unakrsna reakcija sa antitelima u odnosu na ostale bakterije.

Ovaj test se vrši primenom standardizovanih i definisanih preparata brucela alergena koji ne sadrže glatke antigene lipopolisaharida (LPS) budući da to može da izazove nespecifične zapaljenske reakcije ili da ometa kasnije serološke testove.

Zahtevi za proizvodnju brucelina moraju biti u skladu sa Odeljkom C1 Poglavlja 2.4.3 Priručnika Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja za dijagnostičke testove i vakcine za kopnene životinje, šesto izdanje, 2008.

Procedura testiranja obavlja se na sledeći način:

- zapremina od 0.1 ml brucela alergena se ubrizgava intradermalno u kaudalni nabor, kožu boka ili bočnu stranu vrata;
- rezultati testa se očitavaju u periodu između 48 i 72 časa;
- debljina kože na mestu uboda se meri kutinometrom pre ubrizgavanja i prilikom ponovnog pregleda.

Prilikom tumačenja rezultata jake reakcije se lako prepoznaju po otoku i zadebljanjem tkiva na mestu aplikacije alergena, a zadebljanje kože od 1 do 2 mm smatra se pozitivnom reakcijom na BST.

2) Kompetitivna ELISA (k-ELISA)

Uslovi za upotrebu k-ELISA testa su:

- k-ELISA test se ne koristi za potrebe sertifikacije životinja za promet sa zemljama članicama EU;
- goveda koja su tokom ispitivanja pozitivno reagovala na neki od seroloških testova mogu biti testirana k-ELISA testom što je dodatna potvrda rezultata ostalih seroloških testova, posebno kada se kod stada zvanično slobodnih od bruceloze ili kod stada goveda slobodno od bruceloze ne može isključiti unakrsna reakcija sa antitelima u

odnosu na ostale bakterije ili eliminisati reakcija zbog rezidualnih antitela koji nastanu kao reakcija na vakcinaciju primenom S19.

Procedura testiranja obavlja se u skladu sa uputstvom koje je dato u Odeljku B(2) Poglavlja 2.4.3 Priručnika Međunarodne organizacije za zaštitu zdravlja životinja (OIE) za dijagnostičke testove i vakcine za kopnene životinje, šesto izdanje, 2008.

IV MERE ZA SPREČAVANJE ŠIRENJA, SUZBIJANJA I ISKORENJIVANJA BRUCELOZE GOVEDA

Član 6

Slučaj pojave bolesti bruceloza goveda jeste pojava bolesti kod jedne ili više životinja u stadu, koja je službeno potvrđena.

Obolelim od bruceloze smatra se govedo koje je dalo pozitivnu reakciju na najmanje dva propisana serološka testa i kod kojeg je mikrobiološkim ispitivanjem odgovarajućih uzoraka potvrđena bruceloza.

Serološka i mikrobiološka ispitivanja iz stava 2. ovog člana sprovode se u skladu sa poslednjim izdanjem OIE *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*.

Član 7

Kada je bruceloza goveda u stadu službeno potvrđena veterinarski inspektor pored mera iz člana 4. ovog pravilnika nalaže i mere za sprečavanje širenja i suzbijanja bolesti na zaraženom gazdinstvu, i to:

- 1) izdvajanje i izolacija goveda kod kojih je bruceloza službeno potvrđena i koja su bila u kontaktu sa zaraženim govedima;
- 2) ubijanje obolelih goveda i neškodljivo uklanjanje leševa pod nadzorom veterinarskog inspektora najkasnije u roku od sedam dana;
- 3) dijagnostičko ispitivanje na brucelozu svih prijemčivih životinja na gazdinstvu bez odlaganja;
- 4) zabrana upotrebe mleka svih obolelih krava iz zaraženog stada;
- 5) hitno neškodljivo uklanjanje i uništavanje pobačenih fetusa, mrtvorodne teladi, teladi uginule od bruceloze posle telenja, kao i placenti, osim ako bi ih prethodno trebalo dijagnostički ispitati;
- 6) dezinfekcija i neškodljivo uklanjanje slame, stajnjaka i gornjih slojeva zemlje, kao i drugih predmeta koji su došli u kontakt sa zaraženom životinjom, placentom ili drugim zaraženim materijalom;
- 7) pakovanje ili dezinfekcija i odlaganje stajnjaka iz zaraženih objekata na mesto do koga životinje ne mogu doći, dezinfekcija tečnog izmeta (osoke) obolelih životinja i zabrana korišćenja stajnjaka za đubrenje obradivih površina najmanje tri nedelje.

Veterinarski inspektor može odobriti klanje prethodno kastriраних goveda sa gazdinstva, ako su iz stada izdvojene životinje obolele od bruceloze goveda.

Član 8

Posle uklanjanja obolelih goveda sa gazdinstva, a pre uvođenja novih životinja u stado, oprema i predmeti koji su korišćeni u radu sa životinjama čiste se, peru i dezinfikuju pod nadzorom veterinarskog inspektora.

Ponovno korišćenje pašnjaka na kojima su boravile obolele životinje dozvoljeno je 60 dana pošto su ih obolele životinje napustile. Izuzetno, dozvoljeno je korišćenje pašnjaka za kastrirane životinje 30 dana pošto su ih napustile obolele životinje pod uslovom da se ove životinje sa pašnjaka upućuju direktno na klanje ili se premeštaju u objekte za tov iz kojih se upućuju direktno na klanje.

Mesto na kome je obavljen utovar obolelih životinja, prevozna sredstva i oprema koja je bila u kontaktu sa obolelim životinjama ili materijalom koji potiče od obolelih životinja ili sa kojim su iste bile u kontaktu čisti se, pere i dezinfikuju posle upotrebe, utovara i prevoza obolelih životinja.

Vrsta i koncentracija dezinfekcionih sredstava mora biti u skladu sa posebnim propisima.

Član 9

Posle uklanjanja obolelih životinja i sprovedenih mera iz čl. 7. i 8. ovog pravilnika sprovodi se testiranje goveda na brucelozu u stadu propisanim testovima, kako bi se potvrdilo da je bolest iskorenjena.

Nove životinje za priplod ne uvode se u stado sve dok preostale životinje u stadu namenjene za priplod starije od 12 meseci ne daju negativnu reakciju na jedan ili dva propisana serološka testa na brucelozu.

Član 10

Smatra se da je prestala bolest bruceloza goveda u dvorištu posle uspešnog sprovođenja svih mera iz čl. 7, 8. i 9. ovog pravilnika i obavljenih propisanih dijagnostičkih ispitivanja.

Član 11

Veterinarski inspektor sprovodi mere kontrole u stadima goveda u kojima je bruceloza iskorenjena kako bi se sprečilo ponovno zaražavanje goveda iz drugih izvora zaraze i vrši nadzor nad svakim uvođenjem goveda u stado i premeštanjem goveda unutar stada, koje je uključeno u program iskorenjivanja bruceloze.

Član 12

Goveda kod kojih je potvrđena bruceloza ne leče se.

Goveda se ne vakcinišu protiv bruceloze.

V ISPITIVANJE STADA GOVEDA RAZLIČITOG STATUSA

Član 13

Službeno serološko ispitivanje sprovodi se u stadima tipa B1 i B2 sve dok ta stada ne postanu stada tipa B3 i B4.

Član 14

Sve ženske životinje i svi bikovi iz stada tipa B1 uvode se u stado tipa B2 ako su:

1) starije od 12 meseci i službeno serološki ispitane u roku od 30 dana pre stavljanja u promet, što se potvrđuje uverenjem o zdravstvenom stanju i mestu porekla životinje (u daljem tekstu: uverenje);

2) do dolaska u stado izolovane najmanje 60 dana i ako su starije od 12 meseci ispitane serološki pre mešanja sa drugim životinjama.

Sve ženske životinje i svi bikovi se iz stada tipa B2 uvode u drugo stado tipa B2 ako:

1) su starije od 12 meseci i službeno serološki ispitane u roku od 30 dana pre stavljanja u promet, što se potvrđuje uverenjem;

2) tokom transporta ne dolaze u kontakt sa životinjama iz stada nižeg zdravstvenog statusa.

Premeštanje životinja iz stada B3 i B4 sprovodi se na osnovu dijagnostičkog ispitivanja na brucelozu i određivanja statusa stada slobodno i službeno slobodno od bruceloze goveda, u skladu sa ovim pravilnikom.

Član 15

Mere kontrole iz člana 11. ovog pravilnika primenjuju se i na stada slobodna od bruceloze i stada službeno slobodna od bruceloze goveda.

VI NAČIN UTVRĐIVANJA STATUSA GAZDINSTVA SLOBODNOG OD BRUCELOZE GOVEDA

Član 16

Status gazdinstva slobodno od bruceloze goveda stiče se ako se utvrdi da je stado službeno slobodno od bruceloze goveda.

Određivanje statusa goveda odnosi se na sva goveda sa izuzetkom muških životinja za tov, pod uslovom da dolaze iz stada službeno slobodno od bruceloze, da se muške životinje za tov neće koristiti za priplod i da će se slati direktno na klanje.

Član 17

Stado je službeno slobodno od bruceloze goveda ako:

1) nijedno govedo nije imalo kliničke simptome bruceloze najmanje poslednjih šest meseci;

2) u njemu nema goveda koja su vakcinisana protiv bruceloze;

3) testovi kojima su podvrgnuta sva goveda u stadu koja su starija od 12 meseci pokažu negativne rezultate, u skladu sa članom 5. ovog pravilnika, i to:

- dva serološka ispitivanja obavljena u razmaku dužem od tri, a kraćem od 12 meseci;

- tri testa na uzorcima mleka obavljena u razmaku od tri meseca, a zatim u periodu od najmanje šest nedelja serološki test;

4) govedo koje se uvodi u stado potiče iz stada službeno slobodno od bruceloze i ako je test aglutinacije kod goveda starijih od 12 meseci pokazao titar na brucelu manji od 30 IJ/ml ili ako je bilo koji drugi test odobren od nadležnog organa rađen 30 dana pre ili 30 dana posle uvođenja nove životinje u stado pokazao negativan rezultat.

U slučaju iz tačke 4) ovog člana životinje moraju biti fizički izolovane od drugih životinja u stadu dok se ne dokaže da su negativne na brucelozu.

Član 18

Govedo zadržava status stada službeno slobodno od bruceloze goveda ako:

1) se jedan od sledećih testova u skladu sa članom 5. ovog pravilnika obavlja jednom godišnje sa negativnim rezultatom, i to:

- tri mlečno prstenaste probe u razmacima od najmanje tri meseca;
- tri ELISA testa na mleku u razmacima od najmanje tri meseca;
- dve mlečno prstenaste probe na mleku u razmaku od najmanje tri meseca, a nakon najmanje šest nedelja propisani serološki test;
- dva ELISA testa na mleku u razmaku od najmanje tri meseca, a nakon najmanje šest nedelja propisani serološki test;
- dva serološka testa u razmaku ne kraćem od tri meseca i ne dužem od 12 meseci;
- ministarstvo nadležno za poslove veterinarstva na teritoriji zemlje ili jednog njenog dela koja nije službeno slobodna od bruceloze, ali gde su sva stada goveda podvrgnuta službenom programu suzbijanja bruceloze promeni učestalost rutinskih testiranja na sledeći način:
 - kada je raširenost bolesti do 1% od ukupnog broja goveda u stadu potrebno je dva puta godišnje uraditi mlečno prstenaste probe ili ELISA test na uzorku mleka u razmaku od najmanje tri meseca ili jedan propisani serološki test;
 - kada je najmanje 99,8% goveda u stadu službeno slobodno od bruceloze tokom najmanje četiri godine razmak između testiranja može se produžiti na dve godine ukoliko su sve životinje starije od 12 meseci testirane ili se testiranje može ograničiti na životinje starije od 24 meseca, ukoliko se stado kontinuirano testira svake godine. Kontrola se obavlja propisanim serološkim testovima;

2) govedo koje se uvodi u stado potiče iz stada službeno slobodno od bruceloze i ako je test aglutinacije kod goveda starijih od 12 meseci pokazao titar na brucelu manji od 30 IU/ml ili ako je bilo koji drugi test odobren od nadležnog organa rađen 30 dana pre ili 30 dana posle uvođenja nove životinje u stado pokazao negativan rezultat.

U slučaju iz tačke 2) ovog člana životinje moraju da budu fizički izolovane od drugih životinja u stadu dok se ne dokaže da su negativne na brucelu.

Kada procenat stada zaražen brucelom ne prelazi 0,2% u području tokom najmanje dve godine i kada životinje potiču iz stada službeno slobodno od bruceloze goveda koje tokom transporta nisu došle u kontakt sa životinjama nižeg zdravstvenog statusa ne rade se testovi iz tačke 2) ovog člana.

Član 19

Status stada službeno slobodno od bruceloze može se suspendovati ili ukinuti, ako:

- 1) više nisu ispunjeni uslovi iz čl. 16. i 17. ovog pravilnika;
- 2) je jedna ili više životinja sumnjiva na brucelozu goveda i ako su sumnjive životinje zaklane ili izolovane tako da je onemogućen svaki direktan ili indirektan kontakt sa drugim životinjama.

U slučaju da su životinje zaklane suspenzija se može povući ako dva testa serumske aglutinacije sprovedena u skladu sa članom 5. ovog pravilnika kod svih goveda starijih od 12 meseci pokažu titar antitela manji od 30 IJ/ml. Prvi test se obavlja najmanje 30 dana posle uklanjanja životinja iz stada, a drugi 60 dana posle toga.

U slučaju da su životinje izolovane od drugih životinja u stadu one se mogu ponovo uvesti u stado i status stada se može obnoviti:

- 1) posle testa serumske aglutinacije koji je pokazao titar antitela manji od 30 IJ/ml i dobijanja negativnog rezultata testa vezivanja komplementa;
- 2) posle dobijanja negativnog rezultata na bilo koje kombinacije testova odobrene u tu svrhu od strane nadležnog organa.

Status stada službeno slobodan od bruceloze goveda ukinuće se ako rezultati laboratorijskih testova ili epizootioloških istraživanja potvrde prisustvo brucele u stadu.

Status stada se neće obnoviti sve dok se sva preostala goveda koja su bila prisutna u stadu za vreme izbijanja bolesti ne zakolju ili dok se stado ne podvrgne kontrolnom testiranju i ako sve životinje starije od 12 meseci ne pokažu negativan rezultat na dva uzastopna testa u razmaku od 60 dana, pri čemu se prvo testiranje obavlja najmanje 30 dana posle uklanjanja pozitivnih životinja.

U slučaju goveda koja su u vreme izbijanja bolesti bila gravidna završna kontrola se sprovodi najmanje 21 dan pošto se poslednja gravidna životinja oteli.

Član 20

Stado goveda je slobodno od bruceloze ako ispunjava uslove iz člana 16. stav 1. tač. 1) i 2) ovog pravilnika.

Član 21

Status stada slobodan od bruceloze zadržava se ako:

- 1) su goveda podvrgnuta jednom od režima testiranja iz člana 17. stav 1. tačka 1) ovog pravilnika;
- 2) su goveda koja se uvode u stado ispunjavala uslove iz člana 17. stav 1. tačka 2) ovog pravilnika ili potiču iz stada slobodno od bruceloze pri čemu kod životinja starijih od 12 meseci, 30 dana pre ili u izolaciji posle uvođenja u stado test aglutinacije pokazuje titar manji od 30 IJ/ml i imaju negativan rezultat testa vezivanja komplementa, u skladu sa članom 5. ovog pravilnika.

Član 22

Status stada slobodno od bruceloze može se ukinuti ako:

- 1) više nisu ispunjeni uslovi iz čl. 19. i 20. ovog pravilnika;
- 2) se na osnovu rezultata laboratorijskih testova ili epizootioloških istraživanja posumnja da jedna ili više životinja starija od 30 meseci ima brucelozu, a sumnjive životinje su zaklane ili izolovane kako bi se sprečio direktan ili indirektan kontakt sa drugim životinjama.

U slučaju da su životinje zaklane suspenzija se može povući ako dva testa serumske aglutinacije sprovedena u skladu sa članom 5. ovog pravilnika kod svih goveda starijih od 12 meseci pokažu titar antitela manji od 30 IJ/ml. Prvi test se obavlja najmanje 30 dana posle uklanjanja životinja iz stada, a drugi 60 dana posle toga.

U slučaju kada su životinje izolovane od drugih životinja u stadu mogu se ponovo uvesti u stado i status stada se može obnoviti ako naknadni titar serumske aglutinacije bude niži od 30 IJ/ml i ako rezultat testa vezivanja komplementa bude negativan ili ako rezultat drugog testa odobrenog u tu svrhu od strane nadležnog organa bude negativan.

Status stada slobodno od bruceloze povući će se ako rezultati laboratorijskih testova ili epizootioloških istraživanja potvrde prisustvo brucele u stadu.

Status stada se neće obnoviti sve dok se sva preostala goveda koja su bila prisutna u stadu za vreme izbijanja bolesti ne zakolju ili dok se stado ne podvrgne kontrolnom testiranju i sve životinje starije od 12 meseci ne pokažu negativan rezultat na dva uzastopna testa u razmaku od 60 dana pri čemu se prvo testiranje obavlja najmanje 30 dana posle uklanjanja pozitivnih životinja.

U slučaju goveda koja su u vreme izbijanja bolesti bila gravidna završna kontrola se sprovodi najmanje 21 dan pošto se poslednja gravidna životinja oteli.

VII PRELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Član 23

Danom stupanja na snagu ovog pravilnika prestaju da važe odredbe Pravilnika o načinu sprovođenja mera za suzbijanje i iskorenjivanje bruceloze goveda, ovaca, koza, svinja i pasa ("Službeni glasnik RS", broj 36/05) u delu koji se odnosi na goveda.

Član 24

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku Republike Srbije", s tim što se odredbe čl. 13-22. primenjuju od 1. januara 2010. godine.