

KOMISSION PÄÄTÖS,
tehty 10 päivänä joulukuuta 2008,
neuvoston direktiivin 64/432/ETY liitteen C ja päätöksen 2004/226/EY muuttamisesta nautojen
luomistaudin diagnostisten testien osalta

(tiedoksiannettu numerolla K(2008) 7642)

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

(2008/984/EY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon eläinten terveyteen liittyvistä ongelmista yhteisön sisäisessä nautaeläinten ja sikojen kaupassa 26 päivänä kesäkuuta 1964 annetun neuvoston direktiivin 64/432/ETY⁽¹⁾ ja erityisesti sen 6 artiklan 2 kohdan b alakohdan ja 16 artiklan 1 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Direktiivin 64/432/ETY liitteessä C vahvistetaan diagnostiset menetelmät nautan luomistaudin määrittämiseksi, joita on käytettävä kyseisen taudin valvonnassa ja hävittämisessä, tarkastuksessa ja seurannassa sekä luomistaudista virallisesti vapaan karjan aseman vahvistamisessa ja ylläpitämisessä sekä yhteisön sisäisessä nautaeläinten kaupassa vaadittavassa sertifiointissa.
- (2) Testien hyväksymisestä nautojen luomistaudin vasta-ainesten havaitsemiseksi neuvoston direktiivin 64/432/ETY mukaisesti 4 päivänä maaliskuuta 2004 tehdystä komission päätöksessä 2004/226/EY⁽²⁾ hyväksytään tietyt luomistautia koskevat testit, joita voidaan käyttää pakollisen seroagglutinaatiotestin (SAT) vaihtoehtona direktiivin 64/432/ETY 6 artiklan 2 kohdan b alakohdan mukaisessa nautaeläinten sertifiointissa.
- (3) Fluoresenssipolarisaatiomääritys (FPA-testi) on uusi diagnostinen testi, joka on sisällytetty Maailman eläintautijärjestön OIE:n laatiman maaeläinten diagnostisia testejä ja rokotteita koskevan käsikirjan Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6 painos, 2008, luvussa 2.4.3 (nautan luomistauti) vahvistettuihin kansainvälisessä kaupassa käytettäviin testeihin.
- (4) Komissio pyysi Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaiselta (EFSA) tieteellisen lausunnon siitä, soveltuuko FPA-testi direktiivin 64/432/ETY liitteeseen C lisättäväksi.
- (5) Lisäksi komissio pyysi Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaiselta arvioimaan, soveltuvatko FPA-testi sekä päätöksen 2004/226/EY 1 artiklassa luetellut testit yhteisön sisäistä kauppaa varten suoritettavaan nautaeläinten sertifiointiin.
- (6) Eläinten terveyttä ja hyvinvointia käsittelevä lautakunta antoi 11 päivänä joulukuuta 2006 nautojen luomistaudin diagnostisista menetelmistä tieteellisen lausunnon⁽³⁾, jossa se totesi, että direktiivin 64/432/ETY liitteessä C olevat nautan luomistaudin määrittämisen diagnostiset testit soveltuvat edelleen, SAT-testiä lukuun ottamatta, vakiotesteiksi yhteisön sisäistä kauppaa varten suoritettavaan yksittäisten nautaeläinten sertifiointiin.
- (7) Koska SAT-testi on kuitenkin direktiivin 64/432/ETY 6 artiklan 2 kohdan b alakohdassa suoraan säädetty karjan kauppaan siirtämistä edeltäväksi testiksi, kyseisen direktiivin liitteessä C on oltava sitä koskeva tekninen eritelmä.
- (8) Lisäksi 11 päivänä joulukuuta 2006 annetussa tieteellisessä lausunnossa todettiin, että FPA-testin herkkyys ja spesifisyys ovat verrattavissa direktiivin 64/432/ETY liitteessä C oleviin testeihin ja että se soveltuu lisättäväksi kyseiseen liitteeseen näiden eläinten luomistaudin diagnosoimissa yhteisön sisäistä kauppaa varten käytettäväksi vakiotestiksi.
- (9) OIE:n laatiman maaeläinten diagnostisia testejä ja rokotteita koskevan käsikirjan, 6. painos, 2008, luvussa 2.4.3 olevan 1 jakson d kohdassa esitetyt äskettäin kehitetyt polymeerasiketjureaktiomenetelmät tarjoavat lisämenetelmiä *Brucella* spp:n toteamiseksi ja tunnistamiseksi, ja ne olisi sen vuoksi lisättävä direktiivin 64/432/ETY liitteeseen C.
- (10) Sen vuoksi direktiivin 64/432/ETY liitettä C ja päätöstä 2004/226/EY olisi muutettava.
- (11) Tässä päätöksessä säädetyt toimenpiteet ovat elintarviketurvallisuusviranomaiselta (EFSA) tieteellisen lausunnon mukaiset, ja ne olisi suoritettava yhteisön sisäistä kauppaa varten suoritettavaan yksittäisten nautaeläinten sertifiointiin.

⁽¹⁾ EYVL 121, 29.7.1964, s. 1977/64.

⁽²⁾ EUVL L 68, 6.3.2004, s. 36.

⁽³⁾ http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620727231.htm

ON TEHNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

Muutetaan direktiivin 64/432/ETY liite C tämän päätöksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

Korvataan päätöksen 2004/226/EY 1 artikla seuraavasti:

"1 artikla

Hyväksytään sertifiointitarkoituksiin direktiivin 64/432/ETY liitteen C säännösten mukaisesti suoritettut komplementinsi-

toutumistesti, puskuroidut *Brucella*-antigeenitestit (Rose Bengal -testi, RTB), ELISA-testit ja fluoresenssi-polarisaatiomääritys (FPA-testi)."

3 artikla

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 10 päivänä joulukuuta 2008.

Komission puolesta
Androulla VASSILIOU
Komission jäsen

LIITE

1. Korvataan direktiivin 64/432/ETY liitteessä C oleva 1, 2 ja 3 kohta seuraavasti:

"LIITE C

LUOMISTAUTI

1. TAUDINAIHEUTTAJAN TUNNISTAMINEN

Jos abortoituneessa kudoksessa, vaginaeritteessä tai maidossa osoitetaan muunnellulla haponkestävällä tai immunospesifisellä värjäyksellä *Brucella*-muotoisia organismeja, se on todennäköisesti osoitus luomistaudista, erityisesti jos tätä tukevat serologiset testit. Polymeerasiketjureaktiomenetelmät (PCR) tarjoavat lisämenetelmiä organismien toteamiseksi.

Brucella spp. olisi eristettävä aina kun se on mahdollista viljelemällä sitä selektiivisiä tai yleiselatusaineita käyttämällä kohtueritteestä, abortoituneista alkioista, utare-eritteistä tai valituista kudoksista, kuten imusolmukkeista sekä urosten ja naaraiden sukupuolielimistä.

Eristyksen jälkeen laji ja biovar on tunnistettava faagilyysitestillä ja/tai oksidatiivisen metabolian testeillä sekä viljelyominaisuuksiin liittyvillä, biokemiallisilla ja serologisilla perusteilla. Polymeerasiketjureaktiomenetelmää voidaan käyttää sekä täydentävänä että biotyypitysmenetelmänä, joka perustuu erityisiin genomisekvensseihin.

Käytetyn tekniikan ja käytettyjen elatusaineiden, niiden standardoinnin ja tulosten tulkinnan on oltava OIE:n laatiman maaeläinten diagnostisia testejä ja rokotteita koskevan käsikirjan *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6. painos, 2008, 2.4.3 luvun (naudan luomistauti), 2.7.2 luvun (vuohien ja lampaiden luomistauti) ja 2.8.5 luvun (sikojen luomistauti) mukaisia.

2. IMMUNOLOGISET TESTIT

2.1 Standardit

2.1.1 *Brucella abortus* biovar 1 -bakteerin Weybridge-kantaa nro 99 tai USDA-kantaa 1119-3 on käytettävä kaikkien antigeenien valmistuksessa, joita käytetään Rose Bengal -testissä (RBT), seroagglutinaatiotestissä (SAT), komplementinsitoutumis-testissä (CFT) ja ABR-maitotestissä (MRT).

2.1.2 RBT-, SAT-, CFT- ja MRT-testien standardireferenssiseerumi on OIE:n kansainvälinen standardireferenssiseerumi (OIEISS), jota aiemmin kutsuttiin WHO:n toiseksi kansainväliseksi anti-*Brucella abortus* -seerumiksi (second international anti-*Brucella abortus* Serum eli ISAbS).

2.1.3 Entsyymi-immunologisten määritysten (ELISA-testien) standardireferenssiseerumit ovat:

— OIEISS,

— heikko positiivinen OIE:n ELISA-standardiseerumi (OIEELISA_{WPSS}),

— vahva positiivinen OIE:n ELISA-standardiseerumi (OIEELISA_{SPSS}),

— negatiivinen OIE:n ELISA-standardiseerumi (OIEELISA_{NSS}).

2.1.4 Fluoresenssipolarisaatiomääritysten (FPA-testien) standardireferenssiseerumit ovat:

— heikko positiivinen OIE:n ELISA-standardiseerumi (OIEELISA_{WPSS}),

— vahva positiivinen OIE:n ELISA-standardiseerumi (OIEELISA_{SPSS}),

— negatiivinen OIE:n ELISA-standardiseerumi (OIEELISA_{NSS}).

2.1.5 Edellä 2.1.3 ja 2.1.4 kohdassa lueteltuja standardiseerumeja toimittaa yhteisön vertailulaboratorio luomistautia varten tai eläinlääketieteen laboratorio Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Yhdistynyt kuningaskunta.

- 2.1.6 OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{SP}SS ja OIEELISA_NSS ovat kansainvälisiä ensisijaisia standardeja, joista jokaisessa jäsenvaltiossa on kehitettävä kullekin 2.1.1 kohdassa tarkoitetulle testille standardoidut toissijaiset kansalliset referenssiseerumit ('käyttöstandardit').
- 2.2 **Entsyymi-immunologiset määrytykset (ELISA-testit) tai muut sitoutumismäärytykset (binding assay) naudan luomistaudin osoittamiseksi seerumista tai maidosta**
- 2.2.1 *Tarvikkeet ja reagenssit*
- Käytetty tekniikka ja tulosten tulkinta on validoitava OIE:n laatiman maaeläinten diagnostisia testejä ja rokotteita koskevan käsikirjan Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6. painos, 2008, 1.1.4 luvussa vahvistettujen periaatteiden mukaisesti, ja validointiin on sisällyttävä vähintään laboratorio- ja diagnostiikkatutkimukset.
- 2.2.2 *Testin standardisointi*
- 2.2.2.1 Yksittäisiä seeruminäytteitä koskevan testimenettelyn standardisointi:
- negatiiviseen seerumiin (tai negatiiviseen yhdistelmäseerumiin) tehdyn OIEISS:n esilaimennoksen (1:150) ⁽¹⁾ tai OIEELISA_{WP}SS:n esilaimennoksen (1:2) tai OIEELISA_{SP}SS:n esilaimennoksen (1:16) on annettava positiivinen tulos;
 - negatiiviseen seerumiin (tai negatiiviseen yhdistelmäseerumiin) tehdyn OIEISS:n esilaimennoksen (1:600) tai OIEELISA_{WP}SS:n esilaimennoksen (1:8) tai OIEELISA_{SP}SS:n esilaimennoksen (1:64) on annettava negatiivinen tulos;
 - OIEELISA_NSS:n on aina annettava negatiivinen tulos.
- 2.2.2.2 Yhdistettyjä seeruminäytteitä koskevan testimenettelyn standardisointi:
- negatiiviseen seerumiin (tai negatiiviseen yhdistelmäseerumiin) tehdyn OIEISS:n esilaimennoksen (1:150) tai OIEELISA_{WP}SS:n esilaimennoksen (1:2) tai OIEELISA_{SP}SS:n esilaimennoksen (1:16), joka on edelleen laimennettu negatiivisella seerumilla niin moninkertaisesti kuin yhdistelmäseerumissa on seeruminäytteitä, on annettava positiivinen tulos;
 - OIEELISA_NSS:n on aina annettava negatiivinen tulos;
 - testin on oltava riittävä osoittamaan infektio yksittäisessä eläimessä, joka on eläinryhmässä, josta seeruminäytteet on yhdistetty.
- 2.2.2.3 Yhdistettyjä maito- tai heranäytteitä koskevan testimenettelyn standardisointi:
- negatiiviseen seerumiin (tai negatiiviseen yhdistelmäseerumiin) tehdyn OIEISS:n esilaimennoksen (1:1 000) tai OIEELISA_{WP}SS:n esilaimennoksen (1:16) tai OIEELISA_{SP}SS:n esilaimennoksen (1:125), joka on uudelleen laimennettu negatiivisessa maidossa (1:10), on annettava positiivinen tulos;
 - OIEELISA_NSS:n negatiiviseen maitoon (1:10) laimennettuna on aina annettava negatiivinen tulos;
 - testin on oltava riittävä osoittamaan infektio yksittäisessä eläimessä, joka on eläinryhmässä, josta maito- tai heranäytteet on yhdistetty.
- 2.2.3 *Naudan luomistaudin määrittämiseen käytettävien ELISA-testien käyttöedellytykset:*
- 2.2.3.1 Kun seeruminäytteille tehtävät ELISA-testit kalibroidaan 2.2.2.1 ja 2.2.2.2 kohdassa vahvistetulla tavalla, ELISA-testin diagnostisen herkkyuden on oltava vähintään sama kuin RBT- tai CFT-testissä ottaen huomioon epidemiologinen tilanne, jossa testiä käytetään.
- 2.2.3.2 Kun yhdistetyille maitonäytteille tehtävät ELISA-testit kalibroidaan 2.2.2.3 kohdassa vahvistetulla tavalla, ELISA-testin diagnostisen herkkyuden on oltava vähintään sama kuin MRT-testissä ottaen epidemiologisen tilanteen lisäksi huomioon keskimääräiset ja ennakoituvat äärimmäiset kotieläintaloustilastukset.
- 2.2.3.3 Jos ELISA-testejä käytetään sertifiointitarkoituksiin 6 artiklan 1 kohdan mukaisesti tai karjan tautitilanteen toteamiseen ja ylläpitämiseen liitteessä A olevan II kohdan 10 alakohdan mukaisesti, seeruminäytteet on yhdistettävä siten, että kiistatta tiedetään, mitkä eläimet kuuluvat ryhmään, jota testitulos koskee. Varmentavat testit on tehtävä yksittäisistä eläimistä otetuilla seeruminäytteillä.

⁽¹⁾ Tässä liitteessä nestemäisten reagenssien tekemiseksi käytettävät laimennokset ilmaistaan esimerkiksi 1:150, mikä tarkoittaa suhteessa 1:150 tehtyä laimennosta.

2.2.3.4 ELISA-testejä voidaan käyttää sellaisen maitonäytteen tutkimiseen, joka on otettu tilalta, jonka lehmistä ainakin 30 prosenttia on lypsäviä. Kyseistä menetelmää käytettäessä on varmistettava, että kiistatta tiedetään, mitä niistä eläimistä, joista maito on peräisin, kukin testitulos koskee. Varmentavat testit on tehtävä yksittäisistä eläimistä otetuilla seeruminäytteillä.

2.3 Komplementinsitoutumistesti (CTF)

2.3.1 Antigeenina on bakteerisuspensio fenoli-keittosuolaliuoksessa (NaCl 0,85 % (m/v) ja fenoli 0,5 % (v/v)) tai veronaalipuskurissa. Antigeenit voidaan toimittaa tiivisteinä, jos käytettävä laimennuskerroin ilmenee pullon etiketistä. Antigeeni on säilytettävä 4 °C:ssa eikä se saa jäättyä.

2.3.2 Seerumit on inaktivoitava seuraavasti:

— naudan seerumi: 56–60 °C, 30–50 minuuttia,

— sian seerumi: 60 °C, 30–50 minuuttia.

2.3.3 Jotta testissä saadaan todenmukainen reaktio, on käytettävä komplementtiannosta, joka on suurempi kuin täydelliseen hemolyysiin vaadittava vähimmäismäärä.

2.3.4 Komplementinsitoutumistestiä suoritettaessa on joka kerta käytettävä seuraavia kontrolleja:

- a) seerumin antikomplementaarisen vaikutuksen kontrolli;
- b) antigeenikontrolli;
- c) herkistettyjen punasolujen kontrolli;
- d) komplementtikontrolli;
- e) positiivista seerumia käyttäen tehtävä kontrolli reaktion alkuhetkellä vallitsevasta herkkydestä;
- f) negatiivista seerumia käyttäen tehtävä reaktion spesifisyyskontrolli.

2.3.5 Tulosten laskeminen

OIEISS sisältää 1 000 kansainvälistä CFT-yksikköä (ICFTU) millilitrassa. Kun OIEISS testataan tietyllä menetelmällä, tulos annetaan titterinä (eli OIEISS:n suora laimennus, josta saadaan 50-prosenttinen hemolyysi, T_{OIEISS}). Titterinä ($T_{\text{TESTSERUM}}$) ilmoitettu testiseerumin testitulos on ilmaistava yksikköinä ICFTU/ml. Titteri on siis muutettava ICFTU-yksiköksi. Kerroin (F), joka tarvitaan kyseisellä menetelmällä testatun tuntemattoman testiseerumin titterin ($T_{\text{TESTISEERUMI}}$) muuttamiseksi ICFTU-yksiköiksi, saadaan seuraavasta yhtälöstä:

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

ja kansainvälisten CFT-yksiköiden pitoisuus millilitrassa testiseerumia (ICFTU_{TESTSERUM}) yhtälöstä:

$$\text{ICFTU}_{\text{TESTISEERUMI}} = F \times T_{\text{TESTISEERUMI}}$$

2.3.6 Tulosten tulkitseminen

Vähintään 20 ICFTU-yksikköä millilitrassa sisältävää seerumia on pidettävä positiivisena.

2.4 ABR-maitotesti (MRT)

2.4.1 Antigeenina on hematoksyliinillä värjätty bakteerisuspensio fenoli-keittosuolaliuoksessa (NaCl 0,85 % (m/v) ja fenoli 0,5 % (v/v)). Antigeeni on säilytettävä 4 °C:ssa eikä se saa jäättyä.

2.4.2 Antigeenin herkkyys on standardisoitava OIEISS:aa vastaan siten, että antigeeni tuottaa positiivisen reaktion, kun OIEISS laimennetaan 1:500 negatiiviseen maitoon. Laimennoksen 1:1 000 on oltava negatiivinen.

- 2.4.3. ABR-tutkimus on tehtävä kunkin maitotonkan sisällöstä tai kunkin tilatankin sisällöstä.
- 2.4.4. Maitonäytteet eivät saa jäätyä, kuumeta tai olla alttiina kovalle tärinälle.
- 2.4.5. Reaktio on suoritettava jollakin seuraavista menetelmistä:
- maitopatsaassa, jonka korkeus on vähintään 25 mm ja tilavuus 1 ml ja johon on lisätty 0,03 ml tai 0,05 ml yhtä standardoitua ja värjättyä antigeenia,
 - maitopatsaassa, jonka korkeus on vähintään 25 mm ja tilavuus 2 ml ja johon on lisätty 0,05 ml yhtä standardoitua ja värjättyä antigeenia,
 - 8 ml:n erässä maitoa, johon on lisätty 0,08 ml yhtä standardoitua ja värjättyä antigeenia.
- 2.4.6. Maidon ja antigeenin seosta on inkuboitava 37 °C:ssa 60 minuutin ajan yhdessä positiivisten ja negatiivisten käyttöstandardien kanssa. Jos seosta inkuboidaan vielä 16–24 tuntia 4 °C:ssa, testin herkkyys kasvaa.
- 2.4.7. Tulosten tulkinta:
- a) negatiivinen tulos: värjäytynyt maito, väritön kerma;
 - b) positiivinen tulos:
 - maito ja kerma värjäytyneet samalla tavalla, tai
 - väritön maito ja värjäytynyt kerma.
- 2.5. **Puskuroitu brusella-antigeenitesti (Rose Bengal -levytesti, RTB)**
- 2.5.1. Antigeenina on Rose-Bengal-värillä värjätty bakteerisuspensio puskuroidussa brusella-antigeenilaimennusliuoksessa, jonka pH on $3,65 \pm 0,05$. Antigeeni toimitetaan käyttövalmiina, se on säilytettävä 4 °C:ssa eikä se saa jäätyä.
- 2.5.2. Antigeenia valmistettaessa ei tarvitse kiinnittää huomiota solukonsentraatioon, mutta sen herkkyys on standardisoitava OIEISS:a vastaan niin, että antigeeni tuottaa positiivisen tuloksen seerumilaimennuksella 1:45 ja negatiivisen tuloksen laimennuksella 1:55.
- 2.5.3. RBT-testi on tehtävä seuraavalla tavalla:
- a) seerumi (20–30 µl) sekoitetaan samaan määrään antigeeniä valkoisella kaakelilaatalla tai emalilevyllä siten, että seos muodostaa halkaisijaltaan noin 2 senttimetrin täplän. Seosta heilutellaan varovasti 4 minuuttia huoneenlämmössä, minkä jälkeen sitä tarkastellaan hyvässä valossa agglutinaation havaitsemiseksi;
 - b) automaattista menetelmää voidaan käyttää, mutta sen on oltava ainakin yhtä herkkä ja tarkka kuin manuaalinen menetelmä.
- 2.5.4. *Tulosten tulkitseminen*
- Kaikkia näkyviä reaktioita pidetään positiivisina, ellei kuivuminen reunoilla ole liiallista.
- Jokaiseen testisarjaan on sisällytettävä positiiviset ja negatiiviset käyttöstandardit.
- 2.6. **Seroagglutinaatiotesti (SAT)**
- 2.6.1. Antigeenina on bakteerisuspensio fenoli-keittosuolaliuoksessa (NaCl 0,85 % (m/v) ja fenoli 0,5 % (v/v)).
- Formaldehydiä ei saa käyttää.
- Antigeenit voidaan toimittaa tiivisteinä, jos käytettävä laimennuskerroin ilmenee pullon etiketistä.
- Antigeenisuspensioon voidaan lisätä EDTA:ta siten, että loppukonsentraatio testilaimennuksessa on 5 mM, jotta väriin positiivisten määrää seroagglutinaatiotestissä voidaan vähentää. Sen jälkeen tarkistetaan, että pH on 7,2 antigeenisuspensiossa.

- 2.6.2 OIEISS sisältää 1 000 kansainvälistä agglutinaatioyksikköä.
- 2.6.3 Antigeenia valmistettaessa ei tarvitse kiinnittää huomiota solukonsentraatioon, mutta sen herkkyys on standardisoitava OIEISS:a vastaan niin, että antigeeni tuottaa joko 50 %:n agglutinaation, kun lopullinen seerumilaimennos on 1:600–1:1 000, tai 75 %:n agglutinaation, kun lopullinen seerumilaimennos on 1:500–1:750.

Saattaa olla suositeltavaa verrata uusien ja aiemmin standardisoitujen antigeenierien reaktiivisuutta käyttämällä tunnettujen seerumien paneelia.

- 2.6.4 Testi on suoritettava koeputkissa tai mikrotiiterilevyillä. Antigeenin ja seerumilaimennoksen seosta inkuboidaan 16–24 tuntia 37 °C:ssa.

Jokaisesta seerumista on valmistettava vähintään kolme laimennosta. Epäillyn seerumin laimennukset on suoritettava siten, että infektorajalla olevan reaktion arviointi tehdään keskimmaisessa putkessa (tai kuopassa, jos mikrotiiterilevyjä käytetään).

- 2.6.5 *Tulosten tulkinta:*

Seerumin *Brucella*-agglutinaatiotulos ilmoitetaan kansainvälinen yksiköin (IU) millilitraa kohti.

Vähintään 30 IU-yksikköä millilitrassa sisältävää seerumia pidetään positiivisena.

2.7 Fluoresenssipolarisaatiomääritys (FPA-testi)

- 2.7.1 Fluoresenssipolarisaatiomääritys voidaan suorittaa lasiputkessa tai 96-kuoppaisella mikrolevyllä. Käytetyt tekniikan, sen standardisoinnin ja tulosten tulkinnan on oltava OIE:n laatiman maaeläinten diagnostisia testejä ja rokotteita koskevan käsikirjan *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6 painos, 2008, luvun 2.4.3 (naudan luomistauti) mukaisia.

- 2.7.2 *Testin standardisointi*

FPA-testi on standardisoitava siten, että

- OIEELISA_{SpSS} ja OIEELISA_{WpSS} antavat systemaattisesti positiiviset tulokset;
- negatiiviseen seerumiin (tai negatiiviseen yhdistelmäseerumiin) tehty OIEELISA_{WpSS}:n esilaimennos (1:8) tai OIEELISA_{SpSS}:n esilaimennos (1:64) antaa aina negatiivisen tuloksen;
- OIEELISA_{NSS} antaa aina negatiivisen tuloksen.

Jokaiseen testierään on sisällytettävä seuraavaa: vahva positiivinen, heikko positiivinen, negatiivinen käyttöstandardiseerumi (kalibroitu OIE:n standardiseerumia vastaan).

3. TÄYDENTÄVÄT TESTIT

3.1 Luomistaudin ihotesti (BST)

3.1.1 *BST-testin käyttöedellytykset:*

- luomistaudin ihotestiä ei saa käyttää sertifiointitarkoituksissa yhteisön sisäisessä kaupassa;
- luomistaudin ihotesti on yksi spesifisimmistä testeistä luomistaudin osoittamiseksi rokottamattomissa eläimissä; diagnoosia ei kuitenkaan saa tehdä ainoastaan positiivisen nahansisäisen tuloksen perusteella;
- nautaeläimiä, jotka ovat antaneet negatiivisen tuloksen jossakin tässä liitteessä määritellyistä serologisista testeistä ja jotka reagoivat positiivisesti BST-testiin, pidetään tartunnan saaneina tai epäiltyinä tartunnan saaneina;
- nautaeläimille, jotka ovat antaneet positiivisen tuloksen jossakin tässä liitteessä määritellyistä serologisista testeistä, voidaan tehdä BST-testi serologisten testien tulosten tulkinnan tukemiseksi, erityisesti, jos luomistaudista virallisesti vapaassa tai luomistaudista vapaassa nautakarjassa ei voida sulkea pois ristireaktiota muiden bakteerien vasta-aineiden kanssa.

- 3.1.2 Testi on suoritettava käyttämällä standardisoitua ja määriteltyä bruselloosi-allergeenivalmistetta, joka ei sisällä sileää lipopolysakkaridiantigeenia, koska tämä voi aiheuttaa epäspesifisiä tulehdusreaktioita tai aiheuttaa sekaannusta myöhemmissä serologisissa testeissä.

Bruselliinin valmistusta koskevien vaatimusten on oltava OIE:n laatiman maaeläinten diagnostisia testejä ja rokotteita koskevan käsikirjan *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6. painos, 2008, 2.4.3 luvussa olevan C1 jakson mukaisia.

3.1.3 *Testimenetelmä*

- 3.1.3.1 0,1 ml bruselloosi-allergeenia on ruiskutettava nahansisäisesti hännän alla olevaan ihopoiimuun, eläimen kupeeseen tai kaulaan.

- 3.1.3.2 Tulokset on tarkastettava 48–72 tunnin kuluttua.

- 3.1.3.3 Ihon paksuus pistokohdassa on mitattava työntömitalla ennen ruiskeen antamista sekä tuloksia tarkasteltaessa.

- 3.1.3.4 Tulosten tulkinta:

Voimakkaat reaktiot tunnistaa helposti paikallisesta turvotuksesta ja kovettumisesta.

Jos ihon paksuuntuminen on 1,5–2 mm, BST-tulosta pidetään positiivisena.

3.2. **Kompetitiivinen entsyymi-immunologinen määrittäminen (cELISA)**

- 3.2.1 *cELISA-testin käyttöedellytykset*

cELISA-testiä ei saa käyttää sertifiointitarkoituksissa yhteisön sisäisessä kaupassa.

Nautaeläimille, jotka ovat antaneet positiivisen tuloksen jossakin tässä liitteessä määritellyistä muista serologisista testeistä, voidaan tehdä cELISA-testi muiden serologisten testien tulosten tulkinnan tukemiseksi; näin voidaan tehdä erityisesti, jos luomistaudista virallisesti vapaassa tai luomistaudista vapaassa nautakarjassa ei voida sulkea pois ristireaktiota muiden bakteerien vasta-aineiden kanssa tai jos tarkoituksena on eliminoida S19:llä rokottamisen reaktiona tuotetuista vasta-ainejäämistä johtuvat reaktiot.

3.2.2 *Testimenetelmä*

Testi on suoritettava OIE:n laatiman maaeläinten diagnostisia testejä ja rokotteita koskevan käsikirjan *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6. painos, 2008, 2.4.3 luvussa olevan B2-jakson määräysten mukaisesti.”

2. Korvataan direktiivin 64/432/ETY liitteessä C oleva 4.1 kohta seuraavasti

”4.1 **Tehtävät ja velvollisuudet**

Kansalliset vertailulaboratoriot vastaavat

- a) jäsenvaltiossa käytetyn testimenetelmän luotettavuuden osoittavien validointitutkimusten tulosten hyväksymisestä;
 - b) kokoomanäytteisiin yhdistettävien näytteiden enimmäismäärän määrittelystä ELISA-menetelmää käytettäessä;
 - c) edellä 2.1.6 kohdassa tarkoitettujen käyttöstandardien kalibroinnista;
 - d) kaikkien jäsenvaltiossa käytettyjen antigeenien ja ELISA-pakkauserien laatutarkastuksista;
 - e) yhteistyöstä luomistautia koskevan yhteisön vertailulaboratorion kanssa sekä sen suositusten noudattamisesta.”
-