

A BIZOTTSÁG HATÁROZATA

(2008. december 10.)

a 64/432/EGK tanácsi irányelv C. mellékletének és a 2004/226/EK határozatnak a szarvasmarha-brucellózis kimutatására szolgáló diagnosztikai tesztek tekintetében történő módosításáról

(az értesítés a C(2008) 7642. számú dokumentummal történt)

(EGT-vonatkozású szöveg)

(2008/984/EK)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a szarvasmarhafélék és a sertések Közösségen belüli kereskedelmét érintő állat-egészségügyi problémákról szóló, 1964. június 26-i 64/432/EGK tanácsi irányelvre ⁽¹⁾ és különösen annak 6. cikke (2) bekezdésének b) pontjára és 16. cikke (1) bekezdésének második albekezdésére,

mivel:

- (1) A 64/432/EGK irányelv C. melléklete meghatározza a szarvasmarha-brucellózis kimutatására szolgáló azon diagnosztikai módszereket, amelyeket a betegség ellenőrzése és felszámolása, felügyelete és megfigyelése, hatóságilag tuberkulózismentes státusú állományok kialakítása és fenntartása, valamint a szarvasmarhafélék Közösségen belüli kereskedelméhez előírt állat-egészségügyi igazolás céljaira használni kell.
- (2) A 64/432/EGK irányelv keretében történő, a szarvasmarha-brucellózis elleni antitestek kimutatásához szükséges vizsgálatok jóváhagyásáról szóló, 2004. március 4-i 2004/226/EK bizottsági határozat ⁽²⁾ jóváhagy egyes, a szarvasmarha-brucellózis kimutatására szolgáló teszteket, amelyeket a 64/432/EGK irányelv 6. cikke (2) bekezdésének b) pontja szerinti, a szarvasmarhafélékre vonatkozó állat-egészségügyi igazoláshoz kötelező csőagglutinációs próba (serum agglutination test, SAT) alternatívájaként lehet használni.
- (3) A fluoreszcencia-polarizációs próba (fluorescence polarization assay, FPA) új diagnosztikai teszt, amely az Állat-egészségügyi Világszervezet (OIE) „A szárazföldi állatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve” (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 2.4.3. fejezetében (Szarvasmarha-brucellózis) a nemzetközi kereskedelem esetén kötelező tesztként szerepel.
- (4) A Bizottság szakvélemény kiadására kérte fel az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóságot (a továbbiakban: EFSA) abban a kérdésben, hogy felvehető-e a fluoreszcencia-polarizációs próba (FPA) a 64/432/EGK irányelv C. mellékletébe.

- (5) Ezenkívül a Bizottság annak értékelésére is felkérte az EFSA-t, hogy a fluoreszcencia-polarizációs próba (FPA) és a 2004/226/EK határozat 1. cikkében felsorolt tesztek alkalmasak-e a szarvasmarhafélék Közösségen belüli kereskedelméhez szükséges állat-egészségügyi igazolás céljára.
- (6) Az állategészségügy és állatvédelem tudományos testülete 2006. december 11-én szakvéleményt adott ki a szarvasmarha-brucellózis diagnosztikai módszereiről ⁽³⁾, amelyben arra a következtetésre jutott, hogy a 64/432/EGK irányelv C. mellékletében megadott diagnosztikai tesztek – a csőagglutinációs próba (SAT) kivételével – alkalmasak arra, hogy továbbra is szabványos teszteként alkalmazzák őket a szarvasmarhafélék egyedeinek Közösségen belüli kereskedelméhez szükséges állat-egészségügyi igazolás céljára.
- (7) Mivel azonban a csőagglutinációs próba (SAT) olyan teszt, amelyet – mint ahogy azt a 64/432/EGK irányelv 6. cikke (2) bekezdésének b) pontja kifejezetten előírja – a szarvasmarhák kereskedelme esetén a szállítást megelőzően kell elvégezni, az irányelv C. mellékletének tartalmaznia kell a teszt műszaki specifikációját.
- (8) A 2006. december 11-i szakvélemény továbbá arra a következtetésre jutott, hogy a fluoreszcencia-polarizációs próba (FPA) érzékenysége és specifikussága hasonló, mint a 64/432/EGK irányelv C. mellékletében megadott teszteké, és megállapította azt is, hogy fel lehet venni az említett mellékletbe, mint a Közösségen belüli kereskedelemre szánt szarvasmarhafélék brucellózisának kimutatására szolgáló szabványos tesztet.
- (9) Az OIE „A szárazföldi állatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve” (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 2.4.3. fejezetének 1. d) szakaszában leírt, nemrég kifejlesztett polimeráz-lánreakciós (polymerase chain reaction, PCR) módszerek további eszközökkel szolgálnak a *Brucella* spp. kimutatásához és azonosításához, ezért e módszereket fel kell venni a 64/432/EGK irányelv C. mellékletébe.
- (10) A 64/432/EGK irányelv C. mellékletét és a 2004/226/EK határozatot ezért a fentieknek megfelelően módosítani kell.
- (11) Az e határozatban előírt intézkedések összhangban vannak az Élelmiszerlánc- és Állat-egészségügyi Állandó Bizottság véleményével,

⁽¹⁾ HL 121., 1964.7.29., 1977/64. o.⁽²⁾ HL L 68., 2004.3.6., 36. o.⁽³⁾ http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620727231.htm

ELFOGADTA EZT A HATÁROZATOT:

1. cikk

A 64/432/EGK határozat C. melléklete e határozat melléklete szerint módosul.

2. cikk

A 2004/226/EK határozat 1. cikkének helyébe az alábbi szöveg lép:

„1. cikk

A Bizottság a 64/432/EGK irányelv C. melléklete rendelkezései szerint elvégzett komplementkötési próbát (complement

fixation test, CFT), pufferolt *Brucella*-antigénnel végzett próbát (bengálvörös próba – rose Bengal test, RTB), ELISA-próbákat és fluoreszcencia-polarizációs próbát (fluorescence polarisation assay, FPA) állat-egészségügyi igazolás céljára jóváhagyja.”

3. cikk

Ennek a határozatnak a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 2008. december 10-én.

a Bizottság részéről

Androulla VASSILIOU

a Bizottság tagja

MELLÉKLET

1. A 64/432/EGK irányelv C. mellékletében az 1., 2. és 3. pont helyébe a következő szöveg lép:

„C. MELLÉKLET

BRUCELLÓZIS

1. A KÓROKOZÓ MEGHATÁROZÁSA

A *Brucella* morfológiai sajátosságait viselő organizmusok módosított saválló vagy immunspecifikus festéssel, vetelési anyagban, hüvelyváladékban vagy tejben történő kimutatása valószínűsített bizonyítékkal szolgál a brucellózisra, különösen, ha ezt szerológiai próbák is alátámasztják. A kimutatáshoz használható továbbá a polimeráz-lánreakció (PCR) módszere is.

Ha lehetséges, a *Brucella* spp.-t méhváladékból, elvetélt magzatból, tőgyváladékból vagy bizonyos szövetekből (pl. nyirokcsomóból, hím vagy nőstény ivarszervekből) való kitenyésztéssel kell izolálni hagyományos vagy szelektív táptalajok használatával.

Az izolálást követően a fajt és a biovariánst fág-érzékenységi és/vagy oxidatív metabolikai tesztek, tenyésztési, biokémiai és szerológiai kritériumok vizsgálata alapján kell meghatározni. A polimeráz-lánreakció mind kiegészítő eljárásként, mind bizonyos génszekvenciák alapján történő biotípus-meghatározásra is alkalmas.

A vizsgálatok során használt eljárásoknak és táptalajoknak, azok szabványosításának, valamint az eredmények értelmezésének meg kell felelnie az OIE »A szárazföldi állatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve« (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 2.4.3. fejezetében (Szarvasmarha-brucellózis), 2.7.2. fejezetében (Kecske- és juhbrucellózis), valamint 2.8.5. fejezetében (Sertésbrucellózis) meghatározottaknak.

2. IMMUNOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

2.1. **Standardok**

2.1.1. A bengálvörös (RBT) próbában, a csőagglutinációs (SAT) próbában, a komplementkötési (CFT) próbában és a tejsűrűpróba (MRT) alkalmazott valamennyi antigén elkészítéséhez a *Brucella abortus* 1-es biovariánsának 99-es Weybridge törzsét vagy USDA 1119-3-as törzsét kell használni.

2.1.2. Az RBT-, a SAT-, a CFT- és az MRT-próbák standard etalonsavója a nemzetközi standard OIE-etalonsavó (OIEISS) kell, hogy legyen, korábbi nevén a WHO második nemzetközi *Brucella abortus* elleni savója (ISAbS).

2.1.3. Az enzimes immunszorbenses próbák (ELISA-próbák) standard etalonsavói a következők:

— az OIEISS,

— a gyengén pozitív standard OIE-ELISA savó (OIEELISA_{WPSS}),

— az erősen pozitív standard OIE-ELISA-savó (OIEELISA_{SPSS}),

— a negatív standard OIE-ELISA-savó (OIEELISA_{NSS}).

2.1.4. A fluoreszcencia-polarizációs próba (FPA) standard etalonsavói a következők:

— a gyengén pozitív standard OIE-ELISA savó (OIEELISA_{WPSS}),

— az erősen pozitív standard OIE-ELISA-savó (OIEELISA_{SPSS}),

— a negatív standard OIE-ELISA-savó (OIEELISA_{NSS}).

2.1.5. A 2.1.3. és 2.1.4. pontban felsorolt standard savók vagy a brucellózisvizsgálatra kijelölt közösségi referencialaboratóriumtól, vagy a Veterinary Laboratories Agency-től (VLA) (Weybridge, Egyesült Királyság) szerezhetők be.

- 2.1.6. Az OIEISS, az OIEELISA_{WP}SS, az OIEELISA_{SP}SS és az OIEELISA_NSS elsődleges nemzetközi standardok, amelyekből minden tagállamban a 2.1.1. pontban említett minden teszthez másodlagos nemzeti referencianstandardokat (úgynevezett munkastandardokat) kell készíteni.
- 2.2. **Enzimes immunszorbenses próbák (ELISA-próbák) vagy a szarvasmarha-brucellózis vérsavóban vagy tejen történő kimutatására szolgáló, más, megkötésen alapuló vizsgálatok**
- 2.2.1. *Anyag és reagensok*
- Az alkalmazott technikának, amelynek legalább laboratóriumi és diagnosztikai vizsgálatokból kell állnia, és az eredmények értelmezésének hitelesítettnek kell lennie, mégpedig az OIE »A szárazföldi állatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve« (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 1.1.4. fejezetében megállapított elveknek megfelelően.
- 2.2.2. *A vizsgálat standardizálása*
- 2.2.2.1. A vizsgálati eljárás standardizálása egyedi savóminták esetében:
- az OIEISS 1:150 arányú előhígításának⁽¹⁾, vagy az OIEELISA_{WP}SS 1:2 arányú előhígításának, vagy az OIEELISA_{SP}SS 1:16 arányú előhígításának – negatív savóban (vagy savók negatív elegyében) – pozitív reakciót kell adnia;
 - az OIEISS 1:600 arányú előhígításának, vagy az OIEELISA_{WP}SS 1:8 arányú előhígításának, vagy az OIEELISA_{SP}SS 1:64 arányú előhígításának – negatív savóban (vagy savók negatív elegyében) – negatív reakciót kell adnia;
 - az OIEELISA_NSS-nek mindig negatív reakciót kell adnia.
- 2.2.2.2. A vizsgálati eljárás standardizálása összevont savóminták esetében:
- az OIEISS 1:150 arányú előhígításának, vagy az OIEELISA_{WP}SS 1:2 arányú előhígításának, vagy az OIEELISA_{SP}SS 1:16 arányú előhígításának – negatív savóban (vagy savók negatív elegyében) elkészítve, majd negatív savóval az elegyet alkotó minták számával egyező alkalommal újrähígítva – pozitív reakciót kell adnia;
 - az OIEELISA_NSS-nek mindig negatív reakciót kell adnia;
 - a vizsgálatnak alkalmasnak kell lennie arra, hogy a fertőzést egy olyan állatcsoport valamely egyedében kimutassa, amely állatcsoport savómintáit összevonták.
- 2.2.2.3. A vizsgálati eljárás standardizálása az összevont tej- vagy tejsavóminták esetében:
- az OIEISS 1:1 000 arányú előhígításának, vagy az OIEELISA_{WP}SS 1:16 arányú előhígításának, vagy az OIEELISA_{SP}SS 1:125 arányú előhígításának – negatív savóban (vagy savók negatív elegyében) elkészítve, és negatív tejjel 1:10 arányban újra felhígítva – pozitív reakciót kell adnia;
 - negatív tejjel 1:10 arányban hígított OIEELISA_NSS-nek mindig negatív reakciót kell adnia;
 - a vizsgálatnak alkalmasnak kell lennie arra, hogy a fertőzést egy olyan állatcsoport valamely egyedében kimutassa, amely állatcsoport tej- vagy tejsavómintáit összevonták.
- 2.2.3. *Az ELISA-próbák szarvasmarha-brucellózis diagnózisa céljából történő alkalmazásának feltételei:*
- 2.2.3.1. A savóminták ELISA-próbájára vonatkozó, a 2.2.2.1. és 2.2.2.2. pontban leírt kalibrálási feltételek alkalmazása mellett az ELISA diagnosztikai érzékenysége egyenlő vagy nagyobb, mint az RBT- vagy a CFT-próbáé, figyelembe véve azt a járványhelyzetet, amelyben alkalmazzák.
- 2.2.3.2. Az elegymintában összevont tejminták ELISA-próbájára vonatkozó, a 2.2.2.3. pontban leírt kalibrálási feltételek alkalmazása mellett az ELISA diagnosztikai érzékenysége egyenlő vagy nagyobb, mint az MRT-próbáé, a járványhelyzeten kívül figyelembe véve az átlagos és a várható különleges gazdálkodási rendszereket is.
- 2.2.3.3. Ha az ELISA-próbákat a 6. cikk (1) bekezdése szerint állat-egészségügyi igazolás céljára, vagy az A. melléklet II. része 10. pontjával összhangban valamely állomány státuszának megállapítására és fenntartására alkalmazzák, a savómintákat oly módon kell elegymintában összevonni, hogy a vizsgálati eredményeket egyértelműen hozzá lehessen rendelni ahhoz az összevont mintába felvett egyedhez, amelytől a minta származik. A megerősítő vizsgálatokat az egyes állategyedektől vett savómintákon kell elvégezni.

⁽¹⁾ E melléklet alkalmazásában a folyékony reagensok előállításához megadott hígítások például a következőképpen vannak kifejezve: 1:150, ami 1 a 150-hez arányú hígítást jelent.

2.2.3.4. Az ELISA-próbák olyan gazdaságokban gyűjtött tejből vett tejminta vizsgálatára alkalmazhatók, amelyekben a tejelő tehenek legalább 30 %-a tejel. Ha ezt a módszert használják, intézkedéseket kell hozni annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálatra vett mintákat egyértelműen hozzá lehessen rendelni ahhoz az állategyedhez, amelytől a tej származik. A megerősítő vizsgálatokat az egyes állategyedektől vett savómintákon kell elvégezni.

2.3. Komplementkötési próba (CFT)

2.3.1. Az antigén fenolos sóoldattal (0,85 % NaCl [m/V] és 0,5 % fenol [V/V]) készített baktérium-szuszpenzió. Az antigének beszerezhetők koncentrált törzsoldatként is, feltéve hogy az alkalmazandó hígítási tényező fel van tüntetve az üveg címkéjén. Az antigént 4 °C-on kell tárolni, és nem szabad fagyasztani.

2.3.2. A savókat a következőképpen kell inaktiválni:

— szarvasmarhasavó: 30–50 percig 56–60 °C-on,

— sertéssavó: 30–50 percig 60 °C-on.

2.3.3. A próba során a valódi reakció eléréséhez a komplementet a teljes hemolízishez szükséges legkisebb adagnál nagyobb dózisban kell alkalmazni.

2.3.4. A komplementkötési próbánál minden alkalommal el kell végezni a következő ellenőrzéseket:

- a) a savó anti-komplementer hatásának ellenőrzése;
- b) az antigén ellenőrzése;
- c) az érzékennyé tett vörösvértestek ellenőrzése;
- d) a komplement ellenőrzése;
- e) az érzékenység ellenőrzése pozitív savóval a reakció indulásakor;
- f) a reakció specifikusságának ellenőrzése negatív savóval.

2.3.5. *Az eredmények kiszámítása*

Az OIEISS 1 000 nemzetközi CFT-egységet (ICFTU) tartalmaz milliliterenként. Az OIEISS egy adott módszerrel történő mérése esetén az eredmény titerben (azaz az OIEISS olyan közvetlen legnagyobb hígítása, amely 50 %-os hemolízist ad, T_{OIEISS}) adódik. A vizsgált savóra titerben kapott mérési eredményeket ($T_{\text{TESTSERUM}}$) ICFTU/ml értékben kell kifejezni. Egy titerben megadott érték ICFTU-egységre való átváltásához az adott módszerrel mért ismeretlen savó titerének ($T_{\text{TESTSERUM}}$) ICFTU-egységre való átváltásához szükséges tényezőt (F) az alábbi képlet:

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

a vizsgált savó milliliterenkénti ICFTU-mennyiségét ($\text{ICFTU}_{\text{TESTSERUM}}$) pedig az alábbi képlet adja meg:

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

2.3.6. *Az eredmények értelmezése*

Milliliterenként 20 vagy több ICFTU-egységet tartalmazó savó pozitívnak tekintendő.

2.4. Tejgyűrűpróba (MRT)

2.4.1. Az antigén fenolos sóoldattal (0,85 % NaCl [m/V] és 0,5 % fenol [V/V]) készített, hematoxilinnal festett baktérium-szuszpenzió. Az antigént 4 °C-on kell tárolni, és nem szabad fagyasztani.

2.4.2. Az antigén érzékenységét be kell állítani az OIEISS-hez (standardizálás), oly módon, hogy az OIEISS negatív tejjel 1:500 arányban hígítva pozitív, 1:1 000 arányban hígítva pedig negatív eredményt adjon.

- 2.4.3. A tejgyűrűpróbát olyan mintákkal kell elvégezni, amelyek a gazdaságból származó valamennyi tejeskanna vagy tejtartály tartalmára reprezentatívak.
- 2.4.4. A tejmintákat nem szabad fagyasztani, melegíteni vagy erőteljes rázkódásnak kitenni.
- 2.4.5. A reakciót az alábbi módszerek egyikével kell elérni:
- 1 ml, legalább 25 mm magas tejoszlophoz 0,03 vagy 0,05 ml standardizált festett antigént kell adni,
 - 2 ml, legalább 25 mm magas tejoszlophoz 0,05 ml standardizált festett antigént kell adni,
 - 8 ml tejhez 0,08 ml standardizált festett antigént kell adni.
- 2.4.6. A tej és az antigén keverékét a pozitív és negatív standardokkal együtt 37 °C-on 60 percig kell inkubálni. További 16–24 órán keresztül 4 °C-on történő inkubálás növeli a mérés érzékenységét.
- 2.4.7. Az eredmények értelmezése:
- a) negatív reakció: elszíneződött tej, színtelen tejszín,
 - b) pozitív reakció:
 - egyformán elszíneződött tej és tejszín, vagy
 - színtelen tej és elszíneződött tejszín (gyűrű).
- 2.5. **Pufferolt *Brucella*-antigénnel végzett próba (bengálvörös próba) (RBT)**
- 2.5.1. Az antigén bengálvörös festékekkel festett, $3,65 \pm 0,05$ pH értékű, pufferolt *Brucella*-antigén-hígítóval készített baktérium-szuspenzió. Az antigént használatra kész oldatként kell beszerezni, 4 °C-on kell tárolni és nem szabad fagyasztani.
- 2.5.2. Az antigént a vértest-koncentrációtól függetlenül kell elkészíteni, de az érzékenységét be kell állítani az OIEISS-hez (standardizálás) oly módon, hogy az antigén a savóval 1:45 arányú hígításban pozitív, 1:55 arányú hígításban pedig negatív eredményt adjon.
- 2.5.3. A bengálvörös próbát az alábbi módon kell elvégezni:
- a) a savót (20–30 µl) fehér csempén vagy zománcozott lapon azonos térfogatú antigénnel össze kell keverni úgy, hogy mintegy 2 cm átmérőjű csepp keletkezzen. A keveréket szobahőmérsékleten 4 percig kíméletesen össze kell rázni, majd megfelelő fényben meg kell vizsgálni az agglutinációt;
 - b) automatizált eljárás is használható, ha az legalább olyan érzékeny és pontos, mint a manuális.
- 2.5.4. *Az eredmények értelmezése*
- Bármilyen látható reakció esetén a mintát pozitívnak kell tekinteni, kivéve, ha túlzott száradás látható a csepp kerületén.
- Minden próbasorozatban alkalmazni kell pozitív és negatív munkastandardokat.
- 2.6. **Csőagglutinációs próba (SAT)**
- 2.6.1. Az antigén fenolos sóoldattal (0,85 % NaCl [m/V] és 0,5 % fenol [V/V]) készített baktérium-szuspenzió.
- Formaldehid használata tilos.
- Az antigén beszerezhető koncentrált törzsoldatként is, feltéve, hogy az alkalmazandó hígítási tényező fel van tüntetve az üveg címkéjén.
- Az antigén-szuspenzióhoz EDTA adható az álpozitív eredmények csökkentése érdekében olyan mennyiségben, hogy a méréshez a véghígítás legfeljebb 5 mM legyen. Ezután az antigén-szuspenzió pH értékét vissza kell állítani 7,2-re.

- 2.6.2. Az OIEISS agglutinációs koncentrációja 1 000 nemzetközi egység.
- 2.6.3. Az antigént a vértest-koncentrációtól függetlenül kell elkészíteni, de az érzékenységet be kell állítani az OIEISS-hez (standardizálás) oly módon, hogy az antigén a savóval 1:600–1:1 000 arányú véghígításban 50 %-os, vagy pedig 1:500–1:750 arányú véghígításban 75 %-os agglutinációt adjon.
- Tanácsos lehet az új és a korábban standardizált antigén reakcióképességét meghatározott savóetalonok segítségével összehasonlítani.
- 2.6.4. A próba elvégezhető kémcsőben vagy mikrolemezzel. Az antigén és savó keverékét 16–24 órán át 37 °C-on kell inkubálni.
- Az egyes savókból legalább 3-3 hígítást kell készíteni. A fertőzöttségre gyanús savó hígításait úgy kell elkészíteni, hogy a pozitívítás határán fellépő reakció leolvasása a középső kémcsőben (vagy a mikrolemez módszer esetén a középső cellában) történjen.
- 2.6.5. *Az eredmények értelmezése:*
- A savóval kapott *Brucella*-agglutináció mértékét NE/ml értékben kell kifejezni.
- A ml-enként 30 vagy több NE-t tartalmazó savó pozitívnak tekintendő.

2.7. Fluoreszcencia-polarizációs próba (FPA)

- 2.7.1. A fluoreszcencia-polarizációs próba elvégezhető üvegcsőben vagy 96 cellás mikrolemezzel. A használt eljárásnak, a standardizálásnak és az eredmények értelmezésének meg kell felelnie az OIE »A szárazföldi állatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve« (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 2.4.3. fejezetének (Szarvasmarha-brucellózis).
- 2.7.2. *A próba standardizálása*
- A próbát úgy kell standardizálni, hogy
- az OIEELISA_{SP}SS és az OIEELISA_{WP}SS következetesen pozitív eredményeket adjon;
 - az OIEELISA_{WP}SS 1:8 arányú előhígítása vagy az OIEELISA_{SP}SS 1:64 arányú előhígítása – negatív savóval (vagy savók negatív elegyével) – negatív reakciót adjon;
 - az OIEELISA_NSS mindig negatív reakciót adjon.
- A következőket használni kell minden próbasorozatban: munkastandardként erős pozitív, gyenge pozitív és negatív savó (OIE ELISA etalon savókkal kalibrálva).

3. KIEGÉSZÍTŐ PRÓBÁK

3.1. Brucellózis-bőrpróba (BST)

3.1.1. *A bőrpróba használatára vonatkozó feltételek*

- A brucellózis-bőrpróba a Közösségen belüli kereskedelemben állat-egészségügyi igazolásra nem használható.
- A brucellózis-bőrpróba a brucellózis nem vakcinázott állatokban történő kimutatásának egyik legspecifikusabb vizsgálata, de önmagában a pozitív intradermális reakciók alapján nem szabad diagnózist felállítani.
- Ha szarvasmarhaféléknél az e mellékletben meghatározott szerológiai próbák egyike negatív eredményt ad, de az állat a bőrpróbára pozitívan reagál, akkor azt fertőzöttnek vagy feltehetően fertőzöttnek kell tekinteni.
- Az e mellékletben meghatározott szerológiai próbák egyikére pozitívan reagáló szarvasmarha bőrpróbával is megvizsgálható a szerológiai próba eredményének alátámasztása céljából, különösen, ha brucellózismentes vagy hivatalosan brucellózismentes állományokban nem lehet kizárni a más baktériumok ellen termelődött antitestekkel való keresztreakciót.

- 3.1.2. A próbát olyan standardizált és meghatározott brucellózisallergén készítménnyel kell elvégezni, amely nem tartalmaz sima lipopoliszacharid (S-LPS) antigént, mivel az nem specifikus gyulladásozó reakciókat idézhet elő, vagy megghamisíthatja a további szerológiai próbákat.

A brucellin előállítására vonatkozó előírásokat az OIE »A szárazföldi állatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve« (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 2.4.3. fejezetének C1. szakasza ismerteti.

- 3.1.3. *A próba menete*

- 3.1.3.1. Intradermálisan 0,1 ml brucellózisallergént kell beoltani a farokredőn, a horpaszon vagy nyak oldalán levő bőrbe.

- 3.1.3.2. Az eredményt 48–72 óra után kell meghatározni.

- 3.1.3.3. Az oltás helyén tolmércével meg kell mérni a bőr vastagságát a beoltás előtt és az eredmény meghatározásakor.

- 3.1.3.4. Az eredmények értelmezése:

Az erős reakciók könnyen felismerhetők a helyi duzzanatról és a bőr megkeményedéséről.

A bőr 1,5–2 mm-es megvastagodása a bőrpróba adott pozitív reakciónak tekintendő.

- 3.2. **Kompetitív enzimes immunszorbenses próba (cELISA)**

- 3.2.1. *A cELISA használatára vonatkozó feltételek:*

A cELISA a Közösségen belüli kereskedelembe állat-egészségügyi igazolásra nem használható.

Az e mellékletben meghatározott többi szerológiai próba egyikére pozitívan reagáló szarvasmarha cELISA próbával is megvizsgálható az említett szerológiai próba eredményének alátámasztása céljából, különösen, ha brucellóziszmentes vagy hivatalosan brucellóziszmentes állományokban nem lehet kizárni a más baktériumok ellen termelődött antitestekkel való keresztreakciót, vagy ha ki kell zárni az S19-oltásra való reagálásból származó, megmaradt antitestek miatti reakciókat.

- 3.2.2. *A próba menete*

A próbát az OIE »A szárazföldi állatoknál alkalmazott diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve« (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 2.4.3. fejezetének B.2. szakasza szerint kell elvégezni.

2. A 64/432/EKG irányelv C. mellékletében a 4.1. pont helyébe a következő szöveg lép:

„4.1. Feladatok és hatáskörök

A nemzeti referencialaboratóriumok a következőkért felelősek:

- a tagállamban használt módszer megbízhatóságát igazoló hitelesítő vizsgálatok eredményeinek jóváhagyása;
- annak meghatározása, hogy a használt ELISA-készletekben legfeljebb hány mintát szabad összevonni;
- a 2.1.6. pontban említett munkastandardok kalibrálása;
- a tagállamban használt összes antigén- és ELISA-készlet minőség-ellenőrzése;
- a brucellózissal foglalkozó közösségi referencialaboratóriummal való együttműködés, és ajánlásainak követése.”