

DECYZJA KOMISJI

z dnia 10 grudnia 2008 r.

zmieniająca załącznik C do dyrektywy Rady 64/432/EWG oraz decyzję 2004/226/WE w odniesieniu do testów diagnostycznych na obecność brucelozы bydła

(notyfikowana jako dokument nr C(2008) 7642)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

(2008/984/WE)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 64/432/EWG z dnia 26 czerwca 1964 r. w sprawie problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na handel wewnątrzspółnotowy bydłem i trzodą chlewną⁽¹⁾, w szczególności jej art. 6 ust. 2 lit. b) oraz art. 16 ust. 1 akapit drugi,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Załącznik C do dyrektywy 64/432/EWG określa metody diagnostyczne na obecność brucelozы bydła stosowane w celu kontroli i zwalczania tej choroby, jej nadzoru i monitorowania, jak również do celów ustalenia i utrzymania statusu stada oficjalnie uznanego za wolne od brucelozы oraz certyfikacji wymaganej w wewnątrzspółnotowym handlu bydłem.
- (2) Decyzja Komisji 2004/226/WE z dnia 4 marca 2004 r. zatwierdzająca testy na wykrywanie przeciwciał brucelozы bydła w ramach dyrektywy Rady 64/432/EWG⁽²⁾ zatwierdza niektóre testy na obecność brucelozы bydła, które mogą być stosowane w zastępstwie obowiązkowej próby aglutynacji surowicy (SAT) do celów certyfikacji bydła zgodnie z art. 6 ust. 2 lit. b) dyrektywy 64/432/EWG.
- (3) Metoda fluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPA) jest nowym testem diagnostycznym, który został włączony, jako zalecany w handlu międzynarodowym, do rozdziału 2.4.3 (brucelozы bydła) Podręcznika testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt łądowych (wydanie szóste, 2008 r.), wydanego przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE).
- (4) Komisja zwróciła się do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) z wnioskiem o wydanie opinii naukowej na temat tego, czy metodę FPA należy uwzględnić w załączniku C do dyrektywy 64/432/EWG.

- (5) Ponadto Komisja zwróciła się do EFSA o dokonanie oceny przydatności metody FPA oraz testów wymienionych w art. 1 decyzji 2004/226/WE do celów certyfikacji bydła w handlu wewnątrzspółnotowym.
- (6) Dnia 11 grudnia 2006 r. panel ds. zdrowia i dobrostanu zwierząt przyjął opinię naukową na temat metod diagnozowania brucelozы u bydła⁽³⁾, w której uznano, że, z wyjątkiem SAT, testy diagnostyczne na obecność brucelozы uwzględnione w załączniku C do dyrektywy 64/432/EWG są w dalszym ciągu odpowiednie jako testy standardowe do celów certyfikacji pojedynczych sztuk bydła w handlu wewnątrzspółnotowym.
- (7) Jednakże z uwagi na fakt, że test SAT jest testem poprzedzającym przemieszczenie zwierzęcia w ramach handlu bydłem i jest on bezpośrednio zalecany w art. 6 ust. 2 lit. b) dyrektywy 64/432/EWG, specyfikacja techniczna musi być dostępna w załączniku C do tej dyrektywy.
- (8) Ponadto w opinii naukowej z dnia 11 grudnia 2006 r. uznano, że czułość i swoistość metody FPA są porównywalne z parametrami testów wymienionych w załączniku C do dyrektywy 64/432/EWG oraz że metodę tę można uwzględnić w tym załączniku jako standardowy test diagnozowania brucelozы u tego rodzaju zwierząt w handlu wewnątrzspółnotowym.
- (9) Niedawno opracowane metody reakcji łańcucha polimerazy, które opisano w sekcji 1 lit. d) rozdziału 2.4.3 Podręcznika testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt łądowych (wydanie szóste, 2008 r.) wydanego przez OIE, stanowią dodatkowe sposoby wykrywania i identyfikacji *Brucella* spp. i z tego względu należy uwzględnić je w załączniku C do dyrektywy 64/432/EWG.
- (10) W związku z powyższym należy odpowiednio zmienić załącznik C do dyrektywy 64/432/EWG oraz decyzję 2004/226/WE.
- (11) Środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt,

⁽¹⁾ Dz.U. L 121 z 29.7.1964, s. 1977/64.⁽²⁾ Dz.U. L 68 z 6.3.2004, s. 36.⁽³⁾ http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620772731.htm

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

Artykuł 1

Załącznik C do dyrektywy 64/432/EWG zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku do niniejszej decyzji.

Artykuł 2

Artykuł 1 decyzji 2004/226/WE otrzymuje brzmienie:

„Artykuł 1

Metoda odczynu wiązania dopełniacza, test z użyciem buforowanego antygeny brucelozą (próbę z różem bengalskim (RBT)), test ELISA i metoda fluorescencji w świetle spolary-

zowanym (FPA) wykonywane zgodnie z załącznikiem C do dyrektywy 64/432/EWG są niniejszym zatwierdzone do celów certyfikacji.”.

Artykuł 3

Niniejsza decyzja skierowana jest do państw członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 10 grudnia 2008 r.

W imieniu Komisji

Androulla VASSILIOU

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

1. W załączniku C do dyrektywy 64/432/EWG pkt 1, 2 i 3 otrzymują brzmienie:

„ZAŁĄCZNIK C

BRUCELOZA

1. IDENTYFIKACJA CZYNNIKA

Wykazanie poprzez zmodyfikowane, odporne na działanie kwasów lub immunospecyficzne barwienie organizmów morfologii *Brucella* w materiale poronnym, wydzielinie z pochwy lub w mleku dostarcza przypuszczalnych poszlak co do obecności brucelozy, szczególnie jeśli są one potwierdzone wynikami testów serologicznych. Metody reakcji łańcucha polimerazy (PCR) stanowią dodatkowe sposoby wykrywania.

Ilekcją jest to możliwe, należy wyodrębnić *Brucella* spp. przy użyciu prostej lub selektywnej pożywki poprzez hodowlę pochodzącą z wydzielin macicznych, usuniętych płodów, wydzielin z wymion lub z wybranych tkanek, takich jak węzły chłonne oraz męskie i żeńskie narządy płciowe.

Po wyodrębnieniu gatunki i biotyp identyfikuje się za pomocą fagolizy lub oksydacyjnych testów metabolicznych, kryteriów kulturowych, biochemicznych i serologicznych. Reakcja PCR może stanowić zarówno metodę uzupełniającą, jak i metodę biotypowania na podstawie określonych sekwencji genomowych.

Wykorzystane techniki i media, ich normalizacja oraz interpretacja wyników muszą być zgodne z Podręcznikiem OIE testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych, wydanie szóste, 2008 r., rozdział 2.4.3 (bruceloza bydła), rozdział 2.7.2 (bruceloza owiec i kóz) i rozdział 2.8.5 (bruceloza świń).

2. TESTY IMMUNOLOGICZNE

2.1. **Standardy**

2.1.1. Do przygotowania wszystkich antygenów wykorzystywanych w próbach z różem bengalskim (RBT), aglutynacji surowicy (SAT), metodzie odczynu wiązania dopełniacza (CFT) i próbie pierścieniowej mleka (MRT) należy wykorzystać biotyp *Brucella abortus* szczep 1 Weybridge nr 99 lub szczep USDA 1119-3.

2.1.2. Standardową surowicą referencyjną w testach RBT, SAT, CFT i MRT jest międzynarodowa standardowa surowica OIE (OIEISS), której poprzednia nazwa brzmiała: międzynarodowa surowica antybrucelozy poronnej WHO [WHO second international anti-*Brucella abortus* Serum (ISAbS)].

2.1.3. Standardowe surowice referencyjne do metody immunosorbpcji skoniugowanych enzymów (ELISA) to:

— OIEISS,

— słabo dodatnia standardowa surowica OIE ELISA (OIEELISA_{WPSS}),

— silnie dodatnia standardowa surowica OIE ELISA (OIEELISA_{SPSS}),

— ujemna standardowa surowica OIE ELISA (OIEELISA_{NSS}).

2.1.4. Standardowe surowice referencyjne do metody fluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPA) to:

— słabo dodatnia standardowa surowica OIE ELISA (OIEELISA_{WPSS}),

— silnie dodatnia standardowa surowica OIE ELISA (OIEELISA_{SPSS}),

— ujemna standardowa surowica OIE ELISA (OIEELISA_{NSS}).

2.1.5. Standardowe surowice wymienione w pkt 2.1.3 i 2.1.4 można otrzymać ze wspólnotowego laboratorium referencyjnego ds. brucelozy lub Agencji Laboratoriów Weterynaryjnych (VLA), Weybridge, Zjednoczone Królestwo.

- 2.1.6. OIEISS, OIEELISA_{WPSS}, OIEELISA_{SpSS} oraz OIEELISA_{NSS} są międzynarodowymi głównymi standardami, na podstawie których należy tworzyć drugorzędowe standardy porównawcze („standardy robocze”) dla wszystkich testów, o których mowa w pkt 2.1.1, we wszystkich państwach członkowskich.
- 2.2. **Metoda immunosorbpcji skoniugowanych enzymów (ELISA) lub inne wiążące testy wykrywające obecność brucelozę bydła w surowicy lub w mleku**
- 2.2.1. *Materiały i odczynniki*
- Wykorzystywana technika i interpretacja wyników muszą zostać potwierdzone zgodnie z zasadami ustanowionymi w rozdziale 1.1.4 Podręcznika OIE testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych (wydanie szóste, 2008 r.) i powinny obejmować co najmniej badania laboratoryjne i diagnostyczne.
- 2.2.2. *Normalizacja testów*
- 2.2.2.1. Normalizacja procedur testowych dla pojedynczych próbek surowicy:
- wstępne rozcieńczenie ⁽¹⁾ OIEISS 1:150 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{WPSS} 1:2 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{SpSS} 1:16 wykonane w surowicy ujemnej (lub w ujemnej grupie surowic) musi dać reakcję pozytywną;
 - wstępne rozcieńczenie OIEISS 1:600 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{WPSS} 1:8 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{SpSS} 1:64 wykonane w surowicy ujemnej (lub w ujemnej grupie surowic) musi dać reakcję ujemną;
 - surowica OIEELISA_{NSS} musi zawsze dawać reakcję ujemną.
- 2.2.2.2. Normalizacja procedur testowych dla zbioru próbek surowicy:
- wstępne rozcieńczenie OIEISS 1:150 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{WPSS} 1:2 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{SpSS} 1:16 wykonane w surowicy ujemnej (lub w ujemnej grupie surowic) i ponowne rozcieńczenie w surowicach ujemnych tylokrotnie, ile wynosi liczba próbek tworzących zbiór, musi dać reakcję pozytywną;
 - surowica OIEELISA_{NSS} musi zawsze dawać reakcję ujemną;
 - test musi być odpowiedni do tego, aby wykryć dowody zakażenia jednego zwierzęcia w grupie zwierząt, z których próbki surowicy tworzą zbiór.
- 2.2.2.3. Normalizacja procedury testowej dla połączonych próbek mleka lub serwatki:
- wstępne rozcieńczenie OIEISS 1:1 000 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{WPSS} 1:16, lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{SpSS} 1:125 wykonane w surowicy ujemnej (lub w ujemnej grupie surowic) i ponowne rozcieńczenie 1:10 w ujemnym mleku musi dać reakcję pozytywną;
 - surowica OIEELISA_{NSS} rozcieńczona 1:10 w ujemnym mleku musi zawsze dawać reakcję ujemną;
 - test musi być odpowiedni do tego, aby wykryć dowody zakażenia jednego zwierzęcia w grupie zwierząt, z których próbki mleka lub serwatki tworzą zbiór.
- 2.2.3. *Warunki wykorzystania testów ELISA do diagnozowania brucelozę bydła:*
- 2.2.3.1. Przy zastosowaniu warunków kalibracji testów ELISA określonych w pkt 2.2.2.1 i 2.2.2.2 próbek surowicy czułość diagnostyczna metody ELISA jest równa lub większa niż w przypadku metod RBT lub CFT, biorąc pod uwagę sytuację epidemiologiczną, w jakiej jest stosowana.
- 2.2.3.2. Przy zastosowaniu warunków kalibracji testów ELISA określonych w pkt 2.2.2.3 dla połączonych próbek mleka czułość diagnostyczna metody ELISA jest równa lub większa niż w przypadku MRT, biorąc pod uwagę nie tylko sytuację epidemiologiczną, ale także przeciętne i ekstremalne systemy gospodarki rolnej.
- 2.2.3.3. W przypadku gdy metody ELISA są wykorzystywane do celów certyfikacyjnych zgodnie z art. 6 ust. 1 lub do ustalenia i utrzymania statusu stada zgodnie z załącznikiem A pkt II ppkt 10, połączenie próbek surowicy musi zostać wykonane w taki sposób, aby wyniki testu można było bez wątpliwości odnieść do konkretnego zwierzęcia należącego do zbioru. Wszelkie testy potwierdzające należy przeprowadzić na surowicy pobranej z pojedynczego zwierzęcia.

⁽¹⁾ Do celów niniejszego załącznika rozcieńczenia podane w odniesieniu do odczynników ciekłych są wyrażone jako np. 1:150, co oznacza jedną część na 150.

2.2.3.4. Testy ELISA mogą być zastosowane do próbek mleka pobranych z gospodarstw rolnych z udziałem krów mlecznych wynoszącym co najmniej 30 %. Jeśli stosowana jest ta metoda, należy podjąć kroki w celu upewnienia się, że próbki pobrane do badań można bez wątpliwości powiązać z konkretnymi zwierzętami, od których pochodzi mleko. Wszelkie testy potwierdzające należy przeprowadzić na surowicy pobranej z pojedynczego zwierzęcia.

2.3. Metoda odczynu wiązania dopełniacza (CFT)

2.3.1. Antygen występuje w formie zawiesiny bakteryjnej w solance fenolowej [0,85 % NaCl (m/v) i fenolu 0,5 % (v/v)] lub w buforze weralonalowym. Antygeny mogą być dostarczane w postaci koncentratów, pod warunkiem że zalecany wskaźnik rozcieńczenia podany jest na etykiecie butelki. Antygen należy przechowywać w warunkach 4 °C i nie należy go zamrażać.

2.3.2. Surowice muszą zostać inaktywowane w następujący sposób:

— surowica bydłęca: od 56 °C do 60 °C w czasie od 30 do 50 minut,

— surowica wieprzowa: 60 °C w czasie od 30 do 50 minut.

2.3.3. W celu poprawnego przeprowadzenia reakcji opisanej w procedurze próby stosuje się dawkę dopełniacza wyższą od minimalnej dawki niezbędnej do przeprowadzenia całkowitej hemolizy.

2.3.4. Podczas przeprowadzania metody odczynu wiązania dopełniacza za każdym razem należy przeprowadzić następujące kontrole:

- a) kontrola antydopełniaczowego wpływu surowicy;
- b) kontrola antygeny;
- c) kontrola uczulonych czerwonych krwinek krwi;
- d) kontrola dopełniacza;
- e) kontrola czułości z wykorzystaniem surowicy dodatniej na początku reakcji;
- f) kontrola swoistości reakcji z wykorzystaniem surowicy ujemnej.

2.3.5. Obliczanie wyników

OIEISS zawiera 1 000 międzynarodowych jednostek CFT (ICFTU) w ml. W przypadku próby z OIEISS z wykorzystaniem danej metody wynik podaje się w postaci miana roztworu (tj. najwyższego bezpośredniego rozcieńczenia OIEISS dającego 50 % hemolizy, T_{OIEISS}). Wynik próby z surowicą w postaci miana ($T_{\text{TESTSERUM}}$) musi być wyrażony w jednostkach ICFTU/ml. Aby przekształcić miano na jednostki ICFTU, wskaźnik (F) potrzebny do przekształcenia miana nieznanego próby z surowicą ($T_{\text{TESTSERUM}}$) przeprowadzonej tą metodą na jednostki ICFTU wylicza się z następującego wzoru:

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

a ilość międzynarodowych jednostek CFT w ml w przypadku próby z surowicą (ICFTU_{TESTSERUM}) z wzoru:

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

2.3.6. Interpretacja wyników

Surowica zawierająca 20 lub więcej jednostek ICFTU w ml uznawana jest za dodatnią.

2.4. Próba obrączkowa mleka (MRT)

2.4.1. Antygen występuje w postaci zawiesiny bakteryjnej w solance fenolowej [0,85 % NaCl (m/v) i fenolu 0,5 % (v/v)] wybarwionej hematoksyliną. Antygen należy przechowywać w warunkach 4 °C i nie należy go zamrażać.

2.4.2. Czułość antygeny należy standaryzować w odniesieniu do OIEISS w taki sposób, aby antygen dał pozytywną reakcję z OIEISS w ujemnym mleku w rozcieńczeniu 1:500 oraz reakcję negatywną w rozcieńczeniu 1:1 000.

- 2.4.3. Próba pierścieniowa musi być przeprowadzona na próbkach reprezentatywnych dla zawartości każdej kanki lub zawartości każdego zbiorczego zbiornika w gospodarstwie.
- 2.4.4. Próbek mleka nie należy zamrażać, podgrzewać ani poddawać gwałtownym wstrząsom.
- 2.4.5. Reakcję należy przeprowadzać, wykorzystując jedną z poniższych metod:
- na słupku mleka o wysokości co najmniej 25 mm oraz o objętości 1 ml, do którego dodaje się albo 0,03 ml lub 0,05 ml jednego ze standardowych wybarwionych antygenów,
 - na słupku mleka o wysokości co najmniej 25 mm oraz o objętości 2 ml, do którego dodaje się 0,05 ml jednego ze standardowych wybarwionych antygenów,
 - na objętości próbki mleka 8 ml, do której dodaje się 0,08 ml jednego ze standardowych wybarwionych antygenów.
- 2.4.6. Mieszalinę mleka i antygenów umieszcza się w temperaturze 37 °C na czas 60 minut wraz z dodatnim i ujemnym standardem roboczym. Dalsza inkubacja od 16 do 24 godzin w temperaturze 4 °C podwyższa czułość próby.
- 2.4.7. Interpretacja wyników:
- a) reakcja negatywna: próba mleka zabarwiona, śmietanka bezbarwna;
 - b) reakcja pozytywna:
 - mleko i śmietanka identycznie zabarwione, lub
 - bezbarwne mleko i zabarwiona śmietanka.
- 2.5. **Test z użyciem buforowanego antygeny brucelozy (próba z różem bengalskim (RBT))**
- 2.5.1. Antygen występuje w postaci zawiesiny bakteryjnej w zbuforowanym rozcieńczalniku antygeny brucelozy o pH wynoszącym $3,65 \pm 0,05$, wybarwiony różem bengalskim. Antygen powinien występować w postaci gotowej do użytku, musi być przechowywany w warunkach 4 °C oraz nie może być zamrażany.
- 2.5.2. Czułość antygeny należy standaryzować nie w odniesieniu do stężenia komórek, ale w odniesieniu do OIEISS w taki sposób, aby antygen dał pozytywną reakcję z OIEISS w surowicy w rozcieńczeniu 1:45 oraz reakcję negatywną w rozcieńczeniu 1:55.
- 2.5.3. Próbę RBT przeprowadza się w następujący sposób:
- a) surowica (20–30 μ l) mieszana jest z równą objętością antygeny na białym kafelku lub emaliowanej płytce w celu utworzenia strefy o średnicy około 2 cm. Mieszalinę delikatnie wstrząsa się przez cztery minuty w temperaturze otoczenia, a następnie w dobrym oświetleniu obserwuje się aglutynację;
 - b) można zastosować metodę zautomatyzowaną, ale musi być ona co najmniej tak czuła i precyzyjna jak metoda manualna.
- 2.5.4. *Interpretacja wyników*
- Jakakolwiek widoczna reakcja uznawana jest za pozytywną, z wyjątkiem wystąpienia nadmiernego wysuszenia wzdłuż brzegów.
- Dodatnie i ujemne standardy robocze są kontrolowane w każdej serii prób.
- 2.6. **Próba aglutynacji surowicy (SAT)**
- 2.6.1. Antygen występuje w postaci zawiesiny bakteryjnej w solance fenolowej [0,85 % NaCl (m/v) i fenolu 0,5 % (v/v)].
- Nie należy używać formaldehydu.
- Antygeny mogą być dostarczane w postaci koncentratów, pod warunkiem że zalecany wskaźnik rozcieńczenia podany jest na etykiecie butelki.
- Można dodać EDTA do zawiesiny antygeny do ostatecznego rozcieńczenia próby 5 mM w celu zmniejszenia liczby fałszywych reakcji pozytywnych w próbie aglutynacji surowicy. Następnie należy doprowadzić pH zawiesiny antygenów do 7,2.

- 2.6.2. OIEISS zawiera 1 000 międzynarodowych jednostek aglutynacji.
- 2.6.3. Antygeny nie przygotowuje się w odniesieniu do stężenia komórek. Jego czułość należy standaryzować w odniesieniu do OIEISS w taki sposób, aby antygen dał aglutynację w 50 % w reakcji z surowicą o ostatecznym rozcieńczeniu od 1:600 do 1:1 000 lub dał aglutynację w 75 % w reakcji z surowicą o ostatecznym rozcieńczeniu od 1:500 do 1:750.

Można także porównywać aktywność nowych i poprzednio standaryzowanych antygenów przy użyciu tablic zdefiniowanych surowic.

- 2.6.4. Próbę przeprowadza się albo w próbkach, albo na mikropłytkach. Mieszanina antygeny i rozcieńczeń surowicy inkubowana jest w czasie od 16 do 24 godzin w temperaturze 37 °C.

Do każdej surowicy należy przygotować co najmniej trzy różne rozcieńczenia. Rozcieńczenia testowanej surowicy muszą być przygotowane w taki sposób, aby odczyt wyniku reakcji w odniesieniu do limitu pozytywnej reakcji był w próbce z pośrednim rozcieńczeniem (lub w odpowiedniej studziencie w przypadku metody z mikropłytką).

- 2.6.5. *Interpretacja wyników*

Stopień aglutynacji *Brucella* w surowicy musi być wyrażony w IU/ml.

Surowica zawierająca 30 lub więcej jednostek IU w ml uważana jest za dodatnią.

2.7. **Metoda fluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPA)**

- 2.7.1. Metodę FPA można przeprowadzać w szklanych próbkach lub na płytkach 96-studzienkowych. Wykorzystane techniki, ich normalizacja oraz interpretacja wyników muszą być zgodne z rozdziałem 2.4.3 (brucelloza bydła) Podręcznika OIE testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych (wydanie szóste, 2008 r.).

- 2.7.2. *Normalizacja testów*

Metoda FPA jest normalizowana, tak aby:

- a) OIEELISA_{Sp}SS i OIEELISA_{Wp}SS stale dawały wyniki dodatnie;
- b) wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{Wp}SS 1:8 lub wstępne rozcieńczenie OIEELISA_{Sp}SS 1:64 wykonane w surowicy ujemnej (lub w ujemnej grupie surowic) zawsze dawało reakcję negatywną;
- c) surowica OIEELISA_NSS zawsze dawała reakcję negatywną.

W każdej serii prób są kontrolowane następujące robocze standardowe surowice: silnie dodatnia, słabo dodatnia i ujemna (skalibrowane zgodnie ze standardowymi surowicami OIE ELISA).

3. PRÓBY UZUPEŁNIAJĄCE

3.1. **Brucellozowa próba skórna (BST)**

- 3.1.1. *Warunki stosowania BST*

- a) Brucellozowa próba skórna nie może być stosowana do celów certyfikacji w handlu wewnątrzspółnotowym.
- b) Brucellozowa próba skórna jest jedną z najbardziej swoistych prób wykrywania brucellozy u niezaszczepionych zwierząt, jednakże nie można wydawać diagnozy wyłącznie na podstawie pozytywnego wyniku reakcji podskórnej.
- c) Bydło reagujące negatywnie w jednej z serologicznych prób zdefiniowanych w niniejszym załączniku, a wykazujące reakcję pozytywną na próbę BST, uważane jest za zakażone lub podejrzewane o zakażenie.
- d) Bydło reagujące pozytywnie w jednej z serologicznych prób zdefiniowanych w niniejszym załączniku może być poddane próbie BST w celu potwierdzenia interpretacji wyników prób serologicznych, w szczególności w przypadku gdy w stadach bydła uznanych za oficjalnie wolne od brucellozy lub wolnych od brucellozy nie można wykluczyć zajścia krzyżowej reakcji z antyciałami przeciwko innym bakteriom.

- 3.1.2. Próbę należy wykonać, wykorzystując standardowy i zdefiniowany preparat alergenu brucelozы, który nie zawiera antygenu gładkich lipopolisacharydów (LPS), gdyż jego obecność może wywoływać nieswoiste reakcje zapalne lub zakłócać próby serologiczne.

Wymagania dotyczące przygotowania bruceliny są zgodne z sekcją C1 w rozdziale 2.4.3 Podręcznika OIE testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych (wydanie szóste, 2008 r.).

3.1.3. *Wykonanie próby*

- 3.1.3.1. Objętość 0,1 ml alergenu brucelozы jest wstrzykiwana podskórną w fałd ogonowy, w bok ciała lub w bok szyi.

- 3.1.3.2. Reakcję odczytuje się po 48–72 godzinach.

- 3.1.3.3. Grubość skóry w miejscu wstrzyknięcia jest mierzona suwmiarką z noniuszem przed wstrzyknięciem oraz podczas ponownego badania.

- 3.1.3.4. Interpretacja wyników:

Silne reakcje są łatwo zauważalne, gdyż charakteryzują się miejscową opuchlizną i stwardnieniem.

1,5–2-milimetrowe zgrubienie skóry uważa się za reakcję pozytywną na BST.

3.2. **Metoda immunosorbpcji skoniugowanych enzymów w modyfikacji kompetycyjnej (cELISA)**

- 3.2.1. *Warunki stosowania cELISA*

Metoda cELISA nie powinna być stosowana do celów certyfikacji w handlu wewnątrzspółnotowym.

Bydło reagujące pozytywnie w jednej z serologicznych prób zdefiniowanych w niniejszym załączniku może być poddane próbie cELISA w celu potwierdzenia interpretacji innych wyników prób serologicznych, w szczególności w przypadku gdy w stadach bydła oficjalnie uznanych za wolne od brucelozы lub wolnych od brucelozы nie można wykluczyć zajścia krzyżowej reakcji z przeciwciałami przeciwko innym bakteriom lub, aby wykluczyć reakcje spowodowane pozostałościami przeciwciał wytworzonych w reakcji na szczepienie S19.

- 3.2.2. *Wykonanie próby*

Próbę wykonuje się według zaleceń zawartych w sekcji B(2) rozdziału 2.4.3 Podręcznika OIE testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych, wydanie szóste, 2008 r.”.

2. W załączniku C do dyrektywy 64/432/EWG pkt 4.1 otrzymuje brzmienie:

„4.1. **Zadania i obowiązki**

Krajowe laboratoria referencyjne wyznaczone zgodnie z art. 6a odpowiedzialne są za:

- a) zatwierdzanie wyników badań walidacyjnych demonstrujących rzetelność metod wykonywania prób stosowanych w państwach członkowskich;
 - b) określanie maksymalnej liczby próbek, które można zbadać przy pomocy zestawów ELISA;
 - c) kalibrowanie standardów roboczych, o których mowa w pkt 2.1.6;
 - d) kontrole jakościowe wszystkich serii antygenów i zestawów ELISA stosowanych w państwach członkowskich;
 - e) stosowanie się do zaleceń wspólnotowego laboratorium referencyjnego ds. brucelozы i współpracę z nim.”.
-