

## DECIZIA COMISIEI

din 10 decembrie 2008

**de modificare a anexei C la Directiva 64/432/CEE a Consiliului și a Deciziei 2004/226/CE cu privire la testele de diagnostic pentru bruceloza bovină**

[notificată cu numărul C(2008) 7642]

(Text cu relevanță pentru SEE)

(2008/984/CE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 64/432/CEE a Consiliului din 26 iunie 1964 privind problemele de inspecție veterinară care afectează schimburile intracomunitare cu bovine și porcine<sup>(1)</sup>, în special articolul 6 alineatul (2) litera (b) și articolul 16 alineatul (1) al doilea paragraf,

întrucât:

- (1) Anexa C la Directiva 64/432/CEE stabilește metodele de diagnosticare a brucelozei bovine care trebuie utilizate pentru combaterea și eradicarea bolii, pentru supraveghere și monitorizare, precum și pentru stabilirea și menținerea unui statut al șeptelului ca fiind oficial indemn de bruceloză și a certificării necesare în vederea comerțului intracomunitar cu bovine.
- (2) Decizia 2004/226/CE a Comisiei din 4 martie 2004 de autorizare a testelor pentru detectarea anticorpilor împotriva brucelozei bovine în cadrul Directivei 64/432/CEE a Consiliului<sup>(2)</sup> aprobă o serie de teste pentru bruceloza bovină care pot fi utilizate ca alternativă la testul obligatoriu de seroaglutinare (SAT) pentru certificarea bovinelor în conformitate cu articolul 6 alineatul (2) litera (b) din Directiva 64/432/CEE.
- (3) Evaluarea fluorescenței în lumină polarizată (FPA) este un nou test de diagnostic care a fost inclus ca test prevăzut pentru comerțul internațional în capitolul 2.4.3 (bruceloza bovină) al Manualului de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre, ediția a șasea, 2008, al Organizației Mondiale pentru Sănătate Animală (OIE).
- (4) Comisia a solicitat Autorității Europene pentru Siguranța Alimentară (EFSA) să furnizeze un aviz științific privind oportunitatea includerii FPA în anexa C la Directiva 64/432/CEE.

(5) În plus, Comisia a solicitat EFSA să evalueze oportunitatea FPA și a testelor menționate la articolul 1 din Decizia 2004/226/CE în scopul certificării bovinelor în vederea comerțului intracomunitar.

(6) La 11 decembrie 2006, Comitetul pentru sănătatea și bunăstarea animalelor a adoptat un aviz științific privind metodele de diagnosticare a brucelozei la bovine<sup>(3)</sup> în care a concluzionat că, exceptând SAT, testele de diagnostic pentru bruceloza bovină incluse în anexa C la Directiva 64/432/CEE sunt adecvate pentru a fi menținute ca teste standard pentru certificarea în mod individual a bovinelor în vederea comerțului intracomunitar.

(7) Cu toate acestea, deoarece SAT este testul prevăzut înainte de deplasare în cazul comerțului cu bovine prescris în mod direct la articolul 6 alineatul (2) litera (b) din Directiva 64/432/CEE, trebuie să existe o specificație tehnică în anexa C la directiva menționată anterior.

(8) În plus, avizul științific din 11 decembrie 2006 a concluzionat că sensibilitatea și specificitatea FPA sunt comparabile cu cele ale testelor incluse în anexa C la Directiva 64/432/CEE, acesta fiind, de asemenea, adecvat pentru includerea în anexa respectivă ca test standard pentru diagnosticarea brucelozei la animale în vederea comerțului intracomunitar.

(9) Metodele recent dezvoltate ale reacției în lanț a polimerazei, descrise în secțiunea 1 litera (d) din capitolul 2.4.3 al Manualului de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre, ediția a șasea, 2008, al OIE, furnizează metode suplimentare de detectare și identificare a *Brucella* spp., fiind astfel necesară includerea acestora în anexa C la Directiva 64/432/CEE.

(10) Prin urmare, anexa C la Directiva 64/432/CEE și Decizia 2004/226/CE ar trebui modificate în consecință.

(11) Măsurile prevăzute în prezenta decizie sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală,

(1) JO L 121, 29.7.1964, p. 1977/64.

(2) JO L 68, 6.3.2004, p. 36.

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

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

*Articolul 1*

Anexa C la Directiva 64/432/CEE se modifică în conformitate cu anexa la prezenta decizie.

*Articolul 2*

Articolul 1 din Decizia 2004/226/CE se înlocuiește cu următoarele:

*„Articolul 1*

Reacția de fixare a complementului, testul cu antigen *brucelic* tamponat [testul cu roz Bengal (RBT)], testele ELISA și evaluarea fluorescenței în lumină polarizată (FPA) efectuate

în conformitate cu dispozițiile anexei C la Directiva 64/432/CEE sunt autorizate în scopul certificării.”

*Articolul 3*

Prezenta decizie se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 10 decembrie 2008.

*Pentru Comisie*

Androulla VASSILIOU

*Membru al Comisiei*

## ANEXĂ

1. În anexa C la Directiva 64/432/CEE, punctele 1, 2 și 3 se înlocuiesc cu următoarele:

## „ANEXA C

**BRUCELOZĂ**

## 1. IDENTIFICAREA AGENTULUI

Evidențierea prin colorare modificată acid-rezistentă sau imunospecifică a organismelor cu morfologia *Brucella* aflate în resturi rezultate în urma avortului, secreții vaginale sau lapte oferă o indicație probabilă a brucelozei, în special dacă aceasta este confirmată de testele serologice. Reacția în lanț a polimerazei (PCR) oferă metode suplimentare de detecție.

Oricând este posibil, *Brucella* spp. ar trebui să fie izolată utilizând medii simple sau selective, prin recoltarea din secreții uterine, fetuși avortați, secreții ale ugerului sau anumite țesuturi, precum ganglioni limfatici și organe reproducătoare masculine și feminine.

După izolare, speciile și biovarul pot fi identificate prin liza fagilor și/sau teste de metabolism oxidativ, în funcție de criteriile de cultură, biochimice și serologice. PCR poate asigura o metodă deopotrivă complementară și de biotipizare bazată pe secvențe genomice.

Tehnicile și mediile utilizate, standardizarea și interpretarea rezultatelor trebuie să fie conforme celor specificate în Manualul de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre, ediția a șasea, 2008, capitolul 2.4.3 (bruceloză bovină), capitolul 2.7.2 (bruceloză caprină și bovină) și capitolul 2.8.5 (bruceloză porcină).

## 2. TESTE IMUNOLOGICE

## 2.1. Standarde

- 2.1.1. La prepararea tuturor antigenilor utilizați în testul cu roz Bengal (RBT), testul de seroaglutinare (SAT), testul de fixare a complementului (CFT) și testul inelar efectuat pe proba de lapte (MRT) se va utiliza sușa tip Weybridge nr. 99 și USDA 1119-3 ale biovarului 1 de *Brucella abortus*.
- 2.1.2. Serul standard de referință pentru testele RBT, SAT, CFT și MRT va fi serul standard internațional al OIE (OIEISS), cunoscut anterior ca cel de al doilea ser standard internațional anti-*Brucella abortus* al OMS (ISAbS).
- 2.1.3. Serurile standard de referință pentru metodele de imunoabsorbție enzimatică (ELISA) sunt următoarele:
- OIEISS;
  - serul standard ELISA slab pozitiv al OIE (OIEELISA<sub>WP</sub>SS);
  - serul standard ELISA puternic pozitiv al OIE (OIEELISA<sub>SP</sub>SS);
  - serul standard ELISA negativ al OIE (OIEELISA<sub>N</sub>SS).
- 2.1.4. Serurile standard de referință pentru evaluările fluorescenței în lumină polarizată (FPA) sunt următoarele:
- serul standard ELISA slab pozitiv al OIE (OIEELISA<sub>WP</sub>SS);
  - serul standard ELISA puternic pozitiv al OIE (OIEELISA<sub>SP</sub>SS);
  - serul standard ELISA negativ al OIE (OIEELISA<sub>N</sub>SS).
- 2.1.5. Serurile standard menționate la punctele 2.1.3 și 2.1.4 sunt furnizate de către laboratorul de comunitar referință pentru bruceloză sau de către Agenția pentru Laboratoare Veterinare [Veterinary Laboratories Agency (VLA)], Weybridge, Marea Britanie.

- 2.1.6. OIEISS, OIEELISA<sub>WP</sub>SS, OIEELISA<sub>SP</sub>SS și OIEELISA<sub>N</sub>SS sunt standarde internaționale principale pe baza cărora se stabilesc, în fiecare stat membru, seruri standard naționale («seruri etalon») pentru fiecare test menționat la punctul 2.1.1.
- 2.2. **Metodele de imunoabsorbție enzimatică (ELISA) sau alte teste obligatorii de aglutinare pentru detectarea brucelozei bovine în ser sau lapte.**
- 2.2.1. *Material și reactivi*
- Tehnica utilizată și interpretarea rezultatelor trebuie să fi fost validate în conformitate cu principiile prevăzute în capitolul 1.1.4 din Manualul de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre, ediția a șasea, 2008, și trebuie să includă cel puțin studii de laborator și de diagnostic.
- 2.2.2. *Standardizarea testului*
- 2.2.2.1. Standardizarea procedurii de test pentru eșantioane individuale de ser:
- (a) o prediluție <sup>(1)</sup> de 1/150 a serului OIEISS sau o prediluție de 1/2 a serului OIEELISA<sub>WP</sub>SS sau o prediluție de 1/16 a serului OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizate într-un ser negativ (sau într-un amestec de seruri negative) trebuie să producă o reacție pozitivă;
- (b) o prediluție de 1/600 a serului OIEISS sau o prediluție de 1/8 a serului OIEELISA<sub>WP</sub>SS sau o prediluție de 1/64 a serului OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizate într-un ser negativ (sau într-un amestec de seruri negative) trebuie să producă o reacție negativă;
- (c) serul OIEELISA<sub>N</sub>SS trebuie să producă întotdeauna o reacție negativă.
- 2.2.2.2. Standardizarea procedurii de test pentru eșantioane de ser amestecate:
- (a) o prediluție de 1/150 a serului OIEISS, sau o prediluție de 1/2 a serului OIEELISA<sub>WP</sub>SS sau o prediluție de 1/16 a serului OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizate într-un ser negativ (sau într-un amestec de seruri negative) și diluate din nou în seruri negative cu un factor de diluare identic numărului de seruri care constituie amestecul trebuie să producă o reacție pozitivă;
- (b) serul OIEELISA<sub>N</sub>SS trebuie să producă întotdeauna o reacție negativă;
- (c) testul trebuie să fie în măsură să detecteze prezența unei infecții la un singur animal din grupul de animale de la care s-au combinat eșantioanele de ser.
- 2.2.2.3. Standardizarea procedurii de test pentru eșantioane de lapte sau zer amestecat:
- (a) o prediluție de 1/1 000 a serului OIEISS sau prediluție de 1/16 a serului OIEELISA<sub>WP</sub>SS sau o prediluție de 1/125 a serului OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizate într-un ser negativ (sau într-un amestec de seruri negative) și diluate din nou în proporție de 1/10 în lapte negativ trebuie să producă o reacție pozitivă;
- (b) serul OIEELISA<sub>N</sub>SS diluat în proporție de 1/10 în lapte negativ trebuie să producă întotdeauna o reacție negativă;
- (c) testul trebuie să fie în măsură să detecteze prezența unei infecții la un singur animal din grupul de animale de la care s-au combinat eșantioanele de lapte sau zer.
- 2.2.3. *Condițiile de utilizare a testelor ELISA în diagnosticul pentru bruceloza bovină:*
- 2.2.3.1. Dacă se utilizează condițiile de calibrare pentru testele ELISA descrise la punctele 2.2.2.1 și 2.2.2.2 pe eșantioane de ser, sensibilitatea de diagnostic a ELISA va fi egală sau superioară celei din testul RBT sau a testului CFT, având în vedere situația epidemiologică în care este utilizat.
- 2.2.3.2. Dacă se utilizează condițiile de calibrare pentru testele ELISA descrise la punctul 2.2.2.3 pe eșantioane de lapte amestecat, sensibilitatea de diagnostic a ELISA va fi egală sau superioară celei din testul MRT, având în vedere nu doar situația epidemiologică, ci și efectivele medii și ridicate ale sistemelor de creștere a animalelor prevăzute.
- 2.2.3.3. Dacă testele ELISA sunt utilizate în scopuri de certificare în conformitate cu articolul 6 alineatul (1) sau pentru înființarea și menținerea unui statut al șeptelului în conformitate cu anexa A partea II punctul 10, amestecul eșantioanelor de ser trebuie să fie realizat astfel încât rezultatele testelor să poată fi raportate în manieră clară la diferitele animale de la care provine laptele inclus în amestec. Orice test de confirmare trebuie să se efectueze pe eșantioanele de ser recoltate de la animale individuale.

<sup>(1)</sup> În sensul prezentei anexe, diluțiile date pentru alcătuirea reactivilor lichizi sunt exprimate, de exemplu, ca 1/150, ceea ce semnifică o diluție de 1 la 150.

2.2.3.4. Testele ELISA pot fi aplicate la un eșantion de lapte recoltat din laptele colectat de la o fermă cu cel puțin 30 % de vaci de lapte aflate în perioada de lactație. Dacă se utilizează această metodă, trebuie să se ia măsuri pentru ca eșantioanele recoltate pentru a fi examinate să fie raportate în manieră clară la diferitele animale de la care provine laptele. Orice test de confirmare trebuie să se efectueze pe eșantioanele de ser recoltate de la animale individuale.

### 2.3. Testul de fixare a complementului (CFT)

2.3.1. Antigenul reprezintă o suspensie bacteriană în soluție de fenol-salin [NaCl 0,85 % (m/v) și fenol la 0,5% (v/v)] sau într-un tampon veronal. Antigenii pot fi furnizați în stare concentrată cu condiția ca factorul de diluție utilizat să fie indicat pe eticheta flaconului. Antigenul trebuie să fie stocat la o temperatură de 4 °C. Nu se congelează.

2.3.2. Serurile trebuie să fie inactivate după cum urmează:

— serul bovin: la o temperatură între 56-60 °C, timp de 30-50 minute;

— serul porcine: la o temperatură de 60 °C, timp de 30-50 minute.

2.3.3. Pentru a obține o reacție satisfăcătoare în cadrul procedurii de testare, se va utiliza o doză de complement superioară dozei minime necesare pentru o hemoliză completă.

2.3.4. Următoarele controale vor fi efectuate în timpul testului de fixare a complementului:

(a) controlul efectului anticomplementar al serului;

(b) controlul antigenului;

(c) controlul hematiilor sensibilizate;

(d) controlul complementului;

(e) controlul sensibilității la începutul reacției cu ajutorul unui ser pozitiv;

(f) controlul specificității reacției cu ajutorul unui ser negativ.

### 2.3.5. Calcularea rezultatelor

Serul OIEISS conține 1 000 unități internaționale CFT (ICFTU) per ml. Dacă serul OIEISS este testat prin una dintre metodele menționate, rezultatul este exprimat sub forma unui titru (de exemplu, cea mai înaltă diluție directă a serului OIEISS, care produce 50 % hemoliză,  $T_{\text{OIEISS}}$ ). Rezultatul testului pentru serul de test dat ca titru ( $T_{\text{SERTEST}}$ ) trebuie să fie exprimat în ICFTU per ml. Pentru a converti exprimarea unui titru în ICFTU, factorul (F) necesar pentru a converti un titru de ser de test necunoscut ( $T_{\text{SERTEST}}$ ), testat prin această metodă, în exprimare ICFTU, se află din formula:

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

iar conținutul unităților internaționale CFT per ml de ser de test ( $\text{ICFTU}_{\text{SERTEST}}$ ), din formula:

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

### 2.3.6. Interpretarea rezultatelor

Un ser care conține 20 sau mai multe ICFTU per ml va fi considerat pozitiv.

### 2.4. Testul inelar efectuat pe proba de lapte (MRT)

2.4.1. Antigenul reprezintă o suspensie bacteriană în soluție de fenol-salin [NaCl 0,85 % (m/v) și fenol la 0,5 % (v/v)] colorat cu hematoxilină. Antigenul trebuie să fie stocat la o temperatură de 4 °C. Nu se congelează.

2.4.2. Sensibilitatea antigenului trebuie să fie standardizată în raport cu serul OIEISS, astfel încât antigenul să producă o reacție pozitivă cu o diluție de 1/500 a serului OIEISS în lapte negativ și o reacție negativă într-o diluție de 1/1 000.

- 2.4.3. Testul inelar trebuie să fie efectuat pe eşantioane reprezentative ale conţinutului fiecărui recipient de lapte şi ale fiecărui rezervor de exploatare din fermă.
- 2.4.4. Eşantioanele de lapte nu trebuie să fi fost congelate, încălzite sau agitate violent.
- 2.4.5. Reacţia trebuie să se realizeze utilizând una dintre metodele următoare:
- pe o coloană de lapte de cel puţin 25 mm înălţime şi pe un volum de lapte de 1 ml, la care s-au adăugat 0,03 ml sau 0,05 ml din unul dintre antigenii standard coloraţi;
  - pe o coloană de lapte de cel puţin 25 mm înălţime şi pe un volum de lapte de 2 ml, la care s-au adăugat 0,05 ml din unul dintre antigenii standard coloraţi;
  - pe un volum de lapte de 8 ml, la care s-au adăugat 0,08 ml din unul dintre antigenii standard coloraţi.
- 2.4.6. Amestecul de lapte şi antigen trebuie să fie incubat la 37 °C timp de 60 minute, cu seruri etalon pozitive şi negative. Sensibilitatea testului este sporită dacă incubaţia este menţinută la 4 °C timp de 16-24 ore.
- 2.4.7. Interpretarea rezultatelor:
- (a) reacţie negativă: lapte colorat, smântână incoloră;
  - (b) reacţie pozitivă:
    - lapte şi smântână colorate identic; sau
    - lapte incolor şi smântână colorată.
- 2.5. **Testul cu antigen brucelic tamponat [testul cu roz Bengal (RBT)]**
- 2.5.1. Antigenul constă într-o suspensie bacteriană într-un diluant antigen brucelic tamponat cu un pH de  $3,65 \pm 0,05$ , colorat cu roz Bengal. Antigenul se livrează pregătit de utilizare şi trebuie să fie stocat la 4 °C. Nu se congelează.
- 2.5.2. Antigenul se prepară fără a se face referire la concentraţia celulară, dar sensibilitatea sa trebuie să fie standardizată în raport cu serul OIEISS, astfel încât antigenul să producă o reacţie pozitivă cu o diluţie a serului de 1/45 şi o reacţie negativă cu diluţie de 1/55.
- 2.5.3. Testul RBT se va desfăşura astfel:
- (a) serul (20-30 µl) este amestecat cu un volum egal de antigen pe o placă albă sau placă emailată pentru a produce o zonă de aproximativ 2 cm în diametru. Amestecul este agitat uşor timp de patru minute la temperatură ambientală, apoi se iluminează corespunzător pentru a observa aglutinarea;
  - (b) o metodă automată este permisă, dar trebuie să beneficieze de acelaşi grad de sensibilitate şi acurateţe ca metoda manuală.
- 2.5.4. *Interpretarea rezultatelor*
- Orice reacţie vizibilă va fi considerată a fi pozitivă, cu excepţia situaţiei în care există uscare excesivă în jurul marginilor.
- În fiecare serie de teste vor fi incluse seruri etalon pozitive şi negative.
- 2.6. **Testul de seroaglutinare (SAT)**
- 2.6.1. Antigenul reprezintă o suspensie bacteriană în soluţie de fenol-salin [NaCl 0,85 % (m/v) şi fenol la 0,5 % (v/v)].
- Nu se foloseşte formaldehidă.
- Antigenii pot fi furnizaţi în stare concentrată cu condiţia ca factorul de diluţie utilizat să fie indicat pe eticheta flaconului.
- La suspensia de antigen se poate adăuga EDTA până la obţinerea unei diluări finale de 5 mM pentru a reduce rezultatele pozitive false ale testului de seroaglutinare. Ulterior, pH-ul trebuie să fie reajustat la 7,2 în suspensia de antigen.

- 2.6.2. Serul OIEISS conține 1 000 unități internaționale de aglutinare.
- 2.6.3. Antigenul se prepară fără a se face referire la concentrația celulară, dar sensibilitatea sa trebuie să fie standardizată în raport cu serul OIEISS, astfel încât antigenul să producă o aglutinare a serului de 50 % cu o diluție finală a serului între 1/600-1/1 000 sau o aglutinare de 75 % cu o diluție finală a serului între 1/500-1/750.

Se recomandă compararea reactivității noilor loturi de antigen și a loturilor standardizate anterior cu ajutorul unui grup de seruri definite.

- 2.6.4. Testul se va efectua în tuburi sau pe microplăci. Amestecul de antigen și diluții de ser va fi incubat la 37 °C timp de 16-24 ore.

Se vor pregăti cel puțin trei diluții pentru fiecare ser. Diluțiile de ser suspect trebuie să fie făcute astfel încât citirea reacției la limita de pozitivitate se va face în tubul median (sau în cavitățile intermediare în cazul metodei microplăcilor).

- 2.6.5. *Interpretarea rezultatelor:*

Gradul de aglutinare a *Brucella* într-un ser se va exprima în UI per ml.

Un ser care conține 30 sau mai multe UI per ml este considerat a fi pozitiv.

## 2.7. Testul de evaluare a fluorescenței în lumină polarizată (FPA)

- 2.7.1. Testul FPA poate fi efectuat în tuburi de sticlă sau pe o placă cu 96 de cavități. Tehnica utilizată, standardizarea acesteia și interpretarea rezultatelor trebuie să fie conforme celor specificate în capitolul 2.4.3 (bruceloză bovină) din Manualul de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre, ediția a șasea, 2008, al OIE.

- 2.7.2. *Standardizarea testului*

Testul FPA se va standardiza astfel încât:

- (a) serurile OIEELISA<sub>Sp</sub>SS și OIEELISA<sub>Wp</sub>SS produc constant rezultate pozitive;
- (b) o prediluție de 1/8 a serului OIEELISA<sub>Wp</sub>SS sau o prediluție de 1/64 a serului OIEELISA<sub>Sp</sub>SS, realizate într-un ser negativ (sau într-un amestec de seruri negative) trebuie să producă întotdeauna o reacție negativă;
- (c) serul OIEELISA<sub>N</sub>SS produce întotdeauna o reacție negativă.

În fiecare lot de teste se vor include: un ser etalon puternic pozitiv, slab pozitiv, negativ (calibrat în funcție de serurile etalon ELISA ale OIE).

## 3. TESTE COMPLEMENTARE

### 3.1. Testul cutanat al brucelozei (BST)

- 3.1.1. *Condițiile de utilizare ale BST*

- (a) Testul cutanat al brucelozei nu va fi utilizat pentru certificarea în vederea comerțului intracomunitar.
- (b) Testul cutanat al brucelozei este unul dintre cele mai specifice teste pentru detectarea brucelozei la animale nevaccinate; cu toate acestea, diagnosticul nu trebuie să se stabilească exclusiv pe baza reacțiilor intradermale pozitive.
- (c) Bovinele care au avut un rezultat negativ la unul dintre testele serologice definite în prezenta anexă, dar au avut o reacție pozitivă la BST, vor fi considerate a fi infectate sau suspecte de infecție.
- (d) Bovinele care au avut un rezultat pozitiv la unul dintre testele serologice definite în prezenta anexă pot fi supuse unui test BST pentru confirmarea interpretării rezultatelor testelor serologice; în special în cazurile în care nu poate fi exclusă o reacție încrucișată cu anticorpi împotriva altor bacterii din șeptelurile de bovine indemne sau oficial indemne de bruceloză.

- 3.1.2. Testul trebuie să fie efectuat utilizând un preparat alergenic standardizat și definit care nu conține antigen lipopolizaharidic (LPS) neted, deoarece acesta poate provoca reacții inflamatorii nespecifice sau interfera cu testele serologice ulterioare.

Cerințele privind prepararea de brucelină vor fi conforme cu secțiunea C1 a capitolului 2.4.3 din Manualul de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre, ediția a șasea, 2008, al OIE.

3.1.3. *Procedură de testare*

- 3.1.3.1. Se va injecta intradermic un volum de 0,1 ml de alergen de bruceloză în pliul caudal, pielea crupei sau în partea laterală a gâtului.

- 3.1.3.2. Testul va fi citit după 48-72 ore.

- 3.1.3.3. Grosimea pielii la locul injecției se va măsura cu un cutimetru, înaintea injectării și în momentul reexaminării.

- 3.1.3.4. Interpretarea rezultatelor:

Reacțiile puternice sunt ușor de recunoscut ca urmare a inflamării și întăririi pielii la nivel local.

Îngroșarea pielii cu 1,5-2 mm va fi considerată ca indicând o reacție pozitivă la BST.

3.2. **Testele de imunoabsorbție enzimatică de competiție (cELISA)**

- 3.2.1. *Condițiile de utilizare a testului cELISA*

Testul cELISA nu va fi utilizat pentru certificarea în vederea comerțului intracomunitar.

Bovinele care au avut un rezultat pozitiv la unul dintre testele serologice definite în prezenta anexă pot fi supuse unui test cELISA pentru confirmarea interpretării celorlalte rezultate ale testelor serologice, în special în cazurile în care nu poate fi exclusă, la șeptelurile de bovine indemne sau oficial indemne de bruceloză, o reacție încrucișată cu anticorpi împotriva altor bacterii sau pentru eliminarea reacțiilor cauzate de anticorpi reziduali produși ca urmare a vaccinării cu S19.

- 3.2.2. *Procedura de testare*

Testul se va desfășura în conformitate cu prescrierea descrisă în secțiunea B punctul 2 din capitolul 2.4.3 al Manualului de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre, ediția a șasea, 2008 al OIE.”

2. În anexa C la Directiva 64/432/CEE, punctul 4.1 se înlocuiește cu următorul:

„4.1. **Sarcini și responsabilități**

Laboratoarele naționale de referință vor fi responsabile pentru:

- (a) aprobarea rezultatelor studiilor de validare care demonstrează fiabilitatea metodei de test utilizată în statul membru;
  - (b) determinarea numărului maxim de eșantioane care pot fi amestecate în kiturile ELISA utilizate;
  - (c) calibrarea serurilor etalon menționate la punctul 2.1.6;
  - (d) verificările de calitate ale tuturor antigenilor și ale loturilor de kituri ELISA utilizate în statul membru;
  - (e) urmarea recomandărilor laboratoarelor comunitare de referință pentru bruceloză și cooperarea cu acestea.”
-