

KOMMISJONSFORORDNING (EF) nr. 535/2002

2005/EØS/9/25

av 21. mars 2002

om endring av vedlegg C til rådsdirektiv 64/432/EØF, og om endring av vedtak 2000/330/EF(*)

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 64/432/EØF av 26. juni 1964 om dyrehelseproblemer ved handel med storfe og svin innenfor Fellesskapet⁽¹⁾, sist endret ved kommisjonsvedtak 2001/298/EF⁽²⁾, særlig artikkel 16 nr. 1 annet ledd, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) 11. oktober 1999 vedtok Vitenskapskomiteen for dyrs helse og velferd en rapport⁽³⁾ om endring av de tekniske vedleggene til direktiv 64/432/EØF for å ta hensyn til den vitenskapelige utviklingen i forbindelse med tuberkulose, brucellose og enzootisk bovin leukose.
- 2) Ifølge ovennevnte rapport bør prøvene for brucellose foretas i samsvar med Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, tredje utgave, 1996, fra Det internasjonale kontor for epizootier (OIE).
- 3) I august 2001 offentliggjorde OIE fjerde utgave, 2000, av denne håndboken som inneholder visse endringer i beskrivelsen av prøver for brucellose.
- 4) Vedlegg C til direktiv 64/432/EØF bør derfor endres for å fastsette prøvemetoder som skal gjelde ved overvåking og handel innenfor Fellesskapet, og som så langt det er mulig gjenspeiler OIE-standardene, men som også tar hensyn til rådene fra Vitenskapskomiteen og fra medlemsstatenes nasjonale referanselaboratorier som samarbeider innenfor rammen av Den europeiske unions nettverk av nasjonale referanselaboratorier for brucellose.

5) Kommisjonsvedtak 2000/330/EF av 18. april 2000 om godkjenning av prøver for påvisning av antistoffer mot bovin brucellose innenfor rammen av rådsdirektiv 64/432/EØF⁽⁴⁾ bør derfor endres.

6) Tiltakene fastsatt i denne forordning er i samsvar med uttalelse fra Den faste veterinærkomité —

VEDTATT DENNE FORORDNING:

Artikkel 1

Vedlegg C til direktiv 64/432/EØF erstattes med vedlegget til denne forordning.

Artikkel 2

I vedtak 2000/330/EF gjøres følgende endringer:

1. Artikkel 1 skal lyde:

«Artikkel 1

Komplementbindingsprøven, de bufrede brucella-antigenprøvene og ELISA-prøvene som foretas i samsvar med bestemmelsene i vedlegg C til direktiv 64/432/EØF, godkjennes med henblikk på utstedelse av et sertifikat.»

2. Vedlegget oppheves.

Artikkel 3

Denne forordning trer i kraft den 20. dag etter at den er kunngjort i *De Europeiske Fellesskaps Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle deler og kommer direkte til anvendelse i alle medlemsstater.

Utfærdiget i Brussel, 21. mars 2002.

For Kommisjonen

David BYRNE

Medlem av Kommisjonen

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 80 av 23.3.2002, s. 22, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 30/2003 av 14. mars 2003 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitære forhold), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 29 av 5.6.2003, s. 17.

⁽¹⁾ EFT 121 av 29.7.1964, s. 1977/64.

⁽²⁾ EFT L 102 av 12.4.2001, s. 63.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

⁽⁴⁾ EFT L 114 av 13.5.2000, s. 37.

VEDLEGG

«VEDLEGG C

BRUCELLOSE

1. BESTEMMELSE AV AGENSEN

Dersom det ved hjelp av modifisert syrefast eller immunspesifikk farging påvises organismer med brucellamorfologi i abortmateriale, vaginalvæske eller melk, er det overveiende sannsynlighet for brucellose, særlig dersom diagnosen støttes av serologiske prøver.

Etter isolasjon bør arter og biovar bestemmes ved hjelp av lysering av bakterievirus og/eller oksidative stoffskifteundersøkelser, dyrkingskriterier og biokjemiske og serologiske kriterier.

Metodene og mediene som brukes, standardiseringen av disse og tolkingen av resultatene skal være i samsvar med OIEs Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, fjerde utgave, 2000, kapittel 2.3.1 (brucellose hos storfe), kapittel 2.4.2 (brucellose hos geit og sau) og kapittel 2.6.2 (brucellose hos svin).

2. IMMUNOLOGISKE PRØVER

2.1 Standarder

2.1.1. *Brucella abortus*-biovar 1 Weybridge-stamme nr. 99 eller USDA-stamme 1119-3 skal brukes til framstilling av alle antigener som brukes i Rose Bengal-prøven (RBT), serumagglutinasjonsprøven (SAT), komplementbindingsprøven (CFT) og melkeringprøven (MRT).

2.1.2. Standardreferanseserum for RBT, SAT, CFT og MRT er OIEs internasjonale standardreferanseserum (OIEISS) som tidligere ble kalt WHO annet internasjonale anti-*Brucella abortus*-serum (ISAbS).

2.1.3. Standardreferanseserene for ELISA-prøvene er:

- OIEISS,
- OIEs svakt positive ELISA-standardserum (OIEELISA_{WP}SS),
- OIEs sterkt positive ELISA-standardserum (OIEELISA_{SP}SS),
- OIEs negative ELISA-standardserum (OIEELISA_NSS).

2.1.4. Ovennevnte standardsera er tilgjengelige fra Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Det forente kongerike.

2.1.5. OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{SP}SS og OIEELISA_NSS er internasjonale primærstandarder som skal brukes til å fastsette nasjonale sekundære referansestandarder («arbeidsstandarder») for hver prøve i de enkelte medlemsstatene.

2.2. Enzymmerkede antistoffprøver (ELISA) eller andre bindingsprøver for påvisning av bovin brucellose i serum eller melk

2.2.1. Materiale og reagenser

Metoden som brukes, og tolkingen av resultatene skal være godkjent i samsvar med prinsippene fastsatt i kapittel 1.1.3 i OIEs Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, fjerde utgave, 2000, og bør minst omfatte laboratorieundersøkelser og diagnostiske undersøkelser.

2.2.2. Standardisering av prøven

2.2.2.1. Standardisering av prøvemethoden for individuelle serumprøver:

- a) en fortykning av OIEISS i forholdet 1:150⁽¹⁾ eller en fortykning av OIEELISA_{WP}SS i forholdet 1:2 eller en fortykning av OIEELISA_{SP}SS i forholdet 1:16 i et negativt serum (eller i en negativ serumblending) skal gi en positiv reaksjon,
- b) en fortykning av OIEISS i forholdet 1:600 eller en fortykning av OIEELISA_{WP}SS i forholdet 1:8 eller en fortykning av OIEELISA_{SP}SS i forholdet 1:64 i et negativt serum (eller i en negativ serumblending) skal gi en negativ reaksjon,

⁽¹⁾ Fortyninger som brukes til å skape flytende reagenser, uttrykkes i dette vedlegget som for eksempel 1:150, som betyr en fortykning på 1 til 150.

- c) OIEELISA_NSS skal alltid gi en negativ reaksjon.

2.2.2.2. Standardisering av prøvemethoden for blandede serumprøver:

- a) en fortynning av OIEISS i forholdet 1:150 eller en fortynning av OIEELISA_{WP}SS i forholdet 1:2 eller en fortynning av OIEELISA_{SP}SS i forholdet 1:16 i et negativt serum (eller i en negativ serumblending) som igjen er fortynnet i negative sera med antallet prøver som inngår i blandingen, skal gi en positiv reaksjon,
- b) OIEELISA_NSS skal alltid gi en negativ reaksjon,
- c) prøven skal være tilstrekkelig til å påvise infeksjon hos ett enkelt dyr i den gruppen dyr som serumprøvene i blandingen er tatt fra.

2.2.2.3. Standardisering av prøvemethoden for blandede melke- eller myseprøver:

- a) en fortynning av OIEISS i forholdet 1:1000 eller en fortynning av OIEELISA_{WP}SS i forholdet 1:16 eller en fortynning av OIEELISA_{SP}SS i forholdet 1:125 i et negativt serum (eller i en negativ serumblending) som igjen er fortynnet i forholdet 1:10 i negativ melk, skal gi en positiv reaksjon,
- b) OIEELISA_NSS fortynnet i forholdet 1:10 i negativ melk skal alltid gi en negativ reaksjon,
- c) prøven skal være tilstrekkelig til å påvise infeksjon hos ett enkelt dyr i den gruppen dyr som melke- eller myseprøvene i blandingen er tatt fra.

2.2.3. *Vilkår for bruk av ELISA-prøver for diagnostisering av bovin brucellose*

2.2.3.1. Ved bruk av ovennevnte kalibreringsvilkår for ELISA-prøver på serumprøver, skal den diagnostiske følsomheten ved ELISA-prøven være like stor eller større enn ved RBT eller CFT, idet det tas hensyn til den epidemiologiske situasjonen som prøven brukes i.

2.2.3.2. Ved bruk av ovennevnte kalibreringsvilkår for ELISA-prøver på blandede melkeprøver, skal den diagnostiske følsomheten ved ELISA-prøven være like stor eller større enn ved MRT, idet det ikke bare tas hensyn til den epidemiologiske situasjonen, men også til gjennomsnittlige og forventet ekstreme husdyrholdsystemer.

2.2.3.3. Dersom ELISA-prøvene brukes med henblikk på utstedelse av et sertifikat i samsvar med artikkel 6 nr. 1, eller med henblikk på etablering og bevaring av en besetningsstatus i samsvar med vedlegg A del II nr. 10, skal serumprøvene blandes på en slik måte at prøveresultatene med sikkerhet kan spores tilbake til det enkelte dyr i blandingen. Eventuelle bekreftende prøver skal foretas på serumprøver fra enkeltdyr.

2.2.3.4. ELISA-prøver kan brukes på en melkeprøve tatt fra melk som er samlet inn fra en driftsenhet der minst 30 % av kuene er i laktasjon. Dersom denne metoden brukes, skal det treffes tiltak for å sikre at prøvene som tas ut for undersøkelse, med sikkerhet kan spores tilbake til enkeltdyrene som melken stammer fra. Eventuelle bekreftende prøver skal foretas på serumprøver fra enkeltdyr.

2.3. **Komplementbindingsprøve (CFT)**

2.3.1. Antigenet består av en bakteriell suspensjon i fenol-saltløsning (NaCl 0,85 % (m/v) tilsatt 0,5 % (v/v) fenol) eller i en veronal bufferløsning. Antigenene kan leveres i konsentrert form, forutsatt at fortynningsfaktoren som skal brukes, er oppført på flaskens etikett. Antigenet skal oppbevares ved 4 °C og ikke fryses.

2.3.2. Seraene skal inaktiveres slik:

- serum fra storfe: 56–60 °C i 30–50 minutter,
- serum fra svin: 60 °C i 30–50 minutter.

2.3.3. For å oppnå en riktig reaksjon, bør det brukes en komplementærdose som er større enn det minimum som er nødvendig til fullstendig hemolyse.

2.3.4. Hver gang komplementbindingsprøven utføres, skal disse kontrollene foretas:

- a) kontroll av serumets antikomplementære virkning,
- b) kontroll av antigenet,
- c) kontroll av de sensibiliserte røde blodlegemene,
- d) kontroll av komplementet,
- e) kontroll av følsomheten ved hjelp av et positivt serum når reaksjonen begynner,
- f) kontroll av reaksjonens spesifisitet ved hjelp av et negativt serum.

2.3.5. Beregning av resultater

OIEISS inneholder 1 000 internasjonale CFT-enheter (ICFTU) per ml. Dersom OIEISS prøves etter en gitt metode, angis resultatet som en titer (T_{OIEISS}). Prøveresultatet for prøveserumet angitt som titer ($T_{\text{PRØVESERUM}}$), skal uttrykkes i ICFTU per ml. For å regne om en titer til ICFTU, kan faktoren (F) som kreves for å omregne titeren for et ukjent prøveserum ($T_{\text{PRØVESERUM}}$) som er prøvd etter denne metoden, til ICFTU, finnes ved formelen:

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

og innholdet av internasjonale CFT-enheter per ml prøveserum ($\text{ICFTU}_{\text{PRØVESERUM}}$) finnes ved formelen:

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

2.3.6. Tolking av resultater

Et serum som inneholder 20 ICFTU per ml eller mer, anses som positivt.

2.4. Melkeringsprøve (MRT)

2.4.1 Antigenet består av en bakteriell suspensjon i fenol-saltløsning (NaCl 0,85 % (m/v) tilsatt 0,5 % (v/v) fenol) farget med hematoksylin. Antigenet skal oppbevares ved 4 °C og ikke fryses.

2.4.2 Antigenets følsomhet skal standardiseres i forhold til OIEISS på en slik måte at antigenet gir en positiv reaksjon med en fortykning av OIEISS i forholdet 1:500 i negativ melk og en negativ reaksjon med en fortykning i forholdet 1:1 000.

2.4.3 Ringprøven skal foretas på prøver som er representative for innholdet i hvert melkespann eller innholdet i hver samletank fra driftsenheten.

2.4.4 Melkeprøvene må ikke ha vært fryst, oppvarmet eller ristet kraftig.

2.4.5 Reaksjonen skal utføres ved hjelp av en av følgende metoder:

- på en melkesøyle som er minst 25 mm høy, og med en melkemengde på 1 ml, som er tilsatt 0,03 ml eller 0,05 ml av ett av de standardiserte, fargede antigenene,
- på en melkesøyle som er minst 25 mm høy, og med en melkemengde på 2 ml, som er tilsatt 0,05 ml av ett av de standardiserte, fargede antigenene,
- på en melkemengde på 8 ml som er tilsatt 0,08 ml av ett av de standardiserte, fargede antigenene.

2.4.6 Blandingen av melk og antigener skal inkuberes ved 37 °C i 60 minutter sammen med positive og negative arbeidsstandarder. Inkubasjon i ytterligere 16-24 timer ved 4 °C øker prøvens følsomhet.

2.4.7 Tolking av resultatene:

- a) negativ reaksjon: melken er farget, fløten er avfarget,
- b) positiv reaksjon:
 - melken og fløten er farget på samme måte, eller
 - melken er avfarget og fløten er farget.

2.5. Rose Bengal-prøve (RBT)

2.5.1 Antigenet består av en bakteriell suspensjon i en bufret brucella-antigenløsning med en pH på $3,65 \pm 0,05$ farget med Rose Bengal-farge. Antigenet skal leveres klart til bruk og skal oppbevares ved 4 °C og ikke fryses.

2.5.2 Antigenet skal framstilles uten hensyn til cellekonsentrasjonen, men følsomheten skal standardiseres i forhold til OIEISS på en slik måte at antigenet gir en positiv reaksjon med en serumfortynning i forholdet 1:45 og en negativ reaksjon med en fortykning i forholdet 1:55.

2.5.3 RBT-prøven skal foretas slik:

- a) serum (20-30 μl) blandes med en tilsvarende mengde antigen på en hvit eller emaljert plate slik at det dannes en flate med en diameter på omtrent 2 cm. Blandingen vipres lett i 4 minutter ved romtemperatur og avleses deretter for agglutinasjon ved god belysning,
- b) det kan brukes en automatisert metode, men den må ha minst samme følsomhet og være minst like nøyaktig som den manuelle metoden.

2.5.4. *Tolking av resultater*

Enhver synlig reaksjon anses som positiv, med mindre det er ekstraordinær tørking i kantene.

Positive og negative arbeidsstandarder bør tas med i hver prøveserie.

2.6. **Serumagglutinasjonsprøve (SAT)**

- 2.6.1. Antigenet består av en bakteriell suspensjon i fenol-saltløsning (NaCl 0,85 % (m/v) tilsatt 0,5 % (v/v) fenol). Formaldehyd må ikke brukes.

Antigenene kan leveres i konsentrert form, forutsatt at fortynningsfaktoren som skal brukes, er oppført på flaskens etikett.

Antigensuspensjonen kan tilsettes EDTA til en endelig prøvekonsentrasjon på 5 mM for å redusere antallet falske positive prøveresultater. Antigensuspensjonens pH justeres deretter på nytt til 7,2.

- 2.6.2. OIEISS inneholder 1 000 internasjonale agglutinasjonsenheter.

- 2.6.3. Antigenet skal framstilles uten hensyn til cellekonsentrasjonen, men følsomheten skal standardiseres i forhold til OIEISS på en slik måte at antigenet enten gir 50 % agglutinasjon med en endelig serumfortynning på mellom 1:600 og 1:1 000 eller 75 % agglutinasjon med en endelig serumfortynning på mellom 1:500 og 1:750.

Det kan også være tilrådelig å sammenligne reaktiviteten til nye og tidligere standardiserte antigenpartier ved hjelp av en gruppe definerte sera.

- 2.6.4. Prøven foretas enten i reagensglass eller på mikroplater. Blandingen av antigen og serumfortynninger skal inkuberes i 16-24 timer ved 37 °C.

Det skal tilberedes minst tre fortynninger for hvert serum. Fortynninger av serum under mistanke skal lages på en slik måte at reaksjonen ved positivitetsgrensen avleses i det midterste reagensglasset (eller den midterste fordypningen ved bruk av metoden med mikroplater).

2.6.5. *Tolking av resultater*

Graden av brucella-agglutinasjon i et serum skal uttrykkes i IE per ml.

Et serum som inneholder 30 IE per ml eller mer, anses som positivt.

3. TILLEGGSPRØVER

3.1. **Brucellose-intradermalprøve (BST)**

3.1.1. *Vilkår for bruk av BST*

- Brucellose-intradermalprøven skal ikke brukes med henblikk på utstedelse av et sertifikat for handel innenfor Fellesskapet.
- Brucellose-intradermalprøven er en av de mest spesifikke prøvene for påvisning av brucellose hos uvaksinerte dyr, men diagnosen bør ikke stilles bare på grunnlag av positive intradermale reaksjoner.
- Storfe som har reagert negativt på en av de serologiske prøvene definert i dette vedlegg, og som reagerer positivt på BST, anses som angrepet.
- Storfe som har reagert positivt på en av de serologiske prøvene definert i dette vedlegg, kan gjennomgå en BST-prøve som støtte for tolkingen av resultatene av de serologiske prøvene, særlig dersom en kryssreaksjon med antistoffer mot andre bakterier ikke kan utelukkes i brucellosefrie eller offisielt brucellosefrie besetninger.

- 3.1.2. Prøven skal foretas ved hjelp av et standardisert og definert brucellose-allergenpreparat som ikke inneholder glatt lipopolysakkarid-antigen (LPS), ettersom det kan framkalle uspesifikke betennelsesreaksjoner eller forstyrre senere serologiske prøver.

Brucellin INRA er et slikt preparat som er framstilt av en ru *B. melitensis*-stamme. Framstillingskravene er beskrevet i del B2 i kapittel 2.4.2 i OIEs Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, fjerde utgave, 2000.

3.1.3. *Prøvemethode*

- 3.1.3.1. 0,1 ml brucellose-allergen injiseres intradermalt i halerotsfolden, flanken eller siden av halsen.

- 3.1.3.2. Prøven leses av etter 48-72 timer.

- 3.1.3.3. Hudtykkelsen på injeksjonsstedet måles med skyvelære før injeksjonen og ved den påfølgende undersøkelsen.

3.1.3.4. Tolking av resultatene:

Sterke reaksjoner gjenkjennes lett ved lokal hevelse og hardhet.

En hudtykkelse på 1,5-2 mm anses som en positiv reaksjon på BST.

3.2. **Kompetitiv ELISA-prøve (cELISA)**3.2.1. *Vilkår for bruk av cELISA*

- a) cELISA-prøven skal ikke brukes med henblikk på utstedelse av et sertifikat for handel innenfor Fellesskapet.
- b) cELISA-prøven har vist seg å være mer spesifikk enn for eksempel den indirekte ELISA-prøven og kan derfor brukes som støtte for tolkingen av resultatene av de serologiske prøvene.

3.2.2. *Prøvemethode*

Prøven skal foretas i samsvar med bestemmelsene i kapittel 2.3.1 nr. 2 bokstav a) i OIEs Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, fjerde utgave, 2000.

4. NASJONALE REFERANSELABORATORIER

4.1. **Oppgaver og ansvar**

De nasjonale referanselaboratoriene skal være ansvarlige for følgende:

- a) godkjenning av resultatene av valideringsundersøkelsene som dokumenterer at prøvemethoden som brukes i medlemsstaten, er pålitelig,
- b) fastsettelse av høyeste antall prøver som kan samles i ELISA-prøvesettene som brukes,
- c) kalibrering av de nasjonale sekundære referansestandardseraene («arbeidsstandarder») i forhold til det internasjonale primærstandardserumet nevnt i nr. 2.1,
- d) kvalitetskontroll av alle antigener og partier av ELISA-prøvesett som brukes i medlemsstaten,
- e) samarbeid innenfor Den europeiske unions nettverk av nasjonale referanselaboratorier for brucellose.

4.2. **Liste over nasjonale referanselaboratorier**

BELGIA

Centre d'études et de recherches vétérinaires et agrochimiques (CERVA/CODA)
Groeselenberg 99
B-1180 Bruxelles/Brussel

DANMARK

Danish Veterinary Institute
Bulowsvej 27
DK-1790 København

TYSKLAND

Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV)
Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor für Brucellose
Postfach 33 00 13
D-14191 Berlin

HELLAS

Veterinary Laboratory of Larissa
Department of Microbiology
6th km of National Road Larissa-Trikala
GR-4111 10 Larissa

SPANIA

Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe
Camino del Jau S/N
E-18320 Santa Fe (Granada)

FRANKRIKE

Laboratoire national et OIE/FAO de référence pour la brucellose
Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)
BP 67
F-94703 Maisons-Alfort Cedex

IRLAND

Brucellosis Laboratory
Model Farm Road
Cork
Irland

ITALIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise
Via Campo Boario
I-64100 Teramo

LUXEMBOURG

State Laboratory for Veterinarian Medicine
54, avenue Gaston Diderich
BP 2081
L-1020 Luxembourg

NEDERLAND

Centraal Instituut DierziekteControle
CIDC-Lelystad
Houtribweg 39
PO Box 2004
8203 AA Lelystad
Nederland

ØSTERRIKE

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen
Robert-Koch-Gasse 17
A-2340 Modling

PORTUGAL

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV)
Estrada de Benfica, n.º 701
P-1549-011 Lisboa

FINLAND

National Veterinary and Food Research Institute
Hämeentie 57
PO Box 45
FIN-00581 Helsinki

SVERIGE

National Veterinary Institute
S-751 89 Uppsala

DET FORENTE KONGERIKE

- 1) FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis
Veterinary Laboratories Agency
New Haw
Addlestone
Surrey KT15 3NB
Det forente kongerike
 - 2) Immunodiagnosics Department
Veterinary Sciences Division
Stoney Road Stormont
Belfast BT4 3SD
Det forente kongerike»
-