

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 535/2002

ze dne 21. března 2002,

kterým se mění příloha C směrnice Rady 64/432/EHS a rozhodnutí 2000/330/ES

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na s ohledem na směrnici Rady 64/432/EHS ze dne 26. června 1964 o veterinárních otázkách obchodu se skotem a prasaty uvnitř Společenství¹, naposledy pozměněnou rozhodnutím Komise 2001/298/ES², a zejména na čl. 16 odst. 1 druhý pododstavec uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) dne 11. října 1999 přijal Vědecký výbor pro otázky zdraví a dobré životní podmínky zvířat zprávu³ o změně technických příloh směrnice 64/432/EHS na základě výsledků vědeckého vývoje v oblasti tuberkulózy, brucelózy a enzootické leukózy skotu;
- (2) podle uvedené zprávy by měly být testy na brucelózu prováděny podle Příručky standardů pro diagnostické testy a očkovací látky vydaného Mezinárodním úřadem pro nákazy zvířat (OIE) ve třetím vydání v roce 1996;
- (3) v srpnu roku 2001 vydal OIE čtvrté vydání z roku 2000 zmíněné příručky s některými změnami v popisu testů na brucelózu;
- (4) bylo tudíž nezbytné změnit přílohu C směrnice 64/432/EHS a stanovit postupy testování pro dohled a pro účely obchodu uvnitř Společenství s maximálním přihlédnutím k normám OIE, ale také k doporučením Vědeckého výboru a národních referenčních laboratoří v členských státech spolupracujících v rámci Sítě národních referenčních laboratoří Evropské unie pro brucelózu;
- (5) rozhodnutí Komise 2000/330/ES ze dne 18. dubna 2000, kterým se schvalují testy k detekci protilátek proti brucelóze skotu v rámci směrnice Rady 64/432/EHS⁴ by tudíž mělo být změněno;
- (6) opatření tohoto nařízení jsou v souladu se stanoviskem Stálého veterinárního výboru,

¹ Úř. věst. 121, 29. 7. 1964, s. 1977/64.

² Úř. věst. L 102, 12. 4. 2001, s. 63.

³ SANCO/B3/R10/1999.

⁴ Úř. věst. L 114, 13. 5. 2000, s. 37.

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Příloha C směrnice 64/432/EHS se nahrazuje přílohou tohoto nařízení.

Článek 2

Rozhodnutí 2000/330/ES se mění takto:

1. Článek 1 se nahrazuje tímto:

„Článek 1

Test reakce vazby komplementu, testy s pufrovaným brucelovým antigenem a testy ELISA prováděné v souladu s ustanoveními přílohy C směrnice 64/432/EHS se tímto schvalují pro účely osvědčování.“

2. Příloha se zrušuje.

Článek 3

Toto nařízení vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 21. března 2002.

Za Komisi
David BYRNE
člen Komise

PŘÍLOHA

„PŘÍLOHA C

BRUCELÓZA

1. IDENTIFIKACE PŮVODCE

Prokázání mikroorganismů s morfologií *Brucelly* na základě modifikovaného kyselého nebo imunspecifického barvení v materiálu z abortů, výtoků z pochvy nebo v mléce zakládá domněnku výskytu brucelózy, zvláště je-li podpořeno sérologickými testy.

Po izolaci by se měl příslušný druh nebo biovar identifikovat lýzou fágů a/nebo testy oxidativního metabolismu, kultivačními, biochemickými a sérologickými kritérii.

Postupy a použitá média, jejich standardizace a výklad výsledků musí odpovídat ukazatelům, které jsou specifikovány v Příručce standardů pro diagnostické testy a očkovací látky OIE, čtvrté vydání z roku 2000, v kapitole 2.3.1 (brucelóza skotu), v kapitole 2.4.2 (brucelóza koz a ovcí) a v kapitole 2.6.2 (brucelóza prasat).

2. IMUNOLOGICKÉ TESTY

2.1 Standardy

2.1.1 K přípravě všech antigenů použitých v testu s bengálskou červení (RBT), v séroaglutinačním testu (SAT), v testu reakce vazby komplementu (CFT) a v kroužkovém testu s mlékem (MRT) musí být použit *Brucella abortus* biovar 1 kmen Weybridge č. 99 nebo kmen USDA 1119-3.

2.1.2 Standardním referenčním sérem pro testy RMT, SAT a MRT je mezinárodní referenční standardní sérum OIE (OIEISS), původně zvané druhé mezinárodní anti-*Brucella abortus* sérum WHO (ISAbS).

2.1.3 Standardními referenčními séry pro testy ELISA jsou:

- OIEISS,
- slabě pozitivní standardní sérum OIE ELISA (OIEELISA_{WPSS}),
- silně pozitivní standardní sérum OIE ELISA (OIEELISA_{SPSS}),
- negativní standardní sérum OIE ELISA (OIEELISA_{NSS}).

2.1.4 Výše uvedená standardní séra je možno získat od Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Spojené království.

2.1.5 Standardy OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{SP}SS, a OIEELISA_NSS jsou mezinárodními primárními standardy, ze kterých musí vycházet sekundární referenční národní standardy („pracovní standardy“) pro každý z testů v každém ze členských států.

2.2 Enzymoimunoanalýzy (testy ELISA) nebo jiné aglutinační testy k detekci brucelózy skotu v séru nebo mléce

2.2.1 *Materiál a reakční činidla*

Je nutné, aby použitá metoda a výklad výsledků byly validovány v souladu s principy uvedenými v kapitole 1.1.3 Příručky standardů pro diagnostické testy a očkovací látky OIE, čtvrté vydání z roku 2000, a měly by přinejmenším zahrnovat laboratorní a diagnostické studie.

2.2.2 *Standardizace testu*

2.2.2.1 Standardizace postupu testu pro jednotlivé vzorky séra:

- a) předředění 1/150⁵ u OIEISS nebo předředění 1/2 u OIEELISA_{WP}SS nebo předředění 1/16 u OIEELISA_{SP}SS připravené v negativním séru (nebo ve směsi negativních sér) by mělo dát pozitivní reakci;
- b) předředění 1/600 u OIEISS nebo předředění 1/8 u OIEELISA_{WP}SS nebo předředění 1/64 u OIEELISA_{SP}SS připravené v negativním séru (nebo ve směsi negativních sér) by mělo dát negativní reakci;
- c) OIEELISA_NSS by měla dát vždy negativní reakci.

2.2.2.2 Standardizace postupu testu pro vzorky směsného séra:

- a) předředění 1/150 u OIEISS nebo předředění 1/2 u OIEELISA_{WP}SS nebo předředění 1/16 u OIEELISA_{SP}SS připravené v negativním séru (nebo ve směsi negativních sér) a znovu zředěné v negativním séru počtem vzorků tvořících směs by mělo dát pozitivní reakci;
- b) OIEELISA_NSS by měla dát vždy negativní reakci;
- c) test musí být schopný prokázat infekci u jednotlivého zvířete ze skupiny zvířat, od kterých byly vzorky séra dány do směsi.

2.2.2.3 Standardizace postupu testu pro vzorky směsi mléka nebo syrovátky:

- a) předředění 1/1000 u OIEISS nebo předředění 1/16 u OIEELISA_{WP}SS nebo předředění 1/125 u OIEELISA_{SP}SS připravené v negativním séru (nebo směsi negativních sér) a znovu zředěné 1/10 v negativním mléce by mělo dávat pozitivní reakci;

⁵ Pro účely této přílohy jsou ředění stanovená pro vytváření tekutých reakčních činidel vyjádřena tak, že např. 1/150 znamená ředění 1 na 150.

- b) OIEELISA_{NSS} zředěná 1/10 v negativním mléce by měla vždy dávat negativní reakci;
- c) test musí být schopný prokázat infekci u jednotlivého zvířete ze skupiny zvířat, od kterých byly vzorky mléka nebo syrovátky smíchány do směsi.

2.2.3 Podmínky pro použití testů ELISA pro diagnostiku brucelózy skotu:

- 2.2.3.1 Při použití výše uvedených podmínek kalibrace pro testy ELISAS na vzorcích séra se diagnostická citlivost testu ELISA musí rovnat citlivosti RBT nebo SFT nebo být vyšší s přihlédnutím k epizootologické situaci, za které je test používán.
- 2.2.3.2 Při použití výše uvedených podmínek kalibrace pro test ELISA na směsných vzorcích mléka se diagnostická citlivost testu ELISA musí rovnat citlivosti MRT nebo být vyšší s přihlédnutím nejen k epizootologické situaci, ale také k průměrným nebo vysokým počtům zvířat posuzovaných chovů.
- 2.2.3.3 Pokud se testy ELISA používají pro účely osvědčování v souladu s čl. 6 odst. 1 nebo pro uznání a udržení statusu chovu v souladu s přílohou A kapitolou II bodem 10 se vkládání vzorků séra do směsi musí provádět takovým způsobem, aby výsledky testu měly nepochybný vztah k jednotlivému zvířeti zahrnutému ve směsném vzorku. Případný potvrzovací test se musí provádět na vzorcích séra odebraných od jednotlivých zvířat.
- 2.2.3.4 Testy ELISA mohou být používány na vzorku mléka odebraného z mléka shromážděného z hospodářství s nejméně 30 % dojnic v laktaci. Používá-li se tato metoda, musí být učiněna opatření pro zajištění toho, aby se vzorky nepochybně vztahovaly k jednotlivým zvířatům, od kterých mléko pochází. Případný potvrzovací test se musí provádět na vzorcích séra odebraných od jednotlivých zvířat.

2.3 Test reakce vazby komplementu (CFT)

- 2.3.1 Antigen představuje bakteriální suspenzi v solném roztoku s fenolem (NaCl 0,85 % (hmot./obj.) a fenol při 0,5 % (obj./obj.) nebo ve veronalovém pufru. Antigeny mohou být dodávány v koncentrovaném stavu za předpokladu, že faktor ředění, který má být použit, je uveden na etiketě lahvičky. Antigen musí být skladován při teplotě 4 °C a nesmí zmrznout.
- 2.3.2 Sérum se musí inaktivovat takto:
 - sérum skotu: 56 až 60 °C po dobu 30 až 50 minut,
 - sérum prasat: 60 °C po dobu 30 až 50 minut.
- 2.3.3 K provedení věrohodné reakce během postupu testu by se měla použít dávka komplementu vyšší, než je minimum potřebné k úplné hemolýze.

2.3.4. Při provádění testu reakce vazby komplementu musí být pokaždé provedeny tyto kontroly:

- a) kontrola antikomplementárního účinku séra;
- b) kontrola antigenu;
- c) kontrola senzibilizovaných červených krvinek;
- d) kontrola komplementu;
- e) kontrola citlivosti na počátku reakce při použití pozitivního séra;
- f) kontrola specifity reakce použitím negativního séra.

2.3.5 *Výpočet výsledků*

OIEISS obsahuje 1 000 mezinárodních jednotek CFT (ICFTU) na 1 ml. Je-li danou metodou testováno OIEISS, udává se výsledek jako titr (T_{OIEISS}). Výsledek testu pro testované sérum dané jako titr ($T_{\text{TESTSERUM}}$) musí být vyjádřen v ICFTU na 1 ml. Za účelem převodu vyjádření titru na ICFTU je možno faktor F nutný k převodu titru neznámého testovaného séra ($T_{\text{TESTSERUM}}$), které se takovou metodou testuje, zjistit ze vzorce:

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

a obsah mezinárodních jednotek CFT na ml séra v testu ($\text{ICFTU}_{\text{TESTSERUM}}$) ze vzorce:

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

2.3.6 *Výklad výsledků*

Sérum obsahující 20 nebo více ICFTU na 1 ml se považuje za pozitivní.

2.4 **Kroužkový test mléka**

2.4.1 Antigen představuje bakteriální suspenzi v solném roztoku s fenolem (NaCl 0,85 % (hmot./obj.) a fenol při 0,5 % (obj./obj.) a je barven hematoxylinem. Musí být skladován při teplotě 4 °C a nesmí zmrznout.

2.4.2 Citlivost antigenu musí být standardizována ve vztahu k OIEISS takovým způsobem, že antigen vytváří pozitivní reakci s ředěním OIEISS 1/500 v negativním mléce, zatímco ředění 1/1000 by mělo být negativní.

2.4.3 Kroužkový test musí být proveden na vzorcích představujících obsah každé konve mléka nebo obsah každého ze směsných nádrží z příslušného hospodářství.

2.4.4 Vzorky mléka nesmí zmrznout, nesmí se zahřát a nesmí být vystaveny silným otřesům.

2.4.5 Reakce se musí uskutečnit použitím jedné z těchto metod:

- ve sloupci mléka o výšce nejméně 25 mm a objemu mléka 1 ml, ke kterému bylo přidáno buď 0,03 ml anebo 0,05 ml jednoho ze standardizovaných obarvených antigenů,
 - ve sloupci mléka o výšce nejméně 25 mm a objemu mléka 2 ml, ke kterému bylo přidáno 0,05 ml jednoho ze standardizovaných obarvených antigenů,
 - v objemu mléka 8 ml, ke kterému bylo přidáno 0,08 ml jednoho ze standardizovaných obarvených antigenů.
- 2.4.6 Směs mléka a antigenů musí být inkubována při teplotě 37 °C po dobu 60 minut souběžně s pozitivními a negativními pracovními standardy. Citlivost testu zvyšuje ještě následná inkubace dobu 16 až 24 hodin při teplotě 4 °C.
- 2.4.7 Výklad výsledků:
- a) negativní reakce: mléko zbarvené, smetana nezbarvená;
 - b) pozitivní reakce:
 - mléko a smetana mají stejné zbarvení, nebo
 - mléko nezbarvené a smetana zbarvená.

2.5 Test s bengálskou červení na plotně (RBT)

- 2.5.1. Antigen představuje bakteriální suspenzi v pufovaném ředidlu antigenu *Brucelly* s pufrům s pH $3,65 \pm 0,05$ při barvení bengálskou červení. Antigen má být dodáván připravený k použití a musí být skladován při teplotě 4 °C a nesmí zmrznout.
- 2.5.2. Antigen má být připraven bez ohledu na koncentraci buněk, avšak jeho citlivost musí být standardizována ve vztahu k OIEISS tak, že antigen vyvolá pozitivní reakci s ředěním séra 1/45 a negativní reakci s ředěním 1/55.
- 2.5.3 Test RBT se provádí tímto způsobem:
- a) sérum (20 - 30 μ l) se smíchá se stejným objemem antigenu na bílé dlaždicové plotně nebo emailové plotně tak, aby se vytvořila zóna o průměru přibližně 2 cm. Směs se promíchává mírným pohybem po dobu 4 minut při teplotě okolního prostředí a při dobrém osvětlení se pozoruje aglutinace.
 - b) může se použít automatizovaná metoda, musí však být přinejmenším tak citlivá a přesná jako metoda ruční.

2.5.4 Výklad výsledků

Jakákoliv viditelná reakce se považuje za pozitivní, pokud není na okrajích nadměrné zaschnutí.

Do každé ze sérií testů by měly být zahrnuty pozitivní a negativní pracovní standardy.

2.6 Séroaglutinační test (SAT)

- 2.6.1 Antigen představuje bakteriální suspenzi v solném roztoku s fenolem (NaCl 0,85 % (hmot./obj.) a fenol při 0,5 % (obj./obj.). Formaldehyd se nesmí použít.

Antigeny mohou být dodávány v koncentrovaném stavu za předpokladu, že faktor ředění, který má být použit, je uveden na etiketě lahvičky.

K suspenzi antigenu může být přidáno EDTA na finální ředění testu 5 mM, aby se u séroaglutinačního testu snížil počet falešně pozitivních výsledků. Následně musí být hodnota pH 7,2 u suspenze antigenu znovu upravena.

- 2.6.2 OIEISS obsahuje 1 000 mezinárodních jednotek aglutinace.

- 2.6.3 Antigen se připraví bez ohledu na koncentraci buněk, avšak jeho citlivost musí být standardizována ve vztahu k OIEISS takovým způsobem, že antigen vytváří buď 50 % aglutinace při finálním ředění séra 1/600 až 1/1 000, anebo 75 % aglutinace s finálním ředěním séra 1/500 až 1/750.

Lze také doporučit porovnání reaktivity nových a předtím standardizovaných šarží antigenu užitím skupiny definovaných sér.

- 2.6.4 Test se provádí buď ve zkumavkách, nebo na mikrotitračních destičkách. Směs antigenu a příslušných ředění séra by se měla inkubovat po dobu 16 až 24 hodin při teplotě 37 °.

Pro každé ze sér se musí připravit alespoň tři ředění. Ředění podezřelých sér se musí provádět takovým způsobem, že odečítání reakce se provádí v pásmu positivity v prostředních zkumavkách (nebo v prostředních jamkách při odečítání na mikrotitračních destičkách).

- 2.6.5 *Výklad výsledků*

Stupeň aglutinace *Brucella* v séru musí být vyjádřen v IU na 1 ml.

Sérum obsahující 30 nebo více IU na 1 ml se považuje za pozitivní.

3. DOPLŇKOVÉ TESTY

3.1 Kožní test na Brucelózu (BST)

3.1.1 Podmínky pro použití testu

- a) Kožní test na brucelózu se nesmí používat k účelu osvědčování pro obchod uvnitř Společenství.

- b) Kožní test na brucelózu je jedním z nejspecifičtějších testů ke zjišťování brucelózy u neočkovaných zvířat, ale diagnóza by se neměla stanovovat jen na základě pozitivních intradermálních reakcí.
 - c) Skot, který je testován s negativním výsledkem v jednom ze sérologických testů definovaných v této příloze a který reaguje na BST pozitivně, se považuje za nakažený.
 - d) Skot, který je testován při jednom ze sérologických testů definovaných v této příloze a je pozitivní, může být podroben BST, aby byl podpořen výklad výsledků sérologického testu, zejména pokud chovů brucelózy prostých nebo úředně prostých nemůže být vyloučena zkřížená reakce s protilátkami proti jiným bakteriím.
- 3.1.2 Test se musí provést s použitím standardizovaného a definovaného přípravku brucelového alergenu, který neobsahuje lipopolysacharidový antigen S-formy (LPS), protože ten může vyvolat nespecifické zánětlivé reakce nebo může interferovat s následnými sérologickými testy.

Jedním z takových přípravků je Brucellin INRA připravený z kmene R-formy *B. melitensis*. Požadavky na jeho výrobu jsou podrobně uvedeny v části B2 kapitole 2.4.2 Příručky standardů pro diagnostické testy a očkovací látky OIE, čtvrté vydání z roku 2000.

3.1.3 *Postup testu*

- 3.1.3.1 Množství 0,1 ml brucelového alergenu se intradermálně vpraví do předcasní řasy, kůže boku nebo do postranní části krku.
- 3.1.3.2 Test se odečte po 48 až 72 hodinách.
- 3.1.3.3 Tloušťka kůže v místě vpichu se měří kutimetrem před injekcí a při opětovném vyšetření.
- 3.1.3.4 Výklad výsledků

Silné reakce se snadno rozeznají jako místní otok a ztvrdnutí.

Zesílení kůže o 1,5 až 2 mm se považuje za pozitivní reakci na BST.

3.2 **Kompetitivní enzymoimunoanalýza (cELISA)**

3.2.1 *Podmínky pro použití cELISA*

- a) test cELISA se nesmí používat pro účely osvědčování pro obchod uvnitř Společenství.
- b) test cELISA vykázal vyšší specifičnost než např. nepřímý test ELISA, a může být tedy používán na podporu výkladu výsledků sérologického testu.

3.2.2 *Postup testu*

Test se provádí v souladu s předpisem v Příručce standardů pro diagnostické testy a očkovací látky OIE, čtvrté vydání z roku 2000, kapitola 2.3.1 2) písm. a).

4. NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘE

4.1 Úkoly a pověření

Národní referenční laboratoře jsou příslušné pro:

- a) schvalování výsledků validačních studií, které prokazují spolehlivost metody testu použité v členském státě;
- b) určování maximálního počtu vzorků, které mohou být sloučeny do směsi u použitých souprav ELISA;
- c) kalibraci sekundárních referenčních národních standardních sér („pracovních standardů“) proti primárnímu séru mezinárodního standardu uvedenému v bodu 2.1;
- d) kontroly kvality všech šarží antigenů a šarží souprav ELISA používaných v členském státě;
- e) spolupráci v rámci Sítě národních referenčních laboratoří Evropské unie pro brucelózu.

4.2 Seznam národních referenčních laboratoří

BELGIE

Centre d'études et de recherches vétérinaires et agrochimiques
(CERVA/CODA)

Groeselenberg 99

B-1180 Bruxelles/Brussel

DÁNSKO

Danish Veterinary Institute

Bulowsvej 27

DL-1790 Copenhagen

FINSKO

National Veterinary and Food Research Institute

Hämeentie 57

PO Box 45

FIN-00581 Helsinki

FRANCIE

Laboratoire national et OIE/FAO de référence pour la brucellose

Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)

BP 67

F-94703 Maison-Alfort Cedex

IRSKO

Brucellosis Laboratory

Model Farm Road

Cork

Ireland

ITÁLIE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise

Via Campo Boario

I-64100 Teramo

LUCEMBURSKO

State Laboratory for Veterinarian Medicine

54, avenue Gaston Diderich

B.P. 2081

L-1020 Luxembourg

NĚMECKO

Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und
Veterinärmedizin (BGVV)

Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor für Brucellose

Postfach 33 00 13

D-14191 Berlin

NIZOZEMSKO

Centraal Instituut voor DierziekteControle

CIDC-Lelystad

Houtribweg 39

P.O. Box 2004

8203 AA Lelystad

Nederland

PORTUGALSKO

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV)

Estrada de Benfica n.º 701

P- 1549-011 Lisboa

RAKOUSKO

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen

Robert-Koch-Gasse 17

A-2340 Modling

ŘECKO

Veterinary Laboratory of Larissa

Department of Microbiology

6th km of National Road Larissa-Trikala

Gr-4111 10 Larissa

SPOJENÉ KRÁLOVSTVÍ

1. FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research an
Brucellosis

Veterinary Laboratories Agency

New Haw

Addlestone

Surrey KT 15 3NB

Unired Kingdom

2. Immunodiagnostics Department

Veterinary Sciences Division

Stoney Road Stormont

Belfast BT4 3SD

United Kingdom

ŠPANĚLSKO

Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe

Camino del Jau S/N

E-18320 Santa Fe (Granada)

ŠVÉDSKO

National Veterinary Institute

S-751 89 Uppsala