391D0189

17.4.91 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* N:o L 96/1

KOMISSION PÄÄTÖS,

tehty 25 päivänä helmikuuta 1991,

eläinlääkinnällisten kokeiden materiaaleja ja menettelyjä koskevista standardointipöytäkirjoista sekä myyntipaikkojen hyväksymisen edellytyksistä kolmansista maista lähtöisin olevien naudan- ja siansukuisten kotieläinten tuonnissa

(91/189/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon terveyttä ja eläinten terveyttä koskevista ongelmista nautaeläinten ja sikojen sekä tuoreen lihan tai lihavalmisteiden tuonnissa kolmansista maista 12 päivänä joulukuuta 1972 annetun neuvoston direktiivin 72/462/ETY([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna direktiivillä 91/69/ETY([2]), ja erityisesti sen 8 artiklan 1 kohdan,

sekä katsoo, että

direktiivissä 72/462/ETY sallitaan kolmansista maista lähtöisin olevien naudan- ja siansukuisten kotieläinten tuonti päätöksen 79/542/ETY([3])liitteen luettelon mukaisesti, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna päätöksellä 90/485/ETY([4]),

kolmansista maista lähtöisin olevien elävien eläinten tuontiin sovellettavat terveysvaatimukset on asetettava kyseisen maan terveystilanteen mukaan,

vaikka terveysvaatimukset voivat vaihdella maittain, koskevat eläinlääkinnällisten kokeiden standardointipöytäkirjat ja kolmansien maiden myyntipaikkojen hyväksymisen edellytykset yhteisöön vietävien eläinten kaupassa kaikkia kolmansia maita,

kolmansista maista lähtöisin olevien, naudan- ja siansukuisten kotieläinten tuonnissa sovellettavia terveysvaatimuksia koskevien päätösten yksinkertaistamiseksi olisi viitattava vain yhteen yhteiseen päätökseen, joka sisältää eläinlääkinnällisten kokeiden standardointipöytäkirjat ja hyväksyttyjen myyntipaikkojen edellytykset,

eläinlääkinnällisten kokeiden standardointipöytäkirjoja ja kolmansien maiden myyntipaikkojen hyväksymisedellytyksiä koskevaa päätöstä ei voi soveltaa kuin sellaiseen kolmanteen maahan, josta on tehty kyseisessä maassa voimassa olevat terveysvaatimukset huomioon ottava päätös, ja

tässä päätöksessä määrätyt toimenpiteet ovat pysyvän eläinlääkintäkomitean lausunnon mukaiset,

ON TEHNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

1. Tässä päätöksessä määrätään eläinlääkinnällisten kokeiden standardointipöytäkirjoista ja kolmansien maiden myyn-

([1]) EYVL N:o L 302, 31.12.1972, s. 28
([2]) EYVL N:o L 46, 19.2.1991, s. 37
([3]) EYVL N:o L 146, 14.6.1979, s. 15
([4]) EYVL N:o L 276, 27.9.1990, s. 46

tipaikkojen hyväksymisen edellytyksistä yhteisöön vietävien eläinten kaupassa päätöksen 79/542/ETY liitteen luettelon mukaisten, kolmansista maista lähtöisin olevien naudan- ja siansukuisten kotieläinten tuonnissa.

2. Liitteiden I ja II vaatimuksia sovelletaan vain niihin kolmansiin maihin, joista on annettu täsmentävä, jokaisessa tapauksessa erikseen sovellettava, eläinten terveyttä koskeva päätös direktiivin 72/462/ETY 8 artiklan mukaisesti.

2 artikla

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 25 päivänä helmikuuta 1991.

Komission puolesta

Ray MAC SHARRY

Komission jäsen

LIITE I

MATERIAALIEN STANDARDOINTIPÖYTÄKIRJAT JA KOEMENETELMÄT

I LUKU

Naudansukuiset eläimet

1. *Tuberkuloosi*

Suoritetaan vain nahansisäinen tuberkuliinikoe nautatuberkuliinilla eläinten terveyteen liittyvistä ongelmista yhteisön sisäisessä naudan- ja siansukuisten eläinten kaupassa 26 kesäkuuta 1964 annetun neuvoston direktiivin 64/432/ETY liitteen B mukaisesti(1).

2. *Nautojen luomistauti*

Sero-agglutinaatiotutkoe ja komplementin sitoutumiskoe tehdään direktiivin 64/432/ETY liitteessä C olevan A ja B kohdan mukaisesti.

3. *Nautaeläinten tarttuva leukoosi*

Suoritetaan agargeeli-immunodiffuusiokoe direktiivin 64/432/ETY liitteen G mukaisesti.

4. *Bluetongue-tauti*

A. Poissulkeva tai vertaileva ELISA-koe tehdään seuraavalla tavalla:

Vertailevalla ELISA-kokeella monokloonista 3-17-A3 vasta-ainetta käyttäen voidaan havaita kaikki bluetongue-tautiviruksen (BTV) tunnetut seerumityypit.

Kokeessa on periaatteena, että BTV:n antigeenin ja lajiryhmän (3-17-A3) monokloonisen vasta-aineen reaktio keskeytetään lisäämällä koeseerumin laimennoksia. Koeseerumissa olevat BTV:n vasta-aineet estävät monokloonisen vasta-aineen (MKV) reagoinnin ja entsyymiuutteen lisäys heikentää odotettua värimuutosta.

Aineet ja reagenssit

1. Tasapohjaiset mikrotitrauslevyt

2. Antigeeni: valmistetaan jäljempänä esitetyllä menetelmällä.

3. Estopuskuri: 5 % (w/v) "Marvel" kuivattua maitojauhetta, 0,1 % (v/v) Tween-20:tä (polyoksietyleeni-sorbitoni-monolauraatti-siirapin muodossa) fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS).

4. Monoklooninen vasta-aine (MKV): 3-17-A3 (hybridomin kudosviljelmän kelluvana nesteenä) varastoidaan –20 °C:ssa tai kylmäkuivataan, laimennettuna estopuskurilla suhteessa 1/50 ennen käyttöä, kohdistetaan ryhmäspesifistä p_7 polypeptidiä vastaan.

5. Konjugaatti: kanin hiirivasta-aine (absorboituna ja eluoituna), retikka- peroksidaasiin konjugoituna ja säilytettynä pimeässä 4 °C:ssa.

6. Substraatti ja kromogeeni: 0,2 g ortofenyleeniä (OPD) liuotettuna puskuriliuokseen, jossa on 2,553 g sitruunahappoa ja 4,574 g dinatrium-vetyortofosfaattia joka on saatettu 500 ml:ksi tislatulla vedellä, jaettuna 25 ml:n annoksiksi ja säilytettynä pimeässä –20 °C:ssä, välittömästi ennen käyttöä lisätään 12 µl/25 ml vetyperoksidia (30 % w/v).

OPD:tä on käsiteltävä varoen — on käytettävää kumikäsineitä — tuotetta epäillään mutageeniseksi.

7. Rikkihappoa, 1 M: 26,6 ml happoa lisätään 473,4 ml:aan tislattua vettä.

Huom.: happo on aina lisättävä veteen, ei koskaan vettä happoon.

(1) EYVL N:o L 121, 29.7.1964, s. 1977/64

8. Orbital-ravistelija

9. ELISA-levynlukija (koe voidaan lukea silmämääräisesti).

Koekaavake

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Nollaus			Antigeeni + konjugaatti						1
Monoklooninen vasta-aine (MKV)			Antigeeni + MKV + konjugaatti						2
Positiivinen näyte		Antigeeni + positiivinen seerumi + MKV + konjugaatti							3
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
		Koeseerumit							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Koeseerumit									7
									8
									9
									10
									11
									12

Koetapa

Nollausrivi

Rivi 1 A:sta H:hon on nollausrivi, joka sisältää BTV-antigeenin ja konjugaatin. Kokeella ELISA-lukija voidaan kalibroida.

MKV-koe

Rivillä 2 A:sta H:hon on monokloonisen vasta-aineen koe ja siihen kuuluvat BTV:n antigeeni, monoklooninen vasta-aine ja konjugaatti. Kysymyksessä on negatiivinen tarkastus. Tämän koerivin optisen tiheyden keskiarvo vastaa 0 %:n inhibitioarvoa.

Positiivinen tarkastus

Rivillä 3 A:sta H:hon on positiivinen tarkastus. Siihen kuuluvat BTV:n antigeeni, BTV-positiiviset antiseerumilaimennokset, monoklooninen vasta-aine ja konjugaatti. Tällä osoitetaan, että koe sujuu oikein ja että kokeesta toiseen inhibitioarvo on sama.

Koeseerumit

Edellä mainitussa koekaavakkeessa 18 seerumia voidaan testata laimennoksilla 1/2, 1/4, 1/8 ja 1/16. Tulokseksi saadaan tietoja koeseerumien vasta-aineiden pitoisuuksista. Laimennossarjaa voitaisiin vielä laajentaa seerumilaimennosten loppupitoisuuksien saamiseksi. Suuressa mittakaavassa suoritettavissa serologisissa kokeissa yhden (1/4) tai kahden (1/2 ja 1/4) laimennoksen seerumikoetta voitaisiin vaihtoehtoisesti käyttää nopeana seulontakokeena.

Menettely

1. BTV-antigeeni laimennetaan pitoisuudeltaan esititrattuun puskuroituun suolaliuokseen (PBS). Käsitellään lyhyesti ultraäänellä yhteen kasautuneiden virusten hajoittamiseksi (ellei tätä laitetta ole käytettävissä, pipetoidaan voimakkaasti) ja liuosta annostellaan 50 µl ELISA-levyn jokaiseen syvennykseen. Reunoja naputtamalla antigeeni jaetaan tasaisesti levylle.

2. Inkuboidaan 37 °C:ssa 60 minuuttia orbital-ravistelijassa. Levyt pestään kolmeen kertaan huuhtelemalla ja syvennykset tyhjennetään epästeriilillä puskuroidulla suolaliuoksella (PBS) ja kuivataan imupaperilla.

3. Estopuskuria annostellaan 50 µl levysyvennystä kohti. Koeseerumit ja yksi positiivinen seerumi pannaan asianomaisiin syvennyksiin ja levyn sisältö laimennetaan monikanavaisen pipetin avulla. Seerumia ei saa lisätä sokeakoe- ja MKV-koekohtiin.

4. Heti koeseerumien lisäämisen jälkeen MTV laimennetaan estopuskurilla (esititrattuun laimennokseen) ja levyn kaikkiin syvennyksiin sokeakoesyvennystä lukuunottamatta lisätään 50 µl.

5. Inkuboidaan 37 °C:ssa 60 minuuttia orbital-ravistelijassa. Levyt pestään kolmeen kertaan puskuroidulla suolaliuoksella (PBS) ja kuivataan imupaperilla.

6. Kanin hiirivasta-aineen konsentraatti laimennetaan suhteessa 1/5 000 estopuskuriin ja levyn kaikkiin syvennyksiin lisätään 50 µl.

7. Inkuboidaan 37 °C:ssa 60 minuuttia orbital-ravistelijassa. Levyt pestään kolmeen kertaan PBS:lla ja kuivataan imupaperilla.

8. OPD sulatetaan ja välittömästi ennen käyttöä lisätään 12 µl 30-prosenttista vetyperoksidia jokaista OPD:n 25 ml:aa kohti. Levyn jokaiseen syvennykseen lisätään 50 µl. Värin muuttumista odotetaan noin 10 minuuttia ja reaktio keskeytetään 1 M:lla rikkihapolla (50 µl/syvennys). Värin pitäisi muuttua MKV-koesyvennyksissä ja BTV-vasta-aineettomissa seerumisyvennyksissä.

9. Levyt tutkitaan joko silmämääräisesti tai spetrofotometrin avulla ja tulokset kirjataan.

Tulosten määritys

MKV-kokeiden avulla lasketaan OD-keskiarvo. Se vastaa 0 %:n inhibitioarvoa. Koeseerumien optiset tiheysarvot ilmaistaan inhibitioarvoprosentteina seuraavan kaavan mukaisesti:

$$\text{inhibitioarvo } \% = 100 - \frac{\text{OD koeseerumin esiintyessä}}{\text{OD koeseerumin puuttuessa}} \times 100$$

Positiivisena pidetään 1/4-seerumilaimennosta, jonka inhibitioarvot ylittävät 40 %. Silmämääräinen tulosten luku on mahdollista, koska 40 %:n inhibitioarvo on alhaisin hyvin luettavissa oleva arvo.

BTV-ELISA-antigeenin esikäsittely

1. Yhtyvien BHK-21:n solujen 10 Roux-pulloa pestään kolme kertaa seerumittomalla Eagle kasvualustalla ja infektoidaan BTV:n serotyypin 1 avulla seerumittomalla Eagle-kasvualustalla.

2. Inkuboidaan 37 °C:ssa ja solutuhovaikutus (cpe) tutkitaan päivittäin.

3. Kun cpe tulee esille 80–90 %:sti jokaisen Roux-pullon solulevyllä, virus kerätään ravistamalla solut irti seinämästä.

4. Solut sentrifugoidaan rakeiksi nopeudella 2 000 tai 3 000 kierrosta/minuutissa.

5. Kelluva jae heitetään pois ja solut suspendoidaan uudelleen noin 30 ml:ssa puskuroitua suolaliuosta (PBS), jossa on 1 % "Sarkosyliä" ja 2 ml fenyylimetyylisulfonyylifluoridia (lysis-puskuri). Tämä voi aiheuttaa solujen hyytelöitymistä, jolloin on lisättävä enemmän lysis-puskuria.

   Huom! Fenyylimetyylisulfonyylifluoridi on vaarallista, sitä on käsiteltävä äärimmäisen huolellisesti.

6. Solut irrotetaan 60 sekunniksi 30 mikronin amplitudilla toimivan ultraäänisondin avulla.

7. Sentrifugoidaan kymmenen minuutin ajan nopeudella 10 000 kierrosta/min.

8. Kelluva jae varastoidaan +4 °C:seen ja jäljellä olevat solurakeet suspendoidaan uudelleen 10–20 ml:aan lysis-puskuria.

9. Sekoitetaan ultraäänilaitteella ja selkeytetään. Kelluva jae varastoidaan kussakin vaiheessa, kaikkiaan kolme kertaa.

10. Kelluvat jakeet yhdistetään ja sentrifugoidaan nopeudella 24 000 kierrosta/min. 120 minuutin ajan 40 °C:een lämpötilassa 5 ml:n tyynyllä 40-prosenttista sakkaroosia (w/v PBS:ssa) käyttäen Beckmannin 30 ml:n sentrifugiputkia ja SW 28-roottoria.

11. Kelluva jae heitetään pois, putket tyhjennetään hyvin ja rakeet suspendoidaan uudelleen puskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) ultraäänen avulla. Antigeeni varastoidaan määräosissa –70 °C:ssa.

BTV-antigeenin ELISA-titraus

Bluetongue-taudin antigeeni ELISA-koetta varten titrataan epäsuoralla ELISA-tekniikalla. Antigeenin kaksoislaimennokset titrataan monokloonisen vasta-aineen 3-17-A3 vakiolaimennoksella (1/50). Koetapa on seuraava:

Menettely

1. BTV-antigeeni laimennetaan PBS:lla mikrotitrauslevyllä kaksoislaimennosten (50 µl/syvennys) sarjana käyttäen monikanavapipettiä.

2. Inkuboidaan orbital-ravistelijassa tunnin ajan 37 °C:ssa.

3. Levyt pestään kolmeen kertaan puskuroidulla suolaliuoksella (PBS).

4. Monokloonista vasta-ainetta 3-17-A3 (laimennos 1/50) lisätään 50 µl mikrotitrauslevyn jokaiseen syvennykseen.

5. Inkuboidaan orbital-ravistelijassa tunnin ajan 37 °C:ssa.

6. Levyt pestään kolmeen kertaan puskuroidulla suolaliuoksella (PBS).

7. Mikrotitrauslevyn jokaiseen syvennykseen pannaan 50 µl kanin hiirivasta-aineglobuliinia retikkaperoksidaasiin konjugoituneena, joka on laimennettu esititrattuun optimaaliseen pitoisuuteen.

8. Inkuboidaan orbital-ravistelijassa tunnin ajan 37 °C:ssa.

9. Lisätään substraatti ja kromogeeni kuten edellä. Reaktio pysäytetään 10 minuutin kuluttua lisäämällä 1 M:sta rikkihappoa (50 µl/syvennys).

Koska vertailukokeessa monokloonista vasta-ainetta on oltava ylimäärin, on valittava antigeenilaimennos, joka on titrauskäyrällä (eikä tasaisella alueella), joka antaa suunnilleen 0,8 OD:n kymmenen minuutin jälkeen.

B. Agargeeli-immunodiffuusiokoe tehdään seuraavalla tavalla:

Aineet ja reagenssit

Antigeeni

Saostava antigeeni valmistetaan millä tahansa soluviljelyjärjestelmällä, jossa solun jakautuminen on yhtä nopeaa kuin Bluetongue-viruksen asianomaisissa serotyypeissä. Suositellaan BHK- tai Vero-soluja. Antigeeni esiintyy viruskasvun lopussa kelluvassa nesteessä, mutta ollakseen tehokas se on väkevöitävä 50–100 kertaiseksi. Tähän päästään millä tahansa proteiinien väkevöinnin standardimenetelmällä, antigeenivirus voidaan inaktivoida lisäämällä 0,3 % (v/v) beeta-propiolaktonia.

Tunnettu positiivinen tarkastusseerumi

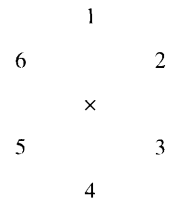
Kansainvälisestä vertailuseerumista ja antigeenista tehdään kansallinen seerumi, joka standardoidaan optimaalisen suhteen aikaansaamiseksi kansainvälisen seerumin kanssa, ja joka kylmäkuivataan ja jota käytetään kaikkien kokeiden tunnettuna tarkastusseerumina.

Koeseerumi

Menettely

Kaadetaan 1-prosenttista agaroosia boraatti- tai natriumbarbitolipuskurissa, pH 8,5–9,0, vähintään 3,0 mm:n syvyiseen petrimaljaan.

Agariin koverretaan seitsemän kosteudesta vapaata, halkaisijaltaan 5,0 mm:n kuoppaa. Kuviossa keskelle tulee yksi kuoppa ja sen ympärille 3 mm:n säteellä 6 kuoppaa.



Keskimmäinen kuoppa täytetään standardiantigeenilla. Kehällä olevat kuopat 2, 4 ja 6 täytetään tunnetuilla positiivisilla seerumeilla, kuopat 1, 3 ja 5 koeseerumeilla.

Järjestelmää inkuboidaan korkeintaan 72 tuntia huoneenlämmössä kosteassa hyvin suljetussa tilassa.

Tulkinta

Koeseerumi on positiivinen, jos se muodostaa määrätyn presipitiinilinjan antigeenin kanssa sekä täysin samanlaisen linjan tarkastusseerumin kanssa. Koeseerumini on negatiivinen, ellei se muodosta määrättyä linjaa antigeenin kanssa eikä taivuta tarkastusseerumin linjaa. Petrimaljoja on tutkittava tummaa taustaa vasten ja epäsuorassa valossa.

5. *Epitsoottinen verenvuototauti*

Agargeeli-immunodiffuusiokoe tehdään seuraavalla tavalla:

Aineet ja reagenssit

Antigeeni

Saostava antigeeni valmistetaan millä tahansa soluviljelyjärjestelmällä, jossa solun jakautuminen on yhtä nopeaa kuin Bluetongue-viruksen asianomaisissa serotyypeissä. Suositellaan BHK- tai Vero-soluja. Antigeeni esiintyy viruskasvun lopussa kelluvassa nesteessä, mutta ollakseen tehokas se on väkevöitävä 50–100-kertaiseksi. Tähän päästään millä tahansa proteiinien väkevöinnin standardimenetelmällä, antigeenivirus voidaan inaktivoida lisäämällä 0,3 % (v/v) beeta-propiolaktonia.

Tunnettu positiivinen tarkastusseerumi

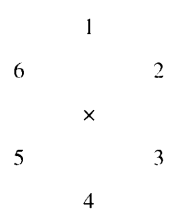
Kansainvälisestä vertailuseerumista ja antigeenista tehdään kansallinen seerumi, joka standardoidaan optimaalisen suhteen aikaansaamiseksi kansainvälisen seerumin kanssa, ja joka kylmäkuivataan ja jota käytetään kaikkien kokeiden tunnettuna tarkastusseerumina.

Koeseerumi

Menettely

Kaadetaan 1-prosenttista agaroosia boraatti- tai natriumbarbitolipuskurissa, pH 8,5–9,0, vähintään 3,0 mm:n syvyiseen petrimaljaan.

Agariin koverretaan seitsemän kosteudesta vapaata, halkaisijaltaan 5,0 mm:n kuoppaa. Kuviossa keskelle tulee yksi kuoppa ja sen ympärille 3 mm:n säteellä 6 kuoppaa.



Keskimmäinen kuoppa täytetään standardiantigeenilla. Kehällä olevat kuopat 2, 4 ja 6 täytetään tunnetuilla positiivisilla seerumeilla, kuopat 1, 3 ja 5 koeseerumeilla.

Järjestelmää inkuboidaan korkeintaan 72 tuntia huoneenlämmössä kosteassa hyvin suljetussa tilassa.

Tulkinta

Koeseerumi on positiivinen, jos se muodostaa määrätyn presipitiinilinjan antigeenin kanssa sekä täysin samanlaisen linjan tarkastusseerumin kanssa. Koeseerumi on negatiivinen, ellei se muodosta määrättyä linjaa antigeenin kanssa eikä taivuta tarkastusseerumin linjaa. Petrimaljoja on tutkittava tummaa taustaa vasten ja epäsuorassa valossa.

6. *Leptospiratauti*

Mikroagglutinaatiokoe on tehtävä seuraavalla tavalla:

Viljelyt

Leptospira kasvatetaan Korthofin tai EMJH-kasvualustalla 30 °C:n lämpötilassa.

Antigeeni

sisältää 2×10^8 organismia viljelyalustamillilitraa kohti.

Menettely

Tasapohjaisiin mikrotitrauslevyihin pannaan yhtä paljon antigeenia ja seerumia, sekoitetaan ja inkuboidaan 30 oC:ssa kahden tunnin ajan tai 37 °C:ssa 1–1 1/2 tunnin ajan, tulokset luetaan pienitehoisessa valaistuksessa tummaa taustaa vasten 60–100 -kertaisesti suurennettuna.

Tulkinta

Tulos on negatiivinen, jos 1/50:n laimennoksella agglutinaatio on alle 50 %.

7. *Tarttuva rhinotracheitis bovinae / pustular vulvovaginitis -tauti*

Seroneutralointikoe on tehtävä seuraavalla tavalla:

Seerumi

Kaikki seerumit inaktivoidaan 56 °C:ssa 30 minuutin ajan ennen käyttöä.

Menettely

Erityyppisten virusten mikrotitrauslevyillä suoritettavassa vakiossa seroneutralointutkokeessa käytetään MDBK- tai muita sopivia soluja. Colorado-, Oxford- tai muuta vertailuviruskantaa käytetään annostuksella 100 $TCID_{50}$/0,025 ml, inaktivoidut, laimentamattomat seeruminäytteet sekoitetaan yhtä suuren (0,025 ml) virussuspension määrän kanssa. Virus-seerumiseoksia inkuboidaan 2 tuntia 37 °C:ssa mikrotitrauslevyillä ennen MDBK-solujen lisäämistä. Solupitoisuuden on riitettävä muodostamaan yksikerroksinen viljelmä 24 tunnin kuluttua.

Suoritettavat tarkastukset

Viruksen tartuntatarkastus
Seerumin myrkyllisyystarkastus
Siirrostamattomien soluviljelyjen tarkastus
Vertailuantiseerumit

Tulkinta

Neutralointikokeen tulokset ja käytetyn viruksen pitoisuus kirjataan sen jälkeen, kun niitä on inkuboitu 37 °C:ssa 3–6 päivää. Seerumi todetaan negatiiviseksi ellei laimennoksella 1/2 (laimentamaton seerumi) tapahdu neutralisoitumista.

8. *Naudan virusperäinen ripuli (BVD)*

A. Viruksen eristämiskoe suoritetaan seuraavalla tavalla:

Koelaitteet ja havaintomenetelmät

Käytetään tartunnan saaneiden valkosolujen tai verihyytymien virussuspensioita, jotka on otettu kuutta kuukautta vanhemman nautaeläimen tuoreesta verinäytteestä, jota ei ole lämmöllä inaktivoitu. Suoritetaan immunologinen värjäys esimerkiksi fluoresoivalla vasta-ainetekniikalla (FA) tai entsyymaattinen vasta-ainekoe esimerkiksi immunoperoksidaasilla (IPX) BVD-viruksen toteamiseksi siirrostetuista viljelmistä.

Reagenssit

FA-koetta varten tarvitaan FITC:llä konjugoitu spesifinen BVD:n antiseerumi. IPX-kokeeseen tarvitaan nautaeläimestä peräisin oleva, konjugoimaton BVD:n spesifinen antiseerumi, peroksidaasiin konjugoitu antinauta-antiseerumi ja sopiva entsyymisubstraatti (esim. 3-amino-9-etyylikarbatsoli). Muuta kuin nautaeläimestä peräisin olevaa anti-BVD-seerumia voidaan käyttää, jos peroksidaasin konjugointi on suunnattu kyseisen lajin seroglobuliineja vastaan. Kaikkien antivirusseerumien on oltava todistetusti spesifisiä ja laajareaktioisia.

Menettely

Kokeeseen käytetään herkkiä soluja kuten naudan turbinaatti-, vasikanmunuais- tai vasikankivessoluja, jotka ovat endogeenisesta BVD-viruksesta vapaita.

Seeruminäytteet – koeseerumi ja kudosviljelysolut kaadetaan peitelasiviljelmiin tai mikrotitrauslevyjen syvennyksiin tai muihin astioihin siten, että lopullinen seerumilaimennos on 10 %.

Tartunnan saaneen ihon ja verihyytymän näytteet lisätään yksikerroksiseen yhtyvään soluviljelmään ja jätetään tunniksi 37 °C:n lämpötilaan, sitten viljelyt pestään ja peitetään kasvualustalla, jossa on 10 % BDV-vapaata vasikan sikiöseerumia.

Viljelyt inkuboidaan sitten 37 °C:ssa, kiinnitetään ja värjätään FA- tai IPX-menetelmällä.

Suoritettavat tarkastukset

BVP-viruksen positiivinen tarkastus
Negatiivinen tarkastus virusta lisäämättä

Tulkinta

FA-koe värjätään 4–6 päivän inkuboinnin jälkeen ja luetaan ultraviolettivalossa. Koenäytteen kanssa inkuboiduissa soluissa esiintyvä fluoresenssi tulkitaan positiiviseksi tulokseksi.

IPX-koe värjätään neljän päivän inkuboinnin jälkeen ja luetaan valomikroskoopilla. Joidenkin solujen soluliman tumman ruskea väri tulkitaan positiiviseksi tulokseksi.

B. Seroneutralointikoe tehdään seuraavalla tavalla:

Seerumi

Kaikki seerumit inaktivoidaan ennen käyttöä 56 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia.

Menettely

Mikrotitrauslevyillä suoritettavassa erityyppisten virusten vakiossa seroneutralointikokeessa käytetään soveltuvia sarjamonistettuja nautasoluja (esim. naudan turbiinisoluja, kuten kuvattu julkaisussa McClurkin ja muut, 1974, Arch. ges. Virusforsch., 45, 285–289).

On tärkeää, että kaikki reagenssit ja solut ovat vapaita satunnaisesti esiintyvistä soluja tuhoamattomista BVD/MD-viruksista.

Koevirusta, joka voi olla mistä tahansa sopivasta soluja tuhoamattomasta vertailukannasta (kuten NADL-kanta) käytetään pitoisuutena keskimäärin 100 infektoitunutta soluviljelyannosta 0,025 ml:aa kohti. Inaktivoituihin seerumilaimennoksiin sekoitetaan yhtä paljon virussuspensiota (0,025 ml) ja virus-seerumiseoksia inkuboidaan 1 tunnin ajan 37 °C:ssa ennen yhtä suurten solususpensioiden lisäämistä. Solupitoisuuden on riitettävä muodostamaan yksikerroksinen viljelmä kahden päivän kuluttua.

Suoritettava tarkastukset

Viruksen tartuntatarkastus
Seerumin myrkyllisyystarkastus
Siirrostamattomien soluviljelyjen tarkastus
Vertailuantiseerumit

Tulkinta

NADL-kannan viruksen koetuloksen optimaalinen luenta tapahtuu viiden päivän, 37 °C:ssa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen.

Keskimäärin 1/10 neutralointipitoisuuden katsotaan osoittavan immuunireaktiota aiemmalle akuutille infektiolle.

9. *Utaretulehduskoe*

Maitomäärityskoe on tehtävä direktiivin 64/432/ETY liitteen D mukaisesti.

10. *Suu- ja sorkkatauti*

A. Näyte ruokatorvesta/nielusta ja sen testaus on suoritettava seuraavalla tavalla:

Reagenssit

Ennen näytteenottoa on valmisteltava siirrettävä kasvualusta. Yhtä moneen astiaan kuin näyte-eläimiä on, pannaan 2 ml:n määrä. Astioiden on kestettävä pakastus kiinteällä CO_2:lla tai nestetypessä.

Näyte otetaan tarkoitukseen valmistetun kaapimen (sputum collector) avulla tai "probang"-tekniikalla.

Näyte otetaan siten, että kaavinkuppi työnnetään eläimen suuhun kielen selälle ja ruokatorven yläosan taakse. Ruokatorven yläosasta ja nielusta yritetään kaapia pintakudosta raaputtamalla sivusuuntaisesti ja selän puolelta. Kaavin vedetään pois mieluummin sen jälkeen, kun eläin on niellyt, kupin on oltava täynnä ja siinä on oltava sekaisin limaa, sylkeä, ruokatorvinestettä ja solun kappaleita. Varmistetaan, että jokaisessa näytteessä on näkyvillä solun osia. Rajuja verenvuotoa aiheuttavia liikkeitä on vältettävä.

Joistakin eläimistä otettuihin näytteisiin on saattanut sekoittua paljon pötsin sisältöä. Siinä tapauksessa näytteet heitetään pois ja eläimen suu huuhdellaan vedellä tai mieluummin fysiologisella suolaliuoksella ennen kuin toimenpide uusitaan.

Näytteiden käsittely

Jokaisen probang-kuppiin kerätyn näytteen laatu tutkitaan, 2 ml sen sisällöstä lisätään samaan määrään siirtoalustaa ja tämä seos siirretään pakastuksenkestävään astiaan. Astiat suljetaan ilmatiiviisti, sinetöidään, desinfioidaan ja varustetaan nimilapuilla. Näytteet säilytetään viileässä (+4 °C) ja niitä tutkitaan 3–4 tunnin sisällä tai ne asetetaan hiilihappojäähän (–69 °C) tai nestetyppeen ja säilytetään pakastettuina kokeeseen asti.

Jokaisen näytteenoton jälkeen probang-kuppi desinfioidaan ja pestään kolmeen kertaan puhtaalla vedellä.

Suu- ja sorkkatautiviruksen havaitsemiskoe

Naudan kilpirauhasen (thyroid) primäärit soluviljelmät siirrostetaan näytteiden avulla käyttäen kolmea putkea näytettä kohti. Muita soveltuvia soluja esimerkiksi naudan- tai sianmunuaisen primäärisoluja voidaan myös käyttää, mutta on muistettava, että nämä solut eivät ole kovin herkkiä suu- ja sorkkatautiviruksen tietyille kannoille. Putket inkuboidaan 37 °C:ssa sylinterikojeessa ja niitä tutkitaan päivittäin 48 tunnin ajan solutuhovaikutuksen (CPE) havaitsemiseksi. Jos tulokset ovat negatiiviset, viljelmät siirretään sokkona uusiin viljelmiin ja niitä tutkitaan 48 tunnin ajan. Jokainen CPE:n spesifisyys on varmistettava.

Suositeltavat siirrettävät kasvualustat

1. Fosfaattipuskuri 0,08 M, pH 7,2, joka sisältää 0,01 % naudan seerumialbumiinia, 0,002 % fenolipunaista 0,002 % ja antibiootteja.

2. Kudosviljelyn kasvualusta (esim. Eaglen MeM), joka sisältää 0,01 % 0,04-motaarista Hepes-puskuria, 0,01 % naudan seerumialbumiinia ja antibiootteja, pH 7,2.

Seuraavat antibioottimäärät lisätään siirrettävän kasvualustan lopullista ml:aa kohti:

— penisilliini	1 000 IU
— neomysiinisulfaatti	100 IU
— polymyksiini B sulfaatti	50 IU
— mykostatiini	100 IU

B. Seroneutralointikoe on tehtävä seuraavalla tavalla:

Reagenssit

Valmistetaan antigeenia varastoon suu- ja sorkkatautivirusta vastaan soluviljelmissä tai naudan kielellä ja varastoidaan –70 °C:n lämpötilassa tai alle –20 °C:n lämpötilassa, kun ensin on lisätty 50 % glyserolia. Tämä on varastoantigeeni. Suu- ja sorkkatautivirus on vakio näissä olosuhteissa eivätkä pitoisuudet juurikaan vaihtele kuukausien kuluessa.

Menettely

Koe suoritetaan tasapohjaisilla kudosviljelmiin tarkoitetuilla mikrotitrauslevyillä käyttäen herkkiä soluja kuten IB-RS-2, BHK-21 tai vasikan munuaissoluja.

Koeseerumit laimennetaan suhteessa 1/4 seerumittomassa soluviljelyn kasvualustassa lisäämällä 100 IU/ml neomysiiniä tai muuta soveltuvaa antibioottia. Seerumit inaktivoidaan 56 °C:ssa 30 minuutissa ja niitä käytetään 0,05 ml:n erissä kaksinkertaissarjojen valmistamiseen mikrotitrauslevyillä käyttäen 0,05 ml:n laimennossilmukoita.

Tämän jälkeen jokaiseen syvennykseen lisätään esititrattua virusta, joka on myös laimennettu seerumittomassa kasvualustassa, ja joka sisältää 100 $TCID_{50}$/0,05 ml. Inkuboimalla tunnin ajan 37 °C:ssa tapahtuu neutraloituminen, jonka jälkeen jokaiseen syvennykseen lisätään 0,05 ml solususpensiota, joka sisältää 0,5–1,0 × 10^6 solua/ml seerumia sisältävää, suu- ja sorkkataudin vasta-aineesta vapaata soluviljelyn kasvualustaa, ja levyt sinetöidään.

Levyt inkuboidaan 37 °C:ssa. Yksikerroksiset viljelmät muuttuvat yhtenäisiksi tavallisesti 24 tunnin sisällä. Tavallisesti CPE on kehittynyt 48 tunnissa niin paljon, että tulos on luettavissa *mikroskoopilla.* Tällöin voidaan tehdä lopullinen *mikroskooppi*luenta tai levyt voidaan kiinnittää ja värjätä *makroskooppista* luentaa varten esimerkiksi käyttäen fysiologista suolaliuosta, jossa on 10 % formolia ja 0,05 % metyleenisiniä.

Suoritettavat tarkastukset

Jokaisessa kokeessa tehdään tunnetun pitoisuuden homologisen antiseerumin tarkastus, solutarkastus, seerumin myrkyllisyystarkastus, kasvualustatarkastus ja virustitraus, jonka perusteella lasketaan kokeeseen sisältyvien virusten todellinen määrä.

Tulkinta

Solutuhovaikutusta osoittavia syvennyksiä pidetään tartunnan saaneina ja neutralointipitoisuudet ilmaistaan seerumi-virusseoksissa esiintyvän seerumin, joka on määritetty kohdalla 50 % arvioidusta loppupisteestä Spearman — Karber-menetelmän mukaisesti, loppulaimennoksen käänteislukuna (Karber, G., 1931, *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 162, 480).*

Kokeita pidetään hyväksyttävinä, kun kokeessa käytetty viruksen määrä syvennystä kohti on välillä $10^{1,5}$ ja $10^{2,5}$ $TCID_{50}$ ja kun vertailuseerumin pitoisuus on sen odotetun pitoisuuden kaksinkertaisen pitoisuuden alueella. Jos tulokset jäävät näiden rajojen ulkopuolelle, kokeet uusitaan.

Jos lopullinen pitoisuus on 1/11 tai alhaisempi, tulosta pidetään negatiivisena.

C. Vasta-aineen etsiminen ja määrän toteaminen ELISA-tekniikalla tapahtuu seuraavan menettelyn mukaisesti:

Reagenssit

Suu- ja sorkkatautiviruksen seitsemää antigeeni 146S -tyyppistä virusta vastaan olevia kanin antiseerumeja käytettynä ennalta määriteltynä optimipitoisuutena 9,6 pH:n karbonaatti/bikarbonaattipuskurissa.

Antigeenit valmistetaan BHK 21-solujen yksikerroksisissa viljelmissä kasvatetuista valikoiduista viruskannoista. Käytetään kelluvia jakeita, joita ei ole puhdistettu, ja ne esititrataan koetavan mukaisesti, mutta ilman seerumia, jotta saadaan laimennos, jonka optinen tiheyslukema on välillä 1,2–1,5 sen jälkeen, kun PBST:tä (fosfaatilla puskuroitu fysiologinen suolaliuos, joka sisältää 0,05 % Tween-20:tä ja fenolipunaindikaattorin) on lisätty yhtä suuri määrä. Viruksia voidaan käyttää inaktivoidussa muodossa. PBST:ta käytetään laimentimena. Valmistetaan marsun antiseerumeita siirrostamalla marsuihin jokaisen serotyypin 146S-antigeenia. Valmistetaan optimaalinen pitoisuus PBST:hen ennalta määritettynä optimipitoisuutena, joka sisältää 10 % tavallista nautaseerumia ja 5 % tavallista kaniseerumia.

Käytetään sian antimarsu-immunoglobuliinia konjugoituna retikka-peroksidaasiin PBST:hen ennalta määriteltynä optimipitoisuutena, joka sisältää 10 % tavallista nautaseerumina ja 5 % tavallista kaniseerumia.

Koeseerumit laimennetaan PBST:hen.

Menettely

1. ELISA-levyt peitetään 50 µl:lla kanin antivirusseerumia ja jätetään yöksi kosteaan tilaan huoneenlämpöön.

2. Valmistetaan 50 µl:n toisintoannos, jokaisesta koeseerumista kaksinkertaiset sarjat alkaen 1/4:sta U-pohjaisille monisyvennyslevyille (kantolevyt). Lisätään 50 µl antigeenin vakioannosta jokaiseen syvennykseen ja seos jätetään yöksi 4 °C:seen. Antigeenin lisäys vähentää laimennossarjan alkavaksi 1/8:sta.

3. ELISA–levyt pestään viisi kertaa PBST:llä.

4. Siirretään sitten 50 µl seerumi-antigeeniseosta kantolevyiltä ELISA-levyille, joille on levitetty kaniseerumia ja niitä inkuboidaan pyörivässä ravistelijassa 37 °C:ssa yhden tunnin ajan.

5. Syvennykset pestään ja niihin lisätään 4 kohdassa käytettyä antigeeni-marsuantiseerumia 50 µl. Levyjä inkuboidaan pyörivässä ravistelijassa 37 °C:ssa tunnin ajan.

6. Pesun jälkeen jokaiseen syvennykseen lisätään 50 ml sian antimarsu-immunoglobuliinia retikka-peroksidaasiin konjugoituna. Levyjä inkuboidaan pyörivässä ravistelijassa 37 °C:ssa tunnin ajan.

7. Levyt pestään ja jokaiseen syvennykseen lisätään 50 µl ortofenyleenidiamiinia, joka sisältää 0,05 % H_2O_2:a (30 %) w/v.

8. Reaktio pysäytetään 1,25 M H_2SO_4:lla 15 minuutin kuluttua.

Levyt luetaan spektrofotometrisesti 492 nm:ssä mikrotietokoneeseen kytketyn ELISA-lukulaitteen avulla.

Suoritettavat tarkastukset

Jokaista käytettyä antigeenia kohti on 40 syvennystä, jotka eivät sisällä seerumia vaan PBST:hen laimennettua antigeenia.

Homologisen vertailu-nauta-antiseerumin 2 laimennoksen kaksoissarja.

Negatiivisen nautaseerumin 2 laimennoksen kaksoissarja.

Tulkinta

Vasta-ainepitoisuudet ilmaistaan koeseerumien lopullisena laimennoksena, jotka antavat tulokseksi 50 % sellaisten virustarkastussyvennyksissä todettujen OD-arvojen keskiarvoista, joissa ei ole koeseerumia. Positiivisina pidetään 1/40 ylittäviä pitoisuuksia.

Viitteitä:

Hamblin C., Barnett ITR ja Hedger RS (1986) "A new enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA." *Journal of Immunological Methods,* 93, 115–121.11.

II LUKU

Siansukuiset eläimet

1. *Turberkuloosi*

Yksinkertainen nahansisäinen tuberkuliinikoe lintutuberkuliinilla on tehtävä direktiivin 64/432/ETY liitteen B mukaisesti kuitenkin siten, että pistospaikka on korvantakainen löysä nahka.

2. *Sikojen luomistauti*

Seroagglutinaatio ja komplementin sitoutumisreaktiokoe on suoritettava direktiivin 64/432/ETY liitteessä C olevan A ja B luvun mukaisesti.

3. *Aujeszkyn tauti*

Seroneutralointikoe on tehtävä seuraavalla tavalla:

Seerumi

Kaikki seerumit inaktivoidaan 56 °C:ssa 30 minuuttia ennen käyttöä.

Menettely

Erityyppisten virusten vakio seroneutralointikoe mikrotitrauslevyillä suoritetaan Vero-solujärjestelmän tai muiden herkkien solujärjestelmien avulla. Aujeszkyn taudin virusta käytetään annoksena 100 $TCID_{50}$ 0,25 ml:aa kohti; inaktivoidut laimentamattomat seeruminäytteet sekoitetaan yhtä suureen määrään (0,025 ml) virussuspensiota. Virus-seerumiseoksia inkuboidaan kahden tunnin ajan 37 °C:ssa mikrotitrauslevyillä ennen sopivien solujen lisäämistä. Soluja käytetään sellaisena pitoisuutena, että ne muodostavat 24 tunnin kuluttua ehjän yksikerroksisen viljelmän. Solususpensiota kaadetaan 0,1 ml jokaiseen syvennykseen.

Suoritettavat tarkastukset

Viruksen tartuntatarkastus
Seerumin myrkyllisyystarkastus
Siirrostamattomien soluviljelyjen tarkastus
Vertailuantiseerumit

Tulkinta

Neutralointikokeen tulokset ja käytetyn viruksen pitoisuus kirjataan 3–7 päivän 37 °C:ssa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen. Negatiivisena pidetään alle 1/2:n seerumipitoisuuksia (laimentamaton seerumi).

4. *Sikojen tarttuva suolistotulehdus (TGE)*

Seroneutralointikoe on tehtävä seuraavalla tavalla:

Seerumi

Kaikki seerumit inaktivoidaan 56 °C:ssa 30 minuuttia ennen käyttöä.

Menettely

Erityyppisten virusten vakio seroneutralointikoe mikrotitrauslevyillä suoritetaan A72-soluilla (koiran kasvain) tai muiden herkkien solujärjestelmien avulla. TGE-virusta käytetään 100 $TCID_{50}$/0,25 ml; inaktivoidut laimentamattomat seeruminäytteet sekoitetaan yhtä suureen määrään (0,025 ml) virussuspensiota. Virus-seerumiseoksia inkuboidaan 30–60 minuuttia 37 °C:ssa mikrotitrauslevyillä ennen sopivien solujen lisäämistä. Soluja käytetään sellaisena pitoisuutena, että ne muodostavat 24 tunnin kuluttua ehjän yksikerroksisen viljelmän. Jokaiseen syvennykseen kaadetaan 0,1 ml solususpensiota.

Suoritettavat tarkastukset

Viruksen tartuntatarkastus
Seerumin myrkyllisyystarkastus
Siirrostamattomien soluviljelyjen tarkastus
Vertailuantiseerumit

Tulkinta

Neutralointikokeen tulokset ja käytetyn viruksen pitoisuus kirjataan 3–5 päivän 37 °C:ssa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen. Negatiivisina pidetään alle 1/2:n (loppulaimennos) seerumipitoisuuksia. Jos laimentamattomat seeruminäytteet vaikuttavat myrkyllisesti kudosviljelmiin, nämä seerumit voidaan ennen niiden käyttöä kokeessa laimentaa suhteessa 1/2. Tämä vastaa seerumin loppulaimennoksen 1/4:aa. Näissä tapauksissa negatiivisina pidetään alle 1/4:n (loppulaimennos) seerumipitoisuuksia.

5. *Sikainfluenssa*

Agglutinaatio-hemagglutinaatiokoe on suoritettava seuraavalla tavalla:

Menettely

Kokeissa käytetään standardimenetelmiä (*US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series No 6).*

Epäspesifisten inhibiittorien tuhoamiseksi sikaseerumit on käsiteltävä joko reseptorituhoentsyymillä (*Vibrio cholera* -suodos), jonka on annettava vaikuttaa yön yli 37 °C:ssa, minkä jälkeen niitä kuumennetaan 56 °C:ssa 30 minuutin ajan kaiken jäljellä olevan entsyymiaktiivisuuden tuhoamiseksi tai 25-prosenttisen kaoliinin annetaan vaikuttaa yön yli 4°C:ssa (Clark ja Casals, 1958, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 7, 561).

Kun seerumit on absorboitu 10-prosenttisella kanan punasolususpensiolla tunnin ajan 37 °C:ssa, ne testataan neljän soveltuvan viruksen hemagglutinaatioyksikön avulla käyttäen 1 % kanan punasoluja.Viruksen ja seerumin annetaan olla kosketuksissa 60 minuutin ajan huoneenlämmössä ennen punasolujen lisäämistä.

Tulkinta

Pitoisuuksia, jotka ovat vähintään 1/10 tai sitä suuremmat, pidetään positiivisina.

6. *Suu- ja sorkkatauti*

Siansukuisten eläinten suu- ja sorkkataudin selvittämiseksi suoritettavat kokeet tehdään I luvun 10 kohdan mukaisesti.

7. *Swine vesicular -tauti*

Seroneutralointikoe on tehtävä seuraavalla tavalla:

Seerumi

Kaikki seerumit inaktivoidaan 56 °C:ssa 30 minuuttia ennen käyttöä.

Menettely

Erityyppisten virusten vakio seroneutralointikoe mikrotitrauslevyillä suoritetaan IB-RS-2 soluilla tai muiden herkkien solujärjestelmien avulla. Käytetään UKG 27/72-viruskantaa tai muuta vertailukantaa annoksena 100 $TCID_{50}$/0,25 ml. Koeseerumit laimennetaan suhteessa 1/4 ja inaktivoidaan ja valmistetaan sarja kaksoislaimennoksia. Seeruminäytteet sekoitetaan samaan määrään virussuspensiota ja inkuboidaan tunnin ajan 37 °C:ssa mikrotitrauslevyillä ennen kuin siihen lisätään 0,025 ml solususpensiota, jossa on 3×10^6 solua/ml.

Suoritettavat tarkastukset:

Viruksen tartuntatarkastus
Seerumin myrkyllisyystarkastus
Siirrostamattomien soluviljelyjen tarkastus
Vertailuantiseerumit

Tulkinta

Neutralointikokeen tulokset ja käytetyn viruksen pitoisuus kirjataan 3 päivän 37 °C:ssa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen. Seerumipitoisuuksia pidetään negatiivisina, jos neutraloitumista ei tapahdu laimennoksella 1/11.

8. *Sikarutto*

Klassisen sikaruton selvittämiseksi suoritettavat kokeet tehdään neuvoston direktiivin 80/217/ETY(1) liitteen I mukaisesti.

9. *Leptospira-tauti*

Siansukuisten eläinten leptospira-taudin selvittämiseksi suoritettavat kokeet tehdään tämän liitteen I luvun 6 kohdan mukaisesti.

---

(1) EYVL N:o L 47, 21.2.1980, s. 11

LIITE II

MYYNTIPAIKKOJEN HYVÄKSYMISEN VÄHIMMÄISEDELLYTYKSET EUROOPAN YHTEISÖÖN VIETÄVIEN NAUDAN- JA SIANSUKUISTEN ELÄINTEN KAUPASSA

1. Virkaeläinlääkärin on valvottava myyntipaikkaa.

2. Myyntipaikan on sijaittava keskellä vyöhykettä, jolla ei kahdenkymmenen kilometrin säteellä 30 päivän aikana ennen paikan käyttämistä hyväksyttynä myyntipaikkana ole virallisten tietojen mukaan ilmoitettu yhtään suu- ja sorkkatautitapausta eikä, kun myyntipaikat on hyväksytty sioille, yhtään sikarutto-, Swine vesicular- tai Teschenin tautitapausta.

3. Ennen käyttöä hyväksyttynä myyntipaikkana myyntipaikka on puhdistettava, desinfioitava vientimaassa virallisesti hyväksytyllä desinfiointiaineella, jotta edellä 2 kohdassa mainitut sairaudet voidaan tehokkaasti ehkäistä.

4. Kokoamiskeskusten, lastauspaikkojen ja muiden paikkojen, joiden kautta yhteisöön vietävät naudan- ja siansukuiset eläimet kulkevat, on täytettävä tämän liitteen 1, 2 ja 3 kohdassa mainitut edellytykset.

5. Kaikkien naudan- tai siansukuisten eläinten, joita kuljetetaan hyväksyttyjen myyntipaikkojen kautta, on täytettävä kyseisen eläinlajin yhteisöön tuontia koskevat terveysvaatimukset.

6. Yhteisöön vietäväksi tarkoitetut, hyväksytyn myyntipaikan kautta kulkevat eläimet on lastattava tai kuljetettava kuuden seuraavan päivän aikana vientimaan rajalle

   a) olematta yhteydessä muiden sorkkaeläinten kuin kyseisen eläinlajin Euroopan yhteisöön tuontia koskevat terveysmääräykset täyttävien naudan- tai siansukuisten eläinten kanssa,

   b) jaettuna ryhmiin siten, että missään ryhmässä ei ole samanaikaisesti jalostuskarjaa tai tuotantoeläimiä tai heti teuraaksi tarkoitettuja eläimiä,

   c) kuljetusvälineissä tai konteissa, jotka on ennalta puhdistettu ja desinfioitu vientimaassa virallisesti hyväksytyllä desinfiointiaineella, jotta edellä 2 kohdassa mainitut sairaudet voidaan tehokkaasti ehkäistä, ja jotka on rakennettu siten, että sonta, virtsa, kuivikkeet tai rehu eivät irtoa tai putoa kuljetusvälineestä kuljetuksen aikana.

7. Kun yhteisöön vietäviä eläimiä koskevat vaatimukset edellyttävät kokeen suorittamista tietyssä määräajassa ennen lastausta, sanottuun määräaikaan luetaan koko kuuden päivän mittainen kokoamisaika alkaen eläinten kuljettamisesta hyväksytyn myyntipaikan kautta.

8. Vientimaa nimeää jalostuskarjan ja tuotantoeläinten hyväksytyt myyntipaikat sekä teuraseläinten hyväksytyt myyntipaikat ja ilmoittaa komissiolle sekä jäsenvaltioiden toimivaltaisille keskusviranomaisille näiden myyntipaikkojen nimet ja osoitteet.

9. Vientimaa päättää myyntipaikkojen, kokoamiskeskusten ja lastauspaikkojen virallisesta valvontamenettelystä ja huolehtii siitä, että valvonta toteutetaan.

10. Vientimaa huolehtii siitä, että myyntipaikkoja ja kokoamiskeskuksia koskevat tiedot merkitään yhteisöön vietäviä eläimiä seuraavien terveystodistusten asianmukaiseen kohtaan.