391D0189

17.4.91 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 96/1

KOMMISSIONENS BESLUT

av den 25 februari 1991

om fastställande av protokollen för standardisering av material och metoder för veterinärprover och villkoren för godkännande av marknader i samband med importen av tama nötkreatur och tamsvin från tredje land

(91/189/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 72/462/EEG av den 12 december 1972 om hälsoproblem och problem som rör veterinärbesiktning vid import från tredje land av nötkreatur, får, getter och svin samt av färskt kött eller färska köttvaror[1], senast ändrat genom direktiv 91/69/EEG[2], särskilt artikel 8.1 i detta, och

med beaktande av följande:

Genom direktiv 72/462/EEG tillåts import av nötkreatur och svin från de tredje länder som förtecknas i bilagan till rådets beslut 79/542/EEG[3], senast ändrat genom beslut 90/485/EEG[4].

De djurhälsovillkor som skall tillämpas vid importen av levande djur från tredje land måste fastställas med hänsyn till djurhälsoförhållandena i det landet.

Även om dessa djurhälsoförhållanden kan variera från land till land så skall protokollen för veterinärprover och villkoren för godkännande av marknader i tredje land för handel med djur som är avsedda för export till gemenskapen gälla för alla tredje länder.

För att förenkla besluten om de djurhälsovillkor som skall tillämpas vid import av tama nötkreatur och svin från tredje länder, vore det lämpligt att kunna hänvisa till ett enda gemensamt beslut som innehåller protokollen för veterinärprover och villkoren för godkännande av marknader.

Ett beslut rörande protokollen för veterinärprover och villkoren för godkännande av marknader i tredje länder skall bara tillämpas på ett tredje land för vilket ett beslut antagits som särskilt rör djurhälsovillkoren i det landet.

De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från Ständiga veterinärkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

1. I detta beslut fastställs protokollen för veterinärprover och villkoren för godkännande av marknader i tredje land för

(1) EGT nr L 302, 31.12.1972, s. 28.
(2) EGT nr L 46, 19.2.1991, s. 37.
(3) EGT nr L 146, 14.6.1979, s. 15.
(4) EGT nr L 276, 27.9.1990, s. 46.

handel med djur som är avsedda för export till gemenskapen i samband med importen av levande nötkreatur och svin från de tredje länder som förtecknas i bilagan till beslut 79/542/EEG.

2. De villkor som fastställs i bilaga 1 och 2 till det här beslutet skall bara tillämpas på de tredje länder för vilka beslut har antagits som fastställer djurhälsovillkoren för varje situation i enlighet med artikel 8 i direktiv 72/462/EEG.

Artikel 2

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 25 februari 1991.

På kommissionens vägnar
Ray MAC SHARRY
Ledamot av kommissionen

BILAGA I

PROTOKOLL FÖR STANDARDISERING AV MATERIAL OCH PROVMETODER

KAPITEL I

Nötkreatur

1. *Tuberkulos*

Det enkla intrakutana tuberkulinprovet med tuberkulin från nötkreatur skall utföras i enlighet med bilaga B till direktiv 64/432/EEG av den 26 juni 1964(1) om djurhälsoproblem som påverkar handeln med nötkreatur och svin inom gemenskapen.

2. *Brucellos*

Serum-agglutinationsprovet och komplementbindningsprovet skall utföras i enlighet med styckena A och B i bilaga C till direktiv 64/432/EEG.

3. *Enzootisk bovin leukos*

Ett agargel-immunodiffusionsprov skall utföras i enlighet med bilaga G till rådets direktiv 64/432/EEG.

4. *Bluetongue*

A. En blockerande eller kompetitiv ELISA skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Den kompetetiva ELISA med användning av monoklonala antikroppar 3-17-A3 kan påvisa antikroppar mot alla kända serotyper av bluetonguevirus (BTV).

Provprincipen är att avbryta reaktionen mellan BTV-antigenen och en gruppspecifik monoklonal antikropp (3-17-A3) genom tillsats av provserumspädningar. De antikroppar mot BTV som finns i provserumet blockerar den monoklonala antikroppens (MAK) reaktionsförmåga och leder till en minskning av den förväntade färgutvecklingen när enzymsubstrat tillsätts.

Material och reagenser

1. Flatbottnade mikrotiterplattor.

2. Antigen: Bereds enligt beskrivningen nedan.

3. Blockeringsbuffert: 5 % (w/v) *Marvel* torrmjölkspulver, 0,1 % (v/v) Tween-20 (levereras som polyoxyetylen-sorbitonmonolauratlösning) i PBS.

4. Monoklonal antikropp (MAK): 3-17-A3 (levereras som hybridom vävnadskultursupernatant) lagrad vid – 20 °C eller frystorkad, före användning utspädd 1:50 med en blockeringsbuffert som riktar sig mot den gruppspecifika polypeptiden p_7.

5. Konjugat: Kanin-antimusglobulin (adsorberat och eluerat) konjugerat med pepparrotsperoxidas och förvarat mörkt vid 4 °C.

6. Substrat och kromogen: 0,2 g ortofenylendiamin (OPD) löst i en buffert som består av 2,553 g citronsyra och 4,574 g av dinatrium-väteortofosfat och är utspätt med destillerat vatten tills det mäter 500 ml, uppdelat i lika stora uttag om 25 ml och förvarat mörkt vid – 20 °C med tillsatts av 12 µl/25 ml väteperoxid (30 % w/v) omedelbart före användning.

Hantera OPD med försiktighet — använd gummihandskar — misstanke om mutagen.

7. En molar svavelsyra: 26,6 ml syra tillsätts till 473,4 ml destillerat vatten.

Kom ihåg — tillsätt alltid syra till vatten, aldrig vatten till syra.

(1) EGT nr L 121, 29.7.1964, s. 1977/64.

8. Skakapparat.

9. ELISA-spektofotometer (provet kan avläsas visuellt)

Provformat

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Blindprov			Antigen + konjugat						1
Mak-kontroll			Antigen + Mak + konjugat						2
positiv kontroll	1/2	1/4	Antigen + positivt serum + Mak + konjugat 1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3
	1/2	1/4	Provsera 1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Provsera									7
									8
									9
									10
									11
									12

Provprotokoll

Blindprov:

Rad 1 A–H är ett blindprov som består av BTV-antigen och konjugat. Detta kan användas som blindprov av ELISA-spektofotometern.

Mak-kontroll:

Rad 2 A–H är den monoklona antikroppskontrollen och består av BTV-antigen, monoklonala antikroppar och konjugat. Detta motsvarar en negativ kontroll. Medelvärdet av absorbansavläsningarna från denna kontroll motsvarar värdet av 0 % hämning.

Positiv kontroll:

Rad 3 A–H är den positiva kontrollen. Den består av BTV-antigen, BTV-positiva antiserumspädningar, Mak och konjugat. Detta ingår som en indikator på att provet fungerar ordentligt och liknande hämningsnivåer bör erhållas från prov till prov.

Provsera:

I det provformat som visas ovan kan 18 sera prövas utspädda i proportionerna 1:2, 1:4, 1:8, och 1:16. Detta ger en viss indikation om antikroppstitern i provserumen. Spädningsserien kan förlängas ytterligare för att få fram serumspädningens sluttiter. Alternativt kan sera, när det gäller storskaliga serologiska undersökningar, prövas i en enda spädning (1:4) eller två spädningar (1:2 och 1:4) som ett snabbt screeningprov.

Metod:

1. Späd BTV-antigen till förtitrerad koncentration i PBS, och sonikera ett ögonblick för att sprida ackumulerat virus (pipettera kraftig om det inte finns någon sonikator) och tillsätt 50 µl till alla brunnar i ELISA-plattan. Knacka på plattans sidor för att sprida antigenen.

2. Inkubera i en skakapparat i 60 minuter vid 37 °C. Tvätta plattorna genom att tre gånger översköljа brunnarna med osterilt PBS och tömma dem, torka sedan med absorberande papper.

3. Tillsätt 50 µl blockeringsbuffert per brunn. Tillsätt provsera och positivt serum i respektive brunnar och späd jämnt över plattan med hjälp av en flerkanalspipett. Tillsätt inget serum till blindprovet eller Mak-kontrollen.

4. Späd Mak-kontrollen i blockeringsbufferten (till förtitrerad spädning) omedelbart efter det att provserumen tillsatts och tillsätt 50 µl till alla brunnar i plattan utom blindprovet.

5. Inkubera i en skakapparat i 60 minuter vid 37 °C. Tvätta tre gånger med PBS och torka med absorberande papper.

6. Späd kanin-antimuskoncentrat 1:5 000 i blockeringsbuffert och tillsätt 50 µl till alla brunnar i plattan.

7. Inkubera i en skakapparat i 60 minuter vid 37 °C. Tvätta tre gånger med PBS och torka med absorberande papper.

8. Tina OPD och tillsätt omedelbart före användning 12 µl av 30 % väteperoxid för varje 25 ml OPD. Tillsätt 50 µl till alla plattans brunnar. Låt färg utvecklas i ungefär 10 minuter och avsluta reaktionen med 1 M svavelsyra (50 µl per brunn). Färgen bör utvecklas i Mak-kontrollbrunnarna och i de brunnar som innehåller sera utan BTV-antikroppar.

9. Undersök och registrera plattorna, antingen visuellt eller med hjälp av en spektofotometer.

Resultatanalys

Beräkna medelvärdet av OD-värdena från Mak-kontrollen. Det är värdet av 0 % hämning. Värdena av den optiska densiteten från provserumen uttrycks som hämningsvärden i procent med hjälp av följande formel:

$$\textit{Hämningsvärde i procent} = 100 - \frac{\textit{OD med provserum}}{\textit{OD utan provserum}} \times 100.$$

Hämningsvärden större än 40 % vid en serumspädning på 1:4 betraktas som positiva. Visuell avläsning är möjlig eftersom 40 % är det lägsta värde som är lätt att se med blotta ögat.

Beredning av BTV-ELISA-antigen:

1. Tvätta 10 flaskor med utväxta BHK-21 celler tre gånger med serumfritt Eagle's medium och infektera med bluetongue virus serotyp 1 i serumfritt Eagle's medium.

2. Inkubera vid 37 °C och undersök dagligen för cytopatisk effekt (cpe).

3. Samla in viruset när cpe kan konstateras i 80 till 90 % av cellagret i varje flaska genom att skaka av alla celler som fortfarande sitter kvar på glaset.

4. Centrifugera cellerna med en hastighet av 2 000 eller 3 000 vpm för att sammanpressa dem.

5. Ta bort supernatanten och lös cellerna igen i cirka 30 ml PBS med 1 % "Sarkosyl" och 2 ml fenolmetylsulfonylflourid (lyseringsbuffert). Det kan få cellerna att bilda en gel och för att minska den effekten får mer lyseringsbuffert tillsättas.

   OBS: Fenylmetylsulfonylflourid är skadligt — hantera med största försiktighet.

6. Splittra cellerna i 60 sekunder med en sonikatorsond med en amplitud på 30 mikron.

7. Centrifugera med en hastighet av 10 000 vpm i 10 minuter.

8. Lagra supernatanten vid + 4 °C och lös de återstående centrifugerade cellerna igen i 10–20 ml lyseringsbuffert.

9. Sonikera och gör supernatanten klar genom att lagra den på varje stadium, totalt tre gånger.

10. Samla supernatanterna och centrifugera med en hastighet av 24 000 vpm i 120 minuter vid + 40 °C på en 5 ml kudde bestående av 40 % sukros (w/v i PBS) med 30 ml Beckmann centrifugrör och en SW 28 rotor.

11. Ta bort supernatanten, töm rören helt och lös de centrifugerade cellerna igen i PBS genom att sonikera. Lagra antigenen i uttag vid −70 °C.

Titrering av BTV ELISA-antigen

Bluetongue ELISA-antigen titreras med hjälp av indirekt ELISA. Dubbelspädda lösningar av antigen titreras mot en konstant lösning (1/50) av monoklonala antikroppar 3-17-A3. Protokollet är följande:

Metod:

1. Späd BTV-antigen i PBS över mikrotiterplattan i en dubbelspädd serie (50 µl per brunn) med hjälp av en flerkanalspipett.

2. Inkubera i en timme vid 37 °C i en skakapparat.

3. Tvätta plattorna tre gånger med PBS.

4. Tillsätt 50 µl monoklonala antikroppar 3-17-A3 (utspädda 1:50) till varje brunn på mikrotiterplattan.

5. Inkubera i en timme vid 37 °C i en skakapparat.

6. Tvätta plattorna tre gånger med PBS.

7. Tillsätt 50 µl kanin-antimusglobulin konjugerat med pepparrotsperoxidas, utspätt till en optimal förtitrerad koncentration, till varje brunn på mikrotiterplattan.

8. Inkubera i en timme vid 37 °C i en skakapparat.

9. Tillsätt substrat och kromogen enligt den tidigare beskrivningen. Avsluta reaktionen efter 10 minuter genom att tillsätta en molar svavelsyra (50 µl per brunn).

Vid det kompetetiva provet måste det finnas ett överskott av monoklonala antikroppar, varför en antigenspädning bestäms genom att ett värde väljs som ligger mitt på titreringskurvans fallande del, vilket ger cirka 0,8 OD efter 10 minuter.

B. Agargel-immunodiffusionsprovet skall genomföras enligt följande protokoll:

Material och reagenser

Antigen:

De antigener som fälls ut bereds i ett cellkultursystem som tål en snabb tillväxt av en referensstam av bluetonguevirus. BHK- eller Vero-celler rekommenderas. Vid slutet av virustillväxten finns det antigener i supernatantvätskan, men de måste koncentreras 50–100 gånger för att bli effektiva. Detta kan uppnås med en standardmetod för proteinkoncentration. Virus i antigenerna kan inaktiveras genom att 0,3 % (v/v) beta-propiolakton tillsätts.

Känt positivt kontrollserum:

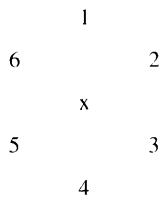
Genom användning av det internationella referensserumet och antigen framställs ett nationellt standardserum, som är standardiserat i ett optimalt förhållande till det internationella standardserumet. Det frystorkas och används som det kända kontrollserumet i varje prov.

Provserum

Metod:

Förbered 1 % agaros i borat eller natriumbarbitolbuffert, pH 8,5–9,0 och häll i en petriskål tills ett djup på minst 3,0 mm uppnåtts.

Skär ut ett provmönster i agarn med sju fuktighetsfria brunnar, var och en minst 5,0 mm i diameter. Mönstret består av en mittbrunn och sex brunnar runt den i en cirkel med radie 3 mm.



Fyll mittbrunnen med standardantigenen. Fyll de yttre brunnarna 2, 4 och 6 med känt positivt serum och brunnarna 1, 3 och 5 med provserum.

Inkubera systemet i upp till 72 timmar vid rumstemperatur i en sluten fuktkammare.

Tolkning:

Ett provserum är positivt om det formar en specifik precipitatlinje med antigenen som är fullständigt identisk med den linje det formar med kontrollserumet. Ett provserum är negativt om det inte formar en specifik linje med antigenen och om inte kontrollserumets linje är böjd. Petriskålarna bör undersökas mot en mörk bakgrund och med indirekt belysning.

5. *Epizoisk hemorragisk sjukdom*

Agargel-immunodiffusionsprovet skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Material och reagenser

Antigen:

De antigener som fälls ut bereds i ett cellkultursystem som tål en snabb tillväxt av den eller de aktuella serotyperna av epizoiskt hemorragisk sjukdomsvirus. BHK- eller Vero-celler rekommenderas. Vid slutet av virustillväxten finns det antigener i supernatantvätskan, men de måste koncentreras 50–100 gånger för att bli effektiva. Detta kan uppnås med en standardmetod för proteinkoncentration. Virus i antigenerna kan inaktiveras genom att 0,3 % (v/v) beta-propiolakton tillsätts.

Känt positivt kontrollserum:

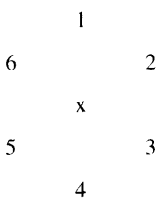
Genom användning av det internationella referensserumet och antigen framställs ett nationellt standardserum, som är standardiserat i ett optimalt förhållande till det internationella standardserumet. Det frystorkas och används som det kända kontrollserumet i varje prov.

Provserum

Metod:

Förbered 1 % agaros i borat eller natriumbarbitolbuffert, pH 8,5–9,0, häll i en petriskål tills ett djup på minst 3,0 mm uppnåtts.

Skär ut ett provmönster i agarn med sju fuktighetsfria brunnar, var och en minst 5,0 mm i diameter. Mönstret består av en mittbrunn och sex brunnar runt den i en cirkel med radien 3 mm.



Fyll mittbrunnen med standardantigenen. Fyll de yttre brunnarna 2, 4 och 6 med känt positivt serum och brunnarna 1, 3 och 5 med provserum.

Inkubera systemet i upp till 72 timmar vid rumstemperatur i en sluten fuktkammare.

Tolkning:

Ett provserum är positivt om det formar en specifik precipitatlinje med antigenen som är fullständigt identisk med den linje det formar med kontrollserumet. Ett provserum är negativt om det inte formar en specifik linje med antigenen och om inte kontrollserumets linje är böjd. Petriskålarna bör undersökas mot en mörk bakgrund och med indirekt beslysning.

6. *Leptospiros*

Det mikroskopiska agglutinationsprovet skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Kulturer:

Odlas i Korthofs eller EMJH odlingssubstrat vid 30 °C.

Antigen:

Innehåller 2×10^8 organismer per ml odlingssubstrat.

Metod:

Lika delar antigen och serum blandas på flatbottnade mikrotiterplattor och inkuberas vid 30 °C i 2 timmar eller vid 37 °C i 1–1,5 timmar. Provet avläses vid mörkfältsbelysning med låg effekt och med en förstoring på 60–100 gånger.

Tolkning:

Ett negativt resultat är mindre än 50 % agglutination vid en spädning på 1:50.

7. *Infektiös bovin rino-trakeit/infektiös pustulös vulvo-vaginit*

Serumneutraliseringsprovet skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Serum:

Alla sera skall värmeinaktiveras vid 56 °C i 30 minuter före användning.

Metod:

Vid det konstanta virusvarierande serumneutraliseringsprovet i mikrotiterplattor används MDBK eller andra mottagliga celler. Colorado, Oxford eller någon annan referensstam av viruset används vid 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml. Inaktiverade outspädda serumprover blandas med lika mängd (0,025 ml) viruslösning. Virus-/serumblandningarna inkuberas i två timmar vid 37 °C i mikrotiterplattorna innan MDBK-cellerna tillsätts. Cellerna har en sådan koncentration att ett fullständigt enskiktslager bildas efter 24 timmar.

Kontroller:

virusinfektivitetsprov,
serumtoxicitetskontroller,
oympade cellkulturkontroller,
referensantisera.

Tolkning:

Resultaten av neutraliseringsprovet och titern för det virus som användes i provet registeras efter tre till sex dagars inkubation vid 37°C. Serumtitrarna anses vara negativa om det inte sker någon neutralisering vid en utspädning på 1:2 (outspätt serum).

8. *Bovin virusdiarré (BVD)*

A. Virusisoleringen skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Provmaterial och påvisningsmetoder:

Använd serum, en suspension med vita blodkroppar och blodkoagel från färska blodprover, som inte har värmeinaktiverats, från nötkreatur som är äldre än sex månader. Ett immunologiskt färgningsförfarande såsom den flourescerande antikroppstekniken (FA) eller ett prov för enzymkopplade antikroppar, t. ex. immunoperoxidas (IPX) används för att upptäcka BVD-virus i oympade cellkulturer.

Provreagens

För FA-provet krävs ett FITC-konjugerat specifikt BVD-antiserum. För IPX-provet krävs ett okonjugerat specifikt BVD-antiserum från nötkreatur, ett peroxidaskonjugerat antibovint antiserum och passande enzymsubstrat (såsom 3-amino-9-etylkarbazol). Ett anti-BVD-serum från en annan art än nötkreatur får användas under förutsättning att peroxidaskonjugatet är riktat mot den artens serumglobuliner. Alla antivirala sera som används måste ha bevisad specificitet och bred reaktivitet.

Metod:

Använd mottagliga celler såsom celler av bovina turbinat, kalvnjurar eller kalvtestiklar som är fria från endogena BVD-virus.

Serumprover — provserumet och vävnadskulturcellerna placeras i täckglaskulturer eller i brunnar i mikrotiterplattor eller andra behållare så att den slutliga serumlösningen är 10 %.

Vita blodkropps- eller blodkoagelsuspension — proverna tillsätts till utväxta enskiktslagerkulturer i en timme vid 37 °C, sedan tvättas kulturerna och täcks med odlingssubstrat innehållande 10 % BVD-fritt kalvfosterserum.

Kulturerna inkuberas sedan vid 37 °C, fixerade och färgade antingen med FA- eller med IPX-metoden.

Kontroller:

positiv BVD-viruskontroll,
negativ kontroll utan tillsats av virus.

Tolkning:

FA-provet färgas efter fyra till sex dagars inkubation och avläses i ultraviolett ljus. Fluorescens i de celler som inkuberats med provet tolkas som ett positivt resultat.

IPX-provet färgas efter fyra dagars inkubation och avläses i ett ljusmikroskop. Mörkbrun färgning i cytoplasman i några av cellerna tolkas som ett positivt resultat.

B. Serumneutraliseringsprovet skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Serum:

Alla sera värmeinaktiveras vid 56 °C i 30 minuter före användning.

Metod:

Vid den konstanta virusvarierande serumneutraliseringsprovet på mikrotiterplattor används lämpliga bovina celler (t. ex. bovina turbinatceller så som de beskrivits av McClurkin m. fl., 1974, Arch. ges. Virusforsch., 45, 285–289).

Det är nödvändigt att alla reagenser och celler är fria från kontaminerande icke-cytopatiska BVD/MD-virus.

Provviruset, som får vara av vilken lämplig cytopatisk referensstam som helst (såsom NADL-stammen) används i en koncentration på i genomsnitt 100 infektiösa cellkulturdoser per 0,025 ml. Spädningar av inaktiverade sera blandas med lika delar virusspädningar (0,025 ml) och virus-/serumblandningarna inkuberas i en timme vid 37 °C innan liknande volymer av cellösningar tillsätts. Cellerna används i en koncentration som gör att det bildas ett fullständigt enskiktslager inom två dagar.

Kontroller:

virusinfektivitetsprov,
serumtoxicitetskontroller,
oympade cellkulturkontroller,
referensantisera.

Tolkning:

För NADL-referensvirusstammen är det optimalt att avläsa efter fem dagars inkubation vid 37 °C.

En genomsnittlig neutraliseringstiter på en tiondel anses indikera en immunreaktion på en tidigare akut infektion.

9. *Mjölkanalys för mastit*

Mjölkanalys skall genomföras i enlighet med bilaga D till direktiv 64/432/EEG.

10. *Mul- och klövsjuka (FMD)*

A. Insamlingen av matstrupe-/svalgprov och provningen skall utföras enligt följande protokoll:

Reagens:

Före provtagningen förbereds transportmediet. Volymer om två ml fördelas i så många behållare som det finns djur att ta prover på. De behållare som används skall tåla frysning över fast koldioxid eller flytande kväve.

Provet tas med en särskilt utformad spottsamlare eller probang.

För probangskålen genom munnen, över tungryggen och ner i övre delen av matstrupen. Försök att skrapa av ytepitelet i övre matstrupen och svalget genom laterala och dorsala rörelser. Ta sedan ut probangen, helst efter det att djuret har svalt. Skålen bör vara full och innehålla en blandning av slem, saliv, vätska från matstrupen och cellmaterial. Var noga med att varje prov ska innehålla synligt cellmaterial. Undvik onödigt hårdhänt behandling som orsakar blödning.

Proverna från vissa djur kan vara kraftigt påverkade av innehåll från idissling. Sådana prov bör kastas och djurets mun sköljas med vatten, eller ännu hellre med fysiologisk koksaltlösning, innan ett nytt prov tas.

Behandling av prover:

Varje prov som tagits med probangskålen skall genomgå en kvalitativ undersökning och 2 ml tillsätts till en lika stor mängd transportmedium i en behållare som tål frysning. Behållarna tillsluts noga, förseglas, desinficeras och märks. Proverna förvaras svalt (+ 4°C) och undersöks inom tre till fyra timmar eller ställs över torr is (– 69°C) eller flytande kväve och hålls frusna tills de skall undersökas.

Probangen desinficeras mellan varje djur och sköljs tre gånger i rent vatten.

Provtagning för FMD-virus:

Proverna ympas in i primära bovina tyroideacellkulturer i minst tre rör per prov. Andra mottagliga celler, t. ex. primära njurceller från nötkreatur eller svin kan användas, men det bör beaktas att de är mindre mottagliga för vissa stammar av FMD-virus. Rören inkuberas vid 37 °C på en cellodlingsutrustning för rollerkulturer och undersöks dagligen i 48 timmar för förekomsten av en cytopatisk effekt (CPE). Om resultatet är negativt överförs cellerna blint till nya kulturer och undersöks igen i 48 timmar. Eventuell CPE:s specificitet skall fastställas.

Rekommenderattransportmedium

1. 0,08 M fosfatbuffert pH 7,2 med 0,01 % bovint serumalbumin, 0,002 % fenolrött och antibiotika.

2. Vävnadskulturmedium (t. ex. Eagles MEM) innehållande 0,04 M Hepesbuffert 0,01 % bovint serumalbumin och antibiotika, pH 7,2.

Antibiotika (per ml slutprodukt) skall tillsättas till transportmediet t.ex.:

—	penicillin	1 000 IU,
—	neomycinsulfat	100 IU,
—	polymyxin-B-sulfat	50 IU,
—	mycostatin	100 IU.

B. Virusneutraliseringen skall utföras enligt följande protokoll:

Reagens:

Stam-FMDV-antigener bereds i cellkulturer eller på nötkreaturstungor och lagras vid –70 °C eller mindre eller vid – 20 °C efter det att 50 % glycerol tillsatts. Detta är stamantigenen. FMDV är stabilt under dessa förhållanden och titrarna varierar väldigt lite under flera månader.

Metod:

Provet utförs i en flatbottnad mikrotiterplatta av vävnadskulturgrad med hjälp av mottagliga celler som t. ex. IB-RS-2, BHK-21 eller kalvnjureceller.

Sera för provet späds 1:4 i serumfritt cellkulturmedium med tillsats av 100 IU/ml neomycin eller annan lämplig antibiotika. Serumen inaktiveras vid 56 °C i 30 minuter och mängder om 0,05 ml används för att bereda en dubbelspädd serie på mikrotiterplattor med hjälp av en 0,05 ml spädningspipett.

Förtitrerade virus som också är utspädda i serumfritt odlingssubstrat och innehåller 100 $TCID_{50}$/0,05 ml tillsätts sedan till varje brunn. Efter inkubation vid 37 °C i en timme för att möjliggöra en neutralisering tillsätts 0,05 ml lösningsceller som innehåller 0,5–1,0 × 10^6 celler/ml i cellodlingssubstrat som innehåller serum utan FMD-antikroppar till varje brunn och plattorna förseglas.

Plattorna inkuberas vid 37 °C. Enskiktslagren är vanligtvis utväxta inom 24 timmar. CPE har vanligtvis framskridit tillräckligt efter 48 timmar för att det skall gå att avläsa provet i mikroskop. Vid den tidpunkten kan en slutlig *mikroskopisk* avläsning av provet göras eller så kan plattorna fixeras och färgas för en *makroskopisk* avläsning, till exempel med 10 % formaldehyd och 0,05 % metylenblått.

Kontroller:

Kontrollerna av varje prov omfattar homologt antiserum av känd titer, en cellkontroll, en serumtoxicitetskontroll, en odlingssubstratkontroll och en virustitrering med hjälp av vilken den verkliga virusmängden i provet beräknas.

Tolkning:

Brunnar, som visar tecken på CPE, anses vara infekterade och neutraliseringstitrarna uttrycks som det reciproka värdet av den slutliga serumspädningen i virus-/serumblandningarna vid sluttitern 50 % uppskattad enligt Spearman-Karbermetoden. (Karber, G., 1931, *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 162, 480.)*

Proverna betraktas som giltiga när den verkliga virusmängd som använts per brunn i provet är mellan $10^{1,5}$ och $10^{2,5}$ $TCID_{50}$ och när referensserumets titer är mindre än dubbelt så hög som den väntade titern, uppskattad utifrån tidigare titreringars modus. Om kontrollvärdena är utanför dessa gränser upprepas proverna.

En sluttiter på 1:11 eller mindre betraktas som negativ.

C. Påvisningen och kvantifieringen av antikroppar genom ELISA skall utföras enligt följande protokoll:

Reagens:

Kaninantiserum till 146S-antigen av sju typer av mul- och klövsjukevirus (FMDV) som används i en förutbestämd optimal koncentration i karbonat/bikarbonatbuffert, pH 9,6.

Antigener bereds av utvalda virusstammar som odlats i enskiktslager av BHK-21 celler. De ej renade supernatanterna används och förtitreras enligt protokollet men utan serum, för att ge en spädning som efter tillsatts av en lika stor mängd PBST (fosfatbuffrat salt med 0,05 % Tween-20 och fenolröd indikator) ger en optisk densitetavläsning på 1,2–1,5. Virusen kan användas inaktiverade. PBST används som förtunningsmedel. Marsvinsantiserum bereds genom att marsvin ympas med 146S-antigen av varje serotyp. En förutbestämd optimal koncentration bereds i PBST innehållande 10 % normalt bovint serum och 5 % normalt kaninserum.

Kanin-antimarsvinsimmunoglobulin konjugerat med pepparotsperoxidas används i en förutbestämd optimal koncentration i PBST innehållande 10 % normalt bovint serum och 5 % normalt kaninserum.

Provsera späds i PBST.

Metod:

1. ELISA-plattor täcks med 50 µl kaninantivirusserum över natten i en fuktkammare vid rumstemperatur.

2. Femtio mikroliter av en extra dubbel serie av varje provserum med början med 1:4 bereds i rundbottnade flerbrunnsplattor (bärarplattor). Femtio mikroliter av en konstant antigendos tillsätts till varje brunn och blandningarna lämnas över natten vid 4 °C. Tillsatsen av antigenen minskar startserumspädningen till 1:8.

3. ELISA-plattorna tvättas fem gånger med PBST.

4. Femtio mikroliter av serum-/antigenblandningar överförs sedan från bärarplattorna till de kaninserumtäckta ELISA-plattorna och inkuberas vid 37 °C i en timme i en skakapparat.

5. Efter tvättning tillsätts 50 ml marsvinsantiserum till den antigen som används i punkt 4 till varje brunn. Plattorna inkuberas vid 37 °C i en timme i en skakapparat.

6. Plattorna tvättas och 50 µl kanin-antimarsvinsimmunoglobulin konjugerat med pepparotsperoxidas tillsätts till varje brunn. Plattorna inkuberas vid 37 °C i en timme i en skakapparat.

7. Plattorna tvättas och 50 µl ortofenylendiamin innehållande 0,05 % H_2Oinf2 (30 %) w/v tillsätts till varje brunn.

8. Reaktionen avslutas efter 15 minuter med 1, 25M H_2SO_4.

Plattorna avläses spektofotometriskt vid 492 nm på en ELISA-spektofotometer som är kopplad till en mikrodator.

Kontroller:

För varje använd antigen innehåller 40 brunnar inget serum utan istället antigen utspätt i PBST.

En extra dubbel spädningsserie av homologt bovint referensantiserum.

En extra dubbel spädningsserie av negativt bovint serum.

Tolkning:

Antikroppstitrarna uttrycks som den slutspädning av provserum som ger 50 % av det genomsnittliga OD-värde som uppmätts i viruskontrollbrunnarna utan provserum. Titrar som är högre än 1:40 bektraktas som positiva.

Referenser:

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

KAPITEL II

Svin

1. *Tuberkulos*

Det enkla intrakutana tuberkulinprovet med fågeltuberkulin skall utföras i enlighet med bilaga B till direktiv 64/432/EEG, med undantag av att injektionsstället skall vara det lösa skinnet vid örats bas.

2. *Brucellos*

Serumagglutinationprovet och komplementbindningsprovet skall utföras i enlighet med styckena A och B i bilaga C till direktiv 64/432/EEG.

3. *Aujeszkys sjukdom*

Serumneutraliseringsprovet skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Serum:

Alla sera värmeinaktiveras vid 56 °C i 30 minuter före användning.

Metod:

Vid det konstanta virusvarierande serumneutraliseringsprovet på mikrotiterplattor används Vero eller andra mottagliga cellsystem. Aujeszkys sjukdomvirus används vid 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml. Inakitverade outspädda serumprover blandas med lika mängd (0,025 ml) viruslösning. Virus-/serumblandningarna inkuberas i två timmar vid 37 °C i mikrotiterplattor innan de celler som krävs för ändamålet tillsätts. Cellerna används i en koncentration som bildar ett fullständigt enskiktslager efter 24 timmar.

Kontroller:

virusinfektivitetsprov,
serumtoxicitetskontroller,
oympade cellkulturkontroller,
referensantisera.

Tolkning:

Resultaten av neutraliseringsprovet och titern för det virus som användes i provet registreras efter tre till sju dagars inkubation vid 37 °C. Serumtitrar på mindre än 1:2 (outspätt serum) betraktas som negativa.

4. *Transmissibel gastroenterit (TGE)*

Serumneutraliseringsprovet skall genomföras i enlighet med följande protokoll:

Serum:

Alla sera värmeinaktiveras vid 56 °C i 30 minuter före användning.

Metod:

Vid det konstanta virusvarierande serumneutraliseringsprovet på mikrotiterplattor används A72-celler (hundtumör) eller andra mottagliga cellsystem. TGE-virus används vid 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml. Inaktiverade outspädda serumprover blandas med lika mängd (0,025 ml) viruslösning. Virus-/serumblandningarna inkuberas i 30–60 minuter vid 37 °C i mikrotiterplattorna innan de celler som krävs för ändamålet tillsätts. Cellerna används i en sådan koncentration att de bildar ett fullständigt enskiktslager efter 24 timmar. Till varje cell tillsätts 0,1 ml cellösning.

Kontroller:

virusinfektivitetsprov,
serumtoxicitetskontroller,
oympade cellkulturkontroller,
referensantisera.

Tolkning:

Resultaten av neutraliseringsprovet och titern för det virus som användes i provet registreras efter tre till fem dagars inkubation vid 37 °C. Serumtitrar på mindre än 1:2 (slutspädning) betraktas som negativa. Om outspädda serumprover är giftiga för vävnadskulturerna får dessa sera spädas 1:2 innan de används i provet. Det motsvarar då en slutspädning av serumet på 1:4. Serumtitrar på mindre än 1:4 (slutspädning) betraktas som negativa i dessa fall.

5. *Svininfluensa*

Hemagglutinations-inhibitonsprovet skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Metod:

Proverna utförs med standardmetoder (*US Department of Health, Education och Welfare, Immunology series No 6).*

För att förstöra icke-specifika inhibitorer skall svinserumen behandlas antingen med receptorförstörande enzym (*Vibrio cholera*-filtrat) över natten vid 37 °C och sedan värmas vid 56 °C i 30 minuter för att förstöra återstående enzymaktivitet, eller genom behandling med 25 % kaolin över natten vid 4 °C (Clark and Casals, 1958, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7, 561).

Efter absorption med en 10 % lösning av kycklingerytrocyter i 1 timme vid 37 °C prövas serumen mot fyra hemagglutinerande enheter av det aktuella viruset med hjälp av 1 % kycklingerytrocyter. Virus och serum får vara i kontakt i 60 minuter vid rumstemperatur innan erytrocyterna tillsätts.

Tolkning:

Titrar på 1:10 eller mer betraktas som positiva.

6. *Mul- och klövsjuka*

Prover för mul- och klövsjuka hos svin skall utföras i enlighet med de protokoll som fastställs i kapitel I punkt 10.

7. *SVD*

Serumneutraliseringsprovet skall utföras i enlighet med följande protokoll:

Serum:

Alla sera värmeinaktiveras vid 56 °C i 30 minuter före användning.

Metod:

Vid det konstanta virus-varierande serumneutraliseringsprovet på mikrotiterplattor används IB-RS-2-celler eller andra mottagliga cellsystem. UKG 27/72 eller någon annan referensvirusstam används vid 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml. Sera för provet späds 1:4 och inaktiveras och en dubbel spädningsserie bereds. Serumproverna blandas med lika mängd viruslösning och inkuberas i en timme vid 37 °C i mikrotiterplattorna innan 0,025 ml celllösning med 3 × 106 celler/ml tillsätts.

Kontroller:

virusinfektivitetsprov,
serumtoxicitetskontroller,
oympade cellkulturkontroller,
referensantisera.

Tolkning:

Resultaten av neutraliseringsprovet och titern för det virus som användes i provet registreras efter tre dagars inkubation vid 37 °C. Serumtitrarna betraktas som negativa om det inte sker någon neutralisering vid en spädning på 1:11.

8. *Klassisk svinpest*

Prov för klassisk svinpest skall utföras i enlighet med bilaga I till rådets direktiv 80/217/EEG(1).

9. *Leptospiros*

Prover för leptospiros hos svin skall utföras i enlighet med kapitel I, punkt 6 i denna bilaga.

---

(1) EGT nr L 47, 21.2.1980, s. 11.

BILAGA 2

LÄGSTA VILLKOR FÖR GODKÄNNANDE AV MARKNADER FÖR HANDEL MED NÖTKREATUR ELLER SVIN AVSEDDA FÖR EXPORT TILL EUROPEISKA GEMENSKAPEN

1. Marknaderna skall övervakas av en officiell veterinär.

2. Varje marknad skall ligga i mitten av ett område med 20 km i diameter, i vilket, enligt officiella uppgifter, inga fall av mul- och klövsjuka eller — när marknaderna är godkända för svin — inga fall av svinpest, SVD eller smittsam svinlamhet (Teschensjukan) har konstaterats under minst de senaste 30 dagarna före det att de används som godkända marknader.

3. Marknaderna skall, innan de används som godkända marknader, rengöras och desinficeras med ett desinfektionsmedel som i det exporterande landet är officiellt erkänt för att vara effektivt vid bekämpning av de sjukdomar som nämns i villkor 2 ovan.

4. Samlingsplatser, lastplatser eller andra platser som de nötkreatur eller svin som skall exporteras till gemenskapen kan komma att passera skall uppfylla villkoren 1, 2 och 3 i denna bilaga.

5. Alla nötkreatur och svin som passerar genom godkända marknader skall uppfylla de hälsovillkor som fastställts för exporten av det relevanta djurslaget till Europeiska gemenskapen.

6. Djur som skall exporteras till Europeiska gemenskapen och som passerar godkända marknader måste, inom sex dagar, lastas och levereras direkt till det exporterande landets gräns

   a) utan att komma i kontakt med klövdjur, utom nötkreatur och svin som uppfyller de hälsovillkor som fastställts för export av det aktuella djurslaget till Europeiska gemenskapen.

   b) indelade i leveranser så att ingen leverans innehåller både djur för avel och produktion och djur som är avsedda för omedelbar slakt.

   c) i transportfordon eller containrar som först har rengjorts och desinficerats med ett desinfektionsmedel som i det exporterande landet är officiellt erkänt som ett effektivt medel vid bekämpning av de sjukdomar som nämns i villkor 2 ovan, och som är konstruerade så att avföring, urin, strö eller foder inte kan flyta eller falla ur fordonet under färden.

7. När villkoren för export av djuren till gemenskapen kräver att ett prov utförs inom en viss tid före lastningen, skall den perioden omfatta den tid det eventuellt kan ta att samla djuren, dock högst sex dagar efter det att djuren passerade den godkända marknaden.

8. Det exporterande landet skall utse de marknader som är godkända för djur som är avsedda för avel och produktion och de marknader som är godkända för djur som är avsedda för slakt och skall anmäla sådana marknaders namn och adresser till kommissionen och medlemsstaternas behöriga centrala myndigheter.

9. Det exporterande landet skall fastställa förfarandet för officiell övervakning av marknader, samlingsplatser och lastplatser och skall säkerställa att sådan övervakning utförs.

10. Det exporterande landet skall säkerställa att detaljer om marknader och samlingsplatser ingår i det relevanta avsnittet i det hälsointyg som medföljer djur som exporteras till Europeiska gemenskapen.