II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 25. februar 1991

om protokollerne for standardisering af materialer og procedurer for veterinærprøver og betingelser for godkendelse af markeder i forbindelse med indførsel af kvæg og svin fra tredjelande

(91/189/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Europæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 72/462/EØF af 12. december 1972 om sundhedsmæssige og veterinærpolitimæssige problemer i forbindelse med indførsel af kvæg og svin samt fersk kød fra tredjelande [1], senest ændret ved direktiv 91/69/EØF [2], særlig artikel 8, stk. 1, og

ud fra følgende betragtninger:

Ifølge direktiv 72/462/EØF tillades indførsel af kvæg og svin fra tredjelande, der er optaget på listen i bilaget til Rådets beslutning 79/542/EØF [3], senest ændret ved beslutning 90/485/EØF [4];

der må fastlægges dyresundhedsbetingelser, som skal gælde for indførslen af levende dyr fra et tredjeland, alt efter dyresundhedssituationen i det pågældende land;

skønt dyresundhedsbetingelserne kan være forskellige fra land til land, gælder protokollerne for veterinærundersøgelser og betingelserne for godkendelse af markeder i tredjelande til at handle med dyr beregnet til udførsel til Fællesskabet for alle tredjelande;

for at forenkle beslutningerne med hensyn til de dyresundhedsbetingelser, der skal gælde for indførslen af kvæg og svin fra tredjelande, vil det være hensigtsmæssigt at have en enkelt, fælles beslutning, som indeholder protokollerne for veterinærundersøgelser og betingelserne for godkendelse af markeder;

en beslutning vedrørende protokollerne for veterinærundersøgelser og betingelser for godkendelse af markeder i tredjelande skal kun gælde for et tredjeland, for hvilket der er blevet vedtaget en beslutning, som specielt vedrører dyresundhedsbetingelserne i det pågældende land;

de i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Veterinærkomité —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

1. Ved denne beslutning indføres der protokoller for veterinærundersøgelser og betingelser for godkendelse af

(1) EFT nr. L 302 af 31. 12. 1972, s. 28.
(2) EFT nr. L 46 af 19. 2. 1991, s. 37.
(3) EFT nr. L 146 af 14. 6. 1979, s. 15.
(4) EFT nr. L 276 af 27. 9. 1990, s. 46.

markeder i tredjelande til handel med dyr beregnet til udførsel til Fællesskabet i forbindelse med indførslen af levende kvæg og svin fra de tredjelande, der er optaget på listen i bilaget til beslutning 79/542/EØF.

2. Kravene i bilag I og II til nærværende beslutning gælder kun for tredjelande, for hvilke der er blevet vedtaget en beslutning, som fastlægger dyresundhedskravene i det enkelte tilfælde efter artikel 8 i direktiv 72/462/EØF.

Artikel 2

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 25. februar 1991.

På Kommissionens vegne

Ray MAC SHARRY

Medlem af Kommissionen

BILAG I

PROTOKOLLER FOR STANDARDISERING AF MATERIALER OG PRØVEPROCEDURER

KAPITEL I

Kvæg

1. *Tuberkulose*

Den enkelte intradermaltuberkulinprøve med kvægtuberkulin foretages i overensstemmelse med bilag B til Rådets direktiv 64/432/EØF af 26. juni 1964 om veterinærpolitimæssige problemer ved handel inden for Fællesskabet med kvæg og svin [1].

2. *Brucellose*

Serumagglutinationsprøven og komplementbindingsprøven foretages i overensstemmelse med bilag C, afsnit A og B, til direktiv 64/432/EØF.

3. *Enzootisk kvægleukose*

Agar-gel-immunodiffusionsprøven foretages i overensstemmelse med bilag G til direktiv 64/432/EØF.

4. *Bluetongue*

A. Den blokerende eller kompetitive ELISA foretages efter følgende protokol:

Den kompetitive ELISA med anvendelse af monoklonalt antistof 3-17-A3 kan påvise antistoffer mod alle kendte serotyper af bluetongue-virus (BTV).

Prøveprincippet er, at reaktionen mellem BTV-antigen og et gruppespecifikt monoklonalt antistof (3-17-A3) afbrydes ved tilsætning af fortyndinger af prøveserum. Tilstedeværende antistoffer mod BTV i prøveserumet blokerer reaktionsevnen hos det monoklonale antistof (Mas) og resulterer i en formindskelse af den forventede farveudvikling ved tilsætning af enzymsubstrat.

Materialer og reagenser:

1. Fladbundede mikrotiterplader.
2. Antigen: tilberedes som beskrevet nedenfor.
3. Blokerende buffer: 5 % (w/v) »Marvel« tørret mælkepulver, 0,1 % (v/v) Tween-20 (leveres som polyoxyethylensorbitanmonolauratsirup) i PBS.
4. Monoklonalt antistof: 3-17-A3 (leveres som hybridom cellekultur supernatant), opbevaret ved – 20 °C eller frysetørret, fortyndet i forholdet 1:50 med blokerende buffer inden brug, rettet mod det gruppespecifikke polypeptid p_7.
5. Konjugat: kanin-antimuseglobulin (adsorberet og elueret), konjugeret med peberrodsperoxidase og opbevaret i mørke ved 4 °C.
6. Substrat og kromogen: 0,2 g ortophenylendiamin (OPD) opløst i en buffer bestående af 2,553 g citronsyre og 4,574 g dinatriumhydrogenortophosphat tilsat destilleret vand op til 500 ml, opdelt i 25 ml alikvoter og opbevaret i mørke ved – 20 °C med tilsætning af 12µl/ml hydrogenperoxid (3 % w/v) umiddelbart inden brug.

OPD omgås med forsigtighed — Brug gummihandsker — Mistanke om mutagen.

7. 1 Molar svovlsyre: 26,6 ml syre blandet i 473,4 ml destilleret vand.

Husk — bland altid syre i vand, aldrig vand i syre.

---

[1] EFT nr. 121 af 29. 7. 1964, s. 1977/64.

8. Orbitalryster.

9. ELISA-pladelæser (prøven kan aflæses visuelt).

Prøveformat

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Blind-prøve			Antigen + konjugat						1
Mas-kontrol		Antigen + Mas + konjugat							2
Positiv kontrol	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
Prøve-sera									5
									6
									7
									8
									9
									10
									11
									12

Prøvekontrol

Blankprøvekontrol

Række 1 A-H er en blankprøvekontrol bestående af BTV-antigen og konjugat. Den kan anvendes som blindprøve for ELISA-læseren.

Mas-kontrol

Række 2 A-H er den monoklonale antistofkontrol og består af BTV-antigen, monoklonalt antistof og konjugat. Den udgør en negativ kontrol. Middelværdien af absorbansaflæsningerne af denne kontrolrække repræsenterer 0 % hæmning.

Positiv kontrol

Række 3 A-H er den positive kontrol. Den består af BTV-antigen, BTV-positive antiserumfortyndinger, Mas og konjugat. Den tjener som indikator for, at prøven fungerer ordentligt, og der bør opnås samstemmende hæmningsniveauer fra prøve til prøve.

Prøvesera

I ovenstående prøveformat kan der afprøves 18 sera fortyndet i forholdet 1:2, 1:4, 1:8 og 1:16. Dette vil vise noget om antistoftiteret i prøveserumet. Fortyndingsrækken kan gå længere, således at titrene for serumfortynding når slutpunktet. Som et alternativ kan sera, når det gælder serologiske undersøgelser i stor skala, prøves i en enkelt fortynding (1:4) eller to fortyndinger (1:2 og 1:4) som en hurtig screeningtest.

Procedure

1. BTV-antigen fortyndes til prætitreret fortynding i PBS, der sonikeres et øjeblik for at sprede akkumuleret virus (hvis der ikke findes nogen sonikator, pippeteres der kraftigt), og der tilføres 50 µl til alle huller i ELISA-pladen. Der bankes på pladens sider for at sprede antigenet.

2. Der inkuberes ved 37 °C i 60 minutter i en orbitalryster. Pladerne vaskes tre gange ved overskylning og tømning af hullerne med usterilt PBS, og de trykkes af med klatpapir.

3. Der tilsættes 50 µl blokerende buffer pr. hul. Prøvesera og positivt serum hældes i de relevante huller, og der fortyndes hen over pladen ved hjælp af en multikanalpipette. Sera må ikke tilsættes blankprøvekontrollen eller Mas-kontrollen.

4. Straks efter tilsætningen af prøveseraene fortyndes Mas i blokerende buffer (for at prætitrere fortyndingen), og der hældes 50 µl i alle pladens huller, undtagen når det gælder blindprøvekontrollen.

5. Der inkuberes ved 37 °C i 60 minutter i en orbitalryster. Der vaskes tre gange med PBS og trykkes af med klatpapir.

6. Kanin-antimusekoncentrat fortyndes til 1:5 000 i blokerende buffer, og der hældes 50 µl i alle pladens huller.

7. Der inkuberes ved 37 °C i 60 minutter i en orbitalryster. Der vaskes tre gange med PBS og trykkes af med klatpapir.

8. OPD optøs, og umiddelbart inden brug tilsættes hver 25 ml OPD 12 µl 30 % hydrogenperoxid. 50 µl hældes i alle pladens huller. Man lader farven udvikle sig i ca. 10 minutter og standser reaktionen med 1 M svovlsyre (50 µl pr. hul.). Farven skal udvikle sig i Mas-kontrolhullerne og i de huller, der ikke indeholder sera med antistof mod BTV.

9. Hullerne undersøges og registreres enten visuelt eller ved hjælp af en spektrofotometrisk læser.

Analyse af resultater

Middel-OD-aflæsningen beregnes ud fra MAS-kontrollerne. Dette repræsenterer hæmningsværdien på 0 %. Absorbansaflæsninger af prøveseraene udtrykkes i procent hæmningsværdier ved hjælp af følgende formel:

$$\text{Procent hæmningsværdi} = 100 - \frac{\text{OD ved tilstedeværelse af prøveserum}}{\text{OD ved fravær af prøveserum}} \times 100.$$

Hæmningsværdier på over 40 % ved en serumfortynding på 1:4 betragtes som positive. Visuel aflæsning er mulig, da 40 % hæmning er den laveste værdi, der let kan ses med det blotte øje.

Tilberedning af BTV ELISA-antigen

1. 10 roux sammenflydende BHK-21 celler vaskes tre gange med serumfrit Eagle's medium, og der inficeres med bluetongue-virus serotype 1 i serumfrit Eagle's medium.

2. Der inkuberes ved 37 °C og undersøges daglig for cytopatisk effekt (cpe).

3. Når der kan konstateres cpe i 80-90 % af cellelaget i hver roux, indsamles viruset ved, at eventuelle celler, der stadig sidder på glasset, rystes af.

4. Der centrifugeres ved 2 000—3 000 rpm for at sammenpresse cellerne.

5. Supernatanten fjernes, og cellerne genopslæmmes i ca. 30 ml PBS, som indeholder 1 % »Sarkosyl« og 2 ml phenolmetylsulfonylfluorid lysisbuffer). Dette kan bevirke, at cellerne danner en gel, og der kan tilsættes mere lysisbuffer for at reducere denne effekt.

   Anmærkning: Phenylmetylsulfonylfluorid er skadeligt — behandles med største forsigtighed.

6. Cellerne sprænges i 60 sekunder ved hjælp af en ultralydsonde med en amplitude på 30 micron.

7. Der centrifugeres ved 10 000 rpm i 10 minutter.

8. Supernatanten opbevares ved +4 °C, og den resterende cellemasse genopslæmmes i 10-20 ml lysisbuffer.

9. Der sonikeres og foretages en klaring, idet supernatanten opbevares på hvert stadium, i alt tre gange.

10. Supernatanterne samles og centrifugeres ved 24 000 rpm i 120 minutter ved +4 °C på en 5 ml pude bestående af 40 % sakkarose (w/v i PBS) ved hjælp af 30 ml Beckman centrifugeglas og en SW 28 rotor.

11. Supernatanten fjernes, glassene tømmes helt, og massen genopslæmmes i PBS ved hjælp af sonikering. Antigenet opbevares i alikvoter ved −70 °C.

Titrering af BTV ELISA-antigen

Bluetongue ELISA-antigen titreres ved hjælp af den indirekte ELISA. Tofoldfortyndinger af antigen titreres over for en konstant fortynding (1:50) af monoklonalt antistof 3-17-A3. Protokollen er som følger:

Procedure:

1. BTV antigen fortyndes i PBS over mikrotiterpladen i en todobbelt fortyndingsrække (50 µl/hul) ved hjælp af en multikanalpipette.

2. Der inkuberes 1 time ved 37 °C i en orbitalryster.

3. Pladerne vaskes tre gange med PBS.

4. Der tilsættes hvert hul i mikrotiterpladen 50 µl monoklonalt antistof 3-17-A3 (fortyndet 1:50).

5. Der inkuberes 1 time ved 37 °C i en orbitalryster.

6. Pladerne vaskes tre gange med PBS.

7. Der tilsættes hvert hul i mikrotiterpladen 50 µl kanin-antimuseglobulin konjugeret med peberrodsperoxidase fortyndet til en prætitreret optimal koncentration.

8. Der inkuberes 1 time ved 37 °C i en orbitalryster.

9. Der tilsættes substrat og kromogen som tidligere beskrevet. Reaktionen standses efter 10 minutter ved tilsætning af 1 Molar svovlsyre (50 µl/hul).

I den kompetitive prøve skal det monoklonale antistof være i overskud, og der vælges derfor en fortynding af antigen, som ligger på titreringskurven (ikke på den flade del), hvilket giver ca. 0,8 OD efter 10 minutter.

B. Agar-gel-immunodiffusionsprøven foretages efter følgende protokol:

Materialer og reagenser

Antigen:

Antigen, der bundfældes, tilberedes i et cellekultursystem, der tåler den hurtige formering af en referencestamme af bluetongue-virus. BHK eller Vero-celler anbefales. Antigen forekommer i supernatantvæsken, når virusets vækst er ophørt, men kræver en koncentration på 50 til 100 gange for at være effektivt. Dette kan opnås ved hjælp af enhver standardprocedure for proteinkoncentrering. Virus i antigenet kan inaktiveres ved tilsætning af 0,3 % (v/v) betapropiolaktion.

Kendt positivt kontrolserum:

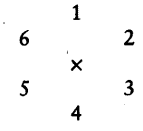
Ved hjælp af det internationale referenceserum og antigen fremstilles et nationalt standardserum, der standardiseres i det optimale forhold som for det internationale referenceserum, frysetørres og anvendes som det kendte kontrolserum i hver enkelt prøve.

Prøveserum

Procedure:

1 % agarose tilberedt i borat eller natriumbarbitolbuffer, pH 8,5 til 9,0 hældes i en petriskål op til mindst 3,0 mm.

Der skæres et prøvemønster på syv fugtfri huller på hver 5,0 mm diameter i agaren. Mønstret består af et centerhul og seks huller, der er anbragt rundt om det i en cirkel med en radius på 3 mm.



Centerhullet fyldes med standardantigenet. De ydre huller 2, 4 og 6 fyldes med kendt positivt serum og hul 1, 3 og 5 fyldes med prøvesera.

Systemet inkuberes i indtil 72 timer ved stuetemperatur i et lukket fugtigt kammer.

Fortolkning:

Et prøveserum er positivt, hvis det danner en specifik bundfældninglinje med antigenet og danner en ubrudt identitetslinje med kontrolserumet. Et prøveserum er negativt, hvis det ikke danner en specifik linje med antigenet og det ikke krummer kontrolserumets linje. Petriskåle bør undersøges mod en mørk baggrund ved indirekte belysning.

5. *Epizootisk hæmoragisk sygdom*

Agar-gel-immunodiffusionsprøven foretages efter følgende protokol:

Materialer og reagenser

Antigen:

Antigen, der bundfældes, tilberedes i et cellekultursystem, der tåler den hurtige formering af den/de pågældende serotype/r epizootisk hæmoragisk sygdomsvirus. BHK eller Vero-celler anbefales. Antigen forekommer i supernatantvæsken, når virusets vækst er ophørt, men kræver en koncentration på 50 til 100 gange for at være effektivt. Dette kan opnås ved hjælp af enhver standardprocedure for proteinkoncentrering. Virus i antigenet kan inaktiveres ved tilsætning af 0,3 % (v/v) betapropiolaktion.

Kendt positivt kontrolserum:

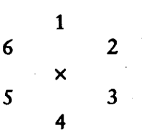
Ved hjælp af det internationale referenceserum og antigen fremstilles et nationalt standardserum, der standardiseres i det optimale forhold som for det internationale referenceserum, frysetørres og anvendes som det kendte kontrolserum i hver enkelt prøve.

Prøveserum

Procedure:

1 % agarose tilberedt i borat eller natriumbarbitolbuffer, pH 8,5 til 9,0 hældes i en petriskål op til mindst 3,0 mm.

Der skæres et prøvemønster på syv fugtfri huller på hver 5,0 mm diameter i agaren. Mønstret består af et centerhul og seks huller, der er anbragt rundt om det i en cirkel med en radius på 3 mm.



Centerhullet fyldes med standardantigenet. De ydre huller 2, 4 og 6 fyldes med kendt positivt serum og hul 1, 3 og 5 fyldes med prøvesera.

Systemet inkuberes i indtil 72 timer ved stuetemperatur i et lukket fugtigt kammer.

Fortolkning:

Et prøveserum er positivt, hvis det danner en specifik bundfældninglinje med antigenet og danner en ubrudt identitetslinje med kontrolserumet. Et prøveserum er negativt, hvis det ikke danner en specifik linje med antigenet og det ikke krummer kontrolserumets linje. Petriskåle bør undersøges mod en mørk baggrund ved indirekte belysning.

6. *Leptospirose*

Den mikroskopiske agglutinationsprøve foretages efter følgende protokol:

Kulturer:

Dyrkes i Korthofs eller EMJH-substrat ved 30 °C.

Antigen:

Indeholder 2 × 10^8 organismer pr. ml kultursubstrat.

Procedure:

Lige dele antigen og serum blandes i fladbundede mikrotiterplader og inkuberes ved 30 °C i to timer eller 37 °C i 1 — 1 1/2 time. Prøven aflæses ved laveffekt mørkefeltbelysning med en forstørrelse på mellem 60 og 100.

Fortolkning:

Et negativt resultat er under 50 % agglutination ved en opløsning på 1:50.

7. *Smitsom bovin rhinotracheitis/infektiøs pustular vilvovaginitis*

Serumneutralisationsprøven foretages efter følgende protokol:

Serum:

Alle sera varmeinaktiveres ved 56 °C i 30 minutter før brugen.

Procedure:

Den konstante virusvariable serumneutralisationsprøve udføres i mikrotiterplader under anvendelse af MDBK eller andre følsomme celler. Colorado, Oxford eller en anden referencestamme af viruset benyttes ved 100 $TCID_{50}$ pr. 0,025 ml; inaktiverede, ufortyndede serumprøver blandes med en tilsvarende mængde (0,025 ml) virussuspension. Virus/serumblandingerne inkuberes to timer ved 37 °C i mikrotiterpladerne, før MDBK-cellerne tilsættes. Der benyttes celler i en koncentration, som danner et fuldstændigt éncellelag efter 24 timer.

Kontrol:

— Virusinfektivitetsprøve
— Serumtoksicitetskontrol
— Kontrol af endnu ikke podet cellekultur
— Referenceantisera.

Fortolkning:

Resultaterne af neutralisationsprøven og titeret for det virus, som benyttes ved prøven, aflæses efter 3—6 dages inkubation ved 37 °C. Serumtitere regnes for negative, hvis der ikke sker nogen neutralisering ved en opløsning på 1:2 (ufortyndet serum).

8. *Bovin virusdiarré (BVD)*

A. Virusisolationsprøven foretages efter følgende protokol:

Prøvemateriale og påvisningsmetoder:

Der anvendes serum, suspensioner af crusta phlogistica eller blodkoagel fra nyindsamlede, ikke varmeinaktiverede blodprøver af mindst seks måneder gammelt kvæg. Der benyttes en immunologisk farvningsprocedure såsom den fluorescerende antistofmetode (FA) eller en enzym-kæde-immunitet-måling, f. eks. immunoperoxidase (IPX), til påvisning af BVD-virus i podede kulturer.

Prøvereagens:

Til FA-prøven kræves et FITC-konjugeret specifikt BVD-antiserum. Til IPX-prøven kræves et ukonjugeret anti-BVD-serum af kvæg, et peroxidasekonjugeret antibovint antiserum og passende enzymsubstrat (f.eks. 3-amino-9-ethylkarbazol). Et anti-BVD-serum fra andre arter end kvæg kan anvendes, forudsat at peroxidasekonjugatet er rettet imod serumglobuliner af den pågældende art. Alle antivirale sera skal have kendt specificitet og et bredt reaktionsområde.

Procedure:

Til prøven anvendes følsomme celler såsom bovint turbinat, kalvenyre eller kalvetestis, der er frie for endogent BVD-virus.

Serumprøver — prøveserum og vævsdyrkningsceller anbringes i dækglaskulturer eller i huller i mikrotiterplader eller andre beholdere, så serumslutfortyndingen er på 10 %.

Crusta phlogistica og blodkoagel — prøverne tilsættes til sammenflydende éncellelagskulturer i 1 time ved 37 °C, hvorefter kulturerne vaskes og påhældes kulturmedium med 10 % BVD-frit føtalt kalveserum.

Kulturerne inkuberes derefter ved 37 °C og fikseres og farves efter FA- eller IPX-metoden.

Kontrol:

— Positiv BVD-viruskontrol,
— Negativ kontrol uden tilsat virus.

Fortolkning:

FA-prøven farves efter 4—6 døgns inkubation og aflæses i ultraviolet lys. Fluorescens i celler, der er inkuberet med prøven, fortolkes som et positivt resultat.

IPX-prøven farves efter 4 døgns inkubation og aflæses ved lysmikroskopi. Mørkebrun farvning af nogle af cellernes cytoplasma fortolkes som et positivt resultat.

B. Serumneutralisationsprøven foretages efter følgende protokol:

Serum:

Alle sera varmeinaktiveres ved 56 °C i 30 minutter før brugen.

Procedure:

Den konstante virusvariable serumneutralisationsprøve i mikrotiterplader foretages ved hjælp af egnede, seriopformerede følsomme bovine celler (f. eks. bovine turbinatceller som beskrevet af McClurkin m.fl., 1974, *Arch. Ges. Virusforsch.*, 45, 285-289).

Det er vigtigt, at alle reagenser og celler er fri for kontaminerende, tilfældigt forekommende ikke-cytopatiske BVD/MD-virus.

Prøvevirus, som kan være enhver egnet cytopatisk referencestamme (f.eks. NADL-stammen), anvendes i en koncentration på i gennemsnit 100 infektive cellekulturdoser pr. 0,025 ml. Fortyndinger af inaktiverede sera blandes med tilsvarende mængder virussuspension (0,025 ml), og virus/serumblandingerne inkuberes i 1 time ved 37 °C, før der tilsættes tilsvarende mængder cellesuspension. Der benyttes celler i en koncentration, som danner et fuldstændigt éncellelag inden for 2 døgn.

Kontrol:

— Virusinfektivitetsprøve
— Serumtoksicitetskontrol
— Kontrol af endnu ikke podet cellekultur
— Referenceantisera.

Fortolkning:

Med NADL-virusstammen er det optimale tidspunkt for aflæsning efter 5 døgns inkubation ved 37 °C.

Et gennemsnitligt neutralisationstiter på 1:10 anses for at indicere en immunreaktion på en tidligere akut infektion.

9. *Mælkeanalyse til påvisning af mastitis*

Mælkeanalysen foretages i overensstemmelse med bilag D til direktiv 64/432/EØF.

10. *Mund- og klovesyge (M&K)*

A. Indsamling og prøvning af prøver af øsofagus/farynks foretages efter følgende protokol:

Reagenser:

Inden prøven tages, tilberedes et transportmedium. Der fordeles 2 ml i lige så mange beholdere som det antal dyr, der skal prøves. Beholderne bør være frysefaste i tøris eller flydende nitrogen.

Der indsamles prøver ved hjælp af en specialkonstrueret spytkollektor eller »probang«.

Prøven indsamles ved, at probangskålen føres gennem munden over tungens dorsum og ned i den øvre del af øsofagus. Der gøres forsøg på at bortskrabe overfladeepitelet fra øvre øsofagus og farynks ved bevægelser lateralt og dorsalt. Derefter fjernes probang, helst efter, at dyret har svælget. Skålen bør være fuld og indeholde en blanding af slim, spyt, øsofagusvæske og celleaffald. Man må sørge for, at hver prøve indeholder noget synligt cellemateriale. Hårdhændet behandling, der forårsager blødninger, skal undgås.

Prøver fra nogle dyr kan være stærkt forurenet med vomindhold. Sådanne prøver kasseres, og dyrets mund skylles med vand eller helst fysiologisk saltvand, inden prøvningen gentages.

Behandling af prøver:

Hver prøve i probangskålen kvalitetsundersøges, og der tilsættes 2 ml til en tilsvarende mængde transportmedium i en frysefast beholder. Beholderne lukkes tæt, forsegles, desinficeres og mærkes. Prøverne opbevares køligt (+4 °C) og undersøges inden for 3—4 timer eller anbringes på tøris (– 69 °C) eller i flydende nitrogen og holdes nedfrosne indtil undersøgelsestidspunktet.

For hvert dyr desinficeres probang og vaskes i tre hold rent vand.

Prøvning for M & K-virus:

Prøverne podes i kulturer af primære bovine thyreoidcellekulturer med brug af mindst tre reagensglas pr. prøve. Andre følsomme celler, f.eks. primære bovine eller porcine nyreceller, kan bruges, men man bør huske, at de er mindre følsomme over for nogle stammer af M&K-virus. Reagensglassene inkuberes ved 37 °C i en tromble og undersøges daglig i 48 timer for cytoplastisk effekt (cpe). Hvis resultatet er negativt, overføres kulturerne blindt til nye kulturer og undersøges igen i 48 timer. Eventuel cpe's specificitet skal bekræftes.

Anbefalet transportmedium:

1. 0,08 M phosphatbuffer pH 7,2 med 0,01 % bovint serumalbumin, 0,002 % phenolrødt og antibiotika.

2. Vævsdyrkningsmedium (f.eks. Eagle's MEM) med 0,04 M HEPES-buffer, 0,01 % bovint serumalbumin og antibiotika, pH 7,2.

Antibiotika (pr. ml slutprodukt) bør tilsættes transportmediet f.eks.

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

B. Virusneutralisationsprøven foretages efter følgende protokol:

Reagenser:

Stam-M&KV-antigen tilberedes i cellekulturer eller på kalvetunger og opbevares ved – 70 °C eller derunder eller ved – 20 °C, efter at der er tilsat 50 % glycerol. Dette er stamantigenet. M&KV er stabilt under disse forhold, og titrene varierer meget lidt i en periode på flere måneder.

Procedure:

Prøven foretages i fladbundede mikrotiterplader af vævskulturgrad med brug af følsomme celler såsom IB-RS-2, BHK-21 eller kalvenyreceller.

Sera til prøven fortyndes 1:4 i serumfrit cellekulturmedium med tilsætning af 100 IU/ml meomycin eller andre egnede antibiotika. Sera inaktiveres ved 56 °C i 30 minutter, og der anvendes mængder på 0,05 ml til tilberedning af en dobbeltserie i mikrotiterplader med brug af 0,05 ml fortyndingsøser. Prætitreret virus, der også er fortyndet i serumfrit kulturmedium og indeholder 100 $TCID_{50}$/0,05 ml tilsættes derefter til hvert hul. Efter inkubation ved 37 °C i 1 time, så neutralisering kan finde sted, tilsættes 0,05 ml suspensionsceller med 0,5 — 1,0 × 10^6 celler pr. 1 ml i cellekulturmedium indeholdende serumfrit M&K-antistof til hvert hul, og pladerne forsegles.

Pladerne inkuberes ved 37 °C. Encellelag er normalt sammenflydende inden for 24 timer. Cpe er normalt tilstrækkeligt fremskredet efter 48 timer til, at der kan foretages en *mikroskopisk* aflæsning af prøven. På dette tidspunkt kan der foretages en endelig *mikroskopisk* aflæsning, eller pladerne kan fikseres og farves med henblik på en *makroskopisk* aflæsning, f.eks. ved hjælp af 10 % formaldehyd og 0,05 % metylenblåt.

Kontrol:

Kontrollen af hver prøve omfatter homologt antiserum med kendt titer, en cellekontrol, en serumtoksicitetskontrol, en mediekontrol og en virustitrering, som danner grundlag for beregningen af den faktiske mængde virus i prøven.

Fortolkning:

Huller, der viser tegn på cpe, betragtes som inficeret, og neutralisationstitrene udtrykkes som den reciprokke af den endelige fortynding af serum, der er til stede i serum/virusblandingerne ved 50 %-slutpunkterne, der bestemmes efter Spearmen-Karber-metoden (Karber, G., 1931, *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie,* 162, 480).

Prøver betragtes som pålidelige, når den faktisk anvendte virusmængde pr. hul i prøven er på mellem $10^{1,5}$ og $10^{2,5}$ $TCID_{50}$, og når referenceserumtiteret ligger inden for det todobbelte af det forventede titer vurderet ud fra tidligere titreringers modus. Når kontrolresultaterne overskrider disse grænser, gentages prøverne.

Et slutpunkttiter på 1:11 eller derunder betragtes som negativt.

C. Påvisningen og kvantificeringen af antistof ved hjælp af ELISA foretages efter følgende protokol:

Reagenser:

Kaninantiserum mod 146S-antigen af syv typer mund og klovesygevirus (M&KV) benyttet i en forud fastlagt optimal koncentration i karbonat/bikarbonatbuffer, pH 9,6.

Antigener fremstilles af udvalgte virusstammer, der er dyrket på BHK-21 énlagsceller. Der benyttes urensede supernatanter, som prætitreres efter protokollen, men uden serum, således at der fremkommer en fortynding, som efter tilsætning af en tilsvarende mængde PBST (phosphatbufferet salt med 0,05 % Tween-20 og phenolrød indikator) giver en absorbansaflæsning på mellem 1,2 og 1,5. Viraene kan anvendes inaktiveret. Der benyttes PBST som fortyndingsmiddel. Der tilberedes marsvineantisera ved indpodning af marsvin med 146S-antigen af hver serotype. Der fremstilles en forud fastlagt optimal koncentration i PBST med 10 % normalt bovint serum og 5 % normalt kaninserum.

Kanin-antimarsvineimmunuglobulin, der er konjugeret med peberrodsperoxidase, anvendes i en forud fastlagt optimal koncentration i PBST med 10 % normalt bovint serum og 5 % normalt kaninserum.

Prøvesera fortyndes i PBST.

Procedure:

1. ELISA-plader belægges med 50 µl antivirale kaninsera natten over i et fugtigt kammer ved stuetemperatur.

2. 50 µl af en ekstra dobbeltserie af hvert prøveserum begyndende med 1:4 tilberedes i rundbundede flerhulsplader (bæreplader). 50 µl af en konstant dosis antigen tilsættes til hvert hul, og blandingerne henstår natten over ved 4 °C. Tilsætningen af antigenet nedsætter startserumfortyndingen til 1:8.

3. ELISA-pladerne vaskes 5 gange med PBST.

4. 50 µl serum/antigenblandinger overføres derefter fra bærepladerne til de kaninserumbelagte ELISA-plader og inkuberes ved 37 °C i 1 time i en orbitalryster:

5. Efter vaskning tilstættes 50 µl marsvineantiserum mod det i punkt 4 anvendte antigen til hvert hul. Pladerne inkuberes ved 37 °C i 1 time i en orbitalryster.

6. Pladerne vaskes, og 50 µl kanin-antimarsvineimmunoglobulin konjugeret med peberrodsperoxidase tilsættes til hvert hul. Pladerne inkuberes ved 37 °C i 1 time i en orbitalryster.

7. Pladerne vaskes, og 50 µl ortofenylendiamin med 0,05 % H_2O_2 (30 %) w/v tilsættes til hvert hul.

8. Reaktionen standses efter 15 minutter med 1,25 M H_2SO_4.

Pladerne aflæses spektrofometrisk ved 492 nm på en ELISA-læser, der er forbundet med en mikrodatamat.

Kontrol:

— For hvert anvendt antigen indeholder 40 huller intet serum, men indeholder antigen fortyndet i PBST.

— En ekstra dobbelt fortyndingsserie af homologt bovint referenceantiserum.

— En ekstra dobbelt fortyndingsserie af negativt bovint serum.

Fortolkning:

Antistoftitere udtrykkes som den endelige fortynding af prøveserum, der giver 50 % af den middel-OD-værdi, der registreres i viruskontrolhullerne uden tilstedeværelse af prøveserum. Titere ud over 1:40 betragtes som positive.

Referencer:

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 Methods,* 93, 115-121.11.

KAPITEL II

Svin

1. *Tuberkulose*

Den enkelte intradermaltuberkulinprøve med fjerkrætuberkulin foretages i overensstemmelse med bilag B til Rådets direktiv 64/432/EØF , dog skal injektionsstedet være den slappe hud ved øreroden.

2. *Brucellose*

Serumagglutinationsprøven og komplementbindingsprøven foretages i overensstemmelse med bilag C, afsnit A og B, til Rådets direktiv 64/432/EØF.

3. *Aujeszky's sygdom*

Serumneutralisationsprøven foretages efter følgende protokol:

Serum:

Alle sera varmeinaktiveres ved 56 °C i 30 minutter før brugen.

Procedure:

Den konstante virusvariable serumneutralisationsprøve udføres i mikrotiterplader under anvendelse af Vero eller andre følsomme cellekulturer. Aujeszky's sygdomsvirus benyttes ved 100 $TCID_{50}$ pr. 0,025 ml; inaktiverede, ufortyndede serumprøver blandes med en tilsvarende mængde (0,025 ml) virussuspension. Virus/serumblandingerne inkuberes i 2 timer ved 37 °C i mikrotiterpladerne, før de til formålet krævede celler tilsættes. Der benyttes celler i en koncentration, som danner et fuldstændigt éncellelag efter 24 timer.

Kontrol:

— Virusinfektivitetsprøve
— Serumtoksicitetskontrol
— Kontrol af endnu ikke podet cellekultur
— Referenceantisera.

Fortolkning:

Resultaterne af neutralisationsprøven og titeret for det virus, som benyttes ved prøven aflæses efter 3—7 dages inkubation ved 37 °C. Serumtitere under 1:2 (ufortyndet serum) regnes for negative.

4. *Overførbar gastroenteritis*

Serumneutralisationsprøven foretages efter følgende protokol:

Serum:

Alle sera varmeinaktiveres ved 56 °C i 30 minutter før brugen.

Procedure:

Den konstante virusvariable serumneutralisationsprøve udføres i mikrotiterplader under anvendelse af A72 (hundetumor) celler eller andre følsomme cellekultuer. TGE-virus benyttes ved 100 $TCID_{50}$ pr. 0,025 ml; inaktiverede ufortyndede serumprøver blandes med en tilsvarnede mængde (0,025 ml) virussuspension. Virus/serumblandingerne inkuberes i 30—60 minutter ved 37 °C i mikrotiterpladerne, inden de til formålet krævede celler tilsættes. Der benyttes celler i en koncentration, der danner et komplet éncellelag efter 24 timer. Der tilsættes 0,1 ml cellesuspension til hver celle.

Kontrol:

— Virusinfektivitetsprøve
— Serumtoksicitetskontrol
— Kontrol af endnu ikke podet cellekultur
— Referenceantisera.

Fortolkning:

Resultaterne af neutralisationsprøven og titeret for det i prøven benyttede virus aflæses efter 3—5 dages inkubation ved 37 °C. Serumtitere under 1:2 (endelig fortynding) betragtes som negative. Hvis ufortyndede serumprøver er toksiske over for vævskulturerne, kan disse sera fortyndes 1:2, inden de benyttes til prøven. Dette svarer til 1:4 endelig serumfortynding. Serumtitere under 1:4 (endelig fortynding) betragtes som negative i disse tilfælde.

5. *Svineinfluenza*

Agglutinationshæmningsprøven foretages efter følgende protokol:

Procedure:

Prøverne udføres efter standardmetoder *(US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series No 6).*

For at nedbryde uspecifikke hæmmende stoffer bør svineserum behandles med enten receptornedbrydende enzym (*Vibrio cholerae*-filtrat) natten over ved 37 °C efterfulgt at opvarmning ved 56 °C i 30 minutter for at standse yderligere enzymaktivitet eller ved behandling med 25 % kaolin natten over ved 4 °C (Clark and Casals, 1958, *American Journal of Tropical Medecine and Hygiene,* 7, 561).

Efter absorbering med en 10 % suspension af kyllingeerythrocyter i 1 time ved 37 °C afprøves seraene på 4 hæmningsagglutionsenheder af det relevante virus under anvendelse af 1 % kyllingeerythrocyter. Virus og serum holdes i kontakt i 60 minutter ved stuetemperatur, før erythrocyterne tilsættes.

Fortolkning:

Titere på 1:10 eller derover betragtes som positive:

6. *Mund- og klovesyge*

Prøver for mund- og klovesyge hos svin foretages efter protokollerne i kapitel I, punkt 10.

7. *Smitsom blæreudslet hos svin*

Serumneutralisationsprøven foretages efter følgende protokol:

Serum:

Alle sera varmeinaktiveres ved 56 °C i 30 minutter før brugen.

Procedure:

Den konstante virusvariable serumneutralisationsprøve foretages i mikrotiterplader under anvendelse af IB-RS-2-celler eller andre følsomme cellekulturer. Der benyttes UKG 27/72 eller enhver anden virusreferencestamme ved 100 $TCID_{50}$ pr. 0,025 ml. Sera til prøven fortyndes 1:4 og inaktiveres, og der tilberedes en dobbelt fortyndingsserie. Serumprøverne blandes med en tilsvarende mængde virussuspension og inkuberes i 1 time ved 37 °C i mikrotiterpladerne, inden der tilsættes 0,025 ml cellesuspension indeholdende 3×10^6 celler/ml.

Kontrol:

— Virusinfektivitetsprøve
— Serumtoksicitetskontrol
— Kontrol af endnu ikke podet cellekultur
— Referenceantisera.

Fortolkning:

Resultaterne af neutralisationsprøven og titeret for det til prøven benyttede virus aflæses efter 3 dages inkubation ved 37 °C. Serumtitere betragtes som negative, hvis der ikke sker en neutralisering med en fortynding på 1:11.

8. *Klassisk svinepest*

Prøver for klassisk svinepest foretages efter bilag I til Rådets direktiv 80/217/EØF [1].

9. *Leptospirose*

Prøver for leptospirose hos svin foretages efter kapitel I, punkt 6, i dette bilag.

---

[1] EFT nr. L 47 af 21. 2. 1980, s. 11.

BILAG II

MINDSTEKRAV FOR GODKENDELSE AF MARKEDER TIL HANDEL MED KVÆG OG SVIN BEREGNET TIL UDFØRSEL TIL DET EUROPÆISKE FÆLLESSKAB

1. Markederne er under tilsyn af en embedsdyrlæge.
2. Markederne ligger centralt i et område med en diameter på 20 km, hvori der ifølge officielle fund i mindst 30 dage forud for deres brug som godkendte markeder ikke er forekommet noget tilfælde af mund- og klovesyge og — hvis markederne er godkendt for svin — ikke noget tilfælde af svinepest, blæresyge hos svin eller porcin enteroviral encephalomyelitis (Teschenersyge).
3. Inden markederne godkendes til brug som godkendte markeder, rengøres og desinficeres de med et desinficeringsmiddel, der er officielt godkendt i udførselslandet som værende effektivt i bekæmpelsen af de i krav nr. 2 omhandlede sygdomme.
4. Samlepladser, indladningspladser eller andre steder, som kvæg eller svin beregnet til udførsel til Det Europæiske Fællesskab eventuelt kan passere, skal opfylde krav nr. 1, 2 og 3 i dette bilag.
5. At kvæg og alle svin, der passerer godkendte markeder, skal opfylde de sundhedskrav, der er stillet for indførsel af den pågældende dyrekategori til Det Europæiske Fællesskab.
6. Dyr, der skal udføres til Det Europæiske Fællesskab, og som passerer godkendte markeder, skal inden seks dage derefter indlades og direkte forsendes til udførselslandets grænse
   a) uden at komme i berøring med andre klovdyr end kvæg og svin, der opfylder de sundhedskrav, der er stillet for indførsel af den pågældende dyrekategori til Det Europæiske Fællesskab
   b) opdelt i forsendelser, således at ingen forsendelse indeholder både avls- og brugsdyr og dyr til øjeblikkelig slagtning
   c) transporteret i transportkøretøjer eller containere, som forinden er blevet rengjort og desinficeret med et desinficeringsmiddel, der er officielt godkendt i udførselslandet som værende effektivt i bekæmpelsen af de i krav nr. 2 omhandlede sygdomme, og være således konstrueret, at ekskrementer, urin, strøelse eller foder ikke kan flyde eller falde ud af køretøjet under transporten.
7. Hvis betingelserne for udførsel af dyr til Fællesskabet kræver, at der foretages en undersøgelse inden for en fastlagt periode inden indladning, omfatter denne periode enhver periode for samling — indtil seks dage — efter at dyrene har passeret godkendte markeder.
8. Udførselslandet udpeger de markeder, der godkendes for avls- og brugsdyr, og de markeder, der godkendes for slagtedyr, og meddeler Kommissionen og medlemsstaternes kompetente centrale myndigheder sådanne markeders navn og adresse.
9. Udførselslandet fastsætter proceduren for officielt tilsyn med markeder, samlepladser og indladningspladser og sørger for, at et sådant tilsyn bliver foretaget.
10. Udførselslandet sørger for, at detaljer vedrørende markeder og samlepladser bliver givet i det relevante afsnit i sundhedscertifikatet, der ledsager dyr, som udføres til Det Europæiske Fællesskab.