II

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση)

ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

25ης Φεβρουαρίου 1991

περί θεσπίσεως των κριτηρίων για την τυποποίηση υλικών και διαδικασιών για κτηνιατρικές δοκιμασίες, καθώς και των προϋποθέσεων για την έγκριση αγορών σε σχέση με την εισαγωγή κατοικιδίων ζώων του βοείου και χοιρείου είδους από τρίτες χώρες

(91/189/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

την οδηγία 72/462/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 12ης Δεκεμβρίου 1972 περί των υγειονομικών προβλημάτων και των υγειονομικών μέτρων κατά τις εισαγωγές ζώων του βοείου και χοιρείου είδους και νωπών κρεάτων προελεύσεως τρίτων χωρών [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 91/69/ΕΟΚ [2], και ιδίως το άρθρο 8 παράγραφος 1,

Εκτιμώντας:

ότι η οδηγία 72/462/ΕΟΚ επιτρέπει την εισαγωγή κατοικιδίων ζώων του βοείου και χοιρείου είδους από τις τρίτες χώρες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο που επισυνάπτεται στην απόφαση 79/542/ΕΟΚ του Συμβουλίου [3], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την απόφαση 90/485/ΕΟΚ [4]·

ότι οι υγειονομικοί όροι που πρέπει να τηρούνται κατά τις εισαγωγές ζωντανών ζώων από τρίτες χώρες πρέπει να καθορίζονται σύμφωνα με την κατάσταση που επικρατεί στη χώρα αυτή όσον αφορά την υγεία των ζώων·

ότι, παρά το γεγονός ότι οι εν λόγω υγειονομικοί όροι μπορούν να διαφέρουν από χώρα σε χώρα, τα κριτήρια για κτηνιατρικές δοκιμασίες και οι προϋποθέσεις για την έγκριση αγορών σε τρίτες χώρες για συναλλαγές ζώων που προορίζονται για εξαγωγή στην Κοινότητα εφαρμόζονται για όλες τις τρίτες χώρες·

ότι, προκειμένου να απλουστευθούν οι αποφάσεις όσον αφορά τους υγειονομικούς όρους που πρέπει να εφαρμόζονται κατά την εισαγωγή κατοικιδίων ζώων του βοείου και χοιρείου είδους από τρίτες χώρες, κρίνεται χρήσιμο να γίνεται αναφορά σε ενιαία κοινή απόφαση, η οποία περιέχει τα κριτήρια για κτηνιατρικές δοκιμασίες και τις προϋποθέσεις για την έγκριση των αγορών·

ότι η απόφαση για τη θέσπιση των κριτηρίων για κτηνιατρικές δοκιμές και των προϋποθέσεων για την έγκριση των αγορών σε τρίτες χώρες εφαρμόζεται μόνον όσον αφορά τις τρίτες χώρες για τις οποίες έχει εκδοθεί απόφαση η οποία λαμβάνει υπόψη την κατάσταση που επικρατεί στις εν λόγω χώρες ως προς την υγεία των ζώων·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με την γνώμη της Μόνιμης Κτηνιατρικής Επιτροπής,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

1. Η παρούσα απόφαση προβλέπει τη θέσπιση κριτηρίων για κτηνιατρικές δοκιμασίες και προϋποθέσεων για την

(1) ΕΕ αριθ. L 302 της 31. 12. 1972, σ. 28.
(2) ΕΕ αριθ. L 46 της 19. 2. 1991, σ. 37.
(3) ΕΕ αριθ. L 146 της 14. 6. 1979, σ. 15.
(4) ΕΕ αριθ. L 276 της 27. 9. 1990, σ. 46.

έγκριση των αγορών σε τρίτες χώρες για συναλλαγές ζώων που προορίζονται για εξαγωγή στην Κοινότητα, όσον αφορά τις εισαγωγές ζωντανών ζώων του βοείου και χοιρείου είδους από τις τρίτες χώρες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο που επισυνάπτεται στην απόφαση 79/542/ΕΟΚ.

2. Οι απαιτήσεις που εμφαίνονται στα παραρτήματα I και II της παρούσας απόφασης εφαρμόζονται μόνον για τις τρίτες χώρες ως προς τις οποίες έχουν εκδοθεί αποφάσεις που ορίζουν τις υγειονομικές απαιτήσεις για κάθε περίπτωση, σύμφωνα με το άρθρο 8 της οδηγίας 72/462/ΕΟΚ.

Άρθρο 2

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 25 Φεβρουαρίου 1991.

Για την Επιτροπή

Ray Mac SHARRY

Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Βοοειδή

1. *Φυματίωση*

Η απλή δοκιμή ενδοδερμικής φυματίνης χρησιμοποιώντας φυματίνη βοοειδών πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με το παράρτημα Β της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 26ης Ιουνίου 1964 σχετικά με προβλήματα υγιεινής ζώων επηρεάζοντα το ενδοκοινοτικό εμπόριο βοοειδών και χοιρινών [1].

2. *Βρουκέλλωση*

Η δοκιμή οροσυγκόλλησης και συμπληρωματικής στερέωσης πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με τις παραγράφους Α και Β του παραρτήματος Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ.

3. *Ενζωοτική λεύκωση βοοειδών*

Η δοκιμή ανοσο-διάχυσης σε πήγμα αγαρόζης πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με το παράρτημα Η της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ.

4. *Κυανή γλώσσα*

Α. Η παρεμποδιστική ή ανταγωνιστική δοκιμή Elisa πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

Η μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει αντισώματα όλων των γνωστών οροτύπων του ιού της κυανής γλώσσας (BTV).

Η αρχή της μεθόδου είναι η διακοπή της αντίδρασης μεταξύ του αντιγόνου του BTV και ενός κατά ομάδα ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος (3-17-Α3) με την προσθήκη αραιωμένων διαλυμάτων δοκιμαστικού ορού. Τα αντισώματα του BTV που υπάρχουν στο δοκιμαστικό οπό παρεμποδίζουν την ικανότητα αντίδρασης του μονοκλωνικού άντισώματος (Mab) και προκαλούν μια μείωση στην αναμενόμενη ανάπτυξη χρώματος κατά την προσθήκη του ενζυματικού υποστρώματος.

Υλικά και αντιδραστήρια

1. Τρυβλία μικροτιτλοδότησης επιπέδου πυθμένα.
2. Αντιγόνο: παρασκευαζόμενο όπως περιγράφεται κατωτέρω.
3. Παρεμποδιστικό ρυθμιστικό διάλυμα: 5 % (β/ο) αποξηραμένη σκόνη γάλακτος «Marvel», 0,1 % (ο/ο) Tween-20 (προμηθευόμενο σαν σιρόπι του πολυοξυαιθυλενοσορβιτόνιου του μονο-λαυρικού οξέος) σε PBS.
4. Μονοκλωνικό αντίσωμα: 3-17-Α3 (προμηθευόμενο σαν υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας υβριδώματος) διατηρημένο στους −20 °C ή λυοφιλιμένο, αραιωμένο κατά 1/50 με παρεμποδιστικό ρυθμιστικό διάλυμα πριν από τη χρήση, κατευθυνόμενο εναντίον κατά ομάδα ειδικού πολυπεπτιδίου p_7.
5. Συζευτικό: αντιγλοβουλίνη ποντικού από κόνικλο (απορροφηθείσα και εκχυλισθείσα) συνεζευγμένη με υπεροξειδάση αγριοραπανιού και διατηρούμενη στο σκοτάδι στους 4 °C.
6. Υπόστρωμα και χρωμογόνο: 0,2 gm ορθοφαινυλενοδιαμίνης (OPD) διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα συνιστώμενο από 2,553 gm κιτρικού οξέος και 4,574 gm δι-υδροορθοφωσφωρικού νατρίου συμπληρωμένου μέχρι τα 500 ml με απεσταγμένο νερό, διαιρεμένου σε δόσεις των 25 ml και διατηρούμενο στο σκοτάδι στους −20 °C, με 12 μl/25 ml υπεροξειδάσης του υδρογόνου (30 % β/ο) να προστίθενται αμέσως πριν από τη χρήση.

Το OPD να χειρίζεται προσεκτικά — Να φορούνται πλαστικά γάντια — πιθανό μεταλλαξιογόνο

7. 1 γραμμομόριο θειικού οξέος: 26,6 ml οξέος προστίθενται σε 473,4 ml απεσταγμένου νερού.

Υπενθύμιση: πάντα προσθήκη οξέος σε νερό, ποτέ νερού σε οξύ.

[1] ΕΕ αριθ. 121 της 20. 7. 1964, σ. 1977/64.

8. Περιστροφικά παλλινδρομούμενος αναδευτήρας.

9. Τρυβλίο ανάγνωσης για Elisa (η δοκιμή μπορεί να αναγνωστεί οπτικά).

Σχέδιο δοκιμής

	Θ	Η	Ζ	Ε	Δ	Γ	Β	Α	
Μάρτυρας αναφοράς			Αντιγόνο + Συζευτικό						1
Έλεγχος Mab		Αντιγόνο + Mab + Συζευτικό							2
Θετικός έλεγχος (+ve)		Αντιγόνο + Θετικός ορός + Mab + Συζεθτικό							3
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
		Δοκιμαστικός ορός							4
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	
									5
									6
Δοκιμαστικός ορός									7
									8
									9
									10
									11
									12

Πρότυπη διαδικασία δοκιμής

Μάρτυρας αναφοράς

Η σειρά 1 Α μέχρι Θ είναι ένας μάρτυρας αναφοράς (τυφλός έλεγχος) αποτελούμενος από αντιγόνο BTV και συζευτικό. Αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ουδετεροποιήσει το τρυβλίο ανάγνωσης Elisa.

Έλεγχος Mab

Η σειρά 2 Α μέχρι Θ είναι ο έλεγχος του μονοκλωνικού αντισώματος και αποτελείται από αντιγόνο BTV, μονοκλωνικό αντίσωμα και συζευτικό. Αυτός αντιπροσωπεύει ένα αρνητικό έλεγχο. Ο μέσος των αναγνωζόμενων τιμών οπτικής πυκνότητας από αυτή τη σειρά ελέγχου αντιπροσωπεύει το 0 % επίπεδο παρεμπόδισης.

Θετικός έλεγχος

Η σειρά 3 Α μέχρι Θ είναι ο θετικός έλεγχος. Αυτός αποτελείται από αντιγόνο BTV, αραιωμένα διαλύματα θετικού αντιορού, Mab και συζευτικό. Αυτός συμπεριλαμβάνεται σαν ένας δείκτης ότι η δοκιμή λειτουργεί κανονικά και ότι παρόμοια επίπεδα παρεμπόδισης πρέπει να παραληφθούν από δοκιμή σε δοκιμή.

Δοκιμαστικός ορός

Στο ανωτέρω σχέδιο δοκιμής, 18 οροί μπορούν να εξεταστούν σε λόγους αραίωσης 1/2, 1/4, 1/8 και 1/16. Αυτό θα δώσει κάποια ένδειξη του τίτλου του αντισώματος στο δοκιμαστικό ορό. Το εύρος αραίωσης μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω για να αποκτηθούν τίτλοι αραίωσης ορού τελικού σημείου. Εναλλακτικά, για ορολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας, ο ορός θα μπορούσε να εξεταστεί σε μία μόνο (1/4) ή δύο αραιώσεις (1/2 και 1/4) σαν μια γρήγορη μέθοδος διαχωρισμού.

Διαδικασία

1. Αραιώνεται αντιγόνο BTV σε προτιτλοδοτημένη συγκέντρωση σε PBS, υπερηχείται σύντομα για να διασπαρούν συσπειρωμένα σωματίδια ιού (εάν δεν υπάρχει υπερηχητής, γίνεται ζωηρός σιφωνισμός) και προστίθενται 50μl σε όλες τις κοιλότητες του τρυβλίου Elisa. Οι πλευρές του τρυβλίου κτυπούνται ελαφρά για να διασκορπιστεί το αντιγόνο.

2. Επώαση στους 37 °C επί 60 λεπτά πάνω σε περιστροφικό αναδευτήρα. Τα τρυβλία πλένονται τρεις φορές υπερχειλίζοντας και αδειάζοντας τις κοιλότητες με μη αποστειρωμένο PBS και αποστύπονται σε απορροφητικό χαρτί.

3. Προστίθενται 50 μl παρεμποδιστικού ρυθμιστικού διαλύματος ανά κοιλότητα. Προστίθεται δοκιμαστικός ορός και θετικός ορός στις κατάλληλες κοιλότητες και αραιώνεται κατά μήκος του τρυβλίου χρησιμοποιώντας ένα σιφώνιο πολλών διαύλων. Δεν προστίθεται ορός στο μάρτυρα αναφοράς ή τον έλεγχο Mab.

4. Αμέσως μετά την προσθήκη του δοκιμαστικού ορού, αραιώνεται το Mab σε παρεμποδιστικό ρυθμιστικό διάλυμα (σε προτιτλοδοτημένη αραίωση) και προστίθενται 50 μl σε όλες τις κοιλότητες του τρυβλίου εκτός από το μάρτυρα αναφοράς.

5. Επώαση στους 37 °C επί 60 λεπτά πάνω σε περιστροφικό αναδευτήρα. Έκπλυση τρεις φορές με PBS και απόστυψη.

6. Αραίωση συμπυκνώματος αντιποντικού από κόνικλο σε 1/5000 σε ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης και προσθήκη 50 μl σε όλες τις κοιλότητες του τρυβλίου.

7. Επώαση στους 37 °C επί 60 λεπτά πάνω σε περιστροφικό αναδευτήρα. Έκπλυση τρεις φορές με PBS και απόστυψη.

8. Το OPD αποψύχεται και αμέσως πριν από τη χρήση προστίθενται 12μl 30 % υπεροξειδίου του υδρογόνου σε κάθε 25 ml OPD. Προστίθενται 50 μl σε όλες τις κοιλότητες του τρυβλίου. Αφήνεται να αναπτυχθεί το χρώμα επί 10 περίπου λεπτά και η αντίδραση διακόπτεται με 1 M θειικού οξέος (50 μl ανά κοιλότητα). Το χρώμα πρέπει να αναπτυχθεί στις κοιλότητες ελέγχου Mab και σε αυτές τις κοιλότητες που περιέχουν ορό χωρίς κανένα αντίσωμα του BTV.

9. Εξετάζονται τα τρυβλία και μετρούνται τα αποτελέσματα είτε οπτικά είτε χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικό αναγνωστήρα.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Υπολογίζεται ο μέσος των μετρήσεων OD (απορρόφησης) από τους ελέγχους Mab. Αυτός αντιπροσωπεύει το 0 % επίπεδο παρεμπόδισης. Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του δοκιμαστικού ορού εκφράζονται σαν ποσοστό τιμής παρεμπόδισης χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Ποσοστό τιμής παρεμπόδισης} = 100 - \frac{\text{OD με παρουσία δοκιμαστικού ορού}}{\text{OD με απουσία δοκιμαστικού ορού}} \times 100$$

Τιμές παρεμπόδισης μεγαλύτερες από 40 % σε μια αραίωση ορού κατά 1/4 θεωρούνται θετικές. Η οπτική ανάγνωση είναι δυνατή καθώς παρεμπόδιση 40 % είναι η χαμηλότερη τιμή εύκολα διακρινόμενη με γυμνό μάτι.

Παρασκευή αντιγόνου BTV για Elisa

1. Εκπλύονται δέκα σειρές συννενωμένων κυττάρων BHK-21 τρεις φορές με μέσο Eagle ελεύθερο ορού και μολύνονται με ορότυπο 1 του ιού της κυανής γλώσσας με μέσο Eagle ελεύθερο ορού.

2. Επωάζονται στους 37 °C και εξετάζονται καθημερινά για κυτοπαθολογικό σύμπτωμα (κπσ).

3. Όταν το κπσ έχει φανεί στο 80 μέχρι 90 % της κυτταρικής στρώσης κάθε σειράς, ο ιός συλλέγεται με δόνηση κάθε ακινητοποιημένου κύτταρου από το γυαλί.

4. Φυγοκέντρηση στις 2 000 ή 3 000 rpm προς ιζηματοποίηση των κυττάρων.

5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε περίπου 30 ml PBS που περιέχει 1 % «Sarkosyl» και 2 ml φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο (ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Αυτό μπορεί να κάνει τα κύτταρα να σχηματίζουν ένα πήγμα και περισσότερο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης μπορεί να προστεθεί για να μειώσει το φαινόμενο αυτό.

   Προσοχή: το φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο είναι επικίνδυνο — να χρησιμοποιείται με εξαιρετική προσοχή.

6. Τα κύτταρα αποκόπτονται επί 60 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας στέλεχος υπερηχητή με πλάτος 30 μικρών.

7. Φυγοκέντρηση στις 10 000 rpm επί δέκα λεπτά.

8. Το υπερκείμενο αποθηκεύεται στους +4 °C και το εναπομείναν κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 10 μέχρι 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.

9. Υπερήχηση και διαύγαση, διατηρώντας το υπερκείμενο σε κάθε στάδιο, τρεις φορές συνολικά.

10. Τα υπερκείμενα συγκεντρώνονται και φυγοκεντρούνται στις 24 000 rpm επί 120 λεπτά στους +4 °C πάνω από ένα στρώμα 5 ml 40 % σουκρόζης (β/ο σε PBS) χρησιμοποιώντας σωλήνες φυγόκεντρου Beckmann των 30 ml και κινητήρα SW 38.

11. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, οι σωλήνες στεγνώνονται εντελώς και το ίζημα επαναιωρείται σε PBS με υπερήχηση. Το αντιγόνο διατηρείται σε επιμέρους δόσεις στους 70 °C.

Τιτλοδότηση του αντιγόνου BTV για Elisa

Αντιγόνο ιού κυανής γλώσσας για Elisa τιτλοδοτείται με την έμμεση Elisa. Διπλασιαζόμενες αραιώσεις του αντιγόνου τιτλοδοτούνται εναντίον μιας σταθερής αραίωσης (1/50) του μονοκλωνικού αντισώματος 3-17-A3. Ο κανόνας εκτέλεσης είναι ο ακόλουθος:

Διαδικασία

1. Αραιώνεται αντιγόνο BTV σε PBS κατά μήκος του τρυβλίου μικροτιτλοδότησης σε σειρά διπλασιαζόμενης αραίωσης (50 μl/κοιλότητα) χρησιμοποιώντας σιφώνιο πολλών διαύλων.

2. Επώαση επί 1 ώρα στους 37 °C πάνω σε περιστροφικό αναδευτήρα.

3. Τα τρυβλία εκπλύονται τρεις φορές με PBS.

4. Προστίθενται 50 μl μονοκλωνικού αντισώματος 3-17-A3 (αραιωμένου κατά 1/50) σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου μικροτιτλοδότησης.

5. Επώαση επί 1 ώρα στους 37 °C πάνω σε περιστροφικό αναδευτήρα.

6. Τα τρυβλία εκπλύονται τρεις φορές με PBS.

7. Προστίθενται 50 μl αντιγλοβουλίνης ποντικού από κόνικλο, συνεζευγμένης με υπεροξειδάση αγριοραπανιού, αραιωμένη σε μια προτιτλοδοτημένη βέλτιση συγκέντρωση, σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου μικροτιτλοδότησης.

8. Επώαση επί μία ώρα στους 37 °C πάνω σε περιστροφικό αναδευτήρα.

9. Προστίθεται χρωμογόνο και υπόστρωμα όπως περιγράφηκε προηγούμενα. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 10 λεπτά με την προσθήκη ενός γραμμομορίου θειικού οξέος (50 μl/κοιλότητα).

Κατά την ανταγωνιστική μέθοδο, το μονοκλωνικό αντίσωμα πρέπει να βρίσκεται σε περίσσεια, για αυτό επιλέγεται μια αραίωση του αντιγόνου που βρίσκεται πάνω στην καμπύλη τιτλοδότησης (όχι στην περιοχή οριζοντιοποίησης) που δίνει περίπου 0,8 OD από 10 λεπτά.

B. Η δοκιμή ανοσοδιάχυσης σε πήγμα αγαρόζης πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία:

Υλικά και αντιδραστήρια

Αντιγόνο

Παρασκευάζεται κατακαθιζόμενο αντιγόνο σε κάθε σύστημα κυτταροκαλλιέργειας που υποστηρίζει τον ταχύ πολλαπλασιασμό μιας φυλής αναφοράς του ιού της κυανής γλώσσας. Συνιστώνται κύτταρα Vero ή BHK. Το αντιγόνο υπάρχει στο υπερκείμενο υγρό στο τέλος της καλλιέργειας του ιού, αλλά απαιτείται 50 έως 100πλάσια συγκέντρωση για να είναι αποτελεσματικό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με κάθε τυποποιημένη διαδικασία συμπύκνωσης πρωτεΐνης· ιός μέσα στο αντιγόνο μπορεί να αδρανοποιηθεί με την προσθήκη 0,3 % (ο/ο) β-προπιολακτόνης.

Γνωστός θετικός ορός αναφοράς

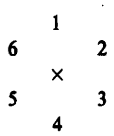
Χρησιμοποιώντας τον ορό και αντιγόνο παγκόσμιας αναφοράς, παράγεται ένας ορός εθνικού τύπου, τυποποιημένος στη βέλτιστη αναλογία έναντι του ορού παγκόσμιας αναφοράς, λυοφιλιμένος και χρησιμοποιούμενος όπως ο γνωστός ορός αναφοράς σε κάθε δοκιμή.

Δοκιμαστικός ορός

Διαδικασία:

1 % αγαρόζη παρασκευασμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος ή βαρβιτολικού νατρίου, pH 8,5 με 9,0, εκχύεται σε τρυβλίο με ελάχιστο βάθος 3,0 mm.

Ένα σχέδιο δοκιμής επτά κοιλοτήτων ελεύθερων υγρασίας, η καθεμία με διάμετρο 5,0 mm, κόβεται μέσα στο άγαρ. Το σχέδιο αποτελείται από μια κεντρική κοιλότητα και έξι κοιλότητες διευθετημένες γύρω της σε ένα κύκλο ακτίνας 3 mm.



Η κεντρική κοιλότητα πληρούται με το τυποποιημένο αντιγόνο. Οι περιφερειακές κοιλότητες 2, 4 και 6 πληρούνται με γνωστό θετικό ορό, οι κοιλότητες 1, 3 και 5 πληρούνται με δοκιμαστικό ορό.

Το σύστημα επωάζεται έως 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό υγρό θάλαμο.

Ερμηνεία

Ένας δοκιμαστικός ορός είναι θετικός αν δημιουργεί μια ειδική γραμμή κατακάθισης με το αντιγόνο και μια πλήρη γραμμή ταυτότητας με τον ορό αναφοράς. Ένας δοκιμαστικός ορός είναι αρνητικός αν δεν σχηματίζει μια ειδική γραμμή με το αντιγόνο και δεν κάμπτει τη γραμμή του ορού αναφοράς. Τα τρυβλία πρέπει να εξετάζονται σε σκούρο φόντο και χρησιμοποιώντας έμμεσο φωτισμό.

5. *Επιζωοτική αιμορραγική ασθένεια*

Η δοκιμή ανοσοδιάχυσης σε πήγμα αγαρόζης πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία:

Αντιγόνο

Παρασκευάζεται κατακαθιζόμενο αντιγόνο σε κάθε σύστημα κυτταροκαλλιέργειας που υποστηρίζει τον ταχύ πολλαπλασιασμό του κατάλληλου ορότυπου(-ων) του ιού της επιζωοτικής αιμορραγικής ασθένειας. Συνιστώνται κύτταρα Vero ή BHK. Το αντιγόνο υπάρχει στο υπερκείμενο υγρό στο τέλος της καλλιέργειας του ιού, αλλά απαιτείται 50 έως 100πλάσια συγκέντρωσης για να είναι αποτελεσματικό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με κάθε τυποποιημένη διαδικασία συμπύκνωσης πρωτεΐνης· ιός μέσα στο αντιγόνο μπορεί να αδρανοποιηθεί με την προσθήκη 0,3 % (ο/ο) β-προπιολακτόνης.

Γνωστός θετικός ορός αναφοράς

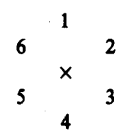
Χρησιμοποιώντας τον ορό και αντιγόνο παγκόσμιας αναφοράς, παράγεται ένας ορός εθνικού τύπου, τυποποιημένος στη βέλτιστη αναλογία έναντι του ορού παγκόσμιας αναφοράς, λυοφιλιμένος και χρησιμοποιούμενος όπως ο γνωστός ορός αναφοράς σε κάθε δοκιμή.

Δοκιμαστικός ορός

Διαδικασία:

1 % αγαρόζη παρασκευασμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος ή βαρβιτολικού νατρίου pH 8,5 με 9,0, εκχύεται σε τρυβλία με ελάχιστο βάθος 3,0 mm.

Ένα σχέδιο δοκιμής επτά κοιλοτήτων ελεύθερων υγρασίας, η καθεμία με διάμετρο 5,0 mm, κόβεται μέσα στο άγαρ. Το σχέδιο αποτελείται από μια κεντρική κοιλότητα και έξι κοιλότητες διευθετημένες γύρω της σε ένα κύκλο ακτίνας 3 mm.



Η κεντρική κοιλότητα πληρούται με το τυποποιημένο αντιγόνο. Οι περιφερειακές κοιλότητες 2, 4 και 6 πληρούνται με γνωστό θετικό ορό, οι κοιλότητες 1, 3 και 5 πληρούνται με δοκιμαστικό ορό.

Το σύστημα επωάζεται έως 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό υγρό θάλαμο.

Ερμηνεία

Ένας δοκιμαστικός ορός είναι θετικός αν δημιουργεί μια ειδική γραμμή κατακάθισης με το αντιγόνο και μια πλήρη γραμμή ταυτότητας με τον ορό αναφοράς. Ένας δοκιμαστικός ορός είναι αρνητικός αν δεν σχηματίζει μια ειδική γραμμή με το αντιγόνο και δεν κάμπτει τη γραμμή του ορού αναφοράς. Τα τρυβλία πρέπει να εξετάζονται σε σκούρο φόντο και χρησιμοποιώντας έμμεσο φωτισμό.

6. *Λεπτοσπείρωση*

Η μικροσκοπική δοκιμή συγκόλλησης πρέπει να εκτελεστεί σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία:

Καλλιέργειες

Διατηρούνται σε μέσο Korthof ή EMJH στους 30 °C.

Αντιγόνο

Περιέχει 2×10^8 οργανισμούς ανά ml μέσου καλλιέργειας.

Διαδικασία

Ίσες ποσότητες αντιγόνου και ορού αναμιγνύονται σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης επίπεδου πυθμένα και επωάζονται στους 30 °C επί 2 ώρες ή στους 37 °C επί 1 έως $1^1/_2$ ώρα. Η ανάγνωση της δοκιμής γίνεται υπό χαμηλής ισχύος φωτισμό σκοτεινού πεδίου, χρησιμοποιώντας μεγέθυνση μεταξύ 60 και 100.

Ερμηνεία

Ένα αρνητικό αποτέλεσμα είναι συγκόλληση λιγότερο από 50 % σε αραίωση 1/50.

7. *Μολυσματική ρινοτραχειίτιδα/μολυσματική φλυκταινώδης αιδιοκολπίτιδα βοοειδών*

Η δοκιμή ουδετεροποίησης ορού πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία:

Ορός

Όλοι οι οροί έχουν αδρανοποιηθεί με θέρμανση στους 56 °C επί 30 λεπτά πριν χρησιμοποιηθούν.

Διαδικασία

Η δοκιμή ουδετεροποίησης σταθερού ιού-μεταβλητού ορού σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης χρειάζεται MDBK ή άλλα ευαίσθητα κύτταρα. Η φυλή του Κολοράντο, Οξφόρδης ή οποιαδήποτε άλλη φυλή αναφοράς του ιού χρησιμοποιείται σε 100 $TCID_{50}$ ανά 0,025 ml δείγματα αδρανοποιημένου, μη αραιωμένου ορού, αναμειγνύονται σε ίσο όγκο (0,025 ml) αιωρήματος ιού. Τα μείγματα ιού/ορού επωάζονται επί δύο ώρες στους 37 °C στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης πριν προστεθούν τα κύτταρα MDBK. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση τέτοια, ώστε να σχηματιστεί πλήρης μονοκυτταρική στοιβάδα μετά από 24 ώρες.

Έλεγχοι

— Δοκιμή μολυσματικότητας ιού,
— Έλεγχοι τοξικότητας ορού,
— Έλεγχοι μη εμβολιασμένης κυτταροκαλλιέργειας,
— Αντιοροί αναφοράς.

Ερμηνεία

Τα αποτελέσματα της δοκιμής ουδετεροποίησης και ο τίτλος του ιού καταγράφονται μετά από επώαση τριών έως έξι ημερών στους 37 °C. Οι τίτλοι των ορών θεωρούνται αρνητικοί εάν δεν υπάρχει ουδετεροποίηση σε αραίωση 1/2 (μη αραιωμένος ορός).

8. *Ιός διάρροιας βοοειδών (ΙΔΒ)*

A. Η δοκιμή απομόνωσης του ιού πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία

Δοκιμαστικό υλικό και μέθοδοι ανίχνευσης

Χρησιμοποιείται ορός, κίτρινο επίχρισμα ή αιωρήματα θρόμβου αίματος από φρεσκοσυλλεγμένα δείγματα αίματος, που δεν έχουν αδρανοποιηθεί με θέρμανση, από βοοειδή μεγαλύτερα των έξι μηνών. Χρησιμοποιείται μια διαδικασία ανοσολογικής χρώσης όπως η τεχνική φθορίζοντος αντισώματος (ΦΑ) ή μια δοκιμή αντισώματος συνδεδεμένου με ένζυμο, π.χ. ανοσοϋπεροξειδάση (ΑΥΞ), για την ανίχνευση ιού διάρροιας βοοειδών σε εμβολιασμένες καλλιέργειες.

Δοκιμαστικά αντιδραστήρια

Για μια δοκιμή ΦΑ απαιτείται εξειδικευμένος αντιορός ΙΔΒ συζευγμένος με FITC. Για τη δοκιμή ΑΥΞ απαιτείται ένας ασύζευκτος, εξειδικευμένος αντι-ΙΔΒ ορός βοοειδούς, ένας αντιορός αντι-βοοειδούς συζευγμένος με υπεροξειδάση και κατάλληλο ενζυματικό υπόστρωμα (όπως 3-αμινο-9-αιθυλκαρβαζόλη). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ορός αντι-ΙΔΒ παραχθείς σε είδη εκτός των βοοειδών, εφόσον η συζευγμένη υπεροξειδάση κατευθύνεται κατά των γλοβουλινών του ορού των ειδών αυτών. Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι οροί κατά του ιού πρέπει να είναι αποδεδειγμένης εξειδίκευσης και να έχουν ευρεία αντιδραστικότητα.

Διαδικασία

Η δοκιμή χρησιμοποιεί ευαίσθητα κύτταρα όπως στροβιλοειδούς βοοειδούς, νεφρού μοσχαριού ή όρχεος μοσχαριού απηλλαγμένου ενδογενούς ΙΔΒ.

Δείγματα ορού — Ο δοκιμαστικός ορός και τα κύτταρα ιστοκαλλιέργειας τοποθετούνται σε καλλιέργειες σε καλυπτρίδα ή σε κοιλότητες τρυβλίων μικροτιτλοδότησης ή άλλα δοχεία έτσι ώστε η τελική αραίωση του ορού να είναι 10 %.

Κίτρινο επίχρισμα και θρόμβος αίματος — τα δείγματα προστίθενται σε σύγχρονες κυτταροκαλλιέργειες μονής στοιβάδας επί μία ώρα στους 37 °C και μετά οι καλλιέργειες πλένονται και επικαλύπτονται με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 10 % ορό εμβρύου μοσχαριού απηλλαγμένο από ΙΔΒ.

Οι καλλιέργειες μετά επωάζονται στους 37 °C, σταθεροποιούνται και χρωματίζονται είτε με μέθοδο ΦΑ είτε με μέθοδο ΑΥΞ.

Έλεγχοι

— Θετικός έλεγχος ΙΔΒ,
— Αρνητικός έλεγχος χωρίς προσθήκη ιού.

Ερμηνεία

Η δοκιμή ΦΑ χρωματίζεται μετά από επώαση 4—6 ημερών και αναγιγνώσκεται με χρήση υπεριώδους φωτός. Ο φθορισμός στα κύτταρα που επωάστηκαν με δοκιμαστικό δείγμα ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα.

Η δοκιμή ΑΥΞ χρωματίζεται μετά από επώαση 4 ημερών και αναγιγνώσκεται με μικροσκοπία ορατού φωτός. Σκούρος καστανός χρωματισμός σε μερικά κύτταρα ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα.

B. Η δοκιμή ουδετεροποίησης ορού πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία

Ορός

Όλοι οι οροί έχουν αδρανοποιηθεί με θέρμανση στους 56 °C επί 30 λεπτά πριν χρησιμοποιηθούν.

Διαδικασία

Η δοκιμή ουδετεροποίησης σταθερού ιού-μεταβλητού ορού σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης χρειάζεται κατάλληλα, σε σειρά πολλαπλασιασμένα ευαίσθητα κύτταρα βοοειδούς (π.χ. στροβιλοειδή κύτταρα βοοειδούς, όπως περιγάφεται από τον *McClurkin* και άλλους, 1974, Arch.Ges. Virusforsch., 45, 285—289).

Είναι απαραίτητο όλα τα αντιδραστήρια και τα κύτταρα να είναι απηλλαγμένα μολυσματικού ανώμαλου μη κυτοπαθολογικού ιού BVD/MD.

Ο δοκιμαστικός ιός, που μπορεί να είναι κάθε κατάλληλη κυτοπαθολογική φυλή αναφοράς (όπως η φυλή NADL), χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 100 μολυσματικών δόσεων μέσων κυτταροκαλλιεργειών ανά 0,025 ml. Αραιώσεις αδρανοποιημένων ορών αναμιγνύονται με ίσους όγκους αιωρήματος ιού (0,025 ml) και τα μείγματα ιού-ορού επωάζονται επί μία ώρα στους 37 °C προτού όμοιοι όγκοι κυτταρικού αιωρήματος προστεθούν. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση τέτοια, ώστε να σχηματιστεί μια πλήρης μονοκυτταρική στοιβάδα μέσα σε δύο μέρες.

Έλεγχοι

— Δοκιμή μολυσματικότητας ιού,
— Έλεγχοι τοξικότητας ορού,
— Έλεγχοι μη εμβολιασμένης κυτταροκαλλιέργειας,
— Αντιοροί αναφοράς.

Ερμηνεία

Με ιό της φυλής NADL ο βέλτιστος χρόνος ανάγνωσης είναι μετά από επώαση πέντε ημερών στους 37 °C.

Ένας μέσος τίτλος ουδετεροποίησης του ενός δεκάτου θεωρείται ενδεικτικός μιας άνοσης αντίδρασης σε παρελθούσα οξεία μόλυνση.

9. *Ανάλυση γάλακτος για μαστίτιδα*

Η ανάλυση του γάλακτος πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με το παράρτημα Δ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ.

10. *Αφθώδης πυρετός (ΑΠ)*

A. Η συλλογή οισοφαγικών/φαρυγγικών δειγμάτων και η δοκιμή πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία:

Αντιδραστήρια

Πριν τη δειγματοληψία, παρασκευάζεται μέσο μεταφοράς. Όγκοι 2 ml διανέμονται σε τόσα δοχεία συλλογής όσα και τα ζώα δειγματοληψίας. Τα χρησιμοποιούμενα δοχεία πρέπει να αντέχουν στην ψύξη με στερεό CO_2 ή υγρό άζωτο.

Τα δείγματα λαμβάνονται χρησιμοποιώντας ένα ειδικά σχεδιασμένο συλλέκτη σιέλου ή «probang».

Για να ληφθεί ένα δείγμα, το κύπελο του probang διέρχεται μέσα από το στόμα, πάνω από τη ράχη της γλώσσας και προς τα κάτω, μέσα στο πάνω τμήμα του οισοφάγου. Καταβάλλεται προσπάθεια να απολεσθεί το επιφανειακό επιθήλιο του πάνω οισοφάγου και φάρυγγα με κινήσεις κατευθυνόμενες εγκαρσίως και επιμήκως. Κατόπιν το probang αποσύρεται, προτιμότερα αφού το ζώο καταπιεί. Το κύπελο πρέπει να είναι γεμάτο και να περιέχει ένα μείγμα βλένας, σιέλου, οισοφαγικού υγρού και κυτταρικών υπολειμμάτων. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλιστεί ότι κάθε δείγμα περιέχει κάποια ποσότητα ορατού κυτταρικού υλικού. Πρέπει να αποφεύγεται απότομη μεταχείριση που προκαλεί αιμορραγία.

Τα δείγματα μερικών ζώων μπορεί να είναι σοβαρά μολυσμένα με περιεχόμενα μηρυκασμού. Τέτοια δείγματα πρέπει να απορρίπτονται και το στόμα των ζώων να ξεπλένεται με νερό, ή κατά προτίμηση φυσιολογικό ορό (αλατούχο διάλυμα), πριν επαναληφθεί η δειγματοληψία.

Μεταχείριση δειγμάτων

Κάθε δείγμα που συλλέγεται στο κύπελο του probang εξετάζεται ποιοτικά και 2 ml προστίθενται σε ίσο όγκο μέσου μεταφοράς σε δοχείο που μπορεί να αντέξει σε ψύξη. Τα δοχεία συλλογής κλείνονται σφιχτά, σφραγίζονται, απολυμαίνονται και καταχωρούνται με ετικέτες. Τα δείγματα διατηρούνται δροσερά (−4 °C) και εξετάζονται μέσα σε τρεις έως τέσσερις ώρες ή τοποθετούνται πάνω σε ξηρό πάγο (−69 °C) ή υγρό άζωτο και διατηρούνται παγωμένα μέχρι να εξεταστούν.

Από ζώο σε ζώο το probang απολυμαίνεται και πλένεται τρεις φορές με καθαρό νερό.

Δοκιμή για ιό αφθώδους πυρετού

Τα δείγματα επωάζονται σε καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων θυρεοειδούς βοοειδούς χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 3 σωλήνες ανά δείγμα. Άλλα ευαίσθητα κύτταρα π.χ. πρωτογενή κύτταρα νεφρού βοοειδών ή χοιρινών μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι για ορισμένες φυλές του ιού του αφθώδους πυρετού είναι λιγότερο ευαίσθητα. Οι σωλήνες επωάζονται στους 37 °C σε συσκευή περιστροφής και εξετάζονται καθημερινά επί 48 ώρες ως προς κυτοπαθολογικό σύμπτωμα (ΚΠΣ). Εάν αποδειχθούν αρνητικές, οι καλλιέργειες περνούνται χωρίς δοκιμή σε νέες καλλιέργειες και επανεξετάζονται επί 48 ώρες. Η εξειδίκευση κάθε ΚΠΣ πρέπει να επιβεβαιώνεται.

Συνιστώμενα μέσα μεταφοράς

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 0,08 M, pH 7,2 περιέχον 0,01 % αλβουμίνης ορού βοοειδών, 0,002 % ερυθρού φαινόλης και αντιβιοτικά.

2. Μέσο ιστοκαλλιέργειας (π.χ. Eagle's MEM) περιέχον ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 0,04 M, 0,01 % αλβουμίνη ορού βοοειδών και αντιβιοτικά, pH 7,2.

Πρέπει να προστεθούν αντιβιοτικά (τελικά ανά ml) στο μέσο μεταφοράς π.χ.:

πενικιλλίνη	1 000 IU,
θειϊκή νεομυκίνη	100 IU,
θειϊκή πολυμυξίνη B	50 IU,
μυκοστατίνη	100 IU.

B. Η δοκιμή ουδετεροποίησης ιού πρέπει να εκτελεσθεί σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία

Αντιδραστήρια

Παρασκευάζεται προς αποθήκευση αντιγόνο ΙΑΠ σε κυτταροκαλλιέργειες ή πάνω σε γλώσσες κατοικιδίων βοοειδών και διατηρείται στους −70 °C ή χαμηλότερα ή στους −20 °C μετά από προσθήκη γλυκερίνης 50 %. Αυτό είναι το αποθηκευμένο αντιγόνο. Ο ιός του αφθώδους πυρετού είναι σταθερός υπό τις συνθήκες αντές και οι τίτλοι λίγο μεταβάλλονται για μία περίοδο μηνών.

Διαδικασία

Η δοκιμή εκτελείται σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης βαθμού ιστοκαλλιέργειας, επίπεδου πυθμένα, χρησιμοποιώντας ευαίσθητα κύτταρα όπως IBRS-2, BHK-21 ή κύτταρα νεφρού μοσχαριού.

Οροί για δοκιμή αραιώνονται στο 1/4 με μέσο κυτταροκαλλιέργειας απηλλαγμένο ορού με την προσθήκη 100 IU/ml νεομυκίνης ή άλλων κατάλληλων αντιβιοτικών. Οι οροί αδρανοποιούνται στους 56 °C επί 30 λεπτά και ποσότητες των 0,05 ml χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μίας διπλής σειράς σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης χρησιμοποιώντας επαναληπτικές αραιώσεις των 0,05 ml. Κατόπιν προστίθεται σε κάθε κοιλότητα προτιτλοδοτημένος ιός επίσης αραιωμένος με μέσο καλλιέργειας απηλλαγμένο ορού και περιέχον 100 $TCID_{50}$/0,05 ml. Ακολουθώντας επώαση στους 37 °C επί μία ώρα για να επέλθει ουδετεροποίηση, προστίθενται σε κάθε κοιλότητα 0,05 ml κυττάρων αιώρησης περιέχοντα 0,5—1,0 × 10^6 κύτταρα ανά 1 ml σε μέσο κυτταροκαλλιέργειας περιέχον ορό απηλλαγμένο αντισώματος αφθώδους πυρετού και τα τρυβλία σφραγίζονται.

Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C. Οι μονοκυτταρικές στοιβάδες είναι κανονικά σύγχρονες μέσα σε 24 ώρες. Το ΚΠΣ έχει συνήθως εξελιχθεί αρκετά σε 48 ώρες για μια *μικροσκοπική* ανάγνωση της δοκιμής. Κατά το χρόνο αυτόν μπορεί να γίνει μία τελική *μικροσκοπική* ανάγνωση ή τα τρυβλία μπορούν να στερεωθούν και να χρωματισθούν για *μακροσκοπική* ανάγνωση, για παράδειγμα χρησιμοποιώντας αλατούχο διάλυμα φορμόλης 10 % και κυανό του μεθυλενίου 0,05 %.

Έλεγχοι

Οι έλεγχοι σε κάθε δοκιμή περιλαμβάνουν ομόλογο αντιορό γνωστού τίτλου, έναν κυτταρικό έλεγχο, έναν έλεγχο τοξικότητας ορού, έναν έλεγχο μέσου και μια τιτλοδότηση ιού από την οποία υπολογίζεται η πραγματική ποσότητα ιού στη δοκιμή.

Ερμηνεία

Κοιλότητες με ένδειξη ΚΠΣ θεωρούνται μολυσμένες και οι τίτλοι ουδετεροποίησης εκφράζονται ως το αμοιβαίο της τελικής αραίωσης του ορού παρόντος στα μείγματα ορού/ιού στο 50 % τελικό σημείο, υπολογιζόμενο σύμφωνα με τη μέθοδο Spearman-Karber (Karber, G., 1931, Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 162, 480).

Οι δοκιμές θεωρούνται έγκυρες όταν η πραγματική ποσότητα του ιού που χρησιμοποιείται ανά κοιλότητα στη δοκιμή είναι μεταξύ $10^{1,5}$ και $10^{2,5}$ $TCID_{50}$ και όταν ο τίτλος του ορού αναφοράς βρίσκεται μέσα στο διπλάσιο του αναμενόμενου τίτλου του, υπολογιζόμενου από την πορεία των αποτελεσμάτων προηγουμένων τιτλοδοτήσεων. Όταν οι έλεγχοι βρίσκονται εκτός των ορίων αυτών, οι δοκιμές επαναλαμβάνονται.

Ένας τίτλος τελικού σημείου 1/11 ή λιγότερο θεωρείται αρνητικός.

Γ. Η ανίχνευση και ποσοτική αξιολόγηση αντισώματος με Elisa πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία

Αντιδραστήρια

Αντιορός κουνελιού στο αντιγόνο 146S 7 τύπων ιού αφθώδους πυρετού (ΙΑΠ) χρησιμοποιούμενος σε προκαθορισμένη βέλτιστη συγκέντρωση σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού/διττανθρακικού, pH 9,6.

Τα αντιγόνα παρασκευάζονται από επιλεγμένες φυλές του ιού ανεπτυγμένες πάνω σε μονοκυτταρική στοιβάδα κυττάρων BHK-21. Χρησιμοποιούνται τα ακαθάριστα υπερκείμενα και προτιτλοδοτούνται σύμφωνα σε την πρότυπη διαδικασία αλλά χωρίς ορό, ώστε να δώσουν μια αραίωση, η οποία, μετά την προσθήκη ίσου όγκου PBST (αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού περιέχον 0,05 % Tween-20 και δείκτη ερυθρό φαινόλης), θα έδινε μία τιμή οπτικής πυκνότητας μεταξύ 1,2 και 1,5. Οι ιοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι. Το PBST χρησιμοποιείται σαν αραιωτικό. Παρασκευάζεται αντιορός ινδικού χοιριδίου με εμβολιασμό ινδικών χοιριδίων με αντιγόνο 146S κάθε οροτύπου. Παρασκευάζεται μία προκαθορισμένη βέλτιστη συγκέντρωση σε PBST περιέχοντας 10 % φυσιολογικό ορό βοοειδούς και 5 % φυσιολογικό ορό κουνελιού.

Χρησιμοποιείται ανοσογλοβουλίνη αντιινδικού χοιριδίου από κουνέλι συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού σε προκαθορισμένη βέλτιστη συγκέντρωση σε PBST περιέχοντας 10 % φυσιολογικό ορό βοοειδούς και 5 % φυσιολογικό ορό κουνελιού.

Οι δοκιμαστικοί οροί αραιώνονται σε PBST.

Διαδικασία

1. Τρυβλία για Elisa καλύπτονται με 50 ml ορού κουνελιού κατά του ιού και αφήνονται μέχρι την επομένη σε υγρό θάλαμο σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Παρασκευάζονται πενήντα μικρολίτρα διπλής, διπλασιαζόμενης σειράς κάθε δοκιμαστικού ορού ξεκινώντας κατά 1/4 σε τρυβλία πολλαπλών κοιλοτήτων, πυθμένα σχήματος U (τρυβλία-φορέας). Πενήντα μικρολίτρα σταθερής δόσης του αντιγόνου προστίθενται σε κάθε κοιλότητα και τα μείγματα αφήνονται στους 4 °C έως την επομένη. Η προσθήκη του αντιγόνου μειώνει την αρχική αραίωση του ορού στο 1/8.

3. Τα τρυβλία για Elisa πλένονται πέντε φορές με PBST.

4. Κατόπιν μεταφέρονται πενήντα μικρολίτρα μειγμάτων ορού/αντιγόνου από τα τρυβλία-φορέας στα καλυμμένα με ορό κουνελιού τρυβλία για Elisa και επωάζονται στους 37 °C επί μία ώρα πάνω σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα.

5. Μετά την έκπλυση, προστίθενται σε κάθε κοιλότητα 50 μl αντιορού στο χρησιμοποιούμενο στο σημείο 4 αντιγόνο από ινδικό χοιρίδιο. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C επί μία ώρα πάνω σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα.

6. Τα τρυβλία πλένονται και προστίθενται σε κάθε κοιλότητα 50 μl ανοσογλοβουλίνης αντιινδικού χοιριδίου από κουνέλι συζευγμένης με υπεροξειδάση αγριοραπανιού. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C επί μία ώρα πάνω σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα.

7. Τα τρυβλία πλένονται και προστίθενται σε κάθε κοιλότητα 50 ml ορθοφαινυλενοδιαμίνης περιέχουσας 0,05 % H_2O_2 (30 % β/ο).

8. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 15 λεπτά με H_2SO_4 σε 1,25 M.

Τα τρυβλία αναγιγνώσκονται φασματοφωτομετρικά στα 492 nm πάνω σε όργανο ανάγνωσης Elisa συνδεδεμένο με μικροϋπολογιστή.

Έλεγχοι

Για κάθε αντιγόνο που χρησιμοποιείται, 40 κοιλότητες δεν περιέχουν ορό αλλά αντιγόνο αραιωμένο σε PBST.

Μια διπλή διπλασιαζόμενη σειρά αραίωσης ομόλογου αντιορού αναφοράς από βοοειδές.

Μια διπλή διπλασιαζόμενη σειρά αραίωσης αρνητικού ορού βοοειδούς.

Ερμηνεία

Οι αντισωματικοί κύκλοι εκφράζονται ως η τελική αραίωση του δοκιμαστικού ορού που δίνει 50 % της μέσης τιμής απορρόφησης (OD) που καταγράφεται στις κοιλότητες ελέγχου του ιού όταν δεν υπάρχει δοκιμαστικός ορός. Τίτλοι μεγαλύτεροι από 1/40 θεωρούνται θετικοί.

Αναφορές

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. Immunological Methods, 93, 115—121.11.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Χοιροειδή

1. *Φυματίωση*

Η απλή ενδοδερμική δοκιμή φυματίνης χρησιμοποιώντας φυματίνη πτηνών πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με το παράρτημα Β του 64/432/ΕΟΚ, με τη διαφορά ότι η θέση της ένεσης πρέπει να είναι το χαλαρό δέρμα στη βάση του αυτιού.

2. *Βρουκέλλωση*

Η δοκιμή συγκόλλησης ορού και η δοκιμή συμπληρωματικής στερέωσης πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με τις παραγράφους Α και Β του παραρτήματος Γ της οδηγίας 63/432/ΕΟΚ.

3. *Ασθένεια του Aujesky*

Η δοκιμή ουδετεροποίησης ορού πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία

Ορός

Όλοι οι οροί αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 56 °C επί 30 λεπτά πριν χρησιμοποιηθούν.

Διαδικασία

Η δοκιμή ουδετεροποίησης σταθερού ιού-μεταβλητού ορού χρειάζεται Vero ή άλλο ευαίσθητο κυτταρικό σύστημα. Ο ιός της ασθένειας του Aujesky χρησιμοποιείται σε 100 $TCID_{50}$ ανά 0,025 ml. Δείγματα αδρανοποιημένου μη αραιωμένου ορού αναμειγνύονται με ίσο όγκο (0,025 ml) αιωρήματος ιού. Τα μείγματα ιού/ορού επωάζονται επί δύο ώρες στους 37 °C στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης πριν προστεθούν τα κατάλληλα κύτταρα. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση τέτοια, ώστε να σχηματίζεται μία πλήρης μονοκυτταρική στοιβάδα μετά από 24 ώρες.

Έλεγχοι

— Δοκιμή μολυσματικότητας ιού,
— Έλεγχοι τοξικότητας ορού,
— Έλεγχοι μη εμβολιασμένης κυτταροκαλλιέργειας,
— Αντιοροί αναφοράς.

Ερμηνεία

Τα αποτελέσματα της δοκιμής ουδετεροποίησης και ο τίτλος του ιού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή καταγράφονται μετά από επώαση τριών έως επτά ημερών στους 37 °C. Τίτλοι ορού μικρότεροι από 1/2 (μη αραιωμένο σπέρμα) θεωρούνται αρνητικοί.

4. *Μεταδοτική γαστρεντερίτιδα (ΜΓΕ)*

Η δοκιμή αδρανοποίησης ορού πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία

Ορός

Όλοι οι οροί αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 56 °C επί 30 λεπτά πριν χρησιμοποιηθούν.

Διαδικασία

Η δοκιμή ουδετεροποίησης σταθερού ιού-μεταβλητού ορού σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης χρειάζεται κύτταρα Α72 (όγκου σκύλου) ή άλλο ευαίσθητο κυτταρικό σύστημα. Ο ιός ΜΓΕ χρησιμοποιείται σε 100 $TCID_{50}$ ανά 0,025 ml· δείγματα αδρανοποιημένου, μη αραιωμένου ορού αναμειγνύονται με ίσο όγκο (0,025 ml) αιωρήματος ιού. Τα μείγματα ιού/ορού επωάζονται επί 30 έως 60 λεπτά στους 37 °C στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης πριν προστεθούν τα κατάλληλα κύτταρα. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση τέτοια, ώστε να σχηματίζεται μία πλήρης μονοκυτταρική στοιβάδα μετά από 24 ώρες. Κάθε κύτταρο λαμβάνει 0,1 ml κυτταρικού αιωρήματος.

Έλεγχοι

— Δοκιμή μολυσματικότητας ιού,
— Έλεγχοι τοξικότητας ορού,
— Έλεγχοι μη ευβολιασμένης κυτταροκαλλιέργειας,
— Αντιοροί αναφοράς.

Ερμηνεία

Τα αποτελέσματα της δοκιμής ουδετεροποίησης και ο τίτλος του ιού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή καταγράφονται μετά από επώαση τριών έως πέντε ημερών στους 37 °C. Τίτλοι ορού μικρότεροι από 1/2 (τελική αραίωση) θεωρούνται αρνητικοί. Εάν μη αραιωμένα δείγματα ορού είναι τοξικά για τις κυτταροκαλλιέργειες, οι οροί αυτοί μπορούν να αραιωθούν κατά 1/2 πριν χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. Αυτό θα ισοδυναμεί με 1/4 τελικής αραίωσης ορού. Τίτλοι ορού μικρότεροι από 1/4 (τελική αραίωση) θεωρούνται αρνητικοί στις περιπτώσεις αυτές.

5. *Γρίπη χοίρου*

Η δοκιμή παρεμπόδισης αιμοσυγκόλλησης πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία

Διαδικασία

Οι δοκιμές εκτελούνται με τυποποιημένες μεθόδους (Υπουργείο Υγείας, Παιδείας και Κοινωνικών Υπηρεσιών των ΗΠΑ, σειρά Ανοσολογίας No 6).

Για να καταστραφούν μη εξειδικευμένοι παρεμποδιστές, οι οροί από χοίρο πρέπει να μεταχειρίζονται είτε με ένζυμο που καταστρέφει τους υποδοχείς (διήθημα δονακίου της χολέρας) μέχρι την επομένη στους 37 °C ακολουθούμενο από θέρμανση στους 56 °C επί 30 λεπτά για να καταστραφεί η υπολειπόμενη ενζυματική δραστικότητα, είτε με 25 % καολίνη μέχρι την επομένη στους 4 °C (Clark and Casals, 1958, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 7, 561).

Μετά από απορρόφηση με αιώρημα 10 % ερυθροκυτών κοτόπουλου επί μία ώρα στους 37 °C, οι οροί δοκιμάζονται κατά 4 αιμοσυγκολλητικών ομάδων του κατάλληλου ιού χρησιμοποιώντας 1 % ερυθροκύτες κοτόπουλου. Ο ιός και ο ορός αφήνονται σε επαφή επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πριν προστεθούν οι ερυθροκύτες.

Ερμηνεία

Τίτλοι 1/10 ή μεγαλύτεροι θεωρούνται θετικοί.

6. *Αφθώδης πυρετός*

Οι δοκιμές για αφθώδη πυρετό σε χοιρινά πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που καθορίζονται στο κεφάλαιο I σημείο 10.

7. *Κυστίτιδα χοίρου*

Η δοκιμή ουδετεροποίησης ορού πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με την ακόλουθη πρότυπη διαδικασία

Ορός

Όλοι οι οροί αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 56 °C επί 30 λεπτά πριν χρησιμοποιηθούν.

Διαδικασία

Η δοκιμή ουδετεροποίησης σταθερού ιού-μεταβλητού ορού πάνω σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης χρειάζεται κύτταρα IB-RS-2 ή άλλο ευαίσθητο κυτταρικό σύστημα. Η φυλή UKG 27/72 ή οποιαδήποτε άλλη φυλή αναφοράς του ιού χρησιμοποιείται σε 100 $TCID_{50}$ ανά 0,025 ml. Οι οροί προς δοκιμή αραιώνονται κατά 1/4 και αδρανοποιούνται και παρασκευάζεται μία διπλασιαζόμενη σειρά αραίωσης. Τα δείγματα ορού αναμειγνύονται με ίσο όγκο αιωρήματος ιού και επωάζονται επί μία ώρα στους 37 °C στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης, πριν προστεθούν 0,025 ml κυτταρικού αιωρήματος 3×10^6 κύτταρα/ml.

Έλεγχοι

— Δοκιμή μολυσματικότητας ιού,
— Έλεγχοι τοξικότητας ορού,
— Έλεγχοι μη εμβολιασμένης κυτταροκαλλιέργειας,
— Αντιοροί αναφοράς.

Ερμηνεία

Τα αποτελέσματα της δοκιμής ουδετεροποίησης και ο τίτλος του ιού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή καταγράφονται μετά από επώαση τριών ημερών στους 37 °C. Οι τίτλοι του ορού θεωρούνται αρνητικοί εάν δεν υπάρχει ουδετεροποίηση σε αραίωση 1/11.

8. *Κλασικός πυρετός χοίρου*

Οι δοκιμές για τον κλασσικό πυρετό χοίρου πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με το παράρτημα I της οδηγίας 80/217/ΕΟΚ του Συμβουλίου [1].

9. *Λεπτοσπείρωση*

Οι δοκιμές για λεπτοσπείρωση στα χοιρινά πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με το κεφάλαιο I σημείο 6 του παραρτήματος αυτού.

---

[1] ΕΕ αριθ. L 47 της 21. 2. 1980, σ. 11.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΓΚΡΙΣΗ ΑΓΟΡΩΝ ΓΙΑ ΣΥΝΑΛΛΑΓΕΣ ΖΩΩΝ ΤΟΥ ΒΟΕΙΟΥ ΚΑΙ ΧΟΙΡΕΙΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ

1. Οι αγορές ελέγχονται από επίσημο κτηνίατρο.

2. Οι αγορές πρέπει να βρίσκονται στο κέντρο περιοχής με διάμετρο 20 χιλιομέτρων στην οποία, σύμφωνα με επίσημα στοιχεία, δεν έχουν υπάρξει, για τουλάχιστον 30 ημέρες πριν αρχίσουν να χρησιμοποιούνται σαν εγκεκριμένες αγορές, κρούσματα αφθώδους πυρετού και, σε περίπτωση που οι αγορές έχουν εγκριθεί για ζώα του χοιρείου είδους, κρούσματα πανώλης των χοίρων, φυσαλιδώδους νόσου των χοίρων ή εντεροϊογενούς εγκεφαλομυελίτιδας (ασθένεια του Teschen).

3. Πριν αρχίσουν να χρησιμοποιούνται σαν εγκεκριμένες αγορές, οι αγορές πρέπει να καθαρίζονται να απολυμαίνονται με απολυμαντική ουσία η οποία έχει εγκριθεί επίσημα από τη χώρα εξαγωγής και θεωρείται αποτελεσματική για την καταπολέμηση των ασθενειών που αναφέρονται στο σημείο 2 ανωτέρω.

4. Τα σημεία συγκέντρωσης, οι τόποι φόρτωσης ή οι άλλοι τόποι από τους οποίους διέρχονται τα βοοειδή ή οι χοίροι που προορίζονται για εξαγωγή στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα πρέπει να πληρούν τις προϋποθέσεις που αναφέρονται στα σημεία 1, 2 και 3 αυτού του παραρτήματος.

5. Όλα τα βοοειδή και οι χοίροι που διέρχονται από εγκεκριμένες αγορές πρέπει να πληρούν τις υγειονομικές προϋποθέσεις που έχουν καθορισθεί για την εισαγωγή της σχετικής κατηγορίας ζώων στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα.

6. Τα ζώα που προορίζονται για εξαγωγή στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα τα οποία διέρχονται από εγκεκριμένες αγορές πρέπει, εντός έξι ημερών μετά τη διέλευσή τους, να φορτώνονται και να αποστέλλονται απ' ευθείας στα σύνορα της χώρας εξαγωγής:

   α) χωρίς να έρχονται σε επαφή με άλλα δίχηλα ζώα εκτός από ζώα του βοείου ή χοιρείου είδους που πληρούν τις υγειονομικές προϋποθέσεις που έχουν καθοριστεί για την εισαγωγή της σχετικής κατηγορίας ζώων στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα·

   β) χωρισμένα σε φορτία έτσι ώστε να μην βρίσκονται σε κανένα φορτίο ζώα για αναπαραγωγή ή παραγωγή και ζώα για άμεση σφαγή·

   γ) σε μεταφορικά μέσα ή περιέκτες που έχουν πρώτα καθαριστεί και απολυμανθεί με απολυμαντική ουσία η οποία έχει εγκριθεί επισήμως στη χώρα εξαγωγής και θεωρείται αποτελεσματική για την καταπολέμηση των ασθενειών που αναφέρονται στο σημείο 2 ανωτέρω, και έχουν κατασκευαστεί κατά τέτοιον τρόπο ώστε τα κόπρανα, τα ούρα, τα απορρίμματα ή οι στρωμνές να μην μπορούν να πέφτουν από το όχημα κατά τη μεταφορά.

7. Όταν οι προϋποθέσεις για την εξαγωγή ζώων στην Κοινότητα περιλαμβάνουν την πραγματοποίηση δοκιμασίας εντός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος πριν από τη φόρτωση, το διάστημα αυτό περιλαμβάνει τον χρόνο που ενδεχομένως απαιτείται για τη συγκέντρωση των ζώων, μέχρι έξι ημέρες, μετά τη διέλευσή τους από εγκεκριμένες αγορές.

8. Η χώρα εξαγωγής υποδεικνύει για ζώα που προορίζονται για αναπαραγωγή και παραγωγή τις αγορές που έχουν εγκριθεί για ζώα που προορίζονται για σφαγή και ανακοινώνει στην Επιτροπή και τις αρμόδιες κεντρικές αρχές του κράτους μέλους τα ονόματα και τις διευθύνσεις των αγορών αυτών.

9. Η χώρα εξαγωγής ορίζει τη διαδικασία για τον επίσημο έλεγχο των αγορών, των σημείων συγκέντρωσης και των τόπων φόρτωσης και εξασφαλίζει τη διενέργεια του εν λόγω ελέγχου.

10. Η χώρα εξαγωγής εξασφαλίζει ότι οι λεπτομέρειες σχετικά με τις αγορές και τα σημεία συγκέντρωσης περιλαμβάνονται στον κατάλληλο χώρο του υγειονομικού πιστοποιητικού που συνοδεύει τα ζώα τα οποία εξάγονται στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα.