

PRILOGA 4

POGOJI ZA PRIDOBITEV, OHRANITEV OZIROMA ODVZEM ZDRAVSTVENEGA STATUSA PRI GOVEDU

I. ZDRAVSTVENI STATUS JE LAHKO:

- **goveja čreda, uradno prosta tuberkuloze**, če so izpolnjeni pogoji iz 2. oziroma 3. točke II. dela te priloge;
- **država ali del države, uradno prosta tuberkuloze**, če so izpolnjeni pogoji iz 6. oziroma 7. točke II. dela te priloge;
- **goveja čreda, uradno prosta bruceloze**, če so izpolnjeni pogoji iz 2. oziroma 3. točke III. dela te priloge;
- **goveja čreda, prosta bruceloze**, če so izpolnjeni pogoji iz 6. oziroma 7. točke III. dela te priloge;
- **država ali del države, uradno prosta bruceloze**, če so izpolnjeni pogoji iz 10. oziroma 11. točke III. dela te priloge;
- **čreda, uradno prosta enzooske goveje levkoze (EGL)**, če so izpolnjeni pogoji iz 2. oziroma 3. točke IV. dela te priloge;
- **država ali del države, uradno prosta EGL**, če so izpolnjeni pogoji iz 6. oziroma 7. točke IV. dela te priloge.

II. TUBERKULOZA

1. Za namene tega dela priloge imajo uporabljeni izrazi naslednji pomen:

- a. živali so vsa goveda, razen goved na kulturnih in športnih prireditvah;
- b. intradermalni tuberkulinski test je test, ki je opisan, izveden in ocenjen v skladu z delom A te priloge.

2. Goveja čreda **je uradno prosta tuberkuloze**, če so izpolnjeni naslednji pogoji:

- a. nobena žival v čredi ne kaže kliničnih znakov tuberkuloze;
- b. so vse živali v čredi, starejše od šest tednov, negativno reagirale na dva intradermalna tuberkulinska testa; prvi test se opravi šest mesecev po izključitvi vseh okuženih ali sumljivih živali v čredi, drugi pa šest mesecev kasneje. Če je čreda sestavljena izključno iz živali, ki izvirajo iz čred, uradno prostih tuberkuloze, se prvi test opravi vsaj 60 dni po formiranju črede, drugi test pa ni potreben;
- c. če se po opravljenem prvem testu iz prejšnje točke čredi priključi nova žival, starejša od šest tednov, mora le-ta reagirati negativno na intradermalni tuberkulinski test; test mora biti opravljen ali v 30 dneh pred ali v 30 dneh po vključitvi nove živali v čredo; če se test opravi v 30 dneh po vključitvi nove živali, je treba novo žival, dokler ni dokazano negativna, fizično izolirati od drugih živali v čredi tako, da se onemogoči vsak posredni ali neposredni stik z ostalimi živalmi. Testi niso obvezni za živali, ki izhajajo iz čred, uradno prostih tuberkuloze, če se vsi premiki živali registrirajo na predpisan način.

Ne glede na prejšnja odstavka, intradermalni tuberkulinski test ni potreben za premike na območju Republike Slovenije za živali, ki izvirajo iz čred, uradno prostih tuberkuloze.

3. Goveja čreda **obdrži status črede, uradno proste tuberkuloze**, če so izpolnjeni naslednji pogoji:
- dokler so izpolnjeni pogoji iz točk 2.a. in 2.c. tega dela priloge;
 - če vse nove živali prihajajo iz čred, uradno prostih tuberkuloze;
 - če se enkrat letno na vseh živalih, razen na teletih, mlajših od šest tednov, ki so bila rojena na tem gospodarstvu, redno opravljajo intradermalni tuberkulinski testi.

Ne glede na prejšnji odstavek se pogostnost rednih preiskav lahko spremeni, in sicer:

- če letno povprečje čred na določenem območju, v katerih je bila potrjena okužba s tuberkulozo, v zadnjih dveh enoletnih kontrolnih obdobjih ni večje od 1%, se lahko presledek med dvema rednima preiskavama podaljša na dve leti; moške živali za pitanje, ki izhajajo iz čred, uradno prostih tuberkuloze in so znotraj epidemiološke celote, se lahko oprosti preiskav; za te živali mora uradni veterinar za inšpekcijski nadzor izdati odločbo, na podlagi katere grede lahko te živali le neposredno v zakol in se nikakor ne smejo uporabljati kot plemenske živali;
- če letno povprečje čred na določenem območju, v katerih je bila potrjena okužba s tuberkulozo, v zadnjih dveh dvoletnih kontrolnih obdobjih ni večje od 0,2%, se lahko presledek med dvema rednima preiskavama podaljša na tri leta oziroma zviša starost živali za opravljanje teh testov na 24 mesecev;
- če letno povprečje čred na določenem območju, v katerih je bila potrjena okužba s tuberkulozo, v zadnjih dveh triletnih kontrolnih obdobjih ni večje od 0,1%, se lahko presledek med dvema rednima preiskavama podaljša na štiri leta;
- pristojni organ lahko ukine tuberkulinizacijo čred, če:
 - se pred vključitvijo v čredo na vseh živalih opravijo intradermalni tuberkulinski testi z negativnim izvidomali
 - se ob zakolu vse živali pregleda na spremembe, značilne za tuberkulozo, ter se vse take spremembe pošljejo v histopatološko in bakteriološko preiskavo, s katero se ugotovi, če gre za tuberkulozo;

Če se število primerov bolezni v državi poveča, se pogostnost tuberkulinizacije lahko tudi poveča.

4. Status **črede, uradno proste tuberkuloze se začasno razveljavi** v naslednjih primerih:

- če pogoji iz 3. točke tega dela priloge niso več izpolnjeni;
- ali
- če se pri eni ali več živalih ugotovi, da so pozitivno reagirale na intradermalni tuberkulinski test ali se pri patoanatomskem pregledu posumi, da gre za tuberkulozo.

Žival, ki je pozitivno reagirala na intradermalni tuberkulinski test, je potrebno izločiti in poslati v zakol. Pri pozitivnih reaktorjih oziroma pri sumu tuberkuloze pri zaklani živali je potrebno opraviti ustrezne patoanatomske, laboratorijske in epidemiološke preiskave.

Status črede se razveljavi do rezultatov vseh laboratorijskih preiskav. Če so rezultati negativni, se status črede, uradno proste tuberkuloze, povrne. Pri tem se mora opraviti intradermalni tuberkulinski test na vseh živalih, starejših od šest tednov. Test mora biti opravljen najmanj 42 dni po izločitvi reaktorjev iz črede. Rezultati tega testa morajo biti negativni;

ali

- c. če so v čredi živali z nedoločnim statusom, kot je opisano v točki 2.2.5.3.3. dela A te priloge. V tem primeru ostane status črede nedoločen, dokler ni razjasnjen status živali. Take živali morajo biti izolirane od drugih živali, dokler se ne določi njihov status. Status se določi z nadaljnjim testiranjem po 42 dneh ali s patoanatomsko in laboratorijsko preiskavo.
- d. z odstopanjem od zahtev iz odstavka c. lahko VURS odloči, če se izvaja rutinsko preskušanje čred s primerjalnim tuberkulinskim testom, opisanim v Prilogi II.a, in v primeru črede, v kateri vsaj tri leta niso bili potrjeni reaktorji, da ne omeji premikov drugih živali iz črede, pod pogojem, da se status vseh reaktorjev, ki pokažejo nedoločen rezultat, dokončno ugotovi z drugim testom po 42 dneh, in da se ne dovoli vstop na trg znotraj Skupnosti za nobeno žival z gospodarstva, dokler ni dokončno ugotovljen status vseh nedoločenih reaktorjev. Če pri tem drugem testu katera koli žival pozitivno reagira ali spet pokaže nedoločen rezultat, veljajo pogoji iz podtočke b. te točke. Če se nato prisotnost bolezni potrdi, je treba izslediti in testirati vse živali, ki so zapustile gospodarstvo po zadnjem popolnoma negativnem testu črede.

5. **Status črede, uradno proste tuberkuloze se mora odvzeti**, če se tuberkuloza potrdi z izolacijo *Mycobacterium bovis* pri laboratorijski preiskavi.

Ne glede na prejšnji odstavek pristojni organ odvzame status tudi v naslednjih primerih:

- a. če pogoji iz 2. točke tega dela priloge niso več izpolnjeni;
- ali
- b. če se pri patoanatomskem pregledu ugotovijo spremembe, značilne za tuberkulozo;
- ali
- c. če se z epidemiološko preiskavo ugotovi verjetnost okužbe;
 - d. ali iz kakršnih koli drugih razlogov, ki so pomembni pri preprečevanju in zatiranju goveje tuberkuloze.

Pristojni organ mora slediti in preverjati vse črede, ki veljajo za epidemiološko povezane. Status uradno tuberkuloze proste črede se ne sme vrniti, dokler ni opravljeno končno čiščenje in dezinfekcija prostorov in pribora in dokler niso vse živali, starejše od šest tednov, negativno reagirale na vsaj dva zaporedna intradermalna tuberkulinska testa - prvi najmanj šestdeset dni in drugi najmanj štiri mesece ter največ dvanajst mesecev po odstranitvi zadnjega pozitivnega reaktorja.

6. **Državo ali del države se lahko proglasi za uradno tuberkuloze prosto, če so** izpolnjeni naslednji pogoji:

- a. da odstotek govejih čred, pri katerih je bila potrjena okužba s tuberkulozo, v zadnjih šestih zaporednih letih ni presegal 0,1 % vseh čred letno in je vsaj 99,9% vseh čred doseglo status črede, uradno proste tuberkuloze v vsakem od zadnjih šestih zaporednih let, pri čemer je bil ta odstotek izračunan na dan 31. decembra vsakega koledarskega leta;

- b. da so živali označene in registrirane v skladu s predpisom, ki ureja označevanje in registracijo govedi, tako da je omogočena identifikacija črede in premikov oziroma prometa za vsako posamezno žival;
 - c. da so vse živali ob zakolu patoanatomsko pregledane;
 - d. da se upoštevajo postopki za začasno razveljavitev in odvzem uradnega statusa tuberkuloze proste črede.
7. **Država ali del države lahko obdrži uradni status tuberkuloze prostega območja**, dokler so izpolnjeni pogoji iz prejšnje točke. Vendar pa v primeru, da se v državi ali delu države, ki je bila priznana kot tuberkuloze prosta, spremeni epizootiološka situacija, se lahko začasno prekliče ali odvzame ta status, dokler niso izpolnjeni predpisani pogoji.

II.A. PREISKAVE NA TUBERKULOZO

1. IDENTIFIKACIJA POVZROČITELJA TUBERKULOZE

Prisotnost *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), povzročitelja tuberkuloze pri govedu, je v kliničnih vzorcih in vzorcih, odvzetih ob pregledu po zakolu, mogoče dokazati s preiskavo razmaza omenjenih vzorcev ali s tehnikami imunoperoksidaze ter potrditi z izolacijo mikobakterij na umetnih gojiščih.

Patološki material za potrditev *M. bovis* se odvzame iz patološko spremenjenih bezgavk in parenhimatoznih organov, kakor so pljuča, jetra, vranica itd. Kadar žival nima patoloških sprememb, se vzorci za pregled in bakteriološko preiskavo vzamejo iz retrofaringealnih, bronhialnih, mediastinalnih, supramamarnih, mandibularnih in nekaterih mezenterialnih bezgavk ter jeter.

Identifikacija izolatov se običajno izvaja z določanjem lastnosti kulture in biokemijskih lastnosti. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) se lahko uporabi za dokazovanje mikobakterij sklopa *M. tuberculosis*. Tehnike analize DNA so lahko hitrejše in zanesljivejše kot biokemijske metode za razločevanje *M. bovis* od drugih mikobakterij sklopa *M. tuberculosis*. Metode genotipizacije omogočajo razločevanje med različnimi sevi *M. bovis* in tako omogočajo ugotavljanje izvora, prenosa in širjenja *M. bovis*.

Uporabljene tehnike in sredstva, njihova standardizacija in razlaga rezultatov morajo biti v skladu s tistimi, opredeljenimi v poslovniku standardnih postopkov za diagnostične preskuse in cepiva, četrta izdaja, 2000, Poglavje 2.3.3 (tuberkuloza pri govedu).

2. TUBERKULINSKI TEST NA KOŽI

Tuberkulini PPD (prečiščeni proteinski derivati), ki izpolnjujejo standarde iz točke 2.1 te priloge, se uporabijo za izvajanje uradnega tuberkulinskega preskusa na koži, po postopkih iz točke 2.2 te priloge.

2.1. Standardi za tuberkulin (bovini in aviarni)

2.1.1. Opredelitev pojma

Tuberkulin prečiščeni proteinski derivat (tuberkulin PPD, bovini ali aviarni) je pripravek, pridobljen iz toplotno obdelanih rastnih in razkrojnih produktov *Mycobacterium bovis* ali *Mycobacterium avium* (kakor je ustrezno), sposobnih povzročiti zapoznelo preobčutljivost v živali, senzibilizirani na mikroorganizme iste vrste.

2.1.2. Pridobivanje

Tuberkulin se pridobi iz delcev, topnih v vodi, pripravljenih s segrevanjem v prosto tekoči pari, čemur sledi filtriranje kultur *M. bovis* ali *M. avium* (kakor je ustrezno), zraslih v tekočem sintetičnem gojišču. Aktivno frakcijo filtrata, ki sestoji pretežno iz beljakovin, se izolira s precipitacijo, spere in ponovno raztopi. Doda se lahko antimikrobni konzervans, ki ne pospešuje lažnih pozitivnih reakcij, kakor na primer fenol. Končni sterilni pripravek, brez mikobakterij, se aseptično razdeli v sterilne steklene posode, ki se jih nato zapre, da se prepreči kontaminacijo. Pripravek se lahko liofilizira.

2.1.3. Identifikacija produkta

Vbrizga se niz stopenjsko naraščajočih odmerkov intradermalno na različnih mestih v primerno senzibilizirane albino morske prašičke, od katerih vsak tehta najmanj 250 g. Po 24 do 28 urah se pojavijo reakcije v obliki edematoznih oteklin z eritemom, z ali brez nekroze na mestih vbrizganja. Obseg in resnost reakcije sta odvisna od odmerka. Nedovzetni morski prašički ne kažejo nobenih reakcij na podobne injekcije.

2.1.4. Preskusi

2.1.4.1. pH: pH je 6.5 do 7.5.

2.1.4.2. Fenol: Če pripravek, ki je v preiskavi, vsebuje fenol, njegova koncentracija ne sme presežati 5 g/l.

2.1.4.3. Učinek senzibilizacije: Uporabi se skupino treh morskih prašičkov, ki niso bili tretirani z nobeno snovjo, ki bi motila preskus. Trikrat v razmaku petih dni se vbrizga intradermalno vsakemu morskemu prašičku odmerek pripravka za preiskavo, ki ustreza 500 IU v 0,1 ml. Petnajst do enaindvajset dni po tretjem vbrizganju se vbrizga isti odmerek (500 IU) intradermalno omenjenim živalim ter kontrolni skupini treh morskih prašičkov z enako telesno težo, ki predhodno še niso bili tuberkulinizirani. Štiriindvajset do osemindvajset ur po zadnjih vbrizganjih ni značilnih razlik v reakciji med obema skupinama.

2.1.4.4. Toksičnost: Uporabi se dva morska prašička, od katerih vsak tehta vsaj 250 g, ki predhodno nista bila tretirana z nobeno snovjo, ki bi motila preskus. Podkožno se vsakemu morskemu prašičku vbrizga 0,5 ml pripravka, ki je v preiskavi. Živali se opazuje sedem dni. V obdobju opazovanja ni nobenih nenormalnih učinkov.

2.1.4.5. Sterilnost: Ustreza preskusu na sterilnost, predpisanem v monografiji o cepivih za uporabo v veterinarstvu, četrta izdaja 2002, Evropske farmakopeje.

2.1.5. Učinkovitost

Učinkovitost tuberkulina PPD (bovinega in aviarnega) se določa s primerjavo reakcij, ki jih pokažejo senzibilizirani morski prašički po intradermalnem vbrizganju niza razredčenih pripravkov za preiskavo, z reakcijami, ki jih povzročijo znane koncentracije referenčnega pripravka tuberkulina (bovinega ali aviarnega, kakor je ustrezno) prečiščenega proteinskega derivata, merjene v IU (mednarodnih enotah).

Za preskus učinkovitosti se senzibilizira najmanj devet albino morskih prašičkov, od katerih vsak tehta od 400 do 600 g, z globoko intramuskularno injekcijo 0,0001 mg mokre mase žive *M. bovis*, sev AN5, razredčene v 0.5 ml raztopine 9 g/l natrijevega klorida R za bovini tuberkulin, ali ustreznega odmerka inaktivirane ali žive *M. avium* za aviarni tuberkulin. Najmanj štiri tedne po senzibilizaciji morskih prašičkov, se morske prašičke obrije po obeh bokih, da se dobi na vsaki strani prostor za največ štiri mesta vbrizga. Pripravi se raztopine pripravka za preiskavo ter referenčnega pripravka, z uporabo izotonične solne raztopine fosfatnega pufra (pH 6,5-7,5), ki vsebuje 0,005 g/l polisorbata 80 R. Uporabi se najmanj tri odmerke referenčnega pripravka, in najmanj tri odmerke pripravka za preiskavo. Odmerke se izbere tako, da imajo nastale lezije premer najmanj 8 mm do največ 25 mm. Raztopine se razporeja po mestih naključno v obliki latinskega kvadrata. Vsak odmerek se vbrizga intradermalno, s konstantnim volumnom 0,1 ml ali

0,2 ml. Po 24 do 28 urah se izmeri premera lezij in izračuna rezultat preskusa po običajnih statističnih metodah in na podlagi domneve, da so premeri lezij premo sorazmerni z logaritmom koncentracije tuberkulinov.

Preskus ni veljaven, če meje zanesljivosti napake ($P = 0,95$) niso manjše od 50% in ne večje od 200% ocenjene učinkovitosti. Ocenjena učinkovitost ni manjša od 66% in ne večja od 150% specificirane učinkovitosti za bovini tuberkulin. Ocenjena učinkovitost ni manjša od 75% in ne večja od 133% specificirane učinkovitosti za aviarni tuberkulin. Specificirana učinkovitost ni manjša od 20000 IU/ml za oba tuberkulina (bovini in aviarni).

2.1.6. Skladiščenje

Skladišči se zaščiteno pred svetlobo, pri temperaturi 5 ± 3 °C.

2.1.7. Označevanje na nalepki

Oznaka na nalepki vsebuje naslednje navedbe:

- a. učinkovitost v mednarodnih enotah IU (International Units) na mililiter,
- b. ime in količino katere koli dodane snovi,
- c. za liofilizirane pripravke:
 - ime in volumen rekonstitucijske tekočine, ki jo je treba dodati,
 - da je treba proizvod uporabiti takoj po rekonstituciji.

2.2. Preskusni postopki

2.2.1. Naslednji postopki se priznavajo kot uradni intradermalni tuberkulinski preskusi:

- enkratni intradermalni preskus: za ta preskus je potrebna ena sama injekcija bovinega tuberkulina,
- intradermalni primerjalni preskus: za ta preskus je treba istočasno vbrizgati eno injekcijo bovinega tuberkulina in eno injekcijo aviarnega tuberkulina.

2.2.2. Odmerek vbrizganega tuberkulina ne sme biti:

- manjši od 2000 IU bovinega tuberkulina,
- manjši od 2000 IU aviarnega tuberkulina.

2.2.3. Volumen vsakega vbrizga ne sme presegati 0,2 ml.

2.2.4. Tuberkulinski preskusi se izvajajo z vbrizganjem tuberkulina(ov) v kožo na vratu. Mesta vbrizganja se morajo nahajati na meji med sprednjo in srednjo tretjino vratu. Kadar se vbrizgata oba, aviarni in bovini tuberkulin v isto žival, mora biti mesto vbrizganja aviarnega tuberkulina približno 10 cm od grebena vratu, in mesto za vbrizganje bovinega tuberkulina približno 12,5 cm nižje, na liniji, približno vzporedni z linijo ramena, ali pa na nasprotnih straneh vratu; pri mladih živalih, kjer ni dovolj prostora za ustrezno ločitev mest vbrizga na eni strani vratu, vbrizgamo po eno injekcijo na vsaki strani vratu, na identičnih mestih v sredini srednje tretjine vratu.

2.2.5. Tehnika tuberkulinskih preskusov in razlaga reakcij sta naslednji:

2.2.5.1. Tehnika:

Mesta vbrizganja je potrebno ostriči in očistiti. Na vsakem ostriženem mestu se prime kožno gubo s palcem in kazalcem, jo izmeri s kutimetrom in zapiše debelino. Odmerek tuberkulina se vbrizga na način, ki zagotavlja, da je tuberkulin vbrizgan intradermalno. Uporabi se lahko kratko sterilno iglo, s poševnim robom navzven, in z graduirano brizgalko, napolnjeno s tuberkulinom, ki se jo vbode poševno v globlje

plasti kože. Pravilen vbod injekcije se potrdi z otipom majhne nabreklina velikosti graha na vsaki strani vbrizga. Debelino kožne gube se na vsakem mestu vbrizga ponovno izmeri 72 ur (\pm 4 ure) po vbrizganju in zapiše.

2.2.5.2. Razlaga reakcij:

Razlaga reakcij mora temeljiti na kliničnem opazovanju ter evidentiranem povečanju debeline kožne gube na mestih vbrizganja 72 ur po vbrizganju tuberkulina(ov). Reakcije so lahko naslednje:

- a. negativna reakcija: če se opazi le omejeno oteklino s povečanjem debeline kožne gube do največ 2 mm in brez kliničnih znakov, kakor so razpršeni ali razširjeni edem, potenje, nekroza, bolečine ali vnetje limfnih kanalov v tem predelu oziroma bezgavk.
- b. sumljiva reakcija: če se ne opazi nobenih kliničnih znakov iz prejšnje podtočke, in če se debelina kožne gube poveča za več kot 2 mm in manj kot 4 mm.
- c. pozitivna reakcija: če se opazijo klinični znaki iz podtočke a) te točke, ali če se debelina kožne gube na mestu vbrizganja poveča za 4 mm ali več.

2.2.5.3. Razlaga uradnega intradermalnega tuberkulinskega preskusa je naslednja:

2.2.5.3.1. Enkratni intradermalni preskus je lahko:

- a. pozitiven: pozitivna bovina reakcija, kakor je opredeljena pod c) točke 2.2.5.2;
- b. sumljiv: sumljiva reakcija, kakor je opredeljena pod b) točke 2.2.5.2;
- c. negativen: negativna bovina reakcija, kakor je opredeljena pod a) točke 2.2.5.2.

Živali, ki reagirajo sumljivo v enkratnem intradermalnem preskusu, je treba ponovno testirati po najmanj 42 dneh.

Za živali, ki ne reagirajo negativno na ta drugi preskus se šteje, da so pozitivne na preskus.

Živali, ki reagirajo pozitivno v enkratnem intradermalnem preskusu, se lahko testirajo po intradermalnem primerjalnem preskusu, če pričakujemo lažno pozitivno ali interferenčno reakcijo.

2.2.5.3.2. Intradermalni primerjalni preskus za vzpostavitev in ohranjanje statusa črede, uradno proste tuberkuloze je lahko:

- a. pozitiven: pozitivna reakcija na bovini tuberkulin, ki je za več kot 4 mm večja od reakcije na aviarni tuberkulin, ali prisotnost kliničnih znakov;
- b. sumljiv: pozitivna ali sumljiva reakcija na bovini tuberkulin, ki je od 1 do 4 mm večja od reakcije na aviarni tuberkulin, in odsotnost kliničnih znakov;
- c. negativen: negativna reakcija na bovini tuberkulin, ali pozitivna ali sumljiva reakcija na bovini tuberkulin, ki je enaka ali manjša od pozitivne ali sumljive reakcije na aviarni tuberkulin in odsotnost kliničnih znakov v obeh primerih.

Živali, ki sumljivo reagirajo na intradermalni primerjalni preskus, je treba ponovno testirati po najmanj 42 dneh. Za živali, ki ne reagirajo negativno na ta drugi preskus, se šteje, da so pozitivne na preskus.

- 2.2.5.3.3. Status črede, uradno proste tuberkuloze, se lahko začasno razveljavi, dokler ni uradno razrešen status naslednjih živali:
- živali, za katere se šteje, da so sumljivo reagirale na enkratni intradermalni tuberkulinski preskus;
 - živali, za katere se šteje, da so pozitivno reagirale na enkratni intradermalni tuberkulinski preskus, vendar čakajo na ponovno testiranje z intradermalnim primerjalnim preskusom;
 - živali, za katere se šteje, da so sumljivo reagirale na intradermalni primerjalni preskus.
- 2.2.5.3.4. Kadar zakonodaja Skupnosti zahteva, da se živali pred premikom pregledajo z intradermalnim testom, se test razlaga tako, da v trgovanje znotraj Skupnosti ne sme vstopiti nobena žival, katere debelina kožne gube presega 2 mm, ali ki kaže klinične znake bolezni.
- 2.2.5.3.5. Da bi se lahko odkrilo kar največje število okuženih ali obolelih živali v čredi ali regiji, lahko VURS spremeni merila za razlago testa in izboljša njegovo občutljivost tako, da za pozitivne reakcije štejejo vse nedoločne reakcije iz 2.2.5.3.1(b) in 2.2.5.3.2(b).

3. DOPOLNILNO PRESKUŠANJE

Da bi omogočili odkritje kar največjega števila inficiranih in bolnih živali v čredi ali regiji, lahko VURS dovoli uporabo testa na interferon gama, omenjenega v OIE Diagnostičnem priročniku standardnih postopkov za diagnostične preskuse in cepiva, četrta izdaja, 2000, Poglavje 2.3.3. (bovina tuberkuloza), dodatno k tuberkulinskemu preskusu.

4. DRŽAVNI INŠTITUTI IN NACIONALNI REFERENČNI LABORATORIJI

4.1. Naloge in odgovornosti

Državni inštituti in referenčni laboratoriji iz točke 4.2 so vsak v svoji državi odgovorni za uradno preskušanje tuberkulinov ali reagentov iz 2. in 3. odstavka, za zagotovitev ustreznosti vsakega omenjenega tuberkulina ali reagenta glede na zgoraj omenjene standarde.

4.2. Seznam državnih inštitutov in nacionalnih referenčnih laboratorijev

Seznam državnih inštitutov in nacionalnih referenčnih laboratorijev držav članic je naveden v točki 4.2 Priloge B Direktive 64/432/EGS.

III. BRUCELOZA

1. Za namene tega dela imajo uporabljeni izrazi naslednji pomen:

- živali so vsa goveda, razen moških živali za pitanje, če prihajajo iz čred, ki so uradno proste bruceloze; za te živali mora uradni veterinar za inšpekcijski nadzor izdati odločbo, na podlagi katere gredo lahko te živali le neposredno v zakol in se nikakor ne smejo uporabljati kot plemenske živali;
- serološki test pomeni ali seroaglutinacijski test, test hitre aglutinacije s puferiranim in obarvanim antigenom, reakcijo vezanja komplementa (RVK), plazma aglutinacijski test, plazma prstanasti test, mikro-aglutinacijski test ali ELISA test za preiskave posameznih vzorcev krvi, kot je opisano v III.a delu te priloge;
- mlečni test pomeni mlečno prstanasti preizkus (MPP) ali mlečni ELISA test v skladu s III.a delom te priloge;

- drugi testi so testi, ki jih lahko za ugotavljanje bruceloze odobri pristojni organ in so opisani v III.a delu te priloge.

2. Goveja čreda je **uradno prosta bruceloze**, če:

- a. živali niso bile cepljene proti brucelozni (krave, cepljene vsaj pred 3 leti);
- b. živali vsaj 6 mesecev ne kažejo kliničnih znakov bruceloze;
- c. so bile vse živali, starejše od 12 mesecev, pregledane in so bili rezultati preiskav negativni, in sicer:
 - kri: dva serološka testa, opravljena v presledku več kot tri mesece in manj kot 12 mesecev ali
 - mleko: trije mlečni preizkusi, opravljene v trimesečnih presledkih, katerim vsaj šest tednov kasneje sledi serološki test;
- d. vse nove živali prihajajo iz čred, uradno prostih bruceloze in je bil pri seroaglutinacijskem testu pri živalih, starejših od 12 mesecev, brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml ali pa so bili rezultati drugih testov negativni; test mora biti opravljen v skladu s III.a delom te priloge, v 30 dneh pred ali 30 dneh po vključitvi teh živali v čredo; če se test opravi v 30 dneh po priključitvi nove živali, je treba novo žival, dokler ni dokazano negativna, fizično izolirati od drugih živali v čredi tako, da se onemogoči vsak posredni ali neposredni stik z ostalimi živalmi.

3. Goveja čreda **obdrži status črede, uradno proste bruceloze**, če so izpolnjeni naslednji pogoji:

- a. če se vsako leto izvede eno od naslednjih testiranj in so rezultati testiranj negativni:
 - trije mlečno prstanasti preizkusi, izvedeni v najmanj trimesečnih presledkih
 - trije mlečni ELISA testi, izvedeni v najmanj trimesečnih presledkih;
 - dva mlečno prstanasta preizkusa, izvedena v najmanj trimesečnih presledkih, katerima najmanj šest tednov pozneje sledi serološki test;
 - dva mlečna ELISA testa, izvedena z najmanj trimesečnim presledkom, katerima šest tednov pozneje sledi serološki test;
 - dva serološka testa, izvedena z najmanj trimesečnim in največ dvanajstmesečnim presledkom.

Pogostnost rednih preiskav v državi ali delu države, ki ni uradno prost bruceloze, ima pa goveje črede vključene v uradni program izkoreninjenja bruceloze, se lahko spremeni na naslednji način:

- če je bruceloza potrjena v manj kot 1 % čred, se letno opravita dva mlečna testa v najmanj trimesečnem presledku ali en serološki test;
 - če je vsaj štiri leta vsaj 99,8 % čred priznanih kot uradno prostih bruceloze, se serološki test opravi vsaki dve leti, če so preiskane vse živali, starejše od 12 mesecev, ali pa se serološko testiranje opravi vsako leto, če se testirajo vse živali, starejše od 24 mesecev;
- b. vse nove živali prihajajo iz čred, uradno prostih bruceloze in je bil pri seroaglutinacijskem testu pri živalih, starejših od 12 mesecev, brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml ali pa so bili rezultati drugih testov negativni; test mora biti opravljen v skladu s III.a delom te priloge, v 30 dneh pred ali 30 dneh po vključitvi teh živali v čredo; če se test opravi v 30 dneh po priključitvi nove živali, je treba novo žival, dokler ni dokazano negativna, fizično izolirati od drugih živali v čredi tako, da se onemogoči vsak posredni ali neposredni stik z ostalimi živalmi.

Test iz prejšnjega odstavka ni potreben, če v državi ali delu države zadnji dve leti odstotek čred, okuženih z brucelozo, ni presegel 0,2% in če živali prihajajo iz čred, uradno prostih bruceloze, ki med prevozom niso prišle v stik z živalmi nižjega zdravstvenega statusa.

- c. ne glede na točko b. pa se lahko v čredo, uradno prosto bruceloze, vključijo tudi živali, ki prihajajo iz črede, proste bruceloze, če so starejše od 18 mesecev in, če so bile cepljene, je moralo cepljenje biti opravljeno vsaj eno leto prej.
- d. Te živali morajo biti pregledane 30 dni pred vključitvijo v čredo s seroaglutinacijskim testom, pri čemer mora biti brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml in rezultat RVK ali drugega testa, negativen.
- e. Kakorkoli pa, če se v čredo, uradno prosto bruceloze, vključi ženska žival iz črede, proste bruceloze, pod pogoji iz prejšnjega odstavka, se taka čreda smatra za čredo, prosto bruceloze še dve leti po vključitvi zadnje cepljene živali.

4. Status **črede, uradno proste bruceloze se začasno razveljavi** v naslednjih primerih:

- a. če pogoji iz 2. in 3. točke tega dela niso več izpolnjeni;
- b. ali
- c. če zaradi izvidov laboratorijskih testov ali na klinični podlagi pri eni ali več živalih obstaja sum, da imajo brucelozo in so bile sumljive živali poslane v zakol ali izolirane na tak način, da ni mogoč posreden ali neposreden stik z drugimi živalmi.

V primeru, da je bila žival poslana v zakol in ni več na razpolago za testiranje, začasna razveljavitev preneha, če se pri vseh živalih v čredi, starejših od 12 mesecev, opravita dva seroaglutinacijska testa, pri čemer je brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml. Prvi test mora biti opravljen vsaj 30 dni po izločitvi živali in drugi vsaj 60 dni kasneje.

Če je bila žival izolirana od drugih živali v čredi, jo je mogoče spet priključiti čredi in čredi povrniti status:

- a. če je bil opravljen seroaglutinacijski test, pri čemer je bil brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml in je bil rezultat RVK testa negativen ALI
- b. po negativnem izvidu kombinacije testov, opravljene v skladu s III.a delom te priloge.

Testi oziroma kombinacija testov se določi v odločbi, s katero se v skladu s tem pravilnikom začasno razveljavi status.

5. Status črede, **uradno proste bruceloze mora biti odvzet**, če je v čredi z laboratorijskimi testi ali epidemiološkimi preiskavami potrjena okužba z brucelo.

Status se čredi povrne, če so vse živali, ki so bile v čredi v času izbruha, izločene ali ko so vse živali v čredi preiskane in sta dva zaporedna testa, opravljena v 60-dnevnem presledku na vseh živalih, starejših od 12 mesecev, negativna, pri čemer mora biti prvi test opravljen najmanj 30 dni po odstranitvi zadnje okužene živali.

V primeru krav, ki so bile v času izbruha okužbe breje, je treba končni test opraviti 21 dni po otelitvi zadnje od krav, ki so bile breje v času izbruha okužbe.

6. Goveja čreda je **prosta bruceloze**, če izpolnjuje pogoje iz točk 2(b) in (c) in je bilo cepljenje izvedeno kot sledi:

a. ženske živali so bile cepljene:

- pred starostjo šestih mesecev z »live strain 19« cepivom ali
- pred starostjo 15 mesecev z »killed 45/20 adjuvant« cepivom, ki je bilo uradno pregledano in odobreno ali
- z drugim odobrenim cepivom.

b. pri živalih mlajših od 30 mesecev, ki so bile cepljene z »live strain 19« cepivom, je lahko brucelozni titer pri seroaglutinacijskem testu višji od 30 IU vendar manjši od 80 IU aglutinacije na ml, s tem, da je rezultat RVK testa nižji kot 30 EEC enot v primeru ženskih živali, ki so bile cepljene v obdobju 12 mesecev pred testiranjem oziroma manj kot 20 EEC enot, v ostalih primerih.

7. Goveja čreda **obdrži status črede, proste bruceloze**, če so izpolnjeni naslednji pogoji:

a. če so živali pregledane na enega od načinov iz točke 3(a);

b. če živali, ki se vključujejo v čredo, izpolnjujejo pogoje iz točke 3(b) ali

- izvirajo iz čred, prostih bruceloze in, če gre za živali, starejše od 12 mesecev, morajo biti 30 dni pred vključitvijo ali v izolaciji po vključitvi, testirane v skladu s prilogo III.a; pri tem mora biti brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml pri seroaglutinacijskem testu in rezultat RVK negativen; ali
- izvirajo iz čred, prostih bruceloze, so mlajše od 30 mesecev in so bile cepljene z »live strain 19« cepivom in je brucelozni titer pri seroaglutinacijskem testu višji od 30 IU vendar manjši od 80 IU aglutinacije na ml, s tem, da je rezultat RVK testa nižji kot 30 EEC enot v primeru ženskih živali, ki so bile cepljene v obdobju 12 mesecev pred testiranjem oziroma manj kot 20 EEC enot v ostalih primerih.

8. Status **črede, proste bruceloze, se začasno razveljavi** v naslednjih primerih:

a. če niso več izpolnjeni pogoji iz točk 6. in 7. ali

b. če na podlagi izvidov laboratorijskih testov ali na klinični podlagi pri eni ali več živalih, starejših od 30 mesecev, obstaja sum, da imajo brucelozo in so bile sumljive živali poslane v zakol ali izolirane na tak način, da ni mogoč posreden ali neposreden stik z drugimi živalmi.

Če je bila žival izolirana od drugih živali v čredi, jo je mogoče spet priključiti čredi in čredi povrniti status:

- če je bil opravljen seroaglutinacijski test, pri čemer je bil brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml in je bil rezultat RVK testa negativen ALI
- po negativnem izvidu kombinacije testov, opravljene v skladu s III.a delom te priloge.

Testi oziroma kombinacija testov se določi v odločbi, s katero se v skladu s tem pravilnikom začasno razveljavi status.

V primeru, da je bila žival poslana v zakol in ni več na razpolago za testiranje, začasna razveljavitev preneha, če se pri vseh živalih v čredi, starejših od 12 mesecev, opravita dva seroaglutinacijska testa, pri čemer je brucelozni titer manjši od 30 IU aglutinacije na ml. Prvi test mora biti opravljen vsaj 30 dni po izločitvi živali in drugi vsaj 60 dni kasneje.

Pri živalih, ki bi morale biti testirane (v skladu s predhodnima odstavkoma) in so mlajše od 30 mesecev ter so bile cepljene z »live strain 19« cepivom, je lahko brucelozni titer pri seroaglutinacijskem testu višji od 30 IU vendar manjši od 80 IU aglutinacije na ml, s tem, da je rezultat RVK testa nižji kot 30 EEC enot v primeru ženskih živali, ki so bile cepljene v obdobju 12 mesecev pred testiranjem oziroma manj kot 20 EEC enot v ostalih primerih.

9. Status **črede, proste bruceloze, mora biti odvzet**, če je v čredi z laboratorijskimi testi ali z epizootiološkimi preiskavami potrjena okužba z brucelo.

Status se čredi povrne, če so vse živali, ki so bile v čredi v času izbruha, izločene ali ko so vse živali v čredi preiskane in sta dva zaporedna testa, opravljena v 60-dnevnem presledku pri vseh necepljenih živalih, starejših od 12 mesecev, negativna, pri čemer mora biti prvi test opravljen najmanj 30 dni po odstranitvi zadnje okužene živali.

Živali, ki bi morale biti testirane (glede na prejšnji odstavek) in so mlajše od 30 mesecev ter so bile cepljene z »live strain 19« cepivom, se smatrajo za negativne, če je brucelozni titer pri seroaglutinacijskem testu višji od 30 IU vendar manjši od 80 IU aglutinacije na ml, s tem, da je rezultat RVK testa nižji kot 30 EEC enot v primeru ženskih živali, ki so bile cepljene v obdobju 12 mesecev pred testiranjem oziroma manj kot 20 EEC enot v ostalih primerih.

V primeru krav, ki so bile v času izbruha okužbe breje, je treba končni test opraviti 21 dni po otelitvi zadnje od krav, ki so bile breje v času izbruha okužbe.

10. **Državo ali del države je mogoče proglasiti za uradno prosto bruceloze, če** izpolnjuje naslednje pogoje:

- a. da vsaj tri leta ni bilo okužbe z brucelo (bruceloznega abortusa ali izolacije *B. abortus*) in je v vsakem od petih zaporednih let vsaj 99,8 % čred doseglo status črede, uradno proste bruceloze, pri čemer je bil ta odstotek izračunan na dan 31. decembra vsakega koledarskega leta.

Če se pri ugotavljanju bruceloze izvaja stamping-out celotne črede, se pri zgoraj omenjenem izračunavanju povprečja ne štejejo:

- posamezni primeri, za katere se z epidemiološko preiskavo ugotovi, da so se pojavili pri živalih, ki so bile pripeljane iz druge države ali iz druge regije;
- črede, katerih status uradno prostih bruceloze je bil začasno razveljavljen ali odvzet zaradi drugih razlogov in ne zaradi suma na brucelozo. VURS vodi register teh primerov in vsako leto pripravi letno poročilo.

- b. da so živali označene in registrirane v skladu s predpisom, ki ureja označevanje in registracijo govedi, tako da je omogočena identifikacija črede in premikov oziroma prometa za vsako posamezno žival in

- c. da se prijavijo vsi primeri abortusov živali in razišče oziroma ugotovi njihov vzrok.

11. Država ali del države **obdrži status države ali regije, uradno proste bruceloze:**

- a. dokler so izpolnjeni pogoji iz prejšnje točke;
- b. če so vsako leto v času prvih petih let po pridobitvi tega statusa vse živali, starejše od 24 mesecev v vsaj 20 % vseh čred negativno reagirale na serološki test oziroma na preiskavo mlečnih vzorcev, če gre za črede molznic;
- c. če se vsak sum boleznih obvezno prijavi in se vsako sumljivo žival pregleda; preiskava zajema najmanj dva serološka testa krvi, vključno z reakcijo vezanja komplementa ter mikrobiološko preiskavo ustreznih vzorcev;

- d. če se v času suma, dokler preiskave iz točke (c) niso končane oziroma niso rezultati preiskav negativni, izvorni čredi oziroma čredi, ki je bila v stiku s sumljivo živaljo, status črede, uradno proste bruceloze, začasno razveljavi;
- e. če so bila v primeru izbruha bruceloze, ki se je razširila, vsa goveda zaklana. Vse ostale, za bolezen dovzetne živali morajo biti pregledane z ustreznimi testi, prostore ter opremo pa očistiti in razkužiti.

III.a BRUCELOZA

1. IDENTIFIKACIJA POVZROČITELJA BOLEZNI

Dokazovanje z modificiranim kislinsko odpornim ali imunospecifičnim barvanjem organizmov z morfologijo *Brucellae* v abortivnem tkivu, vaginalnih izcedkih ali mleku omogoča domnevno dokazovanje prisotnosti bruceloze, zlasti če je podprto s serološkimi testi.

Po izolaciji je treba identificirati vrsto in biovar glede na lizo fagov in/ali teste oksidativnega metabolizma, dejavnike, ki vplivajo na uporabo kultur, biokemijske dejavnike in serološke dejavnike.

Uporabljene tehnike in mediji, njihova standardizacija in interpretacija rezultatov morajo biti v skladu s tistimi, opredeljenimi v Priročniku standardov za diagnostične teste in cepiva – OIE, Četrta izdaja, 2000, Poglavje 2.3.1 (goveja bruceloza), Poglavje 2.4.2 (bruceloza pri kozah in ovcah) in Poglavje 2.6.2 (bruceloza pri prašičih).

2. IMUNOLOŠKI TESTI

2.1. Standardi

- 2.1.1. *Brucella abortus* biovar 1 sev Weybridge 99 ali sev USDA 1119-3 se uporabi za pripravo vseh antigenov, ki se uporabijo za RB aglutinacijski test (Rose Bengal Test), test serumske aglutinacije (SAT), test vezanja komplementa (CFT) in mlečno prstanasti test (MRT).
- 2.1.2. Standardni referenčni serum za RBT, SAT, CFT in MRT je mednarodni referenčni standardni serum OIE (OIEISS), prej imenovan drugi mednarodni serum WHO proti bakteriji *Brucella abortus* (ISAbS).
- 2.1.3. Standardni referenčni serumi za teste ELISA so:
 - OIEISS,
 - šibko pozitivni OIE ELISA standardni serum (OIEELISA_{WP}SS),
 - močno pozitivni OIE ELISA standardni serum (OIEELISA_{SP}SS),
 - Negativni OIE ELISA standardni serum (OIEELISA_NSS).
- 2.1.4. Zgoraj omenjeni standardni serumi so na voljo pri Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Združeno kraljestvo.
- 2.1.5. OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{SP}SS in OIEELISA_NSS so mednarodni primarni standardi, na podlagi katerih se določajo sekundarni referenčni nacionalni standardi (»delovni standardi«) za vsak posamezen test v vsaki državi članici.

2.2. Encimskoimunske metode (testi ELISA) ali drugi vezalni testi za ugotavljanje goveje bruceloze v serumu ali mleku

2.2.1. Snovi in reagenti

Uporabljene tehnike in interpretacija rezultatov morajo biti predhodno validirani v skladu z načeli, predpisanimi v Poglavju 1.1.3 Priručnika standardov za diagnostične teste in cepiva – OIE, Četrta izdaja, 2000, in morajo zajemati vsaj laboratorijske in diagnostične študije.

2.2.2. Standardizacija testa

2.2.2.1. Standardizacija testnega postopka za posamezne vzorce seruma:

- (a) predrazredčitev 1/150⁽¹⁾ standardnega seruma OIEISS ali predrazredčitev 1/2 standardnega seruma OIEELISA_{WP}SS ali predrazredčitev 1/16 standardnega seruma OIEELISA_{SP}SS, pripravljena v negativnem serumu (ali v negativnem zbirnem vzorcu serumov) mora dati pozitivno reakcijo;
- (b) predrazredčitev 1/600 standardnega seruma OIEISS ali predrazredčitev 1/8 standardnega seruma OIEELISA_{WP}SS ali predrazredčitev 1/64 standardnega seruma OIEELISA_{SP}SS, pripravljena v negativnem serumu (ali v negativnem zbirnem vzorcu serumov) mora dati negativno reakcijo;
- (c) standardni serum OIEELISA_NSS mora vedno dati negativno reakcijo.

2.2.2.2. Standardizacija testnega postopka za zbirne vzorce serumov:

- (a) predrazredčitev 1/150 standardnega seruma OIEISS ali predrazredčitev 1/2 standardnega seruma OIEELISA_{WP}SS ali predrazredčitev 1/16 standardnega seruma OIEELISA_{SP}SS, pripravljena v negativnem serumu (ali v negativnem zbirnem vzorcu serumov) in ponovno razredčena v negativnih serumih glede na število vzorcev, ki sestavljajo zbirni vzorec, mora dati pozitivno reakcijo;
- (b) standardni serum OIEELISA_NSS mora vedno dati negativno reakcijo;
- (c) test mora biti ustrezen za ugotavljanje dokazov o infekciji pri eni sami živali iz skupine živali, katerih vzorci seruma sestavljajo zbirni vzorec.

2.2.2.3. Standardizacija testnega postopka za zbirne vzorce mleka ali sirotke:

- (a) predrazredčitev 1/1000 standardnega seruma OIEISS ali predrazredčitev 1/16 standardnega seruma OIEELISA_{WP}SS ali predrazredčitev 1/125 standardnega seruma OIEELISA_{SP}SS, pripravljena v negativnem serumu (ali v negativnem zbirnem vzorcu serumov) in ponovno razredčena 1/10 v negativnem mleku, mora dati pozitivno reakcijo;
- (b) standardni serum OIEELISA_NSS, razredčen 1/10 v negativnem mleku, mora vedno dati negativno reakcijo;
- (c) test mora biti ustrezen za ugotavljanje dokazov o infekciji pri eni sami živali iz skupine živali, katerih vzorci mleka ali sirotke sestavljajo zbirni vzorec.

2.2.3. Pogoji za uporabo testov ELISA za diagnosticiranje goveje bruceloze:

- 2.2.3.1. Ob zgoraj omenjenih pogojih za umerjanje testov ELISA na vzorcih seruma mora biti diagnostična občutljivost testa ELISA enaka ali večja kot pri testih RBT ali CFT, ob upoštevanju epidemioloških razmer, pri katerih se uporablja.

¹ Za namene te priloge so razredčitve, predpisane za pripravo tekočinskih reagentov, izražene na primer v obliki 1/150, kar pomeni razredčitev 1:150.

2.2.3.2. Ob zgoraj omenjenih pogojih za umerjanje testa ELISA na zbirnih vzorcih mleka mora biti diagnostična občutljivost testa ELISA enaka ali večja kot pri testu MRT, ob upoštevanju ne le epidemioloških razmer, temveč tudi povprečnih in pričakovanih odstopajočih sistemov reje.

2.2.3.3. Če se testi ELISA uporabljajo za namene certificiranja v skladu s členom 6(1) ali za vzpostavitev in ohranjanje statusa črede v skladu s Prilogo A(II)(10), je treba zbirne vzorce seruma pripravljati tako, da je mogoče rezultate testov nedvoumno povezati s posamezno živaljo, vključeno v zbirni vzorec. Vsak potrditveni test je treba izvajati na vzorcih seruma, odvzetega od posameznih živali.

2.2.3.4. Testi ELISA se lahko uporabljajo na vzorcu mleka, odvzetega iz mleka, zbranega na gospodarstvu, na katerem je vsaj 30 % krav mlekaric v obdobju mlečnosti. Če se uporabi ta metoda, je treba zagotoviti nedvoumno sledljivost vzorcev, odvzetih za preiskave, do posameznih živali, od katerih je pridobljeno mleko. Vsak potrditveni test je treba izvajati na vzorcih seruma, odvzetega od posameznih živali.

2.3. Test vezanja komplementa (CFT)

2.3.1. Antigen predstavlja bakterijsko suspenzijo v solni raztopini fenola (NaCl z 0,85 % (m/v) in fenol z 0,5 % (v/v)) ali v pufru veronala. Antigeni se lahko dobavljajo v koncentrirani obliki, pod pogojem, da je faktor razredčitve, ki ga je treba uporabiti, naveden na nalepki steklenice. Antigen je treba shranjevati pri 4 °C in se ne sme zamrzniti.

2.3.2. Serumi se inaktivirajo kot sledi:

- goveji serum: 56 do 60 °C v času 30 do 50 minut,
- prašičji serum: 60 °C v času 30 do 50 minut.

2.3.3. Da se v testnem postopku izvede pristna reakcija, je treba uporabiti odmerek komplementa, ki je višji od najmanjšega potrebnega za popolno hemolizo.

2.3.4. Pri izvajanju testa vezanja komplementa je treba vsakokrat opraviti naslednje kontrole:

- (a) kontrola proti-komplementarnega učinka seruma;
- (b) kontrola antigena;
- (c) kontrola senzibiliziranih rdečih krvničk;
- (d) kontrola komplementa;
- (e) kontrola z uporabo pozitivnega seruma z občutljivostjo z začetka reakcije;
- (f) kontrola specifičnosti reakcije ob uporabi negativnega seruma.

2.3.5. *Izračun rezultatov*

Standardni serum OIEISS vsebuje 1000 mednarodnih enot CFT (ICFTU) na ml. Če se standardni serum OIEISS preskuša v dani metodi, je rezultat podan kot titer (T_{OIEISS}). Rezultat testa za testni serum, podan kot titer ($T_{\text{TESTSERUM}}$), mora biti izražen v enotah ICFT na ml. Za pretvorbo izraza titra v enote ICFT se faktor (F), potreben za pretvorbo titra neznanega testnega seruma ($T_{\text{TESTSERUM}}$), preskušane po zadevni metodi, v izraz ICFTU, izračuna po naslednji formuli:

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

in vsebnost mednarodnih enot CFT na ml testnega seruma ($\text{ICF}_{\text{TUTESTSERUM}}$) po formuli:

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

2.3.6. *Interpretacija rezultatov*

Serum, ki vsebuje 20 ali več enot ICFT na ml, se šteje za pozitivnega.

2.4. Mlečno prstanasti test (MRT)

- 2.4.1. Antigen predstavlja bakterijsko suspenzijo v solni raztopini fenola (NaCl z 0,85 % (m/v) in fenol z 0,5 % (v/v)), obarvani s hematoksilinom. Antigen je treba shranjevati pri 4 °C in se ne sme zamrzniti.
- 2.4.2. Občutljivost antigena je treba standardizirati glede na standardni serum OIEISS tako, da antigen da pozitivno reakcijo pri razredčitvi 1/500 standardnega seruma OIEISS v negativnem mleku, medtem ko mora pri razredčitvi 1/1000 reagirati negativno.
- 2.4.3. Mlečni prstanasti test se opravi na vzorcih, ki predstavljajo vsebino vsakega zbiralnika za mleko ali vsebino vsake zbirne cisterne s posameznega gospodarstva.
- 2.4.4. Pred testom vzorci mleka ne smejo biti zamrznjeni, segrevani ali se močno stresati.
- 2.4.5. Reakcija se izvede po eni od naslednjih metod:
 - na stolpcu mleka, visokem vsaj 25 mm, in pri količini mleka 1 ml, kateri je bilo dodanih 0,03 ml ali 0,05 ml enega od standardiziranih obarvanih antigenov,
 - na stolpcu mleka, visokem vsaj 25 mm, in v količini mleka 2 ml, kateri je bilo dodanih 0,05 ml enega od standardiziranih obarvanih antigenov,
 - v količini mleka 8 ml, kateri je bilo dodanih 0,08 ml enega od standardiziranih obarvanih antigenov.
- 2.4.6. Mešanica mleka in antigenov se inkubira pri 37 °C v času 60 minut, skupaj s pozitivnimi in negativnimi delovnimi standardi. Nadaljnje inkubiranje od 16 do 24 ur pri 4 °C poveča občutljivost testa.
- 2.4.7. Interpretacija rezultatov:
 - (a) negativna reakcija: obarvano mleko, neobarvana smetana;
 - (b) pozitivna reakcija:
 - enako obarvana mleko in smetana, ali
 - neobarvano mleko in obarvana smetana.

2.5. Rose Bengal aglutinacijski test (RBT)

- 2.5.1. Antigen predstavlja bakterijsko suspenzijo raztopine antigena *Brucellae* v pufru pri pH $3,65 \pm 0,05$, obarvano z barvilom Rose Bengal. Antigen se dobavi pripravljen za uporabo, shranjevati ga je treba pri 4 °C in se ne sme zamrzniti.
- 2.5.2. Antigen se pripravi brez referenc glede koncentracije celic, njegova občutljivost pa mora biti standardizirana glede na standardni serum OIEISS tako, da antigen da pozitivno reakcijo pri razredčitvi seruma 1/45 in negativno reakcijo pri razredčitvi 1/55.
- 2.5.3. RB aglutinacijski test se izvede na naslednji način:
 - (a) serum (20-30 μ l) zmešamo z enako količino antigena na beli ali emajlirani plošči, da dobimo površino s približnim premerom 2 cm. Mešanico nežno stresamo 4 minute pri prostorski temperaturi, in pri dobri osvetlitvi opazujemo, ali pride do aglutinacije;
 - (b) uporabimo lahko tudi mehanično metodo, ki pa mora biti vsaj enako občutljiva in natančna kot manualna.
- 2.5.4. *Interpretacija rezultatov*

Vsaka opazna reakcija se šteje za pozitivno, razen če ni prevelike izsušitve ob robovih.

V vsako zaporedje testov je treba vključiti pozitivne in negativne delovne standarde.

2.6. Test serumske aglutinacije (SAT)

- 2.6.1. Antigen predstavlja bakterijsko suspenzijo v solni raztopini fenola (NaCl z 0,85 % (m/v) in fenol z 0,5 % (v/v)). Formaldehida ni dovoljeno uporabiti.

Antigeni se lahko dobavijo v koncentrirani obliki, pod pogojem, da je faktor razredčitve, ki ga je treba uporabiti, naveden na nalepki steklenice.

V suspenzijo antigena h končni testni razredčitvi 5 mM lahko dodamo EDTA za zmanjšanje obsega lažno pozitivnih rezultatov pri testu serumske aglutinacije. V suspenziji antigena je treba nato ponovno naravnati pH na vrednost 7,2.

- 2.6.2. Standardni serum OIEISS vsebuje 1000 mednarodnih enot aglutinacije.

- 2.6.3. Antigen se pripravi brez referenc glede koncentracije celic, njegova občutljivost pa mora biti standardizirana glede na standardni serum OIEISS tako, da antigen povzroči bodisi 50-odstotno aglutinacijo pri končnem razredčenju seruma od 1/600 do 1/1000 bodisi 75-odstotno aglutinacijo pri končnem razredčenju seruma od 1/500 do 1/750.

Priporočljivo je tudi primerjati reaktivnost novih in predhodno standardiziranih serij antigena ob uporabi seznama opredeljenih serumov.

- 2.6.4. Test se izvaja v epruветah ali na mikroploščah. Mešanica antigena in razredčitev seruma se inkubira od 16 do 24 ur pri 37 °C.

Pripraviti je treba vsaj tri razredčitve vsakega seruma. Razredčitve sumljivih serumov je treba pripraviti tako, da se reakcija na meji pozitivnosti odčita na srednji epruветi (ali jamici v primeru metode z mikroploščo).

- 2.6.5. *Interpretacija rezultatov:*

Stopnja aglutinacije *Brucellae* v serumu mora biti izražena v IU na ml.

Serum, ki vsebuje 30 ali več IU na ml, se šteje za pozitivnega.

3. DOPOLNILNI TESTI

3.1. Kožni test za dokazovanje bruceloze (BST)

- 3.1.1. Pogoji za uporabo BST

- Kožni test za dokazovanje bruceloze se ne sme uporabiti za namene certificiranja za trgovino med državami članicami Evropske skupnosti.
- Kožni test za dokazovanje bruceloze je eden od najbolj specifičnih testov za ugotavljanje bruceloze pri necepljenih živalih, vendar diagnoze ne smemo postaviti zgolj na podlagi pozitivnih intradermalnih reakcij.
- Govedo, ki negativno reagira na enega od seroloških testov, opredeljenih v tej prilogi, in pozitivno reagira na BST, se šteje za inficirano.
- Govedo, ki pozitivno reagira na enega od seroloških testov, opredeljenih v tej prilogi, se lahko preskusi s testom BST v podporo interpretacije rezultatov seroloških testov, zlasti če v čredah, prostih bruceloze, ali čredah, uradno prostih bruceloze, ni mogoče izključiti navzkrižne reakcije s protitelesi proti drugim bakterijam.

- 3.1.2. Test se mora izvajati ob uporabi standardiziranega in opredeljenega pripravka alergena bruceloze, ki ne vsebuje gladkega antigena lipopolisaharidov (LPS), ker to lahko izzove nespecifične inflamatorne reakcije ali ovira nadaljnje serološke teste.

Primer takega pripravka je Brucellin INRA, pripravljen iz negladkega seva *B. melitensis*. Zahteve za njegovo pripravo so podrobno opredeljene v Oddelku B2 Poglavlja 2.4.2. Priročnika standardov za diagnostične teste in cepiva – OIE, Četrta izdaja, 2000.

3.1.3. Testni postopek

3.1.3.1. Količina 0,1 ml alergena bruceloze se vbrizga intradermalno v kavdalno gubo, kožo na boku ali ob strani vratu.

3.1.3.2. Test se odčita po 48-72 urah.

3.1.3.3. Debelino kože na mestu vbrizganja izmerimo s pomičnim merilom pred vbrizganjem in pri ponovnem pregledu.

3.1.3.4. Interpretacija rezultatov:

Močne reakcije so lahko prepoznavne zaradi lokalne otekline in otrdelosti.

Odebelitev kože za 1,5 do 2 mm se šteje za pozitivno reakcijo na BST.

3.2. Kompetitivna encimskoimunska metoda (cELISA)

3.2.1. Pogoji z uporabo kompetitivnega testa ELISA

(a) Test cELISA se ne sme uporabiti za namene certificiranja za trgovino med državami članicami Evropske skupnosti.

(b) Test cELISA je pokazal, da ima večjo specifičnost, kot na primer indirektni test ELISA, in se zato lahko uporablja v podporo interpretacije rezultatov seroloških testov.

3.2.2. Testni postopek

Test se izvaja v skladu z določili Priročnika standardov za diagnostične teste in cepiva – OIE, Četrta izdaja, 2000, Poglavje 2.3.1(2)(a).

4. NACIONALNI REFERENČNI LABORATORIJI

4.1. Naloge in odgovornosti

Nacionalni referenčni laboratorij je odgovoren za:

- (a) odobritev rezultatov validacijskih študij za dokazovanje zanesljivosti testne metode, uporabljene v državi članici;
- (b) določanje najvišjega števila vzorcev, ki jih je treba zbrati za zbirne vzorce pri uporabljenih garniturah testov ELISA;
- (c) umerjanje standardnih sekundarnih referenčnih nacionalnih standardnih serumov (»delovnih standardov«) glede na primarni mednarodni standardni serum iz odstavka 2.1;
- (d) preverjanje kakovosti vseh antigenov in serij garnitur za teste ELISA, uporabljenih v državi članici;
- (e) sodelovanje z Mrežo nacionalnih referenčnih laboratorijev za brucelozo Evropske unije.

4.2. Seznam nacionalnih referenčnih laboratorijev držav članic EU

Seznam nacionalnih referenčnih laboratorijev držav članic je naveden v Prilogi C Direktive 64/432/EGS.

IV. ENZOOTSKA GOVEJA LEVKOZA (v nadaljnjem besedilu: EGL)

1. Za namene tega dela imajo uporabljeni izrazi naslednji pomen:
 - 1.1. živali so vse goveje živali;
 - 1.2. test pomeni vse preiskave, ki so določene in opravljene v skladu s IV.a delom te priloge.
2. **Goveja čreda je uradno prosta EGL, če:**
 - 2.1. nobena žival v čredi ne kaže kliničnih znakov EGL in v zadnjih dveh letih ni bilo (klinično in laboratorijsko) potrjenega primera EGL in
 - 2.2. so v zadnjem letu vse živali, starejše od 24 mesecev, negativno reagirale na dva testa, izvedena v presledku najmanj štiri mesece v skladu s IV.a delom te priloge, ali
 - 2.3. izpolnjuje pogoje točke 2.1. in se nahaja v državi ali delu države, ki je uradno prost EGL.
3. **Čreda obdrži status črede, uradno proste EGL, če so izpolnjeni naslednji pogoji:**
 - 3.1. še naprej izpolnjuje pogoje iz točke 2.1.;
 - 3.2. vse nove živali prihajajo iz čred, uradno prostih EGL;
 - 3.3. vse živali, starejše od 24 mesecev, negativno reagirajo na teste, izvedene v presledkih treh let, v skladu s IV.a delom te priloge;
 - 3.4. da so bile plemenske živali, ki se priključijo čredi in prihajajo iz tretjih držav, uvožene na predpisan način.
4. **Uradno se EGL prost status začasno razveljavi, v naslednjih primerih:**
 - 4.1. pogoji iz prejšnje točke niso več izpolnjeni, ali
 - 4.2. če se na podlagi laboratorijskih testov ali kliničnih znamenj pri eni ali več živalih sumi, da gre za EGL in se take živali takoj napoti v zakol.
5. **Status ostane začasno razveljavljen, dokler niso izpolnjene naslednje zahteve:**
 - 5.1. Če je **ena sama žival v čredi**, uradno prosti EGL, pozitivno reagirala na enega od testov ali če se pri eni živali kako drugače posumi na bolezen:
 - a) se mora žival, ki je pozitivno reagirala, poslati v zakol pod uradnim nadzorom; v primeru da gre za kravo, se izloči tudi vsako tele, ki ga je morda imela;
 - b) se vse živali, starejše od 12 mesecev, dvakrat serološko testira (dva serološka testa v razmiku najmanj 4 mesece in največ 12 mesecev); prvi test se opravi najmanj tri mesece po izločitvi zadnje okužene oziroma sumljive živali in njenih možnih potomcev; rezultati testov morajo biti negativni;
 - c) se opravi epidemiološka preiskava in se vse črede, ki so epidemiološko povezane z okuženo oziroma sumljivo, testira kot je opisano v točki 5.1.b); rezultati preiskav morajo biti negativni.

Če je bilo tele okužene živali, ločeno od matere takoj po rojstvu, ga ni potrebno izločiti, ampak mora izpolnjevati zahteve iz točke 5.1.c).
 - 5.2. Če je več **kot ena žival iz črede**, uradno proste EGL, pozitivno reagirala na enega od testov, ali če se kako drugače posumi na bolezen:
 - a) je treba vse živali, ki so pozitivno reagirale, poslati v zakol pod uradnim nadzorom; v primeru da gre za krave, se izločijo tudi njihova teleta;

- b) se vse živali, starejše od 12 mesecev, serološko testira (dva serološka testa v razmiku najmanj 4 mesece in največ 12 mesecev); rezultati testov morajo biti negativni;
- c) je potrebno vse preostale živali v čredi vidno označiti; te živali se lahko napotijo neposredno v zakol pod uradnim nadzorom ali pa morajo na gospodarstvu ostati do starosti 24 mesecev; ko dosežejo to starost, jih je treba ustrezno testirati v skladu s poglavjem IV.a;
- d) se opravi epidemiološka preiskava in se vse črede, ki so epidemiološko povezane z okuženo oziroma sumljivo, testira v skladu z točko 5.2.b); rezultati preiskav morajo biti negativni.

Če je bilo tele okužene živali, ločeno od matere takoj po rojstvu, ga ni potrebno izločiti, ampak mora izpolnjevati zahteve iz točke 5.2.c).

6. Država ali del države se lahko proglasi za uradno prosto EGL v naslednjih primerih:

- 6.1. če so izpolnjeni vsi pogoji iz 2. točke in je vsaj 99,8% govejih čred uradno prostih EGL; ALI
- 6.2. če v zadnjih treh letih v državi ali delu države ni bil potrjen noben primer EGL in se vsak sum na EGL (vse tumorozne spremembe, ugotovitev vzroka) obvezno prijavi in - če gre za državo, da so bile v zadnjih 24 mesecih vse živali, starejše od 24 mesecev, v vsaj 10 % poljubno izbranih čred testirane z negativnimi izvidi oziroma če gre za del države, da so bile v zadnjih 24 mesecih vse živali, starejše od 24 mesecev, preiskane; ALI
- 6.3. če je katerakoli druga metoda z 99 % zanesljivostjo pokazala, da je okuženih manj kot 0,2 % čred.

7. Država ali del države obdrži status, uradno prost EGL če so izpolnjeni naslednji pogoji:

- 7.1. če so vse živali ob zakolu pregledane in se vse sumljive spremembe (tumorozne) pošljejo v laboratorijsko preiskavo;
- 7.2. če o vseh ugotovljenih primerih EGL VURS poroča Evropski komisiji;
- 7.3. če so vse živali, ki pozitivno reagirajo na kateregakoli od testov, zaklane in za njihove črede veljajo omejitve do ponovne vzpostavitve njihovega statusa v skladu s točko 5 tega dela priloge; IN
- 7.4. če so bile vse živali, starejše od 24 mesecev testirane in sicer enkrat v prvih petih letih po pridobitvi statusa ali v času prvih petih let po kateremkoli drugem postopku, ki z 99 % zanesljivostjo pokaže, daje bilo okuženih manj kot 0,2 % čred.

V primeru, da v državi ali delu države že vsaj tri leta ni bilo primera EGL v razmerju ena od 10.000 čred, se lahko zniža število rednih seroloških preiskav pod pogojem, da so bila vsa goveda, starejša od 12 mesecev, v vsaj 1 % čred, poljubno izbranih vsako leto, testirana.

8. Uradno enzooske goveje levkoze prost status države ali dela države se razveljavi, če se na podlagi preiskave iz prejšnje točke ugotovi sprememba situacije glede EGL v državi ali delu države, ki je bila priznana kot uradno prosta EGL.

Status razveljavi Evropska komisija z odločbo, s katero določi tudi pogoje za njeno ponovno pridobitev.

IV.a PREISKAVE ZA ENZOOTSKO GOVEJO LEVKOZO (EGL)

Testi za enzootsko govejo levkozo se izvajajo z imunodifuzijskim testom pod pogoji, opisanimi v A in B, ali z encimskoimunsko metodo (testom ELISA) pod pogoji, opisanimi v C. Imunodifuzijska metoda se lahko uporablja le za posamezne teste. Če se rezultati testa izpodbijajo iz utemeljenih razlogov, se izvede dodatna kontrola z imunodifuzijskim testom.

A. Imunodifuzijski test v agar gelu za ugotavljanje EGL

1. Antigen, ki se uporabi v testu, mora vsebovati glikoproteine virusa goveje levkoze. Antigen se standardizira glede na standardni serum (EI serum), ki ga dobavlja State Veterinary Serum Laboratory iz Kopenhagna.
2. Uradne institucije držav članic, navedene v Prilogi D Direktive sveta 64/432 so odgovorne za umerjanje standardnega delovnega antigena v laboratoriju glede na uradni standardni serum EGS (EI serum), ki ga dobavlja State Veterinary Serum Laboratory iz Kopenhagna.
3. Standardne antigene, uporabljene v laboratoriju, je treba vsaj enkrat na leto predložiti v referenčne laboratorije EGS, navedene v točki 2, za preskušanje glede na uradni standardni serum EGS. Poleg te standardizacije se uporabljeni antigen lahko umerja v skladu z B.
4. Reagenti za teste morajo vsebovati:
 - a) antigen: antigen mora vsebovati specifične glikoproteine za virus EGL, ki je standardiziran glede na uradni serum EGS;
 - b) testni serum;
 - c) znan pozitivni kontrolni serum;
 - d) agar gel:
 - 0,8 % agar,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M Tris-pufer pH 7,2;
 - 15 ml tega agarja damo v petrijevko s premerom 85 mm, da dobimo višino agarja 2,6 mm.
5. Testni vzorec sedmih suhih jamic zarezemo v agar do dna plošče; vzorec mora biti sestavljen iz osrednje jamice in šestih jamic v krogu okoli nje.
 - Premer osrednje jamice: 4 mm
 - Premer obrobni jamic: 6 mm
 - Razdalja med osrednjo in obrobni jamicami: 3 mm
6. Osrednja jamica mora biti napolnjena s standardnim antigenom. Obrobni jamici 1 in 4 (glej shemo v nadaljevanju) sta napolnjeni z znanim pozitivnim serumom, jamice 2, 3, 5 in 6 pa s testnimi serumi. Jamice morajo biti napolnjene, dokler ne izgine meniskus.
7. Pri tem dobimo naslednje količine:
 - antigen: 32 ml
 - kontrolni serum: 73 ml
 - testni serum: 73 ml.
8. Inkubacija mora trajati 72 ur pri prostorski temperaturi (20 do 27°C) v zaprti vlažni komori.

9. Rezultate testa lahko odčitamo po 24 in 48 urah, vendar končnega rezultata ne moremo dobiti prej kot po 72 urah:
- testni serum je pozitiven, če oblikuje specifično precipitinsko linijo z antigenom virusa GL in če oblikuje popolno linijo ujemanja s kontrolnim serumom;
 - testni serum je negativen, če ne oblikuje specifične precipitinske linije z antigenom virusa GL in če ne ukrivi linije kontrolnega seruma;
 - reakcije ne moremo šteti za zanesljivo, če:
 - upogne linijo kontrolnega seruma proti jamici z antigenom virusa GL, in ne oblikuje opazne precipitinske linije z antigenom;
 - ali
 - če je ni mogoče odčitati niti kot negativno niti kot pozitivno.
- Pri nezanesljivih reakcijah se test lahko ponovi, in uporabi se koncentrirani serum.
10. Uporabi se lahko tudi drugačna razporeditev ali vzorec jamic, pod pogojem, da se serum E4 v razredčitvi 1:10 v negativnem serumu lahko ugotovi kot pozitiven.

B. Metoda za standardizacijo antigena

Potrebne raztopine in snovi

- 40 ml 1,6-odstotne agaroze v 0,05 M pufru Tris/HCl, pH 7,2 z 8,5-odstotnim NaCl;
- 15 ml seruma goveje levkoze, s protitelesi le proti glikoproteinom virusa GL, v razredčitvi 1:10 v 0,05 M pufru Tris/HCl, pH 7,2 z 8,5-odstotnim NaCl;
- 15 ml seruma goveje levkoze, s protitelesi le proti glikoproteinom virusa GL, v razredčitvi 1:5 v 0,05 M pufru Tris/HCl, pH 7,2 z 8,5-odstotnim NaCl;
- štiri plastične petrijevke s premerom 85 mm;
- luknjač s premerom 4 do 6 mm;
- referenčni antigen;
- antigen za standardizacijo;
- vodna kopel (56 °C).

Postopek

Raztopite agarozo (1,6 %) v pufru Tris/HCl ob previdnem segrevanju do 100°C. Postavite v vodno kopel z vodnimi stolpci za približno eno uro. Tudi razredčitve seruma goveje levkoze postavite v vodno kopel z vodnimi stolpci.

Zmešajte 15 ml raztopine agaroze pri 56 °C s 15 ml seruma goveje levkoze (1:10), hitro stresajte in izlijte po 15 ml v vsako petrijevko. Postopek ponovite s serumom goveje levkoze v razredčitvi 1:5,

Ko se agarozna strdi, naredite luknjice v njej, kakor sledi:

Dodajanje antigena

- Petrijevki 1 in 3:
 - jamica A - nerazredčen referenčni antigen,
 - jamica B - 1:2 razredčen referenčni antigen,
 - jamici C in E - referenčni antigen,
 - jamica D - nerazredčen testni antigen.

b) Petrijevki 2 in 4:

- jamica A - nerazredčen testni antigen,
- jamica B - 1:2 razredčen testni antigen,
- jamica C - 1:4 razredčen testni antigen,
- jamica D - 1:8 razredčen testni antigen.

Dodatna navodila

1. Poskus se izvede z dvema razredčitvama seruma (1:5 in 1:10), da dosežemo optimalno precipitacijo.
2. Če je premer precipitacije premajhen pri obeh razredčitvah, je treba serum še bolj razredčiti.
3. Če je premer precipitacije prevelik in slaboten pri obeh razredčitvah, je treba izbrati nižji serum.
4. Končna koncentracija agaroze mora biti 0,8-odstotna; pri 5- oziroma 10-odstotnih serumih.
5. Izrišite izmerjene premere v naslednji koordinatni sistem. Razredčitev antigena, namenjenega preskušanju, z istim premerom kot ga ima referenčni antigen, je delovna razredčitev.

C. Encimskoimunna metoda (test ELISA) za ugotavljanje enzooske goveje levkoze

1. Uporabijo se naslednje snovi in reagenti:
 - a. mikroplošče za trdno fazo, kivete ali druga trdna faza;
 - b. antigen se veže na trdno fazo z ali brez pomoči poliklonskih ali monoklonskih vezivnih protiteles. Če se antigen nanese neposredno na trdno fazo, je treba vse testne vzorce, ki dajo pozitivno reakcijo, ponovno testirati nasproti kontrolnemu antigenu v primeru EGL. Kontrolni antigen mora biti identičen antigenu, razen antigenov proti virusu GL. Če se na trdno fazo nanesejo vezivna protitelesa, protitelesa ne smejo reagirati z drugimi antigeni, razen z antigeni proti virusu GL;
 - c. biološka tekočina, namenjena preskušanju;
 - d. ustrezna pozitivna in negativna kontrola;
 - e. konjugat;
 - f. substrat, primeren za uporabljeni encim;
 - g. blokirna raztopina, če je potrebno;
 - h. raztopine za razredčenje testnih vzorcev za pripravke reagentov in za spiranje;
 - i. sistem odčitavanja, ustrezen uporabljenemu substratu.

2. Standardizacija in test občutljivosti

Občutljivost testa ELISA mora biti tak, da serum E4 pokaže pozitiven rezultat, če je razredčen 10-krat (vzorci seruma) ali 250-krat (vzorci mleka) bolj kot raztopina, pridobljena od posameznih vzorcev, če so ti vključeni v zbirne vzorce. Testi, pri katerih se vzorci (seruma in mleka) preskušajo posamezno, mora serum E4, razredčen 1:10 (v negativnem serumu) ali 1:250 (v negativnem mleku) pokazati pozitiven rezultat, če se preskuša v isti testni razredčitvi kot se uporablja za posamezne testne vzorce. Uradne institucije, navedene v A.2, so pristojne za preverjanje kakovosti metode ELISA, zlasti za določanje, za vsako proizvodno serijo, števila vzorcev, ki naj sestavljajo zbirni vzorec, na podlagi števila, ugotovljenega za serum E4.

Serum E4 dobavlja National Veterinary Laboratory, Kopenhagen.

3. *Pogoji za uporabo testa ELISA za EGL*

Metoda ELISA se lahko uporablja na vzorcu mleka ali sirotke, odvzete iz mleka, zbranega z gospodarstva, ki ima vsaj 30 % krav mlekaric v obdobju mlečnosti.

Če se uporabi ta metoda, je treba zagotoviti sledljivost vzorcev do živali, od katerih izvirajo mleko ali serumi za preiskave.