

## KOMISJONI OTSUS,

15. detsember 2009,

## millega muudetakse nõukogu direktiivi 64/432/EMÜ D lisa veiste ensootilise leukoosi diagnoosimise meetodite osas

(teatavaks tehtud numbri K(2009) 9951 all)

(EMPs kohaldatav tekst)

(2009/976/EL)

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse nõukogu 26. juuni 1964. aasta direktiivi 64/432/EMÜ ühendusesisest veiste ja sigadega kauplemist mõjutavate loomatervishoiu probleemide kohta, <sup>(1)</sup> eriti selle artikli 16 teist lõiku,

ning arvestades järgmist:

- (1) Direktiivi 64/432/EMÜ kohaldatakse liidusisesel kauplemisel veistega ning selle D lisa II peatükis on sätestatud diagnoosimeetodid, mida tuleb kasutada veiste ensootilise leukoosi tõrjeks ja likvideerimiseks, järelevalveks ja seireks ning veiste ensootilisest leukoosist vaba karja ametliku staatuse määramisel ja säilitamisel ning liidusisesel veistega kauplemisel puhul nõutaval sertifitseerimisel.
- (2) Direktiivi 64/432/EMÜ D lisa II peatükiga on ette nähtud, et veiste ensootilise leukoosi analüüse tuleb teha kas agarosgeeli immuundifusiooni (AGID) meetodil Euroopa Liidu standardseerumi (EI seerumi) suhtes kalibreeritud antigeeni abil või ensüüm-immuunsorbtsiooni (ELISA) meetodil standardiseeritud seerumi E4 suhtes kalibreeritud antigeeni abil. Mõlema standardseerumi tarnija on Taani Tehnikaülikooli veterinaaria instituut.
- (3) Maailma Loomatervishoiu Organisatsiooni veiste ensootilise leukoosi referentlabor Saksamaal (Friedrich-Loeffler-Institut) on koostöös Maailma Loomatervishoiu Organisatsiooni veiste ensootilise leukoosi referentlaboritega Ühendkuningriigis (Veterinary Laboratories Agency) ja Poolas (riiklik veterinaaria uurimise instituut) hiljaaegu välja töötanud (pärast laboritevahelist tulemuste võrdlust) uue standardseerumi (seerum E05) veiste ensootilise leukoosi määramiseks. Seerum E05 on valideeritud seerumite EI ja E4 suhtes mitmes uuringus AGIDi ja ELISA meetodil ning seejärel kantud kui Maailma Loomatervishoiu Organisatsiooni akrediteeritud standardseerum Rahvusvahelise Loomatervishoiu Organisatsiooni mais-

maaloomade diagnoosimistestide ja vaktsiinide käsiraamatu „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” kuuenda väljaande (2008) peatüki 2.4.11 jakku B(2). Kõnealune seerum on saadaval Maailma Loomatervishoiu Organisatsiooni veiste ensootilise leukoosi referentlaboris Saksamaal.

- (4) Taani Tehnikaülikooli veterinaaria instituut on teatanud komisjonile, et ta ei suuda enam täita oma kohustust tarnida direktiivi 64/432/EMÜ D lisa II peatükis osutatud standardseerumeid.
- (5) Saksamaa pädevad asutused ja Friedrich-Loeffler-Institut on nõustunud tarnima seerumit E05, millest saab Euroopa Liidu uus ametlik veiste ensootilise leukoosi standardseerum.
- (6) Seega tuleks direktiivi 64/432/EMÜ vastavalt muuta.
- (7) Käesoleva otsusega ette nähtud meetmed on kooskõlas toiduahela ja loomatervishoiu alalise komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA OTSUSE:

## Artikkel 1

Direktiivi 64/432/EMÜ D lisa II peatükk asendatakse käesoleva otsuse lisaga.

## Artikkel 2

Käesolev otsus on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 15. detsember 2009

Komisjoni nimel  
komisjoni liige  
Androulla VASSILIOU

<sup>(1)</sup> EÜT 121, 29.7.1964, lk 1977/64.

## LISA

Direktiivi 64/432/EMÜ D lisa II peatükk asendatakse järgmisega:

## „II PEATÜKK

**VEISTE ENSOOTILISE LEUKOOSI ANALÜÜSID**

Veiste ensootilise leukoosi analüüse tehakse agarosgeeli immuundifusiooni meetodil (AGID) punktides A ja B kirjeldatud tingimustel või ensüüm-immuunsorbtsiooni meetodil (ELISA) punktis C kirjeldatud tingimustel. Agarosgeeli immuundifusiooni meetodit võib kasutada ainult individuaalsetest proovidest analüüside tegemiseks. Kui analüüsi tulemused on põhjendatult kahtlased, viiakse läbi lisauuring agarosgeeli immuundifusiooni meetodil.

AGIDI ja ELISA test standarditakse seerumi E05, Euroopa Liidu standardseerumi suhtes, mida tarnib

Friedrich-Loeffler-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
OIE-Referenzlabor für Enzoootische Bovine Leukosis (EBL)  
Südufer 10  
17493 Greifswald – Insel Riems  
Saksamaa

**A. Agarosgeeli immuundifusiooni meetod veiste ensootilise leukoosi määramiseks**

1. Analüüsis kasutatav antigeen peab sisaldama veiste leukosiviiruse glükoproteiini. Antigeen kalibreeritakse seerumi E05 suhtes.
2. Laboratoorse standardantigeeni kalibreerimise eest seerumi E05 suhtes vastutavad riiklikud asutused, riigi referentlaborid ja asutused, mis on nimetatud artikli 6a kohaselt veiste ensootilise leukoosi diagnoosimise standardite ja meetodite koordineerijaks.
3. Laboratooriumis kasutatavad standardantigeenid tuleb anda vähemalt kord aastas kontrollimiseks seerumi E05 suhtes riiklikele asutustele, riigi referentlaboritele või asutustele, mis on määratud vastavalt artiklile 6a. Lisaks nimetatud standardimisele võib kasutatavat antigeeni kalibreerida vastavalt punktis B kirjeldatud meetodile.
4. Meetodis kasutatakse järgmisi reaktiive:
  - a) antigeen: antigeen peab sisaldama seerumi E05 suhtes standarditud spetsiifilist veiste ensootilise leukosiviiruse glükoproteiini;
  - b) uuritav seerum;
  - c) teadaolev positiivne kontrollseerum;
  - d) agarosgeel:
    - 0,8 % agarit;
    - 8,5 % NaCl;
    - 0,05 M Tris-puhver pH 7,2;
    - 15 ml agarit paigutatakse 85 mm läbimõõduga Petri tassi, nii et saadakse agarikiht paksusega 2,6 mm.
5. Agarikihti lõigatakse kuni põhjani seitsmest niiskust mittesisaldavast august testmuster, mis koosneb ühest keskmisest august ja kuuest august ringis selle ümber.

Keskmise augu läbimõõt: 4 mm.

Äärmiste aukude läbimõõt: 6 mm.

Keskmise ja äärmiste aukude vahe: 3 mm.

6. Keskmise auk täidetakse standardantigeeniga. Äärmised augud 1 ja 4 (nagu kirjeldatud punktis B.3) täidetakse teadaoleva positiivse seerumiga, augud 2, 3, 5 ja 6 täidetakse uuritavate seerumitega. Augud tuleb täita meniski kadumiseni.
7. Selle tulemusel saadakse järgmised kogused:
  - antigeen: 32 µl;
  - kontrollseerum: 73 µl;
  - uuritav seerum: 73 µl.
8. Inkubeeritakse 72 tundi suletud niiskes kambris toatemperatuuril (20–27 °C).
9. Tulemusi võib lugeda 24 ja 48 tunni pärast, kuid lõplikku tulemust ei saa enne 72 tunni möödumist:
  - a) uuritav seerum on positiivne, kui see moodustab veiste leukosiviiruse antigeeniga spetsiifilise pretsipitatsioonijoone, mis on samane kontrollseerumi joonega;
  - b) uuritav seerum on negatiivne, kui see ei moodusta veiste leukosiviiruse antigeeniga spetsiifilist pretsipitatsioonijoont ega kõverda kontrollseerumi joont;
  - c) reaktsiooni tulemust peetakse ebaselgeks, kui
    - i) kontrollseerumi joon on kõverdunud veiste leukosiviiruse antigeeni augu suunas, moodustamata antigeeniga selgesti nähtavat pretsipitatsioonijoont, või
    - ii) kui seda ei saa pidada ei negatiivseks ega positiivseks.

Ebaselge reaktsioonitulemuse korral võib analüüsi korrata ja kasutada kontsentreeritud seerumit.
10. Kasutada võib ka teistsugust aukude paigutust tingimusel, et seerum E05, mida on lahjendatud negatiivse seerumiga vahekorras 1:10, annab positiivse tulemuse.

## B. Antigeeni kalibreerimise meetod

### 1. Nõutavad lahused ja materjalid

- a) 40 ml 1,6 % agarooši 0,05 M Tris/HCl-puhvris, pH 7,2, koos 8,5 % NaCl;
- b) 15 ml veiste leukoosi seerumit, millel on antikehad üksnes veiste leukosiviiruse glükoproteiinide suhtes, lahjendatud 1:10 puhvris 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2, koos 8,5 % NaCl;
- c) 15 ml veiste leukoosi seerumit, milles on antikehad üksnes veiste leukosiviiruse glükoproteiinide suhtes, lahjendatud 1:5 puhvris 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2, koos 8,5 % NaCl;
- d) neli plastikust Petri tassi läbimõõduga 85 mm;
- e) augustaja läbimõõduga 4–6 mm;
- f) võrdlusantigeen;
- g) kalibreeritav antigeen;
- h) veevann (56 °C).

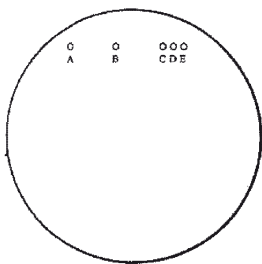
### 2. Menetlus

Agaroom (1,6 %) lahustada puhvris Tris/HCl ettevaatlikul kuumutamisel kuni temperatuurini 100 °C. Hoida 56 °C vee vannis umbes tund aega. Asetada ka lahjendatud veiste leukoosi seerumid 56 °C vee vanni.

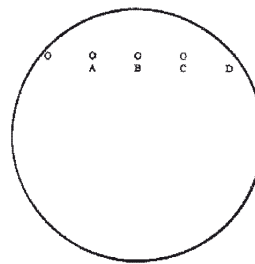
Seejärel segada 15 ml 56 °C agarosilahust 15 ml veiste leukoosi seerumiga (1:10), tugevasti loksutada ning valada mõlemasse Petri tassi 15 ml. Korrata sama veiste leukoosi seerumi lahjendusega 1:5.

Kui agaroo on tardunud, teha sellesse augud järgmiselt:

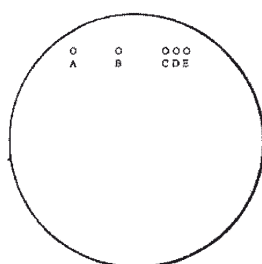
1. Petri tass  
Seerum 1:10



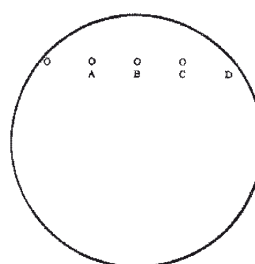
2. Petri tass  
Seerum 1:10



3. Petri tass  
Seerum 1:5



4. Petri tass  
Seerum 1:5



### 3. Antigeeni lisamine

a) 1. ja 3. Petri tass:

- i) auk A – lahjendamata võrdlusantigeen;
- ii) auk B – 1:2 lahjendatud võrdlusantigeen;
- iii) augud C ja E – võrdlusantigeen;
- iv) auk D – lahjendamata uuritav antigeen.

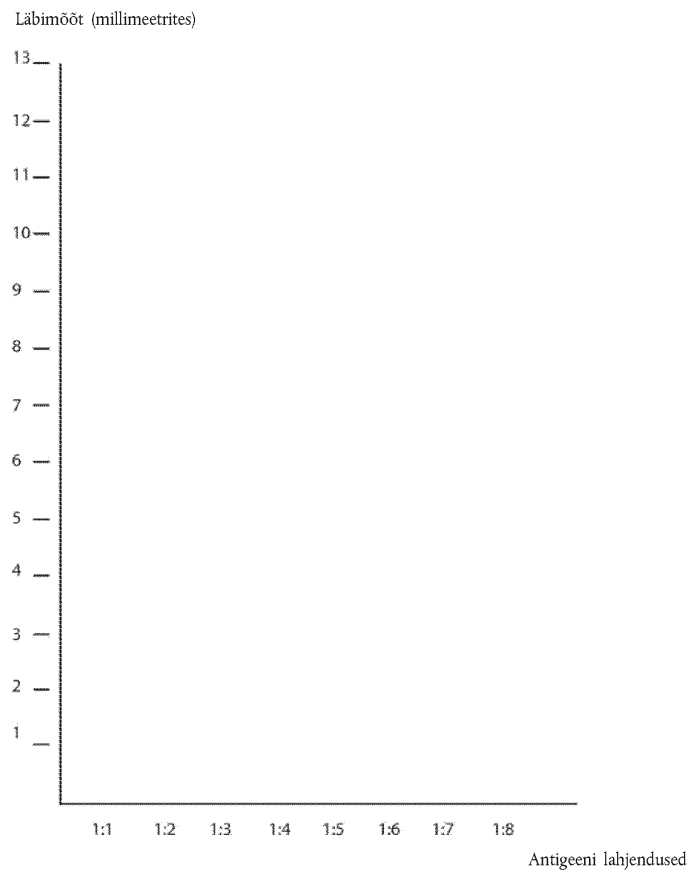
b) 2. ja 4. Petri tass:

- i) auk A – lahjendamata uuritav antigeen;
- ii) auk B – 1:2 lahjendatud uuritav antigeen;
- iii) auk C – 1:4 lahjendatud uuritav antigeen;
- iv) auk D – 1:8 lahjendatud uuritav antigeen.

### 4. Täiendavad juhised

- a) Optimaalse pretsipitatsiooni saavutamiseks tehakse katse kahel seerumi lahjendusel (1:5 ja 1:10).
- b) Kui pretsipitatsioonirõnga läbimõõt on mõlema lahjenduse korral liiga väike, tuleb seerumit edasi lahjendada.
- c) Kui pretsipitatsioonirõngas on mõlema lahjenduse korral liiga suure läbimõõduga ja ebaselge, tuleb valida väiksema lahjendusega seerum.
- d) Agarooosi lõppkontsentratsioon peab olema 0,8 %; seerumitel vastavalt 5 ja 10 %.

- e) Kanda mõõdetud läbimõõdud järgmisesse koordinaadistikku. Töölahjenduseks on uuritava antigeeni lahjendus, millele vastav läbimõõt on sama kui võrdlusantigeenil.



### C. Ensüüm-immuunsorbtsiooni meetod (ELISA test) veiste ensootilise leukoosi määramiseks

1. Kasutatav materjal ja reaktiivid on järgmised:

- tahkefaasi mikroplaadid, küvetid või muud tahkefaasi kandjad;
- antigeen fikseeritakse kandjale polükloonaalsete või monokloonaalsete püüdvate antikehadega või ilma. Kui antigeen kantakse otse tahkele kandjale, tuleb kõiki positiivse tulemuse andnud proove kontrollantigeeni suhtes uuesti analüüsida. Kontrollantigeen peaks olema samane antigeeniga, kuid selles ei tohi leiduda veiste leukoosiviiruse antigeene. Kui tahkefaasi kandja kaetakse püüdvate antikehadega, ei tohi antikehad reageerida muude antigeenidega peale veiste leukoosiviiruse antigeenide;
- uuritav proov;
- vastav positiivne ja negatiivne kontrollproov;
- konjugaat;
- substraat vastavalt kasutatavale ensüümile;
- vajaduse korral peatamislahus;
- lahused uuritavate proovide lahjendamiseks reaktiivide valmistamiseks ja pesemiseks;
- vastav mõõtmisüsteem.

## 2. Analüüsi standardimine ja tundlikkus

ELISA testi tundlikkus peab olema selline, et seerum E05 annaks positiivse reaktsiooni, kui seda lahjendada 10 korda (seerumiproovid) või 250 korda (piimaproovid) rohkem lahjendusest, mis saadakse üksikproovide ühendamisel koondprooviks. Sellistes analüüsides, kus (seerumi- ja piima-) proove uuritakse üksikult, peab 1:10 (negatiivse seerumi korral) või 1:250 (negatiivse piima korral) lahjendatud seerum E05 andma positiivse reaktsiooni, kui seda uurida samas analüüsilahuses, mida kasutatakse üksikproovide jaoks. A jao punktis 2 loetletud asutused vastutavad ELISA testi kvaliteedi kontrollimise eest, eriti aga selle eest, et iga tootepartii jaoks määrataks seerumi E05 puhul saadud tiitri alusel koondproovi ühendatavate proovide arv.

## 3. Veiste ensootilise leukoosi ELISA testi kasutustingimused

- a) ELISA testi võib kasutada nii seerumi kui ka piima proovide analüüsimiseks.
  - b) Kui ELISA testi kasutatakse artikli 6 lõike 2 punkti c kohaselt sertifitseerimiseks või vastavalt D lisa I peatükile karja staatuse määramiseks ja säilitamiseks, tuleb seerumi proovid ühendada koondprooviks nii, et analüüsi tulemusi on võimalik kindlalt seostada konkreetse loomaga, kelle proov on koondproovi lisatud. Tulemuse kinnitamise analüüsid tuleb teha konkreetsetelt loomadelt võetud proovidega.
  - c) ELISA testi võib kasutada piima koondproovide puhul, mis on kogutud karjast, kus vähemalt 30 % lehmadest on lüpsilehmad. Tulemuse kinnitamise analüüs tuleb teha konkreetsetelt loomalt võetud piimast või seerumist.”
-