

KOMISIJAS LĒMUMS

(2009. gada 15. decembris),

ar ko groza Padomes Direktīvas 64/432/EEK D pielikumu attiecībā uz govju enzootiskās leikozes diagnostikas testiem

(izzinots ar dokumenta numuru C(2009) 9951)

(Dokuments attiecas uz EEZ)

(2009/976/ES)

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Padomes 1964. gada 26. jūnija Direktīvu 64/432/EEK par dzīvnieku veselības problēmām, kas ietekmē liellopu un cūku tirdzniecību Kopienā⁽¹⁾, un jo īpaši tās 16. panta otro daļu,

tā kā:

- (1) Direktīvu 64/432/EEK piemēro Eiropas Savienības iekšējai tirdzniecībai ar liellopiem un tās D pielikuma II sadaļā ir minēti govju enzootiskās leikozes (GEL) diagnostikas testi, kas paredzēti šīs slimības kontrolei un izskaušanai, uzraudzībai un monitoringam, kā arī no govju enzootiskās leikozes oficiāli brīva ganāmpulka statusa izveidošanai un saglabāšanai, un Eiropas Savienības iekšējās tirdzniecības sertifikāta izdošanai.
- (2) Direktīvas 64/432/EEK D pielikuma II sadaļā ir noteikts, ka govju enzootiskās leikozes noteikšanai izmanto vai nu agara gēla imūndifūzijas testu (AGID), izmantojot anti-gēnu, kas standartizēts pret oficiālo EK standartserumu (EI serums), vai arī enzīmu imūnsorbcijas testu (ELISA), kas standartizēts pret E4 serumu. Abus standartserumus piegādā Dānijas Tehniskās universitātes veterinārijas institūts (*National Veterinary Institute, Technical University of Denmark*).
- (3) Pasaules Dzīvnieku veselības organizācijas (OIE) references laboratorija govju enzootiskās leikozes jomā Vācijā (*Friedrich-Loeffler-Institute*) sadarbībā ar OIE references laboratoriju Apvienotajā Karalistē (*Veterinary Laboratories Agency*) un Polijā (*National Veterinary Research Institute*) nesen izstrādājusi jaunu GEL standartserumu (E05 serums), iepriekš to testējot pēc kārtas visās trīs minētajās laboratorijās. E05 serums ir validēts attiecībā pret EI serumu un E4 serumu, izmantojot dažādus AGID un ELISA testus, un pēc tam kā akreditēts OIE standartserums iekļauts OIE Sauszemes dzīvnieku slimību diagnos-

tikas testu un vakcīnu rokasgrāmatas sestā izdevuma (2008) 2.4.11. nodaļas B(2) sadaļā. Šo serumu var dabūt no OIE references laboratorijas govju enzootiskās leikozes jomā Vācijā.

- (4) Turklāt Dānijas Tehniskās universitātes veterinārijas institūts ir informējis Komisiju par to, ka tas vairs nespēj pildīt pašlaik Direktīvas 64/432/EEK D pielikuma II sadaļā noteiktās standartserumu piegādes saistības.
- (5) Vācijas kompetentās iestādes ir vienojušās ar *Friedrich-Loeffler-Institute*, ka tas kļūs par E05 seruma piegādātāju, un minētais serums pēc tam kļūs par jauno oficiālo Eiropas Savienības (ES) standartserumu govju enzootiskās leikozes noteikšanai.
- (6) Tāpēc attiecīgi jāgroza Direktīva 64/432/EEK.
- (7) Šajā lēmumā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Pārtikas aprites un dzīvnieku veselības pastāvīgās komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO LĒMUMU.

1. pants

Direktīvas 64/432/EEK D pielikuma II sadaļas tekstu aizstāj ar šā lēmuma pielikuma tekstu.

2. pants

Šis lēmums ir adresēts dalībvalstīm.

Briselē, 2009. gada 15. decembrī

Komisijas vārdā –
Komisijas locekle
Androulla VASSILIOU

⁽¹⁾ OV 121, 29.7.1964., 1977./64. lpp.

PIELIKUMS

Direktīvas 64/432/EEK D pielikuma II sadaļu aizstāj ar šādu tekstu:

"II SADAĻA

GOVJU ENZOOTISKĀS LEIKOZES TESTI

Govju enzootiskās leikozes testus veic ar agara gēla imūndifūzijas testu (AGID), ievērojot A un B daļā minētos nosacījumus, vai ar enzīmu imūnsorbcijas testu (ELISA), ievērojot C daļā minētos nosacījumus. Agara gēla imūndifūzijas testu drīkst izmantot tikai atsevišķu paraugu testēšanai. Ja rezultāti rada nopietnas šaubas, veic papildu kontroli ar agara gēla imūndifūzijas testu.

AGID un ELISA testu standartizē attiecībā pret E05 serumu, kurš ir oficiālais ES standartserums un kuru piegādā

Friedrich-Loeffler-Institut

Federal Research Institute for Animal Health

OIE Reference Laboratory for Enzootic Bovine Leukosis (EBL)

Südufer 10

17493 Greifswald – Insel Riems

Vācija.

A. Agara gēla imūndifūzijas tests govju enzootiskās leikozes noteikšanai

1. Testā izmantotais antigēns satur govju enzootiskās leikozes vīrusa glikoproteīnus. Antigēns ir standartizēts attiecībā pret E05 serumu.
2. Nosaka, ka valsts institūti, nacionālās references laboratorijas vai oficiāli institūti, kas izraudzīti saskaņā ar 6.a pantu, lai koordinētu govju enzootiskās leikozes testu diagnožu standartus un metodes, ir atbildīgi par laboratorijas standarta darba antigēna kalibrēšanu attiecībā pret E05 serumu.
3. Laboratorijā izmantojamais standarta antigēnus vismaz reizi gadā iesniedz valsts institūtiem, nacionālajām references laboratorijām vai oficiāliem institūtiem, kas izraudzīti saskaņā ar 6.a pantu, lai šos antigēnus pārbaudītu attiecībā pret E05 serumu. Izņemot šādu standartizāciju, izmantoto antigēnu var kalibrēt, izmantojot B daļā aprakstīto metodi.
4. Testos izmanto šādus reagentus:
 - a) antigēnu: antigēns satur specifiskus govju enzootiskās leikozes vīrusa glikoproteīnus, kas standartizēti pret E05 serumu;
 - b) testa serumu;
 - c) zināmu pozitīvu kontroles serumu;
 - d) agara gēlu:
 - 0,8 % agara,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M *Tris-buffer* pH 7,2;
 - 15 ml šā agara ievieto Petrī trauciņā ar diametru 85 mm tā, lai agara slāņa biezums būtu 2,6 mm.
5. Agara platē izveido testa sagatavi ar septiņām sausām iedobēm; testam ir vajadzīga viena centrālā iedobe un sešas iedobes lokā ap to.

Centrālās iedobes diametrs: 4 mm

Perifēro iedobju diametrs: 6 mm

Attālums starp centrālo iedobi un perifērajām iedobēm: 3 mm

6. Centrālo iedobi piepilda ar standarta antigēnu. 1. un 4. perifēro iedobi (sk. B.3) piepilda ar zināmu pozitīvu serumu, 2., 3., 5. un 6. iedobi – ar testa serumiem. Iedobes piepilda, līdz pazūd menisks.
7. Tādējādi iegūst šādus daudzumus:
 - antigēns: 32 µl,
 - kontroles serums: 73 µl,
 - testa serums: 73 µl.
8. Inkubācija istabas temperatūrā (20–27 °C) noslēgtā mitrā kamerā ilgst 72 stundas.
9. Testa rezultātus var nolasīt pēc 24 un 48 stundām, taču galīgo rezultātu neiegūst ātrāk kā pēc 72 stundām:
 - a) testa serums ir pozitīvs, ja tas izveido specifisku precipitācijas līniju ar govju leikozes vīrusa (BLV) antigēnu un pilnīgu identitātes līniju ar kontroles serumu;
 - b) testa serums ir negatīvs, ja tas neveido specifisku precipitācijas līniju ar BLV antigēnu un neveido identitātes līniju ar kontroles serumu;
 - c) reakciju nevar uzskatīt par skaidru, ja:
 - i) testa serums noliec kontroles seruma līniju virzienā uz BLV antigēna iedobi, neveidojot redzamu precipitācijas līniju ar antigēnu; vai
 - ii) ja to nevar uzskatīt ne par pozitīvu, ne negatīvu.

Ja reakcija ir neskaidra, testu var atkārtot, izmantojot koncentrētu serumu.
10. Var izmantot jebkuru citu iedobju konfigurāciju vai izkārtojumu, ja E05 serumu atšķaidījumā 1:10 negatīvā serumā var identificēt kā pozitīvu.

B. Antigēnu standartizācijas metode

1. Vajadzīgie šķīdumi un materiāli:

- a) 40 ml 1,6 % agarozes 0,05 M Tris/HCl buferšķīdumā, pH 7,2 ar 8,5 % NaCl;
- b) 15 ml govju leikozes seruma, kurā ir antivielas tikai pret govju leikozes vīrusa glikoproteīniem, atšķaidījumā 1:10 0,05 M Tris/HCl buferšķīdumā, pH 7,2 ar 8,5 % NaCl;
- c) 15 ml govju leikozes seruma, kurā ir antivielas tikai pret govju leikozes vīrusa glikoproteīniem, atšķaidījumā 1:5 0,05 M Tris/HCl buferšķīdumā, pH 7,2 ar 8,5 % NaCl;
- d) četri plastmasas Petrī trauciņi ar 85 mm diametru;
- e) perforators ar diametru 4–6 mm;
- f) standarta antigēns;
- g) standartizējamais antigēns;
- h) ūdens vanna (56 °C).

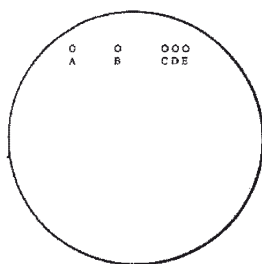
2. Procedūra

Agarozī (1,6 %), uzmanīgi karsējot līdz 100 °C, atšķaida Tris/HCl buferšķīdumā. Apmēram uz vienu stundu liek ūdens peldē 56 °C temperatūrā. Govju leikozes seruma atšķaidījumu arī liek ūdens peldē 56 °C temperatūrā.

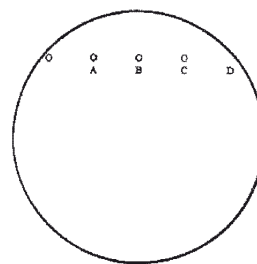
Tad samaisa 15 ml agarozes šķīduma (kura temperatūra ir 56 °C) ar 15 ml govju leikozes seruma (1:10), ātri sakrata un katrā no abiem Petrī trauciņiem ielej 15 ml. Procedūru atkārto ar govju leikozes serumu atšķaidījumā 1:5.

Kad agarozē ir sacietējusi, izveido caurumus šādi:

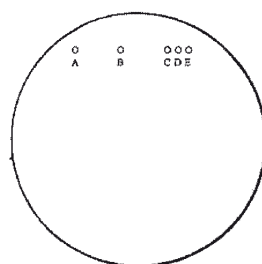
1. Petrī trauciņš
Serums 1:10



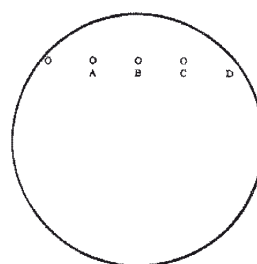
2. Petrī trauciņš
Serums 1:10



3. Petrī trauciņš
Serums 1:5



4. Petrī trauciņš
Serums 1:5



3. Antigēna pievienošana

a) 1. un 3. Petrī trauciņš:

- i) A iedobe – neatšķaidīts standarta antigēns;
- ii) B iedobe – standarta antigēns atšķaidījumā 1:2;
- iii) C un E iedobe – standarta antigēns;
- iv) D iedobe – neatšķaidīts testa antigēns;

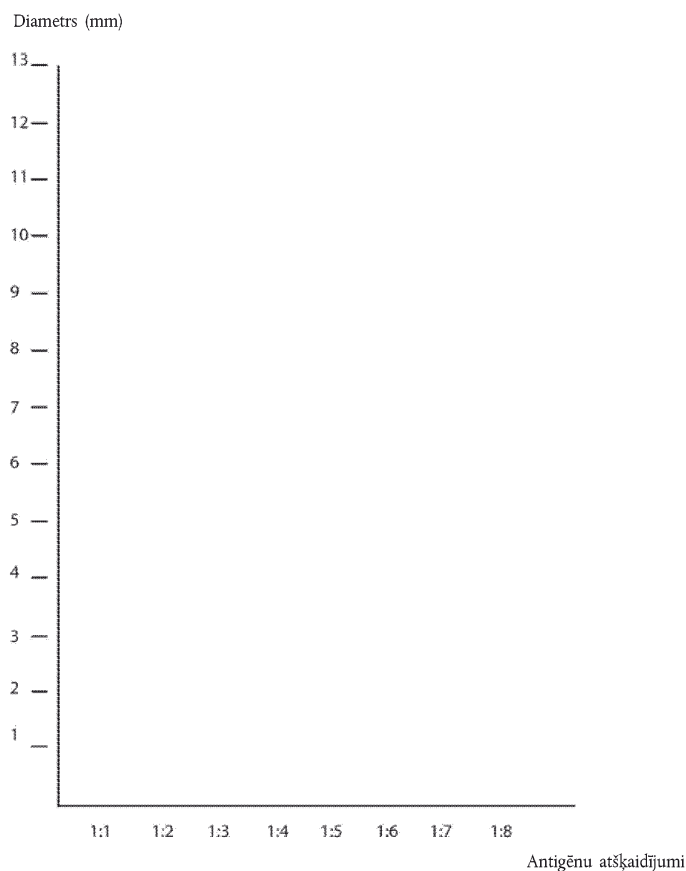
b) 2. un 4. Petrī trauciņš:

- i) A iedobe – neatšķaidīts testa antigēns;
- ii) B iedobe – testa antigēns atšķaidījumā 1:2;
- iii) C iedobe – testa antigēns atšķaidījumā 1:4;
- iv) D iedobe – testa antigēns atšķaidījumā 1:8.

4. Papildu instrukcijas

- a) eksperimentu veic ar diviem seruma atšķaidījumiem (1:5 un 1:10), lai panāktu optimālo precipitāciju;
- b) ja precipitācijas diametrs abos atšķaidījumos ir pārāk mazs, serumu atšķaida vairāk;
- c) ja precipitācijas diametrs abos atšķaidījumos ir pārāk liels un neskaidrs, izvēlas vajākās koncentrācijas serumu;
- d) agarozes galīgā koncentrācija ir 0,8 %, bet seruma koncentrācija – attiecīgi 5 % un 10 %;

- e) izmērītos diametrus ieraksta koordinātu sistēmā. Darba antigēns ir testējamais antigēns, kura diametrs atbilst standarta antigēnam.



C. Enzīmu imūnsorbcijas tests (ELISA) govju enzootiskās leikozes noteikšanai

1. Izmanto šādus materiālus un reaģentus:

- a) cietās fāzes mikroplates, kivetes vai citu cieto fāzi;
- b) antigēnu fiksē pie cietās fāzes, izmantojot poliklonālās vai monoklonālās slimības antivielas, vai arī tās neizmantojot. Ja antigēnu saista tieši pie cietās fāzes, visi testa paraugi, kam konstatē pozitīvu reakciju, ir atkārtoti jātestē attiecībā pret kontroles antigēnu. Kontroles antigēniem jābūt identiskiem ar šo antigēnu, izņemot, ja nekonstatē BLV antigēnus. Ja antigēnus saista pie cietās fāzes, antivielas drīkst reaģēt tikai ar BLV antigēniem;
- c) testējamo bioloģisko šķidrumu;
- d) atbilstošu pozitīvu un negatīvu kontroli;
- e) konjugātu;
- f) izmantotajam enzīmam atbilstošu substrātu;
- g) reakcijas apturēšanas šķidrumu, ja vajadzīgs;
- h) šķidrumus testa paraugu atšķaidīšanai, reaģentu sagatavošanai un mazgāšanai;
- i) izmantotajam substrātam atbilstošu nolasīšanas sistēmu.

2. Testa standartizācija un jutība

ELISA noteikšanai ir jābūt tik jutīgai, lai E05 serumu par pozitīvu atzītu desmit reizes lielākā atšķaidījumā (seruma paraugiem) vai 250 reizes lielākā atšķaidījumā (piena paraugiem), salīdzinot ar atšķaidījumu, ko iegūst no apvienotajos paraugos iekļautajiem atsevišķajiem paraugiem. Ja paraugus (seruma un piena) testē atsevišķi, E05 serumu atšķaidījumā 1:10 (negatīvā seruma) vai arī 1:250 (negatīvā piena) novērtē kā pozitīvu, ja to testē tādā pašā noteikšanas atšķaidījumā, kā atsevišķos testa paraugus. A daļas 2. punktā minētie institūti atbild par *ELISA* metodes kvalitātes kontroli, tai skaitā katrai ražošanas partijai nosakot apvienojamo paraugu skaitu, pamatojoties uz skaitu, kas iegūts E05 serumam.

3. Nosacījumi, ar kādiem *ELISA* testu izmanto govju enzootiskās leikozes noteikšanai

- a) *ELISA* testus var izmantot, analizējot seruma un piena paraugus;
 - b) ja *ELISA* testus izmanto sertifikācijas nolūkā saskaņā ar 6. panta 2. punkta c) apakšpunktu vai, lai izveidotu un uzturētu ganāmpulka statusu saskaņā ar D pielikuma I sadaļu, seruma vai piena paraugu apvienošanu veic tā, lai testa rezultātus varētu neapšaubāmi attiecināt uz atsevišķiem dzīvniekiem, uz kuriem attiecas apvienotais paraugs. Visus apstiprinājuma testus veic paraugiem, kas ņemti no atsevišķiem dzīvniekiem;
 - c) ja *ELISA* testus izmanto nefasēta piena paraugam, šo paraugu ņem no piena, kas ir savākts saimniecībā, kurā ir vismaz 30 % slaucamu piena govju. Visus apstiprinājuma testus veic seruma vai piena paraugiem, kas ņemti no atsevišķiem dzīvniekiem."
-