

SKLEP KOMISIJE

z dne 15. decembra 2009

o spremembi Priloge D k Direktivi Sveta 64/432/EGS glede diagnostičnih testov za enzoosko govejo levkozo

(notificirano pod dokumentarno številko C(2009) 9951)

(Besedilo velja za EGP)

(2009/976/EU)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Direktive Sveta 64/432/EGS z dne 26. junija 1964 o problemih v zvezi z zdravstvenim varstvom živali, ki vplivajo na trgovino z govedom in prašiči znotraj Skupnosti ⁽¹⁾, ter zlasti drugega odstavka člena 16 Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Direktiva 64/432/EGS se uporablja za trgovino z govedom znotraj Unije in poglavje II Priloge D k Direktivi določa diagnostične preiskave na enzoosko govejo levkozo za uporabo pri kontroli in izkoreninjenju navedene bolezni ter nadzoru in spremljanju, pa tudi za ugotovitev in vzdrževanje statusa črede, uradno proste enzooske goveje levkoze, ter za zahteve certificiranja za trgovino z govedom znotraj Unije.
- (2) Poglavje II Priloge D k Direktivi 64/432/EGS določa, da se preiskave na enzoosko govejo levkozo opravijo ali z imunodifuzijo v agarškem gelu (AGID) z uporabo antigena, ki je standardiziran glede na uradni standardni serum ES (serum EI), ali z encimskoimunskim testom (ELISA), ki je standardiziran glede na serum E4. Oba standardna seruma dobavlja National Veterinary Institute, Technical University of Denmark.
- (3) Nedavno je referenčni laboratorij za enzoosko govejo levkozo v Nemčiji (Friedrich-Loeffler-Institut) Svetovne organizacije za zdravje živali (OIE) v sodelovanju z referenčnim laboratorijem OIE v Združenem kraljestvu (Veterinary Laboratories Agency) in na Poljskem (National Veterinary Research Institute) razvil nov standardni serum za enzoosko govejo levkozo (serum E05), potem ko je bil ta primerjalno preskušan med navedenimi laboratoriji. Serum E05 je bil validiran glede na serume EI in E4 z različnimi preiskavami AGID in ELISA in nato vključen kot priznan standardni serum OIE v oddelek B(2) poglavja 2.4.11 Priročnika za

diagnostične teste in cepiva za kopenske živali OIE, šesta izdaja, 2008. Ta serum je na voljo v referenčnem laboratoriju OIE za enzoosko govejo levkozo v Nemčiji.

- (4) Poleg tega je National Veterinary Institute iz Technical University of Denmark obvestil Komisijo, da ne more več izpolnjevati svoje obveznosti dobave standardnih serumov, ki jih trenutno določa poglavje II Priloge D k Direktivi 64/432/EGS.
- (5) Nemški pristojni organi in Friedrich-Loeffler-Institut so se dogovorili, da bodo dobavljali serum E05, ki bo zato postal novi uradni standardni serum Evropske unije (v nadaljnjem besedilu: EU) za enzoosko govejo levkozo.
- (6) Direktivo 64/432/EGS je zato treba ustrezno spremeniti.
- (7) Ukrepi, predvideni s to odločbo, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali –

SPREJELA NASLEDNJI SKLEP:

Člen 1

Poglavje II Priloge D k Direktivi 64/432/EGS se nadomesti z besedilom iz Priloge k temu sklepu.

Člen 2

Ta sklep je naslovljen na države članice.

V Bruslju, 15. decembra 2009

Za Komisijo
Androulla VASSILIOU
Članica Komisije

⁽¹⁾ UL 121, 29.7.1964, str. 1977/64.

PRILOGA

Poglavje II Priloge D k Direktivi 64/432/EGS se nadomesti z naslednjim:

„POGLAVJE II

PREISKAVE NA ENZOOTSKO GOVEJO LEVKOZO

Preiskave na enzootsko govejo levkoko se izvajajo z imunodifuzijskim testom v agarskem gelu (AGID) pod pogoji iz oddelkov A in B ali z encimskoimunskim testom (ELISA) pod pogoji iz oddelka C. Imunodifuzijski test v agarskem gelu se lahko uporablja samo za preskušanje individualnih vzorcev. Če se rezultati testov ustrezno utemeljeno izpodbijajo, se opravi dodatna preiskava z imunodifuzijskim testom v agarskem gelu.

AGID in ELISA se standardizirata glede na serum E05, ki je uradni standardni serum EU in ga dobavlja:

Friedrich-Loeffler-Institut
Federal Research Institute for Animal Health
OIE Reference Laboratory for Enzootic Bovine Leukosis (EBL)
Südufer 10
17493 Greifswald – Insel Riems
NEMČIJA

A. Imunodifuzija v agarskem gelu za enzootsko govejo levkoko

1. Antigen, ki se uporablja v testu, vsebuje glikoprotein virusa goveje levkoze. Antigen je standardiziran glede na serum E05.
2. Državni inštituti, nacionalni referenčni laboratoriji ali uradni inštituti, imenovani v skladu s členom 6a za usklajevanje standardov in diagnostičnih metod za preiskave na enzootsko govejo levkoko, so pristojni za kalibracijo standardnih delovnih antigenov laboratorija glede na serum E05.
3. Standardni antigeni, ki jih uporablja laboratorij, se najmanj enkrat na leto predložijo državnim inštitutom, nacionalnim referenčnim laboratorijem ali uradnim inštitutom, imenovanim v skladu s členom 6a, za preskušanje glede na serum E05. Poleg takšne standardizacije se lahko antigen, ki se uporablja, kalibrira v skladu z metodo iz oddelka B.
4. Reagenti za izvedbo testov so:
 - (a) antigen: antigen vsebuje specifične glikoproteine virusa enzootske goveje levkoze, standardizirane glede na serum E05;
 - (b) preiskovani serum;
 - (c) znan pozitivni kontrolni serum;
 - (d) agar gel:
 - 0,8 % agarja,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M tris pufer pH 7,2,
 - 15 ml tega agarja se vlije v petrijevko s premerom 85 mm, da dobimo agar globine 2,6 mm.
5. V agar se do dna petrijevke vreže vzorec s sedmimi suhimi vdolbinicami; vzorec je sestavljen iz centralne vdolbinice in šestih perifernih v krogu okrog nje.

Premer centralne vdolbinice: 4 mm.

Premer perifernih vdolbinic: 6 mm.

Razdalja med centralno in perifernimi vdolbinicami: 3 mm.

6. Centralna vdolbinica se napolni s standardnim antigenom. Periferni vdolbinici 1 in 4 iz B.3 se napolnita z znanim pozitivnim serumom; vdolbinice 2, 3, 5 in 6 pa s preiskovanimi serumi. Vdolbinice se napolnijo tako, da meniskus izgine.
7. Tako dobimo naslednje količine:
 - antigen: 32 µl,
 - kontrolni serum: 73 µl,
 - preiskovani serum: 73 µl.
8. Inkubira se 72 ur pri sobni temperaturi (20 do 27 °C) v zaprti vlažni komori.
9. Test se lahko odčita pri 24 in 48 urah, vendar se končni rezultat dobi šele po 72 urah:
 - (a) preiskovani serum je pozitiven, če oblikuje specifično precipitacijsko črto z antigenom virusa goveje levkoze in popolno identifikacijsko črto s kontrolnim serumom;
 - (b) preiskovani serum je negativen, če ne oblikuje specifične precipitacijske črte z antigenom virusa goveje levkoze in ne ukrivi črte kontrolnega seruma;
 - (c) reakcija se šteje za sumljivo, če:
 - (i) ukrivi črto kontrolnega seruma proti vdolbinici z antigenom virusa goveje levkoze, ne da bi oblikovala vidno precipitacijsko črto z antigenom; ali
 - (ii) se ne more odčitati niti kot negativna niti kot pozitivna.

Pri sumljivih reakcijah se lahko test ponovi z uporabo koncentriranega seruma.
10. Lahko se uporabi katera koli druga konfiguracija ali vzorec vdolbinic, pod pogojem, da je serum E05, razredčen 1:10 v negativnem serumu, mogoče zaznati kot pozitiven.

B. Metoda za standardizacijo antigena

1. Potrebne raztopine in materiali:

- (a) 40 ml 1,6 % agaroze v 0,05 M tris/HCl pufru, pH 7,2 z 8,5 % NaCl;
- (b) 15 ml seruma goveje levkoze, ki ima protitelesa samo proti glikoproteinom virusa goveje levkoze, razredčenega 1:10 v 0,05 M tris/HCl pufru, pH 7,2, z 8,5 % NaCl;
- (c) 15 ml seruma goveje levkoze, ki ima protitelesa samo proti glikoproteinom virusa goveje levkoze, razredčenega 1:5 v 0,05 M tris/HCl pufru, pH 7,2, z 8,5 % NaCl;
- (d) štiri plastične petrijevke premera 85 mm;
- (e) perforator premera 4 do 6 mm;
- (f) referenčni antigen;
- (g) antigen, ki ga je treba standardizirati;
- (h) vodna kopel (56 °C).

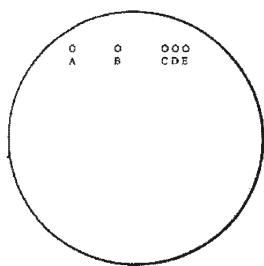
2. Postopek:

Agarozo (1,6 %) raztopimo v tris/HCl pufru s previdnim gretjem na 100 °C. Raztopino postavimo v vodno kopel s temperaturo 56 °C za približno eno uro. Prav tako damo v vodno kopel s temperaturo 56 °C razredčitve seruma goveje levkoze.

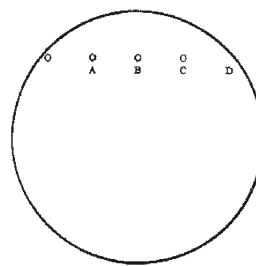
Zmešamo 15 ml raztopine agaroze na 56 °C s 15 ml seruma goveje levkoze (1:10), hitro pretresemo in v vsako od obeh petrijevk vlijemo po 15 ml. Ta postopek ponovimo s serumom goveje levkoze, razredčenim 1:5.

Ko se agaroz strdi, se v njej naredijo vdolbinice na naslednji način:

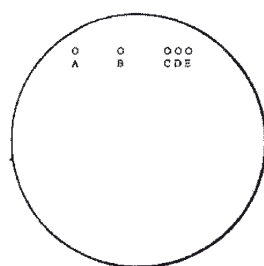
Petrijevka št. 1
Serum 1:10



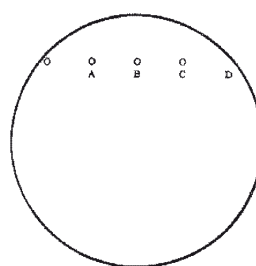
Petrijevka št. 2
Serum 1:10



Petrijevka št. 3
Serum 1:5



Petrijevka št. 4
Serum 1:5



3. Dodajanje antigena:

(a) petrijevk 1 in 3:

- (i) vdolbinica A – nerazredčen referenčni antigen;
- (ii) vdolbinica B – referenčni antigen, razredčen 1:2;
- (iii) vdolbinici C in E – referenčni antigen;
- (iv) vdolbinica D – nerazredčen preiskovani antigen;

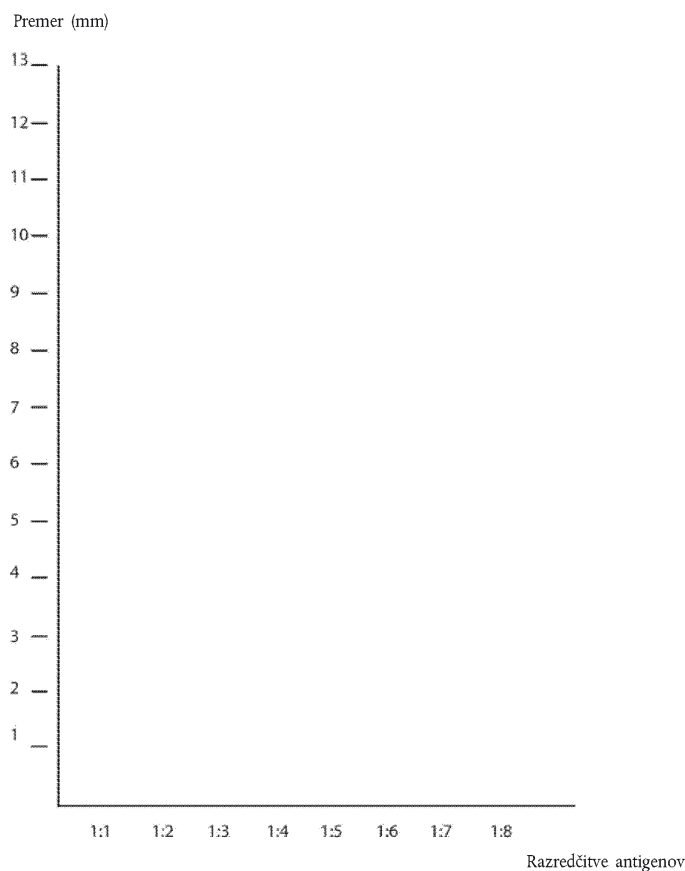
(b) petrijevk 2 in 4:

- (i) vdolbinica A – nerazredčen preiskovani antigen;
- (ii) vdolbinica B – preiskovani antigen, razredčen 1:2;
- (iii) vdolbinica C – preiskovani antigen, razredčen 1:4;
- (iv) vdolbinica D – preiskovani antigen, razredčen 1:8.

4. Dodatna navodila:

- (a) poskus se izvaja z dvema razredčitvama seruma (1:5 in 1:10), da bi se dosegla optimalna precipitacija;
- (b) če je premer precipitacije pri obeh razredčitvah premajhen, se serum še bolj razredči;
- (c) če je premer precipitacije pri obeh razredčitvah prevelik in slabo viden, se izbere nižji serum;
- (d) končna koncentracija agaroze je 0,8 %; končna koncentracija serumov pa 5 % oziroma 10 %;

- (e) izmerjene premere narišemo v koordinatni sistem. Razredčitev preiskovanega antigena, ki ima enak premer kot referenčni antigen, je delovna razredčitev.



C. Encimskoimunski test (ELISA) za odkrivanje enzooske goveje levkoze

1. Uporabljajo se naslednji material in reagenti:

- (a) mikroplošče, kivete ali kateri koli drug nosilec;
- (b) antigen je vezan na nosilec s poliklonskimi ali monoklonskimi protitelesi za vezanje ali brez njih. Če je antigen vezan neposredno na nosilec, je treba vse preiskovane vzorce, ki dajo pozitivno reakcijo, ponovno testirati glede na kontrolni antigen. Kontrolni antigen bi moral biti identičen temu antigenu, razen če so antigeni virusa goveje levkoze odsotni. Če so na nosilec vezana protitelesa za vezanje, ta ne reagirajo na druge antigene razen na antigene virusa goveje levkoze;
- (c) biološka tekočina, ki se bo testirala;
- (d) ustrezna pozitivna in negativna kontrola;
- (e) konjugat;
- (f) substrat, prilagojen uporabljenemu encimu;
- (g) raztopina za zaustavljanje, če je potrebna;
- (h) raztopine za razredčevanje preiskovanih vzorcev, namenjenih pripravi reagentov, in izpiranje;
- (i) sistem za odčitavanje, ki ustreza uporabljenemu substratu.

2. Standardizacija in občutljivost testa

Občutljivost ELISA je tolikšna, da se serum E05 zazna kot pozitiven, če je desetkrat (vzorci seruma) ali 250-krat (vzorci mleka) bolj razredčen kot razredčitev individualnih vzorcev, kadar so ti del skupinskega vzorca. V testih, v katerih so vzorci (seruma in mleka) testirani individualno, se serum E05, razredčen 1:10 (v negativnem serumu) ali 1:250 (v negativnem mleku), zazna kot pozitiven, če se testira v istih testnih razredčitvah, kot se uporabljajo za individualne preiskovane vzorce. Inštituti iz točke 2 oddelka A so odgovorni za preverjanje kakovosti ELISA in zlasti za določanje, pri vsaki proizvodni seriji, števila vzorcev, ki se združijo v skupinski vzorec na podlagi titra, dobljenega za serum E05.

3. Pogoji za uporabo ELISA za enzootsko govejo levkozo:

- (a) ELISA se lahko uporabljajo na vzorcih seruma in mleka.
 - (b) Če se ELISA uporabljajo za certificiranje v skladu s členom 6(2)(c) ali za ugotavljanje in vzdrževanje statusa črede v skladu s Prilogo D(I), se zbiranje vzorcev seruma ali mleka v skupinski vzorec izvede tako, da je mogoče preiskovane vzorce nesporno povezati s posameznimi živalmi, vključenimi v skupinski vzorec. Kateri koli test za potrditev se opravi na vzorcih, odvzetih posameznim živalim.
 - (c) Če se ELISA uporabljajo na skupnem vzorcu mleka, se ta vzorec odvzame iz mleka, zbranega v čredi, ki zajema vsaj 30 % krav mlekaric, ki niso presušene. Kateri koli test za potrditev se opravi na vzorcih seruma ali mleka, odvzetega posameznim živalim.“
-