

32009D0976

L 336/36

SLUŽBENI LIST EUROPSKE UNIJE

18.12.2009.

ODLUKA KOMISIJE**od 15. prosinca 2009.****o izmjeni Priloga D Direktivi Vijeća 64/432/EEZ u pogledu dijagnostičkih testova za enzoosku leukozu goveda***(priopćena pod brojem dokumenta C(2009) 9951)***(Tekst značajan za EGP)****(2009/976/EU)**

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 64/432/EEZ od 26. lipnja 1964. o zdravstvenim problemima životinja koji utječu na promet govedima i svinjama unutar Zajednice ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 16. drugi stavak,

budući da:

- (1) Direktiva 64/432/EEZ primjenjuje se na trgovinu govedima unutar Unije, a u poglavlju II. njezinog Priloga D navode se dijagnostički testovi za enzoosku leukozu goveda (EBL) koji se upotrebljavaju za kontrolu i iskorjenjivanje te bolesti te za nadzor i praćenje, kao i za uspostavljanje i održavanje službenog statusa stada da je slobodno od enzooske leukoze goveda i za certifikaciju koja se zahtijeva za trgovinu govedima unutar Unije.
- (2) Poglavljem II. Priloga D Direktivi 64/432/EEZ predviđa se da se testovi za EBL moraju izvoditi bilo agar gel imunodifuzijskim testom (AGID) upotrebom antigena standardiziranog prema službenom EZ standardnom serumu (serum EI) ili enzimskim vezanim imunosorbentnim testom (ELISA) standardiziranim prema serumu E4. Oba standardna seruma dobavlja Nacionalni veterinarski institut, Tehničko sveučilište Danske.
- (3) Nedavno je referentni laboratorij za enzoosku leukozu goveda u Njemačkoj (Friedrich-Loeffler-Institute) Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE) razvio novi standardni serum za EBL (serum E05), u suradnji s referentnim laboratorijima OIE-a u Ujedinjenoj Kraljevini (Agencija za veterinarske laboratorije) i u Poljskoj (Nacionalni veterinarski istraživački institut), nakon što je bio ispitan u međulaboratorijskom ispitivanju. Serum E05 je bio vrednovan prema serumima EI i E4 različitim testovima AGID i ELISA, te je potom kao odobreni standardni serum OIE-a uključen u odjeljak B(2) poglavlja 2.4.11 Priručnika za dijagnostičke testove i cjepiva za kopnene

životinje OIE-a, šesto izdanje, 2008. Ovaj serum stavlja na raspolaganje referentni laboratorij OIE-a za enzoosku leukozu goveda u Njemačkoj.

- (4) Osim toga, Nacionalni veterinarski institut Tehničkog sveučilišta Danske obavijestio je Komisiju da više ne može ispunjavati svoje obveze u pogledu dobave standardnih seruma koji su trenutačno predviđeni u poglavlju II. Priloga D Direktivi 64/432/EEZ.
- (5) Nadležna tijela Njemačke i Friedrich-Loeffler-Institute složili su se da budu dobavljači seruma E05, koji će stoga postati novi službeni standardni serum Europske unije (EU) za EBL.
- (6) Direktivu 64/432/EEZ treba stoga na odgovarajući način izmijeniti.
- (7) Mjere predviđene ovom Odlukom u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za prehrambeni lanac i zdravlje životinja,

DONIJELA JE OVU ODLUKU:

Članak 1.

Poglavlje II. Priloga D Direktivi 64/432/EEZ zamjenjuje se tekstom u Prilogu ovoj Odluci.

Članak 2.

Ova je Odluka upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 15. prosinca 2009.

Za Komisiju
Androulla VASSILIOU
Članica Komisije

⁽¹⁾ SL 121, 29.7.1964., str. 1977/64.

PRILOG

Poglavlje II. Priloga D Direktivi 64/432/EEZ zamjenjuje se sljedećim:

„POGLAVLJE II.

TESTOVI ZA ENZOOTSKU LEUKOZU GOVEDA

Testovi za enzootsku leukozu goveda provode se agar gel imunodifuzijskim testom (AGID) pod uvjetima opisanim u odjeljcima A i B ili enzimski vezanim imunosorbentnim testom (ELISA) pod uvjetima opisanim u odjeljku C. Agar gel imunodifuzijski test može se koristiti samo za individualne uzorke. Ako su rezultati testova predmet valjano potkrijepljenog osporavanja, provodi se dodatna provjera pomoću agar gel imunodifuzijskog testa.

AGID i ELISA se standardiziraju prema serumu E05, koji je službeni standardni serum EU-a i dobavlja ga:

Friedrich-Loeffler-Institut
Federal Research Institute for Animal Health
OIE Reference Laboratory for Enzoootic Bovine Leukosis (EBL)
Südufer 10
17493 Greifswald — Insel Riems
Germany.

A. Agar gel imunodifuzijski test za enzootsku leukozu goveda

1. Antigen koji se koristi u testu mora sadržavati glikoprotein virusa leukoze goveda. Antigen mora biti standardiziran prema serumu E05.
2. Državni instituti, nacionalni referentni laboratoriji ili službeni instituti koji se imenuju u skladu s člankom 6.a za usklađivanje standarda i dijagnostičkih metoda testova za enzootsku leukozu goveda, odgovorni su za umjeravanje standardnog radnog antigena laboratorija prema serumu E05.
3. Standardni antigeni koji se koriste u laboratoriju moraju se najmanje jedanput godišnje dostaviti državnim institutima, nacionalnim referentnim laboratorijima ili službenim institutima imenovanim u skladu s člankom 6.a, radi testiranja prema serumu E05. Osim takve standardizacije, antigen koji se koristi može se umjeravati u skladu s metodom opisanom u odjeljku B.
4. Reagensi za testove sastoje se od:
 - (a) antigena: antigen mora sadržavati specifični glikoprotein virusa enzootske leukoze goveda koji je standardiziran prema serumu E05;
 - (b) testnog seruma;
 - (c) poznatog pozitivnog kontrolnog seruma;
 - (d) agar gela:
 - 0,8 % agara,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M Tris-buffer pH 7,2,
 - 15 ml ovog agara unosi se u Petrijevu posudu promjera 85 mm, što rezultira dubinom agara od 2,6 mm.
5. U agar se do dna posude urezuje struktura od sedam udubina u kojima nema vlage; ta se struktura sastoji od jedne središnje udubine i šest udubina raspoređenih u krugu oko nje.

Promjer središnje udubine: 4 mm

Promjer perifernih udubina: 6 mm

Udaljenost između središnje i perifernih udubina: 3 mm

6. Središnja se udubina napuni standardnim antigenom. Periferne udubine 1 i 4 opisane u odjeljku B točki 3. napune se poznatim pozitivnim serumom; udubine 2, 3, 5 i 6 napune se testnim serumima. Posude se moraju puniti dok ne nestane meniskus.
 7. Kao rezultat toga dobivaju se sljedeće količine:
 - antigena: 32 μ l,
 - kontrolnog seruma: 73 μ l,
 - testnog seruma: 73 μ l.
 8. Inkubacija traje 72 sata na sobnoj temperaturi (20 do 27 °C) u zatvorenoj vlažnoj komori.
 9. Test se može očitati nakon 24 sata i nakon 48 sati, ali se konačni rezultat dobiva nakon 72 sata:
 - (a) testni serum je pozitivan ako stvara specifičnu precipitacijsku liniju s antigenom virusa leukoze goveda (BLV) i potpunu identifikacijsku liniju s kontrolnim serumom;
 - (b) testni serum je negativan ako ne stvara specifičnu precipitacijsku liniju s antigenom BLV-a i ako ne zakrivljuje liniju kontrolnog seruma;
 - (c) reakcija se ne može smatrati zaključnom ako:
 - i. liniju kontrolnog seruma zakrivljuje prema antigenu BLV-a bez stvaranja vidljive precipitacijske linije s antigenom; ili
 - ii. ako se ne može očitati niti kao negativna niti kao pozitivna.
- Kod sumnjivih reakcija test se može ponoviti upotrebom koncentriranog seruma.
10. Može se koristiti bilo koja druga dobra konfiguracija ili obrazac pod uvjetom da se serum E05 razrijeđen u omjeru 1:10 u negativnom serumu može detektirati kao pozitivan.

B. Metoda za standardizaciju antigena

1. Potrebne otopine i materijali:

- (a) 40 ml 1,6 % agaroze u puferiranom 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 s 8,5 % NaCl;
- (b) 15 ml seruma leukoze goveda koji ima protutijela samo na glikoproteine virusa leukoze goveda, razrijeđen 1:10 u puferiranom 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 s 8,5 % NaCl;
- (c) 15 ml seruma leukoze goveda koji ima protutijela samo na glikoproteine virusa leukoze goveda, razrijeđen 1:5 u puferiranom 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 s 8,5 % NaCl;
- (d) četiri plastične petrijeve posudice promjera 85 mm;
- (e) perforator promjera od 4 do 6 mm;
- (f) referentni antigen;
- (g) antigen koji se mora standardizirati;
- (h) vodena kupka (56 °C).

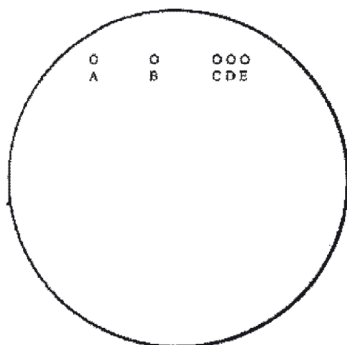
2. Postupak:

Razrijediti agarozu (1,6 %) u Tris/HCl puferu pažljivim zagrijavanjem do 100 °C. Staviti u vodenu kupku temperature 56 °C na otprilike jedan sat. U vodenu kupku na 56 °C staviti i razrijeđeni serum leukoze goveda.

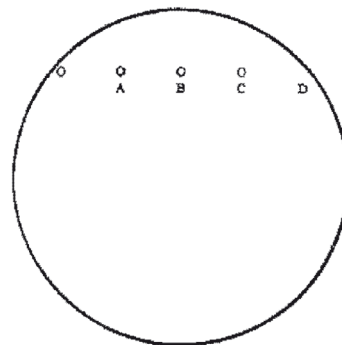
Zatim izmiješati 15 ml otopine agaroze na 56 °C s 15 ml seruma leukoze goveda (1:10), brzo protresti i uliti 15 ml u svaku od dvije petrijeve posudice. Postupak ponoviti sa serumom leukoze goveda u razrjeđenju 1:5.

Kada se agaroza stvrdne, u njoj napraviti rupice kako slijedi:

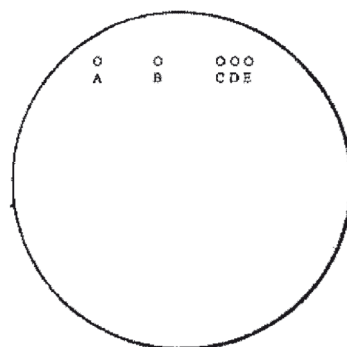
Petrijeva posudica br. 1
serum 1:10



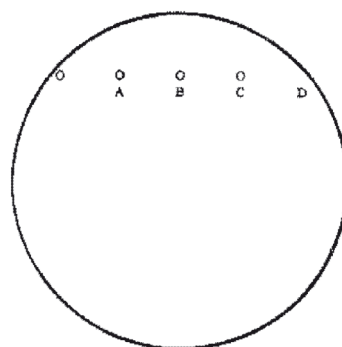
Petrijeva posudica br. 2
serum 1:10



Petrijeva posudica br. 3
serum 1:5



Petrijeva posudica br. 4
serum 1:5



3. Dodavanje antigena:

(a) Petrijeve posudice 1 i 3:

- i. udubina A — nerazrijeđen referentni antigen;
- ii. udubina B — razrijeđeni referentni antigen 1:2;
- iii. udubine C i E — referentni antigen;
- iv. udubina D — nerazrijeđen testni antigen;

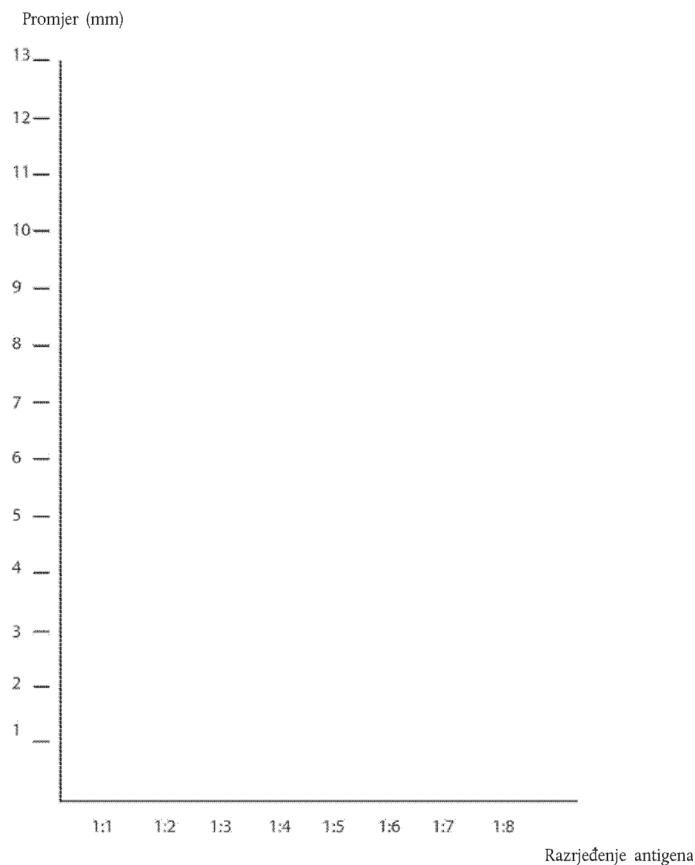
(b) petrijeve posudice 2 i 4:

- i. udubina A — nerazrijeđeni testni antigen;
- ii. udubina B — razrijeđen testni antigen 1:2;
- iii. udubina C —razrijeđen testni antigen 1:4;
- iv. udubina D —razrijeđen testni antigen 1:8.

4. Dodatne upute:

- (a) pokus se provodi s dva razrjeđenja seruma (1:5 i 1:10) kako bi se postigla optimalna precipitacija;
- (b) ako je promjer precipitacije premali s oba razrjeđenja, tada se serum mora dodatno razrijediti;
- (c) ako je promjer precipitacije u oba razrjeđenja prevelik i slabo vidljiv, tada se odabire niži serum;
- (d) konačna koncentracija agaroze mora biti 0,8 %; seruma 5 i 10 %;

- (e) unesite izmjerene promjere u sljedeći koordinatni sustav. Razrjeđenje antigena koji se testira s istim promjerom kao i referentni antigen je radno razrjeđenje.



C. Enzimski vezani imunosorbentni test (ELISA) za otkrivanje enzootske leukoze goveda

1. Materijali i reagensi koji se koriste su sljedeći:

- (a) mikropločice čvrste faze, kivete ili bilo koja druga čvrsta faza;
- (b) antigen se fiksira na čvrstu fazu sa ili bez poliklonskih ili monoklonskih vezujućih antitijela. Ako antigen izravno obloži čvrstu fazu, svi testni uzorci koji imaju pozitivnu reakciju, moraju se ponovno testirati u odnosu na kontrolni antigen. Kontrolni antigen mora biti istovjetan tom antigenu osim što nema antigena BLV-a. Ako vezujuća antitijela oblože čvrstu fazu, ta antitijela ne smiju reagirati na druge antigene osim na antigene BLV-a;
- (c) biološka tekućina koju treba testirati;
- (d) odgovarajuća pozitivna i negativna kontrola;
- (e) konjugat;
- (f) supstrat prilagođen korištenom enzimu;
- (g) otopina za zaustavljanje reakcije, prema potrebi;
- (h) otopine za razrjeđivanje testnih uzoraka za pripremu reagensa i za ispiranje;
- (i) sustav očitavanja primjeren upotrijebljenom supstratu.

2. Standardizacija i osjetljivost testa

Osjetljivost testa ELISA mora biti takve razine da serum E05 ima pozitivan rezultat kad je razrijeđen 10 puta (serumski uzorci) ili 250 puta (mliječni uzorci) više nego razrjeđenje individualnih uzoraka, kada su oni uključeni u skupne uzorke. U testovima u kojima se uzorci (seruma i mlijeka) testiraju individualno, serum E05 razrijeđen 1 prema 10 (u negativnom serumu) ili 1 prema 250 (u negativnom mlijeku) mora imati pozitivan rezultat kad se testira u istom razrjeđenju koje se koristi za individualne testne uzorke. Instituti iz odjeljka A točke 2. odgovorni su za provjeru kvalitete testa ELISA, a posebno za određivanje, za svaku seriju proizvodnje, broja uzoraka koji se udružuju u skupni uzorak na temelju vrijednosti dobivenih za serum E05.

3. Uvjeti za upotrebu testa ELISA za enzootsku leukozu goveda

- (a) ELISA se može koristiti na uzorcima seruma i mlijeka;
 - (b) Kada se testovi ELISA koriste u svrhu certificiranja u skladu s člankom 6. stavkom 2. točkom (c) ili u svrhu uspostavljanja i održavanja statusa stada u skladu s Dodatkom D poglavljem I., objedinjavanje uzoraka seruma ili mlijeka u skupni uzorak izvodi se na takav način da se uzorci uzeti za ispitivanje mogu nedvojbeno povezati s pojedinačnim životinjama uključenim u skupni uzorak. Bilo koji potvrdni test izvodi se na uzorcima uzetim od pojedinačnih životinja;
 - (c) Kada se testovi ELISA koriste na skupnom uzorku mlijeka, taj uzorak mora biti uzet iz mlijeka prikupljenog od stada s najmanje 30 % muznih krava u fazi laktacije. Bilo koji potvrdni test izvodi se na uzorcima seruma ili mlijeka uzetim od pojedinačnih životinja."
-