

A BIZOTTSÁG HATÁROZATA

(2009. december 15.)

az enzootiás szarvasmarha-leukózis diagnosztikai vizsgálatait tekintetében a 64/432/EGK tanácsi irányelv D. mellékletének módosításáról

(az értesítés a C(2009) 9951. számú dokumentummal történt)

(EGT-vonatkozású szöveg)

(2009/976/EU)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a szarvasmarhafélék és a sertések Közösségen belüli kereskedelmét érintő állat-egészségügyi problémákról szóló, 1964. június 26-i 64/432/EGK tanácsi irányelvre ⁽¹⁾ és különösen annak 16. cikkére,

mivel:

- (1) A 64/432/EGK irányelv a szarvasmarhafélék az Unión belüli kereskedelmére alkalmazandó, és D. mellékletének II. fejezete meghatározza az enzootiás szarvasmarha-leukózis (EBL) kimutatására szolgáló azon diagnosztikai vizsgálatokat, amelyeket a betegség ellenőrzése és felszámolása, felügyelete és megfigyelése, a betegségtől hatóságilag mentes státusú állományok kialakítása és fenntartása, valamint a szarvasmarhafélék Unión belüli kereskedelméhez előírt állat-egészségügyi igazolás céljaira használni kell.
- (2) A 64/432/EGK irányelv D. mellékletének II. fejezete előírja, hogy az enzootiás szarvasmarha-leukózis vizsgálatait vagy olyan agargél-immundiffúziós próbával (AGID) kell elvégezni, amely során hivatalos EK-standardszérummal (EI szérum) standardizált antigént használnak fel, vagy pedig enzimköttött immunoszorbens teszttel (ELISA), amelyet E4 szérummal standardizáltak. Mindkét standardszérumot a Dán Műszaki Egyetem Nemzeti Állategészségügyi Intézete (National Veterinary Institute, Technical University of Denmark) biztosítja.
- (3) Az Állat-egészségügyi Világszervezet (OIE) enzootiás szarvasmarha-leukózissal foglalkozó németországi referencialaboratóriuma (Friedrich-Loeffler-Institute) az OIE brit (Állategészségügyi Laboratóriumi Ügynökség, Veterinary Laboratories Agency) és a lengyel (Nemzeti Állategészségügyi Kutatóintézet) referencialaboratóriumaival együttműködve nemrégiben új enzootiás szarvasmarha-leukózis standardszérumot (E05 szérum) fejlesztett ki, miután a szeren a három laboratóriumban körvizsgálatot végeztek. Az E05 szérumot különböző AGID és ELISA-tesztekkel validálták az EI és az E4 szérummal szemben, következőképpen akkreditált OIE standardszérumként bekerült az OIE „A szárazföldi állatoknál alkalmazott

diagnosztikai vizsgálatok és vakcinák kézikönyve” (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) című kiadványa (hatodik kiadás: 2008) 2.4.11. fejezetének B(2) szakaszába. A szérum Németországban az OIE enzootiás szarvasmarha-leukózissal foglalkozó referencialaboratóriumában szerezhető be.

- (4) Ezen túlmenően a Dán Műszaki Egyetem Nemzeti Állategészségügyi Intézete értesítette a Bizottságot, hogy a jövőben nem tudja teljesíteni azon köteletségét, amely szerint a 64/432/EGK irányelv D. mellékletének II. fejezetében előírtak szerint biztosítani kell a jelenlegi standardszérumot.
- (5) A német illetékes hatóságok és a Friedrich-Loeffler-Institut megállapodása szerint ők fogják biztosítani az E05 szérumot, amely ennek eredményeként az enzootiás szarvasmarha-leukózis új hivatalos európai unió (EU-s) standardszérumává válik.
- (6) A 64/432/EGK irányelvet ezért ennek megfelelően módosítani kell.
- (7) Az e határozatban előírt intézkedések összhangban vannak az Élelmiszerlánc- és Állategészségügyi Állandó Bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A HATÁROZATOT:

1. cikk

A 64/432/EGK irányelv D. mellékletének II. fejezete helyébe e határozat mellékletének szövege lép.

2. cikk

Ennek a határozatnak a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 2009. december 15-én.

a Bizottság részéről
Androulla VASSILIOU
a Bizottság tagja

⁽¹⁾ HL 121., 1964.7.29., 1977/64. o.

MELLÉKLET

A 64/432/EGK irányelv D. mellékletének II. fejezete helyébe a következő szöveg lép:

„II. FEJEZET

AZ ENZOOTIÁS SZARVASMARHA-LEUKÓZIS KIMUTATÁSÁRA ALKALMAZHATÓ VIZSGÁLATOK

A enzootiás szarvasmarha-leukózis kimutatására szolgáló vizsgálatokat az A. és B. szakaszban leírt feltételek szerinti agargél-immundiffúziós próbával (AGID) vagy a C. szakaszban leírt feltételek szerinti enzimkött immunoszorbens teszttel (ELISA) végzik. Az agargél-immundiffúziós módszert kizárólag egyedi esetekben lehet alkalmazni. Amennyiben a vizsgálat eredményei megalapozottan kétségbe vonhatók, úgy további vizsgálatra van szükség az agargél-immundiffúziós próba alkalmazásával.

Az AGID- és ELISA-teszt standardizálásra kerül az E05 szérummal, amely az Unió hivatalos standardszéruma, és amelyet a következő intézet biztosít:

Friedrich-Loeffler-Institut

Szövetségi Állategészségügyi Kutatóintézet

Az OIE enzootiás szarvasmarha-leukózissal foglalkozó referencialaboratóriuma

Südufer 10

17493 Greifswald — Insel Riems

Németország

A. Agargél-immundiffúziós próba az enzootiás szarvasmarha-leukózis kimutatására

1. A próbához felhasználandó antigénnek a szarvasmarhaleukózis-vírus glikoproteinjét kell tartalmaznia. Az antigént az E05 szérummal standardizálni kell.
2. A laboratórium standard munkaantigénjének az E05 standardszérummal történő hitelesítéséért a 6a. cikkel összhangban az enzootiás szarvasmarha-leukózis vizsgálatához szükséges diagnosztikai standardok és módszerek összehangolása érdekében kijelölt állami intézetek, nemzeti referencialaboratóriumok vagy hivatalos intézetek felelősek.
3. A laboratóriumban használt standard antigéneket évente legalább egyszer be kell nyújtani a 6a. cikkel összhangban kijelölt állami intézetek, nemzeti referencialaboratóriumok vagy hivatalos intézetek számára az E05 szérummal történő vizsgálat céljából. A standardizálás mellett a használt antigén a B. szakaszban ismertetett módszer szerint is hitelesíthető.
4. A próbához szükséges reagensek a következők:
 - a) antigén: az antigénnek tartalmaznia kell az E05 szérummal standardizált enzootiás szarvasmarha-leukózis vírusspecifikus glikoproteinjeit;
 - b) a vizsgálandó szérum;
 - c) ismerten pozitív kontrollszérum;
 - d) agargél:
 - 0,8 % agar,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M Tris-puffer pH 7,2,
 - 15 ml agar 85 mm átmérőjű Petri-csészébe kiöntve 2,6 mm vastagságú agart eredményez.
5. Hét nedvességmentes vájatot kell az edény aljáig az agargélbe vágni a következő minta szerint: egy központi vájat és körülötte kör alakban további hat vájat.
 - A központi vájat átmérője: 4 mm
 - A külső vájatok átmérője: 6 mm
 - A központi és a külső vájatok közötti távolság: 3 mm

6. A középső vájatot meg kell tölteni a standard antigénnel. A B.3. szakaszban leírt módon az 1-es és a 4-es perifériás vájatot az ismerten pozitív szérummal, a 2-es, 3-as, 5-ös és 6-os vájatot pedig a vizsgálandó szérummal kell megtölteni. A vájatokat addig kell feltölteni, amíg az edény alja el nem tűnik.
7. Ez a következő mennyiségeket eredményezi:
- antigén: 32 µl,
 - kontrollszérum: 73 µl,
 - vizsgálandó szérum: 73 µl.
8. Az inkubáció 72 órán keresztül, szobahőmérsékleten (20 °C és 27 °C között), zárt nedves kamrában történik.
9. A próbát 24 és 48 óra elteltével is lehet értékelni, de végleges eredményt csak 72 óra elteltével lehet kapni:
- a) a vizsgálandó szérum pozitív, ha specifikus precipitációs ívet alkot a szarvasmarhaleukózis-vírus (BLV) antigénnel, és teljes identikus precipitációs ívet ad a kontrollszérummal;
 - b) a vizsgálandó szérum negatív, ha nem alkot specifikus precipitációs ívet a BLV antigénnel, valamint nem hajlítja el a kontrollszérum által adott ívet;
 - c) a reakció nem tekinthető egyértelműnek, amennyiben az:
 - i. a kontrollszérum ívét a BLV antigént tartalmazó vájat felé hajlítja anélkül, hogy látható precipitációs ívet mutatna az antigénnel; vagy
 - ii. ha sem pozitívnak, sem negatívnak nem minősíthető.
- Kétes reakciók esetében a próbát meg lehet ismételni koncentrált szérum felhasználásával.
10. Alkalmazható bármely más vájatkonfiguráció vagy mintázat, feltéve, hogy a negatív szérummal 1:10 arányban hígított E05 szérum esetében pozitív eredmény mutatható ki.

B. Az antigén-standardizálás

1. Szükséges oldatok és anyagok:

- a) 40 ml 1,6 %-os agaróz 0,05 M Tris/HCl pufferben, 7,2 pH, 8,5 % NaCl-dal;
- b) 15 ml szarvasmarha-leukózis szérum, amely kizárólag a szarvasmarha-leukózis vírus glikoproteinjei ellen tartalmaz ellenanyagokat, 7,2-es pH-jú 0,05 M Tris/HCl pufferben 1:10 arányban hígítva, 8,5 % NaCl-dal;
- c) 15 ml szarvasmarha-leukózis szérum, amely kizárólag a szarvasmarhaleukózis-vírus glikoproteinjei ellen tartalmaz ellenanyagokat, 7,2-es pH-jú 0,05 M Tris/HCl pufferben 1:5 arányban hígítva, 8,5 % NaCl-dal;
- d) négy darab 85 mm átmérőjű műanyag Petri-csésze;
- e) 4–6 mm átmérőjű lyukasztó;
- f) referencia-antigén;
- g) a standardizálandó antigén;
- h) vízfürdő (56 °C).

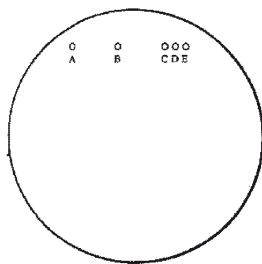
2. Eljárás:

Az agarózt (1,6 %) 100 °C-ra történő óvatos melegítéssel oldjuk fel a Tris/HCl pufferben. Körülbelül egy órára helyezzük 56 °C-os vízfürdőbe. A szarvasmarha-leukózis szérumhígításokat szintén helyezzük 56 °C-os vízfürdőbe.

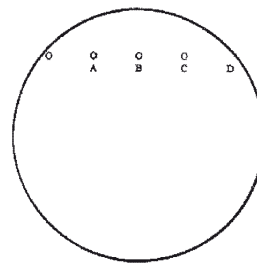
Ezután az 56 °C-os agarózból 15 ml-nyi mennyiséget keverjük össze a 15 ml szarvasmarhaszérum-hígítással (1:10), gyorsan rázzuk össze, és 15-15 ml-t öntsünk a két Petri-csésze mindegyikébe. Ismételjük meg az eljárást az 1:5-ös hígítású szarvasmarhaleukózis-szérummal.

Amikor az agaróz megszilárdult, a lyukakat a következők szerint kell elkészíteni:

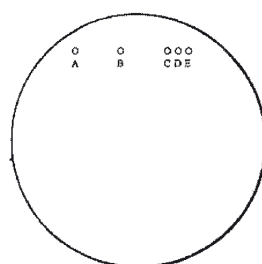
1. Petri-csésze
Szérum: 1:10



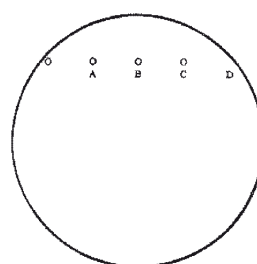
2. Petri-csésze
Szérum: 1:10



3. Petri-csésze
Szérum: 1:5



4. Petri-csésze
Szérum: 1:5



3. Az antigén hozzáadása:

a) 1. és 3. Petri-csésze:

- i. A. vájat – hígítatlan referencia-antigén;
- ii. B. vájat – 1:2 hígítású referencia-antigén;
- iii. C. és E. vájat – referencia-antigén;
- iv. D. vájat – hígítatlan vizsgálandó antigén.

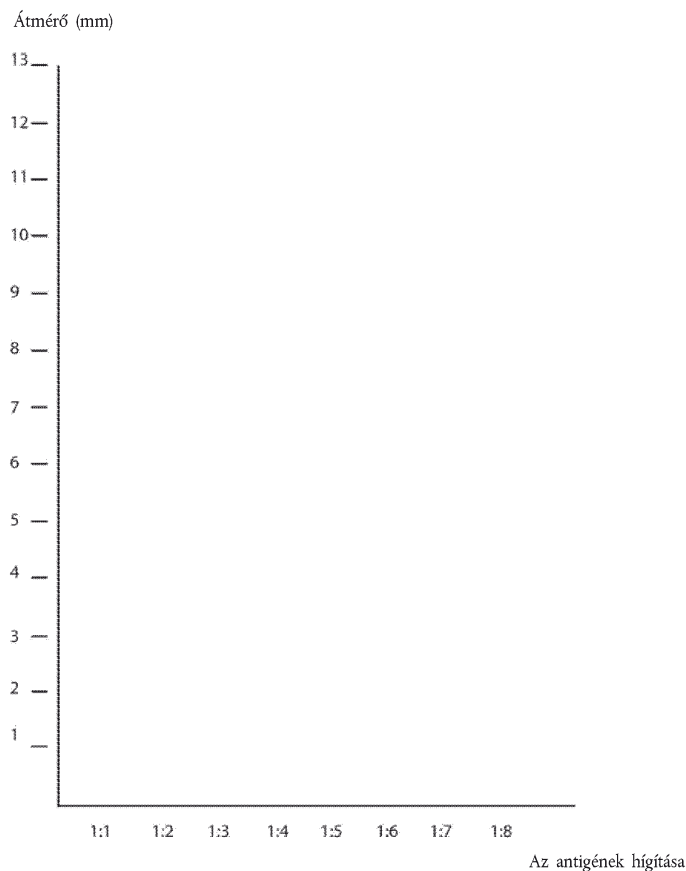
b) 2. és 4. Petri-csésze:

- i. A. vájat – hígítatlan vizsgálandó antigén;
- ii. B. vájat – 1:2 hígítású vizsgálandó antigén;
- iii. C. vájat – 1:4 hígítású vizsgálandó antigén;
- iv. D. vájat – 1:8 hígítású vizsgálandó antigén.

4. További utasítások:

- a) Az optimális precipitáció elérése érdekében a próbákat két szérumhígítással (1:5 és 1:10) kell elvégezni.
- b) Amennyiben a precipitációs gyűrű átmérője mindkét hígítás esetén túl kicsi, úgy a szérumot tovább kell hígítani.
- c) Amennyiben a precipitációs gyűrű átmérője mindkét hígítás esetén túl nagy és elmosódott, úgy alacsonyabb hígítási léptékű szérumot kell választani.
- d) Az agaróz végső koncentrációja 0,8 %, a szérumoké pedig 5, illetve 10 %.

- e) A mért átmérőket a következő koordinátarendszerben kell ábrázolni. A referencia-antigénnel azonos átmérőjű precipitációt mutató antigénhígítás a munkahígítás.



C. Enzimmötött immunoszorbens teszt (ELISA) alkalmazása enzootiás szarvasmarha-leukózis kimutatására

1. Az alkalmazandó anyagok és reagensek a következők:

- a) szilárd fázisú mikrolemezek, küvetták vagy más szilárd fázis;
- b) poliklonális vagy monoklonális elfogó ellenanyagok segítségével vagy anélkül a szilárd fázishoz rögzített antigén. Amennyiben az antigént közvetlenül a szilárd fázishoz kötik, minden pozitív reakciót mutató mintát a kontrollantigénnel újra meg kell vizsgálni. A kontrollantigénnek meg kell egyeznie az antigénnel, kivéve, ha a BLV antigének nincsenek jelen. Amennyiben elfogó ellenanyagokkal vonják be a szilárd fázist, az ellenanyagok kizárólag a BLV antigénekre reagálhatnak;
- c) a vizsgálandó biológiai folyadék;
- d) megfelelő pozitív és negatív kontroll;
- e) konjugátum;
- f) a használt enzimhez adaptált szubsztrát;
- g) szükség esetén leállító oldat;
- h) a reagensek előkészítésére, a vizsgálandó minták hígítására és lemosásra szolgáló oldatok;
- i) a használt szubsztrátnak megfelelő leolvasási rendszer.

2. A teszt standardizálása és érzékenysége

Az ELISA-teszt érzékenységének olyan fokúnak kell lennie, hogy az egyesített egyedi minták esetében kapott hígítás 10-szeresére (szérumminták esetében) vagy 250-szeresére (tejminták esetében) hígított E05 szérum pozitív eredményt adjon. A minták (szérum- és tejminták) egyedi vizsgálata esetén a (negatív szérumban) 1:10 arányban vagy (negatív tejben) 1:250 arányban hígított E05 szérumnak pozitív eredményt kell hoznia, ha az egyedi minták vizsgálatára alkalmazott hígítási fokkal megegyező hígításban vizsgálják. Az ELISA-teszt minőségének ellenőrzése és különösen az E05 szérummal kapott szám alapján az egyesítendő minták számának minden egyes termelési tétel esetében történő meghatározása az A. szakasz 2. pontjában említett intézetek feladata lesz.

3. Az ELISA-teszt enzootiás szarvasmarha-leukózis kimutatására való alkalmazásának feltételei

- a) Az ELISA-tesztek szérum- és tejmintákon alkalmazhatók.
 - b) Amennyiben az ELISA-tesztek a 6. cikk (2) bekezdésének c) pontjával összhangban bizonylatolási célokra, vagy a D. melléklet I. fejezetével összhangban valamely állomány státuszának megállapítására és fenntartására alkalmazzák, a szérum- és tejmintákat oly módon kell elegykezelni, hogy a vizsgálati mintákat egyértelműen hozzá lehessen rendelni ahhoz az állategyedhez, amelyből származó mintát az elegy tartalmazta. Az igazoló vizsgálatokat az egyes állategyedekből vett mintákon kell elvégezni.
 - c) Az ELISA-teszt alkalmazható valamely olyan gazdaságból gyűjtött tejből vett ömlesztettej-minta vizsgálatára, amelyben a tejelő tehenek legalább 30 %-a tejel. Az igazoló vizsgálatokat az egyes állategyedekből vett szérummintákon kell elvégezni.”
-