

**BESLUIT VAN DE COMMISSIE****van 15 december 2009****tot wijziging van bijlage D bij Richtlijn 64/432/EEG van de Raad wat betreft diagnosestests voor endemische runderleukose***(Kennisgeving geschied onder nummer C(2009) 9951)***(Voor de EER relevante tekst)***(2009/976/EU)*

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gelet op het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gelet op Richtlijn 64/432/EEG van de Raad van 26 juni 1964 inzake veterinaire rechtelijke vraagstukken op het gebied van het intracommunautaire handelsverkeer in runderen en varkens<sup>(1)</sup>, en met name op artikel 16, tweede alinea,

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) Richtlijn 64/432/EEG is van toepassing op het handelsverkeer in runderen binnen de Unie en hoofdstuk II van bijlage D stelt de diagnostische tests voor endemische runderleukose (EBL) vast die moeten worden gebruikt voor de bestrijding en uitroeiing van die ziekte en voor toezicht en bewaking, alsmede voor de vaststelling en handhaving van de officieel endemische runderleukosevrije status van een rundveebeslag en de voor het handelsverkeer in runderen binnen de Unie vereiste certificering.
- (2) Hoofdstuk II van bijlage D bij Richtlijn 64/432/EEG bepaalt dat de tests voor EBL moeten worden uitgevoerd met de agargel-immunodiffusietest (AGID) met gebruik van antigeen dat is gestandaardiseerd ten opzichte van het officiële EG-standaardserum (EI-serum) of met enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) dat is gestandaardiseerd ten opzichte van het E4-serum. Beide standaardsera worden geleverd door het National Veterinary Institute, Technical University of Denmark.
- (3) Er is onlangs een nieuw EBL-standaardserum (E05-serum) ontwikkeld door het referentielaboratorium voor endemische runderleukose van de Wereldgezondheidsorganisatie (OIE) in Duitsland (Friedrich-Loeffler-Institut) in samenwerking met de referentielaboratoria van de OIE in het Verenigd Koninkrijk (Veterinary Laboratories Agency) en Polen (National Veterinary Research Institute) na te zijn getest in een ringonderzoek tussen die laboratoria. Het E05-serum is ten opzichte van de EI- en E4-sera met verschillende AGID's en ELISA's gevalideerd en vervolgens als een geaccrediteerd OIE-standaardserum opgenomen in deel B(2) van hoofdstuk 2.4.11 van het

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals van de OIE, zesde editie, 2008. Dit serum is verkrijgbaar bij het referentielaboratorium van de OIE voor endemische runderleukose in Duitsland.

- (4) Bovendien heeft het National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, de Commissie meegedeeld dat het niet langer in staat is zijn verplichtingen na te komen wat betreft de levering van de standaardsera, als momenteel bepaald in hoofdstuk II van bijlage D bij Richtlijn 64/432/EEG.
- (5) De Duitse bevoegde autoriteiten en het Friedrich-Loeffler-Institut hebben ermee ingestemd om leverancier te worden van het E05-serum dat bijgevolg het nieuwe officiële standaardserum van de Europese Unie (EU) voor EBL zal worden.
- (6) Richtlijn 64/432/EEG moet daarom dienovereenkomstig worden gewijzigd.
- (7) De in dit besluit vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid,

HEEFT HET VOLGENDE BESLUIT VASTGESTELD:

*Artikel 1*

Hoofdstuk II van bijlage D bij Beschikking 64/432/EEG wordt vervangen door de tekst in de bijlage bij dit besluit.

*Artikel 2*

Dit besluit is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 15 december 2009.

Voor de Commissie  
Androulla VASSILIOU  
Lid van de Commissie

<sup>(1)</sup> PB 121 van 29.7.1964, blz. 1977/64.

## BIJLAGE

Hoofdstuk II van bijlage D bij Richtlijn 64/432/EEG wordt vervangen door:

## „HOOFDSTUK II

**TESTS VOOR HET OPSPOREN VAN ENDEMISCHE RUNDERLEUKOSE**

Voor de opsporing van endemische runderleukose wordt gebruikgemaakt van de agargel-immunodiffusietest (AGID) overeenkomstig het bepaalde in de delen A en B hieronder, of van de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) overeenkomstig het bepaalde in deel C hieronder. De agargel-immunodiffusietest mag alleen worden gebruikt voor het testen van individuele monsters. Indien de testresultaten op een naar behoren gemotiveerde wijze worden betwist, wordt een aanvullende controle verricht met behulp van de agargel-immunodiffusietest.

De AGID en ELISA worden gestandaardiseerd ten opzichte van het E05-serum, dat het officiële EU-standaardserum is en wordt geleverd door:

Friedrich-Loeffler-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Referentielaboratorium van de OIE voor endemische runderleukose (EBL)  
Südufer 10  
17493 Greifswald — Insel Riems  
DUITSLAND.

**A. Agargel-immunodiffusietest op endemische runderleukose**

1. Het bij deze test te gebruiken antigeen moet de glycoproteïnen van het runderleukosevirus bevatten. Het antigeen moet worden gestandaardiseerd ten opzichte van het E05-serum.
2. De rijksinstituten, nationale referentielaboratoria of officiële instellingen die overeenkomstig artikel 6 bis zijn aangewezen voor de coördinatie van de diagnosenormen en -methoden van de tests voor endemische runderleukose, moeten worden belast met het standaardiseren van het standaardantigeen van het laboratorium ten opzichte van het E05-serum.
3. Ten minste eenmaal per jaar dienen de in het laboratorium gebruikte standaardantigenen te worden voorgelegd aan de overeenkomstig artikel 6 bis aangewezen rijksinstituten, nationale referentielaboratoria of officiële instellingen om er ten opzichte van het E05-serum te worden getoetst. Bovendien kan het gebruikte antigeen ook worden gestandaardiseerd volgens de in deel B beschreven methode.
4. Voor de uitvoering van de tests zijn de volgende reagentia vereist:
  - a) antigeen: het antigeen moet glycoproteïnen bevatten die specifiek zijn voor het virus van endemische runderleukose dat is gestandaardiseerd ten opzichte van het E05-serum;
  - b) het testserum;
  - c) een controleserum waarvan bekend is dat het positief is;
  - d) agargel:
    - 0,8 % agar,
    - 8,5 % NaCl,
    - 0,05 M Tris-bufferoplossing pH 7,2,
    - 15 ml agar moet in een petrischaal met een diameter van 85 mm worden overgebracht, zodat het laagje agar een dikte heeft van 2,6 mm.
5. In de agar moeten zeven vochtvrije putjes worden gemaakt tot op de bodem van het schaalpje, en wel zodanig dat één putje in het midden ligt en de zes overige in een cirkel eromheen.

Diameter van het centrale putje: 4 mm

Diameter van de perifere putjes: 6 mm

Afstand tussen het centrale en de perifere putjes: 3 mm

6. Het centrale putje wordt gevuld met het standaardantigeen, de perifere putjes 1 en 4 (beschreven in B.3) met positief serum en de putjes 2, 3, 5 en 6 met testserum. De putjes moeten worden gevuld totdat de meniscus verdwijnt.
7. Dit resulteert in onderstaande hoeveelheden reagentia:
  - antigeen: 32 µl,
  - controleserum: 73 µl,
  - testserum: 73 µl.
8. Gedurende 72 uur bij kamertemperatuur (20-27 °C) incuberen in een gesloten vochtige kamer.
9. Aflezing van de test is reeds mogelijk 24 en 48 uur na het begin van de incubatie, maar het definitieve resultaat wordt pas na 72 uur verkregen:
  - a) een testserum is positief indien het een specifieke precipitatielijns vormt met het runderleukosevirus (BLV)-antigeen en een volledig identieke lijn met het controleserum;
  - b) een testserum is negatief indien het geen specifieke precipitatielijns vormt met het BLV-antigeen en indien het de lijn van het controleserum niet buigt;
  - c) de reactie wordt geacht geen uitsluitel te geven indien:
    - i) de lijn van het controleserum wel in de richting van het BLV-antigeen wordt gebogen, maar het testserum toch geen duidelijke precipitatielijns vormt met het antigeen, of
    - ii) de reactie niet duidelijk positief of negatief is.

Indien de reactie geen uitsluitel geeft, kan de test worden overgedaan met geconcentreerd serum.
10. De putjes mogen volgens een ander patroon worden aangebracht, op voorwaarde dat het E05-serum in de verdunning 1:10 (in negatief serum) een positieve reactie te zien geeft.

## **B. Methode voor standaardisatie van het antigeen**

### **1. Oplossingen en materiaal:**

- a) 40 ml agar (1,6 %) in 0,05 M Tris/HCl-bufferoplossing, pH 7,2 met 8,5 % NaCl;
- b) 15 ml runderleukoseserum met alleen antilichamen die gericht zijn tegen de glycoproteïnen van het runderleukosevirus, verdunning 1:10 in 0,05 M Tris/HCl-bufferoplossing, pH 7,2 met 8,5 % NaCl;
- c) 15 ml runderleukoseserum met alleen antilichamen die gericht zijn tegen de glycoproteïnen van het runderleukosevirus, verdunning 1:5 in 0,05 M Tris/HCl-bufferoplossing, pH 7,2 met 8,5 % NaCl;
- d) vier plastic petrischaaltjes met een diameter van 85 mm;
- e) een buisje met een diameter van 4-6 mm;
- f) een referentieantigeen;
- g) het te standaardiseren antigeen;
- h) een waterbad (56 °C).

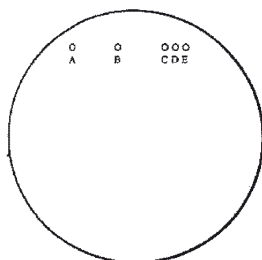
### **2. Procedure:**

De agar (1,6 %) oplossen in de Tris/HCl-buffervloeistof door het mengsel voorzichtig te verwarmen tot 100 °C. Daarna gedurende ongeveer één uur in het waterbad (56 °C) plaatsen. Ook het verdunde runderleukoseserum in het waterbad (56 °C) plaatsen.

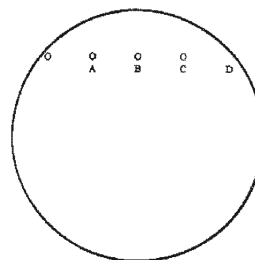
Vervolgens 15 ml van de agaroplossing (56 °C) vermengen met de 15 ml runderleukoseserum (1:10), snel schudden en het mengsel in twee petrischaaltjes gieten, 15 ml in elk schaalje. Deze procedure herhalen met het runderleukoseserum in de verdunning 1:5.

Wanneer de agar hard is geworden, dienen daarin met het buisje putjes te worden gemaakt volgens onderstaand schema:

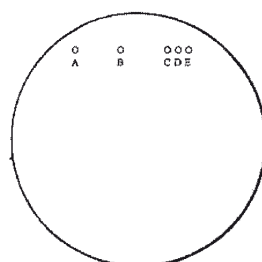
Petrischaaltje nr. 1  
Serum 1:10



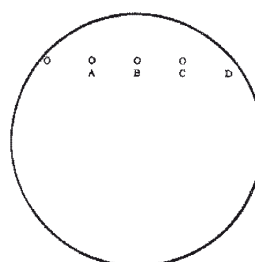
Petrischaaltje nr. 2  
Serum 1:10



Petrischaaltje nr. 3  
Serum 1:5



Petrischaaltje nr. 4  
Serum 1:5



### 3. Toevoeging van antigeen:

#### a) petrischaaltjes 1 en 3:

- i) putje A — onverdund referentieantigeen,
- ii) putje B — referentieantigeen in de verdunning 1:2,
- iii) putjes C en E — referentieantigeen,
- iv) putje D — onverdund te standaardiseren antigeen;

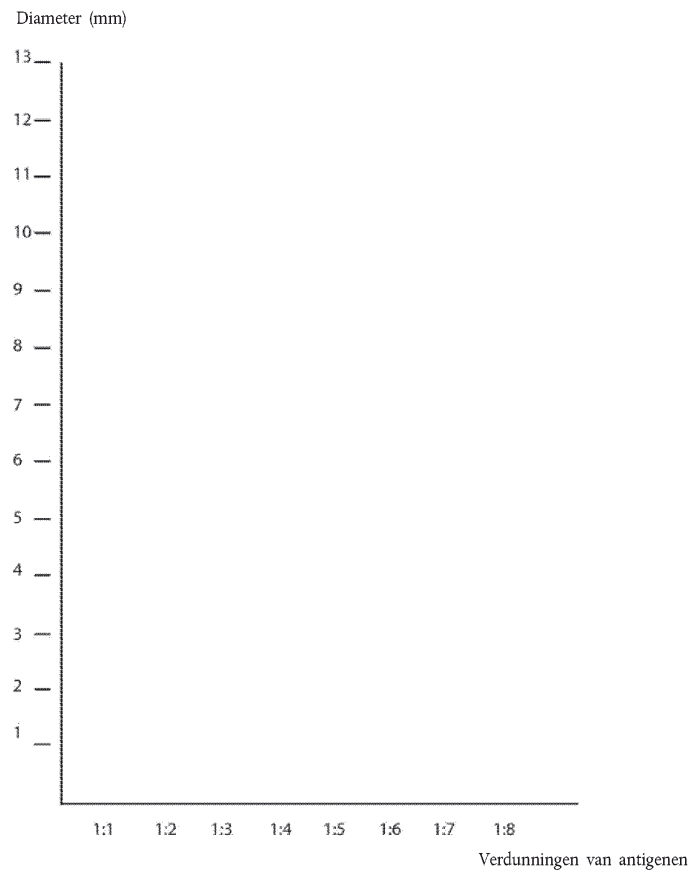
#### b) petrischaaltjes 2 en 4:

- i) putje A — onverdund te standaardiseren antigeen,
- ii) putje B — te standaardiseren antigeen in de verdunning 1:2,
- iii) putje C — te standaardiseren antigeen in de verdunning 1:4,
- iv) putje D — te standaardiseren antigeen in de verdunning 1:8.

### 4. Aanvullende aanwijzingen:

- a) met het oog op een optimale precipitatie moet de test worden uitgevoerd met twee verschillende verdunningen van het serum (1:5 en 1:10);
- b) indien de precipitatie diameter met beide verdunningen te klein is, moet het serum verder worden verdund;
- c) indien de precipitatie diameter met beide verdunningen te groot is en te onduidelijk, moet een minder sterke verdunning van het serum worden genomen;
- d) de uiteindelijke concentratie van de agar moet 0,8 % bedragen, die van de sera 5 respectievelijk 10 %;

- e) de gemeten diameters dienen op bijgevoegd coördinatenstelsel te worden geplot. De verdunning van het te standaardiseren antigeen die dezelfde diameter heeft als het referentieantigeen moet worden aangehouden.



### C. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) voor het opsporen van endemische runderleukose

1. De volgende materialen en reagentia moeten worden gebruikt:

- a) microtiterplaten, cuvettes of ander vast dragermateriaal;
- b) het antigeen wordt met of zonder behulp van polyklonale of monoklonale antilichamen op de vaste drager gefixeerd. Indien directe coating van de vaste drager met het antigeen wordt toegepast, moeten alle positief reagerende monsters opnieuw worden getoetst aan het controleantigeen. Het controleantigeen moet identiek zijn aan het gebruikte antigeen, behalve dat de antigenen van het runderleukosevirus afwezig zijn. Indien coating van de vaste drager met antilichamen wordt toegepast, mogen de antilichamen alleen reageren met de antigenen van het runderleukosevirus en niet met andere antigenen;
- c) de te testen lichaamsvloeistof;
- d) een overeenkomstig positief en negatief controleserum;
- e) een conjugaat;
- f) een op het gebruikte enzym afgestemd substraat;
- g) eventueel een remmingsoplossing;
- h) oplossingen voor de verdunning van de te onderzoeken monsters, de bereiding van reagentia en het spoelen van de vaste dragers;
- i) een aan het gebruikte substraat aangepast afleessysteem.

## 2. Standaardisatie en gevoeligheid van de testmethode

De gebruikte ELISA moet zo gevoelig zijn dat het E05-serum een positieve reactie te zien geeft wanneer het (voor serummonsters) 10 keer of (voor melkmonsters) 250 keer sterker is verdund dan de verdunning die met gegroepeerde individuele monsters wordt verkregen. Indien een testmethode wordt toegepast waarbij monsters (serum- en melkmonsters) individueel worden onderzocht, moet het E05-serum in de verdunning 1:10 (in negatief serum) of 1:250 (in negatieve melk) een positieve reactie te zien geven, wanneer het in eenzelfde verdunningsgraad wordt onderzocht als de individuele monsters. De in deel A, punt 2, genoemde instellingen zijn verantwoordelijk voor de kwaliteitscontrole van de ELISA en zij moeten met name voor elke productiepartij bepalen hoeveel monsters, naargelang van het voor het E05-serum verkregen gehalte, moeten worden gegroepeerd.

## 3. Voorwaarden voor het gebruik van de ELISA bij endemische runderleukose

- a) ELISA's mogen worden gebruikt bij serum- en melkmonsters.
  - b) Wanneer ELISA's worden gebruikt voor certificeringsdoeleinden overeenkomstig artikel 6, lid 2, onder c), of voor het bepalen en handhaven van de gezondheidsstatus van een beslag overeenkomstig bijlage D, deel I, moet het vormen van mengmonsters van serum of melk zodanig worden uitgevoerd dat de voor onderzoek genomen monsters onomstotelijk kunnen worden gerelateerd aan de individuele dieren in het mengmonster. Tests ter bevestiging moeten worden uitgevoerd op monsters van individuele dieren.
  - c) Wanneer ELISA's worden gebruikt op een verzamelmelkmonster, moet dit monster worden genomen van de melk van een beslag met ten minste 30 % lacterende melkkoeien. Tests ter bevestiging moeten worden uitgevoerd op monsters van serum of melk van elk individueel dier.”.
-