ROZHODNUTÍ KOMISE

ze dne 15. prosince 2009,

kterým se mění příloha D směrnice Rady 64/432/EHS, pokud jde o diagnostické testy na enzootickou leukózu skotu

(oznámeno pod číslem K(2009) 9951)

(Text s významem pro EHP)

(2009/976/EU)

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na směrnici Rady 64/432/EHS ze dne 26. června 1964 o veterinárních otázkách obchodu se skotem a prasaty uvnitř Společenství [1], a zejména na čl. 16 druhý pododstavec uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Směrnice 64/432/EHS se týká obchodu se skotem uvnitř Unie a kapitola II přílohy D uvedené směrnice stanoví diagnostické testy na enzootickou leukózu skotu, které by se měly používat k tlumení a eradikaci této choroby a k dozoru a monitorování, jakož i ke stanovení a udržení statusu stáda úředně prostého enzootické leukózy skotu a k vystavení osvědčení pro obchod se skotem uvnitř Unie.

(2) Kapitola II přílohy D směrnice 64/432/EHS stanoví, že testy na enzootickou leukózu skotu se provádějí buď agarovým imunodifuzním testem (AGID) za použití antigenu standardizovaného srovnáním s úředním referenčním sérem ES (EI sérum), nebo enzymoimunoanalýzou (ELISA) srovnáním s referenčním sérem E4. Obě referenční séra dodává Národní veterinární ústav, Technická univerzita v Dánsku (National Veterinary Institute, Technical University of Denmark).

(3) Referenční laboratoř pro enzootickou leukózu skotu Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE) v Německu (Friedrich-Loeffler-Institute) ve spolupráci s referenčními laboratořemi OIE ve Spojeném království (Veterinary Laboratories Agency) a v Polsku (National Veterinary Research Institute) nedávno vyvinula nové referenční sérum na enzootickou leukózu skotu (sérum E05), poté, co bylo sérum vyzkoušeno kruhovým testem mezi uvedenými laboratořemi. Sérum E05 bylo validováno srovnáním se séry EI a E4 různými testy AGID a ELISA a následně bylo zařazeno do kapitoly 2.4.11 oddílu B odst. 2 Příručky norem pro diagnostické testy a očkovací látky pro suchozemská zvířata Světové organizace pro zdraví zvířat, šestého vydání z roku 2008, jako akreditované referenční sérum OIE. Toto sérum je k dispozici u referenční laboratoře pro enzootickou leukózu skotu Světové organizace pro zdraví zvířat v Německu.

(4) Kromě toho Komisi informoval Národní veterinární ústav, Technická univerzita v Dánsku, že nadále nemůže plnit své povinnosti ohledně dodávek referenčního séra, jež je v současné době stanoveno v příloze D kapitole II směrnice 64/432/EHS.

(5) Příslušné německé orgány a Friedrich-Loeffler-Institute se dohodly, že budou dodávat sérum E05, které se následně stane novým úředním referenčním sérem pro enzootickou leukózu skotu Evropské unie (EU).

(6) Směrnice 64/432/EHS by proto měla být odpovídajícím způsobem změněna.

(7) Opatření stanovená tímto rozhodnutím jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

Oddíl II přílohy D směrnice 64/432/EHS se nahrazuje zněním přílohy tohoto rozhodnutí.

Článek 2

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

V Bruselu dne 15. prosince 2009.

Za Komisi

Androulla VASSILIOU

členka Komise

[1] Úř. věst. 121, 29.7.1964, s. 1977/64.

PŘÍLOHA

Kapitola II přílohy D směrnice 64/432/EHS se nahrazuje tímto:

„KAPITOLA II

TESTY NA ENZOOTICKOU LEUKÓZU SKOTU

Testy na enzootickou leukózu skotu se provádějí agarovým imunodifuzním testem (AGID) za podmínek uvedených v oddílu A a B nebo enzymoimunoanalýzou (ELISA) za podmínek uvedených v oddíle C. Agarový imunodifuzní test se může používat pouze při testování individuálních vzorků. Jsou-li výsledky testů důvodně zpochybněny, provede se doplňková kontrola prostřednictvím agarového imunodifuzního testu.

AGID a ELISA budou normalizovány srovnáním se sérem E05, které bude úředním referenčním sérem EU a bude ho dodávat:

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

A. **Agarový imunodifuzní test na enzootickou leukózu skotu**

1. Antigen, který se použije v tomto testu, musí obsahovat glykoproteiny viru leukózy skotu. Antigen musí být standardizován srovnáním se sérem E05.

2. Státní ústavy, národní referenční laboratoře nebo úřední ústavy určené v souladu s článkem 6a ke koordinaci norem a diagnostických metod testů na enzootickou leukózu skotu jsou pověřeny kalibrací referenčního pracovního antigenu laboratoře podle séra E05.

3. Referenční antigeny používané v laboratoři budou nejméně jednou za rok předloženy státním ústavům, národním referenčním laboratořím nebo úředním ústavům určeným v souladu s článkem 6a ke srovnání se sérem E05. Kromě této standardizace může být použitý antigen kalibrován v souladu s metodou popsanou v oddíle B.

4. Reakční činidla testu jsou:

   a) antigen: antigen musí obsahovat specifické glykoproteiny viru enzootické leukózy skotu standardizované srovnáním se sérem E05;

   b) testované sérum;

   c) pozitivní kontrolní sérum;

   d) agarové želé:

      — 0,8 % agaru,

      — 8,5 % NaCl,

      — 0,05 M Tris-pufr pH 7,2,

      — 15 ml tohoto agaru musí být vloženo do Petriho misky o průměru 85 mm s výslednou výškou agaru 2,6 mm.

5. Do agaru se až na dno misky vyhloubí zkušební vzorec sedmi jamek prostých vlhkosti; vzorec se skládá z jedné ústřední jamky a šesti jamek v kruhu okolo ní.

   Průměr ústřední jamky: 4 mm

   Průměr obvodových jamek: 6 mm

   Vzdálenost mezi ústřední a obvodovou jamkou: 3 mm

6. Ústřední jamka se naplní referenčním antigenem. Obvodové jamky 1 a 4 (viz oddíl B odst. 3) se naplní známým pozitivním sérem; jamky 2, 3, 5 a 6 testovaným sérem. Jamky se naplní až do zmizení menisku.

7. To znamená, že v jamkách je:

   — 32 µl antigenu,

   — 73 µl kontrolního séra,

   — 73 µl testovaného séra.

8. Inkubace trvá 72 hodin při pokojové teplotě (20 až 27 °C) v uzavřené vlhké komoře.

9. Test lze odečítat po 24 nebo 48 hodinách, avšak konečný výsledek lze získat až po 72 hodinách:

   a) testované sérum je pozitivní, jestliže vytvoří specifickou křivku precipitace s antigenem viru leukózy skotu (BLV), která je totožná s kontrolním sérem;

   b) testované sérum je negativní, jestliže nevytvoří specifickou křivku precipitace s antigenem BLV a jestliže nezakřiví křivku kontrolního séra;

   c) reakci nelze považovat za průkaznou, jestliže:

      i) zakřiví křivku kontrolního séra směrem k antigenu BLV, aniž by se vytvořila viditelná křivka precipitace s antigenem, nebo

      ii) ji nelze vykládat jako pozitivní ani negativní.

   Při neprůkazné reakci lze test opakovat s koncentrovaným sérem.

10. Lze použít jakoukoliv jinou konfiguraci nebo jiný vzorec jamek za podmínky, že při použití séra E05 smíchaného v poměru 1:10 s negativním sérem vznikne pozitivní reakce.

B. **Metoda standardizace antigenu**

1. Potřebné roztoky a materiál:

   a) 40 ml 1,6 % agarózy s 0,05 M Tris/HCl pufrem, pH 7,2, v 8,5 % NaCl;

   b) 15 ml séra leukózy skotu s protilátkami pouze na glykoproteiny viru leukózy skotu, smíchaného v poměru 1:10 s 0,05 M Tris/HCl pufrem, pH 7,2, v 8,5 % NaCl;

   c) 15 ml séra leukózy skotu s protilátkami pouze na glykoproteiny viru leukózy skotu, smíchaného v poměru 1:5 s 0,05 M Tris/HCl pufrem, pH 7,2, v 8,5 % NaCl;

   d) čtyři umělohmotné Petriho misky o průměru 85 mm;

   e) razidlo o průměru 4–6 mm;

   f) referenční antigen;

   g) antigen, který se má standardizovat;

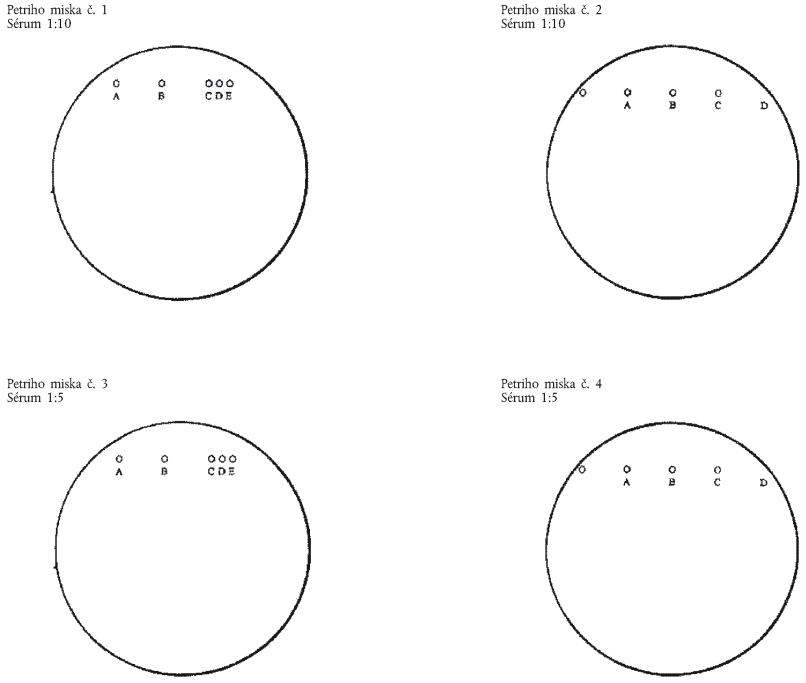
   h) vodní lázeň (56 °C).

2. Postup:

   Rozpusťte agarózu (1,6 %) v 0,05 M Tris/HCl pufru opatrným zahřáním na 100 °C. Přibližně na jednu hodinu ji umístěte do vodní lázně o teplotě 56 °C. Do vodní lázně o teplotě 56 °C rovněž umístěte roztok séra bovinní leukózy.

   Nyní smíchejte 15 ml roztoku agarózy zahřátého na 56 °C s 15 ml séra leukózy skotu (1:10), rychle zamíchejte a vlijte 15 ml do obou Petriho misek. Zopakujte tento postup se sérem leukózy skotu v ředění 1:5.

Když agaróza ztuhne, vyhlubte jamky takto:



3. Přidání antigenu:

   a) Petriho misky 1 a 3:

      i) jamka A – neředěný referenční antigen,

      ii) jamka B – referenční antigen ředěný 1:2,

      iii) jamky C a E – referenční antigen,

      iv) jamka D – neředěný testovaný antigen.

   b) Petriho misky 2 a 4:

      i) jamka A – neředěný testovaný antigen,

      ii) jamka B – testovaný antigen ředěný 1:2,

      iii) jamka C – testovaný antigen ředěný 1:4,

      iv) jamka D – testovaný antigen ředěný 1:8.

4. Další pokyny:

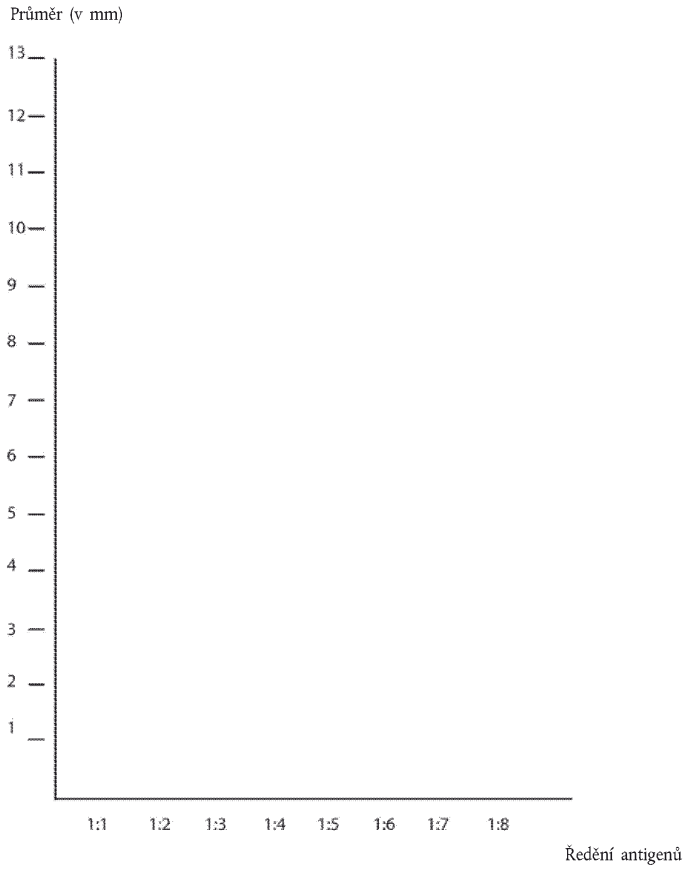
   a) pokus se provede se dvěma ředěními séra (1:5 a 1:10) za účelem dosažení optimální precipitace;

   b) je-li průměr precipitace příliš malý v případě obou ředění, musí být sérum dále ředěno;

   c) je-li průměr precipitace v obou případech příliš velký a neznatelný, musí se vybrat sérum s nižším ředěním;

   d) konečná koncentrace agarózy musí být 0,8 %, koncentrace séra 5 a 10 %;

e) zaneste naměřené průměry do následujícího souřadnicového systému. Pracovní ředění testovaného antigenu je to ředění, které vykazuje stejný průměr jako referenční antigen.



C. **Enzymoimunoanalýza (ELISA) pro zjištění enzootické leukózy skotu**

1. Použije se následující materiál a reakční činidla:

a) mikrodestičky pevné fáze, kyvety nebo jiná pevná fáze;

b) antigen se naváže na pevnou fázi, též pomocí polyklonových nebo monoklonových protilátek. Je-li antigen navázán přímo na pevnou fázi, musí být všechny zkušební vzorky s pozitivní reakcí znovu testovány srovnáním s referenčním antigenem. Referenční antigen by měl být stejný jako testovaný antigen s výjimkou toho, že nejsou přítomny antigeny BVL. Jsou-li protilátky navázány na pevnou fázi, nesmí reagovat s jinými antigeny než antigeny BLV;

c) testovaná biologická kapalina;

d) odpovídající pozitivní a negativní kontrola;

e) konjugát;

f) substrát přizpůsobený použitému enzymu;

g) roztok k zastavení reakce, pokud je třeba;

h) roztoky pro ředění testovaných vzorků, pro přípravu reakčních látek a pro promývání;

i) odečítací systém vhodný pro použitý substrát.

2. Standardizace a citlivost testu:

Citlivost testu ELISA musí být taková, aby sérum E05 vykazovalo pozitivní reakci, je-li ředěno 10 × (vzorky séra) nebo 250 × (vzorky mléka) více než ředění jednotlivých vzorků pocházejících z bazénového vzorku. Při testech, kdy jsou vzorky (sérum a mléko) vyšetřovány jednotlivě, musí sérum E05 zředěné 1:10 (negativní sérum) nebo 1:250 (negativní mléko) vykazovat pozitivní reakci, je-li testováno ve stejném ředění jako jednotlivé testované vzorky. Ústavy uvedené v oddílu A odst. 2 jsou pověřeny kontrolou jakosti testů ELISA a zejména za určení počtu vzorků, které se pro výrobní šarži sloučí do bazénového vzorku na základě odečtu získaného pro sérum E05.

3. Podmínky pro použití testu ELISA ke zjištění enzootické leukózy skotu:

a) testy ELISA mohou být používány na vzorku séra a mléka;

b) pokud se testy ELISA používají pro účely osvědčování v souladu s čl. 6 odst. 2 písm. c) nebo pro stanovení a udržení statusu stáda v souladu s přílohou D kapitolou I, provádí se vkládání vzorků séra nebo mléka do směsi takovým způsobem, aby vzorky odebrané k vyšetření měly nepochybný vztah k jednotlivému zvířeti zahrnutému ve směsném vzorku. Případný potvrzovací test se musí provádět na vzorcích odebraných od jednotlivých zvířat;

c) používají-li se testy ELISA na směsném vzorku mléka, odebere se tento vzorek z mléka shromážděného ze stáda s nejméně 30 % dojnic v laktaci. Případný potvrzovací test se provádí na vzorcích séra nebo mléka odebraných od jednotlivých zvířat.“