388L0406

22.7.88 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* N:o L 194/1

NEUVOSTON DIREKTIIVI,

annettu 14 päivänä kesäkuuta 1988,

direktiivin 64/432/ETY muuttamisesta nautaeläinten tarttuvan leukoosin osalta ja direktiivin 80/1102/ETY kumoamisesta

(88/406/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN NEUVOSTO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen ja erityisesti sen 43 artiklan,

ottaa huomioon komission ehdotuksen(1),

ottaa huomioon Euroopan parlamentin lausunnon(2),

ottaa huomioon talous- ja sosiaalikomitean lausunnon(3),

sekä katsoo, että

eräs yhteisön tehtävistä eläinlääkinnän alalla on parantaa karjan terveydentilaa ja nostaa karjankasvatuksen tuottavuutta,

on tarvetta suojata yhteisö nautaeläinten tarttuvan leukoosin varalta; yhteisö on direktiiveillä 77/391/ETY(4) ja 78/52/ETY(5) ja päätöksellä 87/58/ETY(6) jo toteuttanut toimenpiteitä tämän taudin hävittämiseksi,

tämän kaltaisten toimenpiteiden on myös osaltaan helpotettava niiden jäsenvaltioiden välisen elävien eläinten kaupan esteiden poistamista, jotka johtuvat terveydellisten olosuhteiden välisistä eroista,

tämän päämäärän saavuttamiseksi on eläinten terveyteen liittyvistä ongelmista yhteisön sisäisessä nautaeläinten ja sikojen kaupassa 26 päivänä kesäkuuta 1964 annetulla neuvoston direktiivillä 64/432/ETY(7), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella 3805/87(8), 31 päivään joulukuuta 1987 asti otettu käyttöön suojatoimenpiteet nautaeläinten tarttuvaa leukoosia vastaan,

näitä toimenpiteitä on tarpeen jatkaa ottaen samalla huomioon uudet menetelmät nautaeläinten tarttuvan leukoosin toteamiseksi,

siirtymäkauden päättyessä on nykyisillä sopimuksilla säädetyt erityissäännökset kumottava niiden maiden osalta, jotka ovat täytäntöönpanneet kansallisia ohjelmia tämän taudin vastustamiseksi,

olisi säädettävä karjojen kelpoisuudesta nautaeläinten tarttuvan leukoosin osalta,

jäsenvaltioiden on karjojensa kelpuuttamiseksi toteutettava sellainen ohjelma, jossa niiden karjat tutkitaan yhdellä direktiivin 64/432/ETY liitteessä G säädetyllä leukoosin toteavalla tutkimuksella, ja

lukuun ottamatta vähemmän kuin 30 kuukauden ikäisiä teuraseläimiä, yhteisön sisäiseen kauppaan tarkoitettujen eläinten on oltava lähtöisin testatusta karjasta ja ne on oltava yksilökohtaisesti tutkittuja,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Muutetaan direktiiviä 64/432/ETY 1 päivästä heinäkuuta 1988 alkaen seuraavasti:

(1) EYVL N:o C 5, 9.1.1988, s. 5
(2) EYVL N:o C 49, 22.2.1988, s. 164
(3) EYVL N:o C 80, 28.3.1988, s. 34
(4) EYVL N:o L 145, 13.6.1977, s. 44
(5) EYVL N:o L 15, 19.1.1978, s. 34
(6) EYVL N:o L 24, 27.1.1987, s. 51
(7) EYVL N:o 121, 29.7.1964, s. 1977/64
(8) EYVL N:o L 357, 19.12.1987, s. 1

1 Lisätään 2 artiklaan seuraavat alakohdat:

"s) "nautaeläinten tarttuvasta leukoosista vapaalla karjalla" tarkoitetaan karjaa, jossa

i) ei ole saatu todisteita, jotka ovat joko kliinisiä tai liitteen G mukaan suoritetuista tutkimuksista saatuja tuloksia, yhdestäkään nautaeläinten tarttuvan leukoosin tapauksesta eikä yhtään tällaista tapausta ole vahvistettu kahden edellisen vuoden aikana;

ii) yli 24 kuukauden ikäisillä eläimillä on 12 edeltävän kuukauden aikana ollut kielteinen tutkimustulos kahdessa, ainakin 4 kuukauden väliajoin liitteen G mukaan suoritetussa tutkimuksessa, tai kun on kyse tämän vaatimuksen jo täyttävästä karjasta, on ollut kielteinen tutkimustulos yhdessä tämän liitteen mukaan suoritetussa tutkimuksessa;

iii) ensimmäisen tutkimuksen ajankohdan jälkeen karjaan tulleet uudet eläimet ovat yksinomaan eläimiä, jotka ovat syntyneet siihen tai jotka ovat lähtöisin nautaeläinten tarttuvasta leukoosista vapaasta karjasta".

2 Lisätään 3 artiklan 2 kohtaan seuraavat alakohdat:

"j) kun kyse on direktiivin 77/504/ETY 1 artiklassa olevan määritelmän mukaisista sellaisista puhdasrotuisista jalostusnautaeläimistä, joita aiotaan käyttää ainostaan lisääntymistarkoituksissa ja jotka ovat hyvin arvokkaita, ja jotka ovat peräisin karjasta:

i) jonka osalta virkaeläinlääkärin tietoon ei ole tullut yhtään tosiseikkaa, josta voisi tulla siihen johtopäätökseen, että nautaeläinten tarttuvaa leukoosia koskevia tapauksia olisi ilmaantunut kahden edellisen vuoden aikana;

ii) jonka omistaja on ilmoittanut, että hänen tiedossaan ei ole yhtään tällaista tapausta ja on lisäksi antanut kirjallisen selvityksen siitä, että eläin tai yhteisön sisäiseen kauppaan aiotut eläimet ovat joko syntyneet mainitussa karjassa ja kasvatettu siinä tai ovat pysyneet sen olennaisena osana 12 edellisen kuukauden ajan".

3 Lisätään 3 artiklan 3 kohtaan seuraavat alakohdat:

"d) polveutuvat karjasta, jossa ei ole esiintynyt merkkejä nautaeläinten tarttuvasta leukoosista kahden edellisen vuoden aikana, ja jos ne ovat yli 12 kuukauden ikäisiä, ovat antaneet kielteisen tutkimustuloksen yksilökohtaisessa tutkimuksessa, joka on suoritettu liitteen G mukaisesti 30 päivän aikana ennen kuljetukseen lastaamista.

Tätä tutkimusta ei kuitenkaan vaadita alle 30 kuukauden ikäisistä kuohituista urospuolisista naudoista, joita on aikomus käyttää lihan tuotantoon, jos näiden eläinten tunnistamiseksi käytetään erityistä merkintää kuljetukseen lastattaessa ja että jäsenvaltiot ryhtyvät kaikkiin toimenpiteisiin kotoisten karjojen tartunnan estämiseksi".

4 Lisätään 7 artiklan 1 kohtaan seuraava alakohta:

"G. Lihantuotantoon aiotut naaraspuoliset, nuoremmat kuin 30 kuukauden ikäiset nautaeläimet, joille, sen estamättä, mitä 3 artiklan 3 kohdan d alakohdassa säädetään, ei ole tehty yksilökohtaista tutkimusta. Tällaiset eläimet on varustettava erityismerkinnällä. Vastaanottavan jäsenvaltion on toteutettava kaikki toimenpiteet kotimaisten karjojen saastumisen estämiseksi".

5 Lisätään 8 artiklan 2 kohtaan seuraavat virkkeet:

"Erityisesti nautaeläinten tarttuvan leukoosin osalta ja 3 artiklan 2 kohdan j alakohdassa tarkoitettujen eläinten ollessa kyseessä, jäsenvaltiot ovat oikeutettuja, ottaen huomioon perustamissopimuksen yleiset määräykset, lisäksi vaatimaan, että kaikki sen karjan yksilöt, josta eläimet ovat peräisin, jotka tutkimusajankohtana ovat olleet yli 24 kuukauden ikäisiä, ovat antaneet kielteisen tutkimustuloksen liitteen G mukaan suoritetussa tutkimuksessa. Näitä takuita ei vaadita tuotaessa eläimiä jäsenvaltiosta, jonka 12 artiklassa säädetyn menettelytavan mukaan on tunnustettu antavan riittävät takeet nautaeläinten tarttuvan leukoosin osalta".

6 Lisätään seuraava artikla:

"8 a artikla

1 Jäsenvaltiot, joissa vuodesta 1980 alkaen on sovellettu käytäntöön pakollista kansallista ohjelmaa nautaeläinten tarttuvan leukoosin hävittämiseksi, voivat asettaa leukoosiepäilyistä vapaisiin karjoihin yhdistettäväksi aiottujen ja jalostukseen tai tuotantoon tarkoitettujen nautaeläinten alueelleen tuomisen edellytykseksi sellaisen todistuksen esittämisen, jonka toimivaltainen virkaeläinlääkäri on antanut lastauspäivänä ja joka on laadittu vähimmäisvaatimuksena määrämaan kielellä tai kielillä ja jossa todistetaan,

a) että eläinlääkärin tiedossa ei ole tosiseikkoja, joista voitaisiin päätellä nautaeläinten tarttuvaa leukoosia esiintyneen kolmen edellisen vuoden aikana karjassa, josta ne ovat peräisin ja että hän on lisäksi antanut kirjallisen selvityksen siitä, että yhteisön sisäiseen kauppaan tarkoitettu eläin tai tarkoitetut eläimet ovat joko syntyneet mainitussa karjassa ja kasvatettu siinä tai ovat pysyneet sen olennaisena osana 12 edellisen kuukauden ajan;

b) että 12 edellisen kuukauden aikana kaikki nautaeläimet, jotka tutkimuksen ajankohtana ovat olleet yli 24 kuukauden ikäisiä ja muodostaneet osan alkuperäisestä karjasta, josta ne ovat peräisin, ovat antaneet kielteisen tutkimustuloksen liitteen G mukaisesti suoritetussa tutkimuksessa.

2 Noudattaen 12 artiklassa säädettyä menettelyä, voidaan jäsenvaltiot, jotka ovat muita kuin 1 kohdassa tarkoitettuja valtioita, oikeuttaa soveltamaan aluettaan koskevia, tai, kun on kyse Yhdistyneestä kuningaskunnasta, Pohjois-Irlantia koskevia, samanlaisia vaatimuksia, jos niissä ollaan toteuttamassa päätöksen 87/58/ETY mukaista suunnitelmaa nautaeläinten tarttuvan leukoosin hävittämiseksi tai jos voidaan osoittaa, että sinä ajankohtana, jolloin asia on saatettu pysyvän eläinlääkintäkomitean käsiteltäväksi, ne ovat soveltaneet alueellaan taudin hävittämiseksi ainakin kahden vuoden ajan vähimmäisohjelmaa, johon sisältyvät seuraavat vähimmäisvaatimukset:

— kaikista nautaeläinten elimissä ja lymfaattisessa järjestelmässä tavatuista kasvaimista on tehtävä viralinen ilmoitus ja liitteessä G mainitun laboratorion välittömän valvonnan alaisen eläinlääketieteellisen laboratorion on tutkittava ne histologisesti,

— nautaeläinten tarttuva leukoosi on tutkittava liitteessä G olevien vaatimusten mukaisesti sellaisessa karjassa olevista kaikista nautaeläimistä, jotka ovat olleet tartuntavaaran aiheuttavassa kosketuksessa leukoottisista kasvaimista kärsiväksi havaittuun eläimeen, ja tutkimus on suoritettava tässä liitteessä mainitun laboratorion suoraan valvomassa laboratoriossa,

— karjasta, jossa eläin on havaittu leukoottisen kasvaimen vaivaamaksi ja nautaeläinten tarttuvan leukoosin diagnoosi on varmistettu, voidaan infektoituneet eläimet viedä pois ainoastaan silloin kun ne viedään eläinlääkintäviranomaisten valvonnassa teurastettaviksi. Karjan on jäätävä viranomaisten valvontaan siihen asti, kunnes kaikista sen yli 24 kuukauden ikäisistä nautaeläimistä on saatu kielteinen tutkimustulos ainakin kahdesta ainakin neljän kuukauden väliajoin ja liitteessä G olevien vaatimusten mukaisesti liitteessä G mainitun laboratorion välittömän valvonnan alaisessa laboratoriossa suoritetusta tutkimuksesta.

Ensimmäisessä alakohdassa tarkoitetussa päätöksessä voidaan täsmentää lisäedellytyksiä, joita voidaan asettaa tälle laajennukselle kunkin jäsenvaltion tai sen osan osalta."

7 Lisätään liitteessä E olevan a alakohdan loppuun seuraava luetelmakohta:

"— nautaeläinten tarttuva leukoosi".

8 Liitteessä F olevassa mallissa I:

a) Muutetaan V kohtaa seuraavasti:

aa) lisätään d alakohdan jälkeen seuraavat alakohdat:

"e) — 12 edellisen kuukauden ajan([5]) tai jos ne ovat vähemmän kuin 12 kuukauden ikäisiä, niitä on syntymästään asti pidetty karjassa, jossa kolmen edellisen vuoden aikana([5]) allekirjoittaneen tiedossa ja omistajan antaman selvityksen mukaan ei ole diagnostisoitu yhtään nautaeläinten tarttuvan leukoosin tapausta([2, 12]),

— ne ovat peräisin karjasta, josta kolmen edellisen vuoden aikana ei ole ollut todisteita nautaeläinten tarttuvasta leukoosista([2]),

— kaikille yli 24 kuukauden ikäisille eläimille ne tutkimusajankohtaa edeltävien 12 kuukauden([5]) aikana tehty([2, 12]), tutkimus([13]), josta on saatu kielteinen tutkimustulos,

— niistä on säädetyn 30 päivän kuluessa([5]) saatu kielteinen tutkimustulos([2, 5, 11]) nautaeläinten tarttuvan leukoosin yksilökohtaisessa tutkimuksessa([13]),

— ne on tarkoitettu lihotettaviksi([2, 11])."

bb) siirretään e–i alakohta f–j alakohdaksi, tässä järjestyksessä mainittuna;

b) lisätään alaviitteen([10]) jälkeen seuraavat alaviitteet:

"([11]) Tämä poikkeus sallitaan ainoastaan vähemmän kuin 30 kuukauden ikäisten lihotettaviksi aiottujen urospuolisten eläinten ollessa kysymyksessä, että edellytetään, että nämä eläimet merkitään selvästi ja että niille tehdään määrämaassa erityistarkastus.

([12]) Merkitseminen on välttämätöntä ainoastaan, kun eläimet ovat puhdasrotuisia jalostuseläimiä, jotka on tarkoitettu lisääntymistarkoituksiin ja jotka ovat hyvin arvokkaita

([13]) Yksilökohtainen tutkimus on suoritettu direktiivin 64/432/ETY liitteen G mukaisesti",

9 Lisätään liite G tämän direktiivin liitteen G mukaisesti.

2 artikla

Muutetaan direktiiviä 64/432/ETY 1 päivästä heinäkuuta 1990 alkaen seuraavasti:

1 Poistetaan 3 artiklan 2 kohdan j alakohta;

2 Korvataan 3 artiklan 3 kohdan d alakohta ja lisätään e–f alakohdat seuraavasti:

"d) ovat peräisin 2 artiklan s kohdassa tarkoitetusta nautaeläinten tarttuvasta leukoosista vapaasta karjasta;

e) edellä d alakohdassa olevan edellytysten lisäksi, niiden ollessa yli 12 kuukauden ikäisiä niistä on saatu kielteinen tutkimustulos liitteen G mukaisesti 30 päivän aikana ennen lastausta suoritetussa yksilökohtaisessa tutkimuksessa;

f) eivät ole d ja e alakohdan vaatimusten alaisia, jos ne ovat vähemmän kuin 30 kuukauden ikäisiä ja niitä aiotaan käyttää lihantuotantoon, jos ne

i) ovat peräisin karjasta, josta ei kahden edeltävän vuoden ajalta ole tehty virallista ilmoitusta ja vahvistusta yhdestäkään nautaeläinten tarttuvasta leukoositapauksesta;

ii) tunnistetaan varustamalla ne lastattaessa erityismerkinnällä ja ne jäävät valvonnan alaisiksi teurastukseen asti;

edellyttäen, että vastaanottava jäsenvaltio toteuttaa kaikki tarpeelliset toimenpiteet omien karjojensa tartunnan estämiseksi";

3 Poistetaan 7 artiklan 1 kohdan G alakohta;

4 Poistetaan 8 artiklan 2 kohdan viimeinen alakohta;

5 Poistetaan 8 a artikla;

6 Liitteessä F olevassa I mallissa

— korvataan V kohdan e alakohta seuraavasti:

"e) — ne on pidetty 12 edellisen kuukauden ajan([5]) tai jos ne ovat nuorempia kuin 12 kuukauden ikäisiä([5]), syntymästään asti, nautaeläinten tarttuvasta leukoosista vapaassa karjassa([2])([11]),

— niistä on säädetyn 30 päivän kuluessa([5]) saatu kielteinen tutkimustulos([12]) nautaeläinten tarttuvan leukoosin yksilökohtaisessa tutkimuksessa([2])([11])";

— ne on tarkoitettu lihotettaviksi([11])";

— korvataan alaviite([11]) seuraavasti:

"([11]) Tämä poikkeus sallitaan vain nuorempien kuin 30 kuukauden ikäisten lihotukseen aiottujen nautaeläinten ollessa kysymyksessä edellyttäen, että eläimet

— ovat peräisin karjasta, josta ei kahden edeltävän vuoden ajalta ole tehty virallista ilmoitusta ja vahvistusta yhdestäkään nautaeläinten tarttuvan leukoosin tapauksesta

— on merkitty selvästi erottuvalla tavalla ja niille tehdään määrämaassa erityistarkastus";

— poistetaan alaviite([12])

— muutetaan alaviitteen([13]) numero numeroksi([12]).

3 artikla

1 Jotta jäsenvaltiot voisivat kelpuuttaa karjansa nautaeläinten tarttuvasta leukoosista vapaaksi, niiden on toteutettava ohjelma, jossa niiden karjat tutkitaan jollakin direktiivin 64/432/EEC liitteeseen G kuuluvista tutkimuksista.

2 Jäsenvaltioiden on ilmoitettava komissiolle ainakin kerran vuodessa ohjelmiensa edistymisestä ja saaduista tuloksista.

4 artikla

Neuvosto vahvistaa 1 päivään tammikuuta 1990 mennessä komission ehdotuksesta arviointiperusteet, joilla jäsenvaltio tai jäsenvaltion alueen osa tunnustetaan nautaeläinten tarttuvasta leukoosista vapaaksi, ja edellytykset, jotka on täytettävä tämän aseman säilyttämiseksi sekä määräyksistä, joita sovelletaan nautaeläinten tarttuvasta leukoosista vapaista jäsenvaltioista tai alueilta tulevassa kaupassa.

5 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava voimaan niiden vaatimusten noudattamisen edellyttämät säädökset, joista säädetään

— 1 ja 3 artiklassa, viimeistään 1 päivänä heinäkuuta 1988

— 2 artiklassa, viimeistään 1 päivänä heinäkuuta 1990.

Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

6 artikla

Kumotaan direktiivi 80/1102/ETY([1]).

7 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Luxemburgissa 14 päivänä kesäkuuta 1988.

Neuvoston puolesta

Puheenjohtaja

I. KIECHLE

([1]) EYVL N:o L 325, 1.12.1980, s. 18.

LIITE

"LIITE G

NAUTAELÄINTEN TARTTUVAA LEUKOOSIA KOSKEVAT TUTKIMUKSET

Nautaeläinten tarttuvaa leukoosia koskevat tutkimukset suoritetaan immunodiffuusiotutkimuksella A ja B kohdassa esitetyissä olosuhteissa tai entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA) C kohdassa esitetyissä olosuhteissa. Immunodiffuusiomenetelmää voidaan käyttää ainoastaan yksilökohtaisiin tutkimuksiin.

Jos tutkimustulokset ovat asiallisin perustein kiistanalaisia, suoritetaan uusi tarkistus immunodiffuusiotutkimuksella.

A. **Agargeeli-immunodiffuusiotutkimus nautaeläinten tarttuvan leukoosin määrittämiseksi**

1 Tutkimuksessa käytettävän antigeenin on sisällettävä nautaeläinten leukoosiviruksen glykoproteiineja. Antigeeni on standardoitava standardiseerumia (E I -seerumi) vastaan, jonka toimittaa Statens Veterinaere Serum Laboratorium, Kööpenhamina.

2 Luettelossa esitetyt viralliset laitokset on määrättävä vastaamaan laboratorion antigeenikäyttöstandardien kalibroinnista standardiseerumia (E I -seerumi) vastaan, jonka toimittaa Statens Veterinaere Serum Laboratorium, Kööpenhamina.

a) Saksa:	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
b) Belgia:	Institut national de recherches vétérinaires, Bryssel
c) Ranska:	Laboratoire national de pathologie bovine, Lyon
d) Luxemburgin suurherttuakunta:	—
e) Italia:	Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Perugia
f) Alankomaat:	Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdelning Rotterdam
g) Tanska:	Statens Veterinaere Serum Laboratorium, Kööpenhamina
h) Irlanti:	Veterinary Research Labortory, Abbotstown, Dublin
i) Yhdistynyt kuningaskunta:	
1 Iso-Britannia:	The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Englanti
2 Pohjois-Irlanti:	The Veterinary Research Laboratory Stormont, Belfast
j) Espanja:	Laboratorio de Sanidad y Produccion Animal de Barcelona
k) Portugali:	Laboratório Nácional de Investigação Veterinária, Lissabon

3 Laboratoriossa käytetyt standardiantigeenit on toimitettava ainakin kerran vuodessa 2 kohdassa lueteltuihin ETY:n vertailulaboratorioihin testattavaksi ETY:n virallista standardiseerumia vastaan. Tätä standardisointia lukuun ottamatta käytössä oleva antigeeni voidaan kalibroida B kohdan mukaisesti.

4 Kokeeseen käytettyjen reagenssien koostumus on:

a) antigeeni: antigeenin on sisällettävä nautaeläinten tarttuvan leukoosiviruksen spesifisiä glykoproteiineja, jotka on standardoitu virallista ETY-seerumia vastaan;

b) tutkittava seerumi

c) tunnettu positiivinen kontrolliseerumi

d) Agargeeli,

0,8 % agar
8,5 % NaCl
0,05 M Tris-puskuri, pH 7,2

15 ml tätä agaria on vietävä 85 mm läpimittaiselle petrimaljalle, josta agarin paksuudeksi saadaan 2,6 mm.

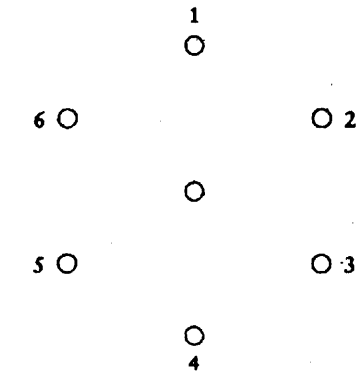
5 Agariin leikataan seitsemästä kosteutta sisältämättömästä kuopasta muodostuva maljan pohjaan asti ulottuva testikuvio, joka koostuu yhdestä keskikuopasta ja kuudesta tätä renkaana ympäröivästä kuopasta.

Keskikuopan läpimitta: 4 mm

Laitakuoppien läpimitta: 6 mm

Keskikuopan ja laitakuoppien etäisyys: 3 mm

6 Keskikuoppa on täytettävä standardiantigeenilla. Laitakuopat 1 ja 4 (ks. oheinen kaavio) täytetään tunnetulla positiivisella seerumilla ja kuopat 2, 3 5 ja 6 tutkittavilla seerumeilla. Kuopat on täytettävä siten, että meniski katoaa.



7 Tästä saadaan määrät, jotka ovat:
antigeeni: 32 µl
kontrolliseerumi: 73 µl
tutkittava seerumi: 73 µl.

8 Inkuboinnin on oltava 72 tuntia huoneenlämmössä (20–27 °C) suljetussa kosteassa kammiossa.

9 Tutkimuksen tulos voidaan lukea 24 ja 48 tunnin kohdalla, mutta lopullista tulosta ei voida saada ennenkuin 72 tunnin kuluttua;

a) tutkittava seerumi on positiivinen, jos se muodostaa spesifisen presipitaatioviivan BLV-antigeenin ja muodostaa yhtenäisen identiteettiä merkitsevän viivan kontrolliseerumin kanssa;

b) tutkittava seerumi on negatiivinen, jos se ei muodosta spesifistä presipitaatioviivaa BLV-antigeenin kanssa ja jos se ei taivuta kontrolliseerumin viivaa;

c) reaktiota ei voida pitää varmana, jos se

i) taivuttaa kontrolliseerumin viivaa BLV-antigeenikuoppaa kohti muodostamatta näkyvää viivaa antigeenin kanssa; tai

ii) jos sitä ei voida lukea kielteiseksi eikä positiiviseksi.

Epävarmojen tutkimustulosten tapauksessa tutkimus voidaan toistaa ja voidaan käyttää väkevöityä seerumia.

B. **Antigeenin standardointimenetelmä**

Tarvittavat liuokset ja materiaalit:

1 40 ml 1,6-%:sta agaroosia, joka on valmistettu 0,05-%:seen M Tris-HCl-puskuriin, pH 7,2, jossa on 8,5 % NaCl:ää.

2 15 ml nautaleukoosiseerumia, jossa on vasta-ainetta ainoastaan nautaleukoosiviruksen glykoproteiineja vastaan ja joka on laimennettu suhteessa 1:10 puskuriliuokseen, jonka koostumus on 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 ja 8,5 % NaCl.

3 15 ml nautaleukoosiseerumia, jossa on vasta-ainetta ainoastaan nautaleukoosiviruksen glykoproteiineja vastaan ja joka on laimennettu suhteessa 1:5 puskuriliuokseen, jonka koostumus on 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 ja 8,5 % NaCl.

4 Neljä muovista petrimaljaa, joiden läpimitta on 85 mm.

5 Lävistin, jonka läpimitta on 4–6 mm

6 Vertailuantigeeni

7 Standardoitava antigeeni

8 Vesihaude (56 °C).

Menettely:

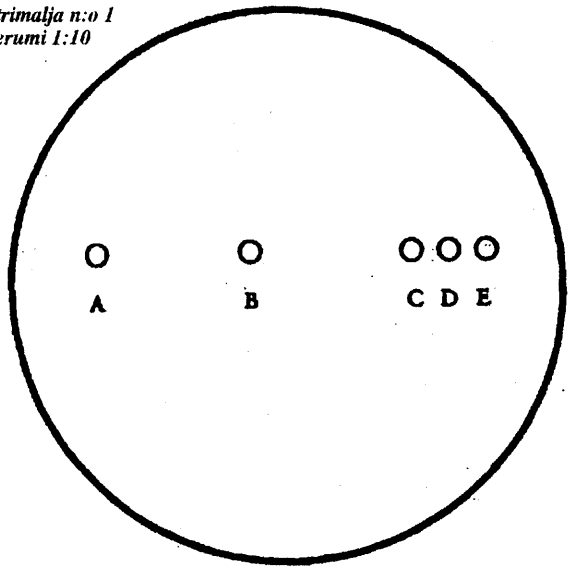
Liuotetaan agaroosi (1,6 %) Tris/HCl-puskuriin lämmittämällä se varovasti 100 °C:seen. Seisotetaan sitä 56 °C:ssa vesihauteessa noin tunnin ajan. Myös nautaleukoosiseerumilaimennoksia pidetään 56 °C:n vesihauteesssa.

Tämän jälkeen sekoitetaan keskenään 15 ml 56 °C:n agaroosiliuosta ja 15 ml nautaleukoosiseerumia (1:10), ravistetaan nopeasti ja kaadetaan kumpaankin kahteen petrimaljaan.

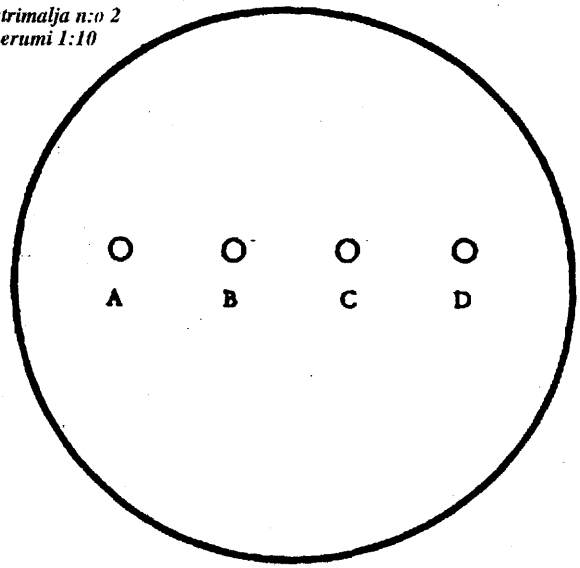
Toistetaan nämä toimenpiteet nautaleukoosiseerumilla, joka on laimennettu 1:5:seen.

Kun agaroosi on jähmettynyt, siihen tehdään aukot seuraavasti:

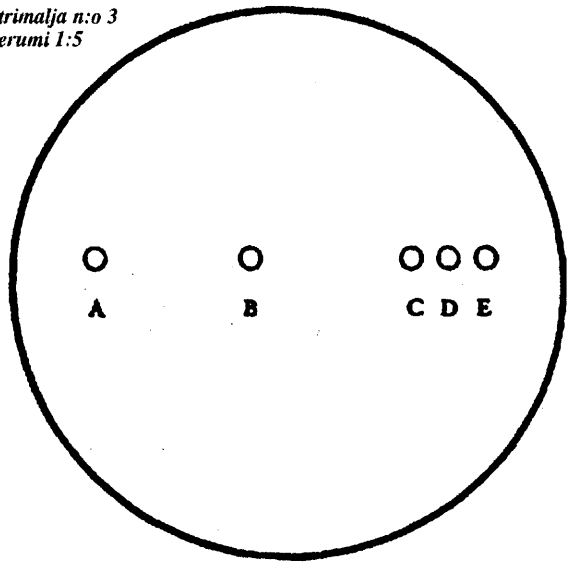
Petrimalja n:o 1
Seerumi 1:10



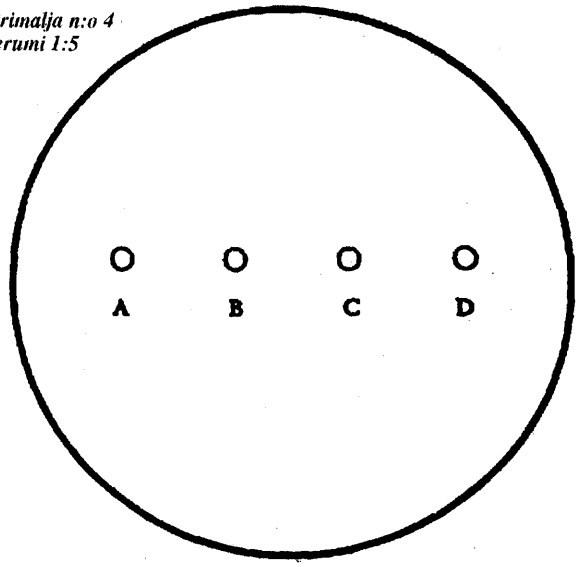
Petrimalja n:o 2
Seerumi 1:10



Petrimalja n:o 3
Seerumi 1:5



Petrimalja n:o 4
Seerumi 1:5



Antigeenin lisäys:

I Petrimaljat n:o 1 ja 3

kuoppa A = laimentamaton vertailuantigeeni

kuoppa B = 1:2 laimennettu vertailuantigeeni,

kuoppa C ja E = vertailuantigeeni ja

kuoppa D = laimentamaton tutkittava antigeeni.

II Petrimaljat n:o 2 ja 4

kuoppa A = laimentamaton tutkittava antigeeni,

kuoppa B = 1:2 laimennettu tutkittava antigeeni,

kuoppa C = 1:4 laimennettu tutkittava antigeeni ja

kuoppa D = 1:8 laimennettu tutkittava antigeeni.

Lisäohjeet:

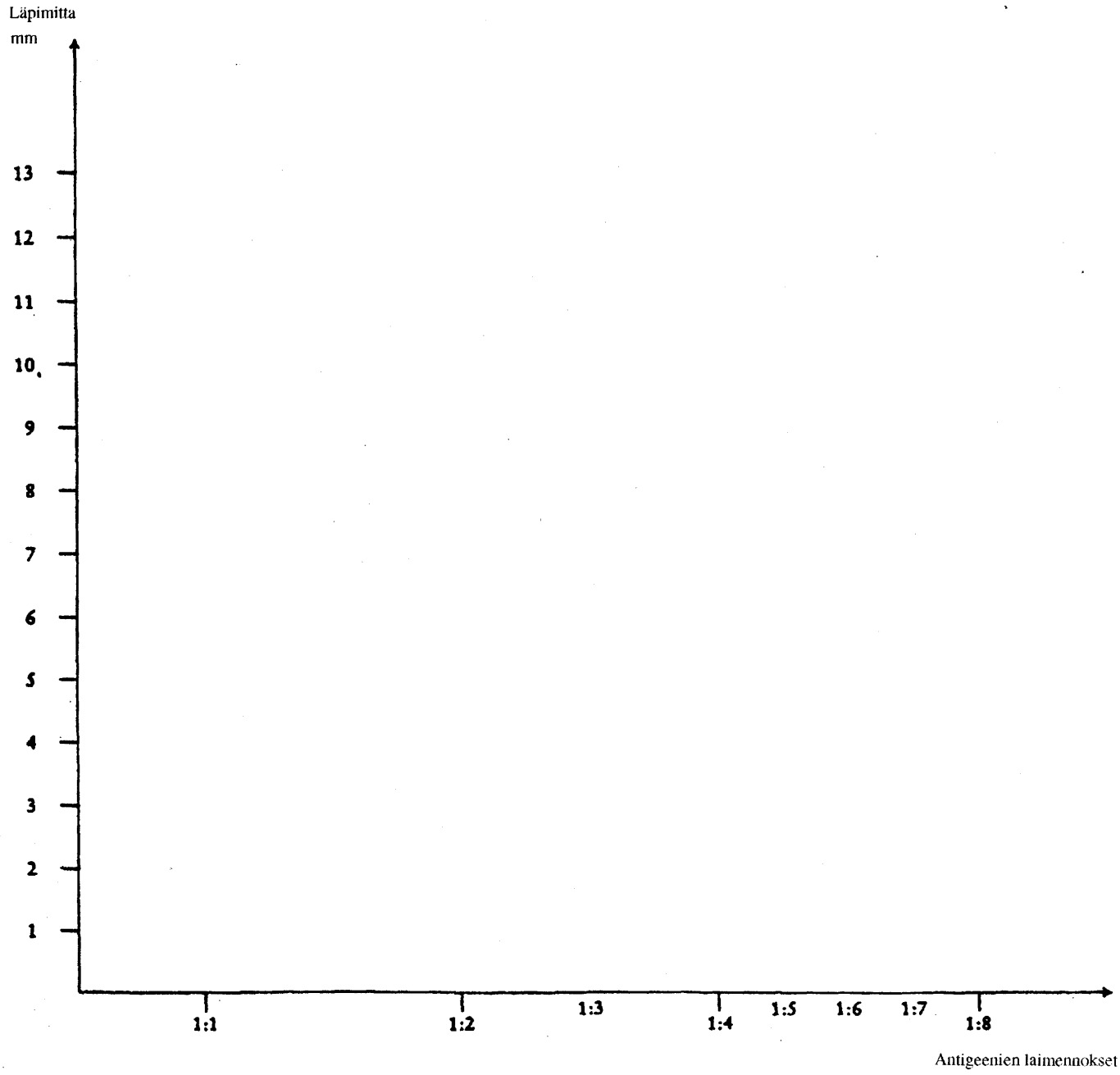
1 Koe on suoritettava kahdella seerumilaimennoksella (1:5 ja 1:10) optimaalisen saostumisen saavuttamiseksi.

2 Jos saostuman läpimitta on liian pieni molemmilla laimennoksilla, on seerumia laimennettava enemmän.

3 Jos saostuman läpimitta molemmissa laimennoksissa on liian suuri ja heikosti näkyvä, on valittava alempi seerumitaso.

4 Agaroosin lopullisen pitoisuuden on oltava 0,8 % ja seerumien vastaavasti 5 % ja 10 %.

5 Laaditaan kuvaaja mitatuista läpimitoista kuvan esittämässä koordinaattijärjestelmässä. Käyttölaimennos on se tutkittavan antigeenin laimennos, jolla saadaan sama läpimitta kuin vertailuantigeenia käyttämällä.



C. **Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (Elisa) nautaeläinten tarttuvan leukoosin määrittämiseksi**

1 Elisa-menetelmässä käytettävät materiaalit ja reagenssit ovat seuraavat:

a) kiinteän faasin mikrotiitterilevyt, kyvetit tai mikä tahansa kiinteä faasi;

b) antigeeni kiinnitetään kiinteään faasiin joko käyttämällä apuna polyklonaalisia tai monoklonaalisia sieppausvasta-aineita tai ilman näiden apua. Jos antigeeni pinnoitetaan suoraan kiinteään faasiin, on kaikki positiivisen tutkimustuloksen antaneet tutkittavat näytteet tutkittava uudelleen kontrolliantigeenia vastaan. Kontrolliantigeenin on oltava identtinen tämän antigeenin osalta BLV-antigeeneja lukuun ottamatta. Jos kiinteä faasi pinnoitetaan sieppausvasta-aineilla, nämä vasta-aineet eivät saa reagoida muita antigeeneja kuin BLV-antigeeneja vastaan;

c) tutkittava biologinen neste (seerumi tai maito);

d) positiivinen ja negatiivinen kontrolli;

e) konjugaatti -nautaa vastaan suunnattu immunoglobuliini, joka on biotinyloitu tai johon on konjugoitu entsyymi tai BLV:tä vastaan suunnattu immunoglobuliini, joka on biotinyloitu tai johon on konjugoitu entsyymi;

f) avidiini -biotinyloituja immunoglobuliinipreparaatteja käyttävissä määrityksissä käytetty entsyymi;

g) käytettävää entsyymiä vastaava substraatti

h) pysäytysliuos

i) puskuroitu liuos tutkittavien näytteiden laimentamiseksi, reagenssien valmistamiseksi ja pesuihin;

j) tulosten lukemiseen käytettävä järjestelmä, jossa on sopivat käytettyjä substraatteja vastaavat suotimet.

2 *Testin standardointi ja herkkyys*

Elisa-määrityksen herkkyyden on oltava sellaista tasoa, että E 4 -seerumista saadaan positiivinen tutkimustulos, kun se on laimennettu 10-kertaisesti (seeruminäytteet) tai 250-kertaisesti (maitonäytteet) verrattuna yhdistetyissä näytteissä oleville yksittäisille näytteille saatavaan laimennokseen.

Määrityksissä, joissa näytteet (seerumi tai maito) tutkitaan yksittäin, on E 4 -seerumista, joka on laimennettu suhteessa 1:10 (laimennettu negatiivisella seerumilla) tai suhteessa 1:250 (laimennettu negatiivisella maidolla), saatava positiivinen tutkimustulos testattaessa nämä siinä määrityslaimennoksessa, jota käytetään yksittäisille tutkittaville näytteille.

E 4 -seerumin toimittaa Statens Veterinaere Serum Laboratorium, Kööpenhamina

3 *Elisa-tutkimuksen käytön edellytykset*

Elisa-menetelmää voidaan käyttää sellaisen maitonäytteen tutkimiseen, joka on otettu talteen tilalta, jonka lehmistä ainakin 30 % on lypsäviä, edellyttäen, että näyte on saatu vähemmän kuin 50 lehmän tuottamasta maidosta, ja herakonsentraatista, jos tämä on otettu talteen 20 ja enintään 50 lehmän välillä olevasta lehmämäärästä ja että jos talteen otettu maito on saatu suuremmasta lehmämäärästä kuin 50, on näytteiden määrää nostettava samassa suhteessa.

Elisa-menetelmää voidaan myös käyttää verinäytteen tutkimiseen, joka on otettu enintään 50 eläimestä.

Jos jotakin edellä mainituista mahdollisuuksista käytetään on toteutettava toimenpiteet sen varmistamiseksi, että otetut näytteet voidaan samaistaa niihin eläimiin, joista tutkittu maito tai seerumi otettiin.

Jos yhdellä otetuista näytteistä saadaan positiivinen tutkimustulos, on karjan jäätävä viranomaisten valvontaan siihen asti, kunnes on saatu kielteinen tutkimustulos ainakin kahdessa yksilökohtaisessa kokeessa, jotka on suoritettu vähintään neljän kuukauden väliajoin, kaikista nautakarjaan kuuluvista yli 6 kuukauden ikäisistä eläimistä edellä mainittujen säädösten mukaisesti ja laboratoriossa, joka on A kohdassa mainitun laboratorion välittömän valvonnan alainen."