II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

RAAD

RICHTLIJN VAN DE RAAD

van 14 juni 1988

houdende wijziging van Richtlijn 64/432/EEG met betrekking tot endemische runderleukose en houdende intrekking van Richtlijn 80/1102/EEG

(88/406/EEG)

DE RAAD VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap, inzonderheid op artikel 43,

Gezien het voorstel van de Commissie (1),

Gezien het advies van het Europese Parlement (2),

Gezien het advies van het Economisch en Sociaal Comité (3),

Overwegende dat de Gemeenschap onder meer tot taak heeft op diergeneeskundig gebied de nodige maatregelen te nemen om de gezondheidstoestand van de veestapel te verbeteren ten einde de rentabiliteit van de veehouderij te verhogen;

Overwegende dat in dit verband de Gemeenschap moet worden beschermd tegen endemische runderleukose; dat de Gemeenschap overigens reeds bij de Richtlijnen 77/391/EEG (4) en 78/52/EEG (5) en bij Beschikking 87/58/EEG (6) een actie voor de uitroeiing van deze ziekte heeft opgezet;

Overwegende dat deze en soortgelijke acties moeten bijdragen tot de opheffing van de bestaande belemmeringen voor het intracommunautaire handelsverkeer in levende dieren die uit de verschillen inzake de gezondheidssituatie voortvloeien;

Overwegende dat daartoe tot en met 31 december 1988 in Richtlijn 64/432/EEG van de Raad van 26 juni 1964 inzake veterinairrechtelijke vraagstukken op het gebied van het intracommunautaire handelsverkeer in runderen en varkens (7), laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 3805/87 (8), maatregelen zijn opgenomen ter bescherming tegen endemische runderleukose;

Overwegende dat het dienstig is deze maatregelen te verlengen, met dien verstande dat nieuwe methoden voor het opsporen van endemische runderleukose moeten worden erkend;

Overwegende dat na een overgangsperiode een eind moet worden gemaakt aan de bijzondere voorschriften die de huidige regeling kent voor landen die nationale programma's ter bestrijding van deze ziekten toepasten;

Overwegende dat het wenselijk is bepalingen vast te stellen voor de kwalificatie van rundveebeslagen ten opzichte van endemische runderleukose;

Overwegende dat de Lid-Staten, voor de kwalificatie van hun rundveebeslag, een programma moeten uitvoeren ten einde hun beslag te onderwerpen aan een van de tests ter opsporing van leukose bedoeld in bijlage G van Richtlijn 64/432/EEG;

Overwegende dat, met uitzondering van slachtvee dat nog geen 30 maanden oud is, runderen die bestemd zijn voor het intracommunautaire handelsverkeer afkomstig moeten zijn uit een getest beslag en een individuele test moeten hebben ondergaan,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

Per 1 juli 1988 wordt Richtlijn 64/432/EEG als volgt gewijzigd:

(1) PB nr. C 5 van 9. 1. 1988, blz. 5.
(2) PB nr. C 49 van 22. 2. 1988, blz. 164.
(3) PB nr. C 80 van 28. 3. 1988, blz. 34.
(4) PB nr. L 145 van 13. 6. 1977, blz. 44.
(5) PB nr. L 15 van 19. 1. 1978, blz. 34.
(6) PB nr. L 24 van 27. 1. 1987, blz. 51.
(7) PB nr. 121 van 29. 7. 1964, blz. 1977/64.
(8) PB nr. L 357 van 19. 12. 1987, blz. 1.

1. aan artikel 2 wordt het volgende punt toegevoegd:

„s) Beslag vrij van endemische runderleukose: een beslag

i) waarvoor de laatste twee jaar geen enkel geval van endemische runderleukose, klinisch dan wel ingevolge test overeenkomstig bijlage G is aangetoond en bevestigd;

ii) waarin de dieren van meer dan 24 maanden oud die de laatste twaalf maanden zijn getest, negatief hebben gereageerd op twee tests die overeenkomstig bijlage G met tussenpozen van ten minste vier maanden werden uitgevoerd of, in geval van een beslag dat reeds aan deze eis heeft voldaan, op één test die overeenkomstig die bijlage werd uitgevoerd;

iii) waarin zich vanaf de datum van controle alleen nog maar dieren bevinden die in dat beslag zijn geboren of afkomstig zijn uit een beslag dat vrij is van endemische runderleukose.";

2. aan artikel 3, lid 2, wordt het volgende punt toegevoegd:

„j) voor zover het raszuivere fokrunderen als omschreven in artikel 1 van Richtlijn 77/504/EEG betreft, die uitsluitend bestemd zijn voor de reproduktie en die van grote waarde zijn, afkomstig zijn van een beslag:

i) waarvoor aan de officiële dierenarts geen feiten ter kennis zijn gekomen die erop wijzen dat in de laatste twee jaar endemische runderleukose is voorgekomen;

ii) waarvan de eigenaar heeft verklaard dat hij geen kennis heeft gehad van dergelijke feiten en voorts schriftelijk heeft verklaard dat de voor het intracommunautaire handelsverkeer bestemde dieren geboren of gefokt zijn in het bedoelde rundveebeslag of er gedurende de twaalf maanden voorafgaand aan het onderzoek een integrerend deel van hebben uitgemaakt.";

3. artikel 3, lid 3, wordt aangevuld met het volgende punt:

„d) afkomstig zijn van een rundveebeslag waarin gedurende de laatste twee jaar geen enkele aanwijzing tot het bestaan van endemische runderleukose liet concluderen en, indien de dieren ouder zijn dan twaalf maanden, deze binnen 30 dagen vóór hun inlading negatief hebben gereageerd op een overeenkomstig bijlage G uitgevoerde individuele test.

Deze test is evenwel niet vereist voor mannelijke en gecastreerde runderen van minder dan 30 maanden oud die voor de vleesproduktie bestemd zijn, mits deze dieren bij inlading van een speciaal merk zijn voorzien en de Lid-Staat alle maatregelen treft om te voorkomen dat de dieren de nationale beslagen op hun grondgebied besmetten.";

4. aan artikel 7, lid 1, wordt het volgende punt toegevoegd:

„G. vrouwelijke runderen van minder dan 30 maanden oud die voor de vleesproduktie bestemd zijn en die in afwijking van artikel 3, lid 3, onder d), geen individuele test hebben ondergaan. Deze dieren moeten van een speciaal merk zijn voorzien. De Lid-Staat van bestemming treft alle maatregelen om besmetting van de nationale beslagen op hun grondgebied te voorkomen.";

5. aan artikel 8, lid 2, wordt de volgende alinea toegevoegd:

„Wat de in artikel 3, lid 2, punt j), bedoelde dieren betreft kunnen de Lid-Staten, in het bijzonder met betrekking tot endemische runderleukose, voorts, met inachtneming van de algemene bepalingen van het Verdrag, eisen dat alle dieren van meer dan 24 maanden oud op de datum van de test die deel uitmaken van het beslag waarvan de dieren afkomstig zijn, in de laatste twaalf maanden negatief hebben gereageerd op een individuele test uitgevoerd overeenkomstig bijlage G. Dergelijke garanties kunnen evenwel niet worden vereist voor het binnenbrengen van dieren afkomstig uit een Lid-Staat waarvan, volgens de procedure van artikel 12, is vastgesteld dat hij voldoende garanties biedt op het gebied van endemische runderleukose.";

6. het volgende artikel wordt ingevoegd:

„*Artikel 8 bis*

1. Het Koninkrijk Denemarken en de Bondsrepubliek Duitsland, die sedert 1980 een verplicht nationaal programma ter voorkoming van de verbreiding van endemische runderleukose toepassen, kunnen het binnenbrengen van fok- en gebruiksrunderen die bestemd zijn voor opneming in als leukosevrij beschouwde rundveebeslagen, afhankelijk stellen van overlegging van een door een bevoegde officiële dierenarts op de dag van de lading in ieder geval ook in de taal of talen van het land van bestemming opgesteld certificaat waaruit blijkt:

a) dat aan deze dierenarts geen feiten ter kennis zijn gekomen die erop wijzen dat in de laatste drie jaren endemische runderleukose is voorgekomen in het rundveebeslag waaruit de dieren afkomstig zijn en dat de eigenaar van het rundveebeslag heeft verklaard dat hij geen kennis heeft gehad van dergelijke feiten, en dat hij voorts ook schriftelijk verklaard heeft dat de voor het intracommunautaire handelsverkeer bestemde dieren geboren en gefokt zijn in het bedoelde rundveebeslag of er gedurende de twaalf maanden voorafgaand aan het onderzoek een integrerend deel van hebben uitgemaakt;

b) dat alle runderen van meer dan 24 maanden oud op de datum van de test die deel uitmaken van het rundveebeslag waaruit de dieren afkomstig zijn, in de laatste twaalf maanden negatief hebben gereageerd op een test uitgevoerd overeenkomstig bijlage G.

2. Volgens de procedure van artikel 12 kunnen andere Lid-Staten dan die bedoeld in lid 1 gemachtigd

worden dezelfde eisen voor hun grondgebied of, wat het Verenigd Koninkrijk betreft, voor Noord-Ierland toe te passen, indien daar een plan voor de uitroeiing van endemische runderleukose wordt uitgevoerd uit hoofde van Beschikking 87/58/EEG of indien wordt aangetoond dat zij op de dag dat de kwestie bij het Permanent Veterinair Comité aanhangig wordt gemaakt, daar sedert ten minste twee jaar een minimumuitroeiingsprogramma uitvoeren en daarbij de volgende minimumeisen in acht nemen:

— alle tumoren in de organen en het lymfestelsel bij runderen moeten worden aangemeld en histologisch worden onderzocht door een veterinair laboratorium dat onder rechtstreeks toezicht staat van een van de in bijlage G genoemde laboratoria;

— alle runderen van beslagen die in besmettelijk contact zijn geweest met een dier waarbij een leukosetumor is geconstateerd, worden onderworpen aan een test ter opsporing van endemische runderleukose die wordt uitgevoerd overeenkomstig bijlage G in een laboratorium dat onder rechtstreeks toezicht staat van een van de in genoemde bijlage genoemde laboratoria;

— in een beslag waarin bij een dier een leukosetumor is aangetroffen en waarin de aanwezigheid van endemische runderleukose middels diagnose is bevestigd, kunnen de besmette dieren genoemd beslag slechts verlaten om onder toezicht van de bevoegde veterinaire autoriteiten te worden geslacht. Het beslag dient onder officieel toezicht te blijven totdat elk dier van meer dan 24 maanden oud negatief heeft gereageerd op ten minste twee tests die met tussenpozen van ten minste vier maanden zijn uitgevoerd overeenkomstig bijlage G in een laboratorium dat onder rechtstreeks toezicht staat van een van de in genoemde bijlage genoemde laboratoria.

De aanvullende voorwaarden waaronder deze uitbreiding voor elke betrokken Lid-Staat of voor elk betrokken gedeelte van hun grondgebied zou kunnen plaatsvinden, kunnen worden gepreciseerd in het in de eerste alinea bedoelde besluit.";

7. in bijlage E, aan het einde van punt a), wordt het volgende toegevoegd:

„— endemische runderleukose;";

8. in bijlage F, model I:

a) in punt V:

aa) na punt d) de volgende tekst invoegen:

„e) — zij zijn sedert de laatste twaalf maanden(5), of indien het dieren betreft die niet ouder zijn dan twaalf maanden, sedert hun geboorte, gehouden in een beslag waarin volgens de aan ondergetekende bekende feiten en de verzekering gegeven door de eigenaar sedert de laatste drie jaar (5) geen enkel geval van endemische runderleukose is geconstateerd (2) (12);

— zij zijn afkomstig uit een beslag waar niets de conclusie wettigt dat er de laatste drie jaar endemische runderleukose heeft geheerst (2),

— op de datum van het onderzoek hebben alle runderen van meer dan 24 maanden oud, tijdens de laatste twaalf maanden (5) een test (13) ondergaan (2) (12) waarop zij negatief hebben gereageerd;

— binnen de voorgeschreven termijn van 30 dagen (5) hebben zij negatief gereageerd (2) (5) (11) op een individuele test (13) ter opsporing van endemische runderleukose;

— zij zijn bestemd om te worden gemest (2) (11).";

bb) de punten e) tot en met i) worden respectievelijk f) tot en met j);

b) na voetnoot (10) de volgende voetnoten toevoegen:

„(11) Deze uitzondering geldt slechts voor mannelijke dieren van minder dan 30 maanden oud die bestemd zijn om te worden gemest, voor zover deze dieren van een speciaal merk zijn voorzien en in het land van bestemming een bijzondere controle ondergaan.

(12) Deze aanduiding is slechts vereist voor raszuivere fokdieren, die uitsluitend bestemd zijn voor de reproduktie en die van veel waarde zijn.

(13) De individuele test is uitgevoerd overeenkomstig bijlage G.";

9. de bijlage bij deze richtlijn wordt toegevoegd.

Artikel 2

Per 1 juli 1990 wordt Richtlijn 64/432/EEG als volgt gewijzigd:

1. in artikel 3, lid 2, wordt punt j) geschrapt;

2. in artikel 3, lid 3, wordt punt d) vervangen door het volgende punt d) en worden de punten e) en f) toegevoegd:

„d) afkomstig zijn uit een beslag dat vrij is van endemische runderleukose in de zin van artikel 2, punt s);

e) niet alleen voldoen aan de voorwaarde onder d) maar, indien zij ouder zijn dan twaalf maanden, voorts binnen 30 dagen vóór hun inlading negatief hebben gereageerd op een overeenkomstig bijlage G uitgevoerde individuele test;

f) niet aan de vereisten van de punten d) en e) worden onderworpen wanneer het gaat om runderen van minder dan 30 maanden oud die voor de vleesproduktie bestemd zijn en indien zij:

i) afkomstig zijn van een beslag waar in de voorafgaande twee jaren geen geval van endemische runderleukose gemeld en bevestigd is;

ii) bij inlading van een speciaal merk zijn voorzien en tot het slachten onder toezicht blijven,

mits de Lid-Staat van bestemming alle maatregelen treft om besmetting van de eigen beslagen te voorkomen.";

3. in artikel 7, lid 1, wordt punt G geschrapt;

4. in artikel 8, lid 2, wordt de laatste alinea geschrapt;

5. artikel 8 bis wordt geschrapt;

6. in bijlage F, model I:

— wordt punt V, e) vervangen door:

„e) — zij zijn sedert de laatste twaalf maanden (5) of, indien het dieren betreft die nog geen twaalf maanden oud zijn (5) sedert hun geboorte, gehouden in een beslag dat vrij is van endemische runderleukose (2) (11);

— zij hebben bij een binnen de voorgeschreven termijn van dertig dagen (5) uitgevoerde individuele test (12) ter opsporing van endemische runderleukose negatief gereageerd (2) (11);

— wordt voetnoot (11) vervangen door:

„(11) Deze uitzondering geldt slechts voor mestrunderen van minder dan 30 maanden oud, voor zover deze dieren

— afkomstig zijn van een bestand waarin gedurende de laatste twee jaren geen gevallen van endemische runderleukose zijn gemeld en bevestigd,

— van een speciaal merk zijn voorzien en in het land van bestemming aan een bijzondere controle zijn onderworpen.";

— wordt voetnoot (12) geschrapt;

— wordt voetnoot (13) voetnoot (12).".

Artikel 3

1. Om hun beslag als vrij van endemische runderleukose te kunnen kwalificeren, voeren de Lid-Staten een programma uit waarbij hun beslagen worden onderworpen aan een der in bijlage G van Richtlijn 64/432/EEG genoemde tests.

2. De Lid-Staten stellen de Commissie ten minste eenmaal per jaar in kennis van het verloop van hun programma, alsmede van de resultaten van de toepassing ervan.

Artikel 4

De Raad stelt, op voorstel van de Commissie, vóór 1 januari 1990 de criteria vast op grond waarvan een Lid-Staat of een deel van het grondgebied van een Lid-Staat kan worden erkend als vrij van endemische runderleukose. Voorts bepaalt hij aan welke voorwaarden moet worden voldaan om deze status te kunnen handhaven, alsmede welke voorschriften van toepassing zijn op het handelsverkeer uit gebieden of Lid-Staten die vrij zijn van endemische runderleukose.

Artikel 5

De Lid-Staten doen de nodige bepalingen in werking treden om te voldoen aan:

— de artikelen 1 en 3: uiterlijk per 1 juli 1988,

— artikel 2: uiterlijk per 1 juli 1990.

Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Artikel 6

Richtlijn 80/1102/EEG (1) wordt ingetrokken.

Artikel 7

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Luxemburg, 14 juni 1988.

Voor de Raad
De Voorzitter
I. KIECHLE

(1) PB nr. L 325 van 1. 12. 1980, blz. 18.

BIJLAGE

„BIJLAGE G

TESTS VOOR HET OPSPOREN VAN ENDEMISCHE RUNDERLEUKOSE

Het opsporen van endemische runderleukose geschiedt door middel van de immunodiffusietest onder de onder A en B beschreven voorwaarden of door middel van de enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) onder de onder C beschreven voorwaarden. De immunodiffusiemethode wordt uitsluitend gebruikt voor de individuele tests.

In geval van naar behoren gemotiveerde betwisting van het resultaat van de tests wordt een aanvullende controle uitgevoerd door middel van een immunodiffusietest.

A. Agar-gel-immunodiffusietest op endemische runderleukose

1. Het bij deze test te gebruiken antigeen moet de glycoproteïnen van het runderleukosevirus bevatten. Het antigeen moet gestandaardiseerd zijn ten opzichte van een standaardserum (E.I.-serum) dat wordt betrokken bij het Statens Veterinære Serumlaboratorium, Bülovsvej 27, 1870 Kopenhagen V.

2. De hieronder vermelde overheidsinstellingen moeten worden belast met het standaardiseren van het eigen standaardantigeen ten opzichte van het officiële EEG-standaardserum (E.I.-serum) dat wordt betrokken bij het Statens Veterinære Serumlaboratorium te Kopenhagen:

a) Duitsland:	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen;
b) België:	Nationaal Instituut voor Diergeneeskundig Onderzoek, Brussel;
c) Frankrijk:	Laboratoire national de pathologie bovine, Lyon;
d) Groothertogdom Luxemburg:	—
e) Italië:	Istituto zooprofilattico sperimentale, Perugia;
f) Nederland:	Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;
g) Denemarken:	Statens Veterinære Serumlaboratorium, Kopenhagen;
h) Ierland:	Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin;
i) Verenigd Koninkrijk:	
1. Groot-Brittannië:	The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England;
2. Noord-Ierland:	The Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast;
j) Spanje:	Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Barcelona;
k) Portugal:	Laboratório Nácional de Investigação Veterinária, Lisboa.

3. Ten minste eenmaal per jaar dienen de standaardantigenen die in het laboratorium worden gebruikt te worden voorgelegd aan de hierboven in punt 2 vermelde EEG-referentielaboratoria om er opnieuw ten opzichte van het officiële EEG-standaardserum te worden getoetst. Bovendien kan het gebruikte antigeen ook worden gestandaardiseerd volgens de onder B beschreven methode.

4. Voor de uitvoering van deze test zijn de volgende reagentia vereist:

   a) antigeen: het antigeen moet glycoproteïnen bevatten die specifiek zijn voor het endemische runderleukosevirus dat is gestandaardiseerd ten opzichte van het officiële EEG-serum;

   b) het testserum;

   c) een controleserum waarvan bekend is dat het positief is;

   d) agar-gel

   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.

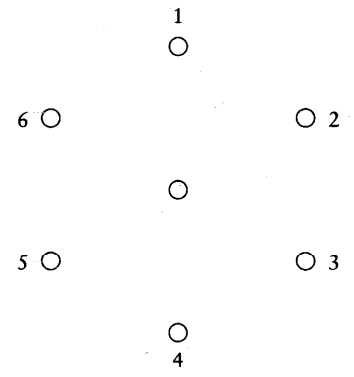
5. In de agar moeten zeven vochtvrije putjes worden gemaakt tot op de bodem van het schaaltje, en wel zodanig dat één putje in het midden ligt en de zes overige in een cirkel er omheen.

   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 moet worden gevuld met het standaardantigeen, de perifere putjes 1 en 4 (zie schema) 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 microliter.
Controleserum:	73 microliter.
Testserum:	73 microliter.

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 precipitatielijn vormt met het B.L.V.-antigeen en een volledig identieke lijn met het controleserum;

   b) een testserum is negatief indien het geen specifieke lijn vormt met het B.L.V.-antigeen en indien het de lijn van het controleserum niet buigt;

   c) de reactie wordt geacht geen uitsluitsel te geven indien:

      i) de lijn van het controleserum wel in de richting van het B.L.V.-antigeen wordt gebogen maar het testserum toch geen duidelijke precipitatielijn vormt met het antigeen

      of

      ii) de reactie niet duidelijk positief of negatief is.

   Indien de reactie geen uitsluitsel geeft kan de test worden overgedaan, eventueel met geconcentreerd serum.

B. Methode voor standaardisatie van het antigeen

Uitrusting en materiaal:

1. 40 ml agar (1,6 %) in 0,05 M Tris/HCl-bufferoplossing, pH 7,2 met 8,5 % NaCl;
2. 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;
3. 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;
4. vier plastic petrischaaltjes met een diameter van 85 mm;
5. een buisje met een diameter van 4 – 6 mm;
6. een referentie-antigeen;
7. het te standaardiseren antigeen;
8. een waterbad (56 °C).

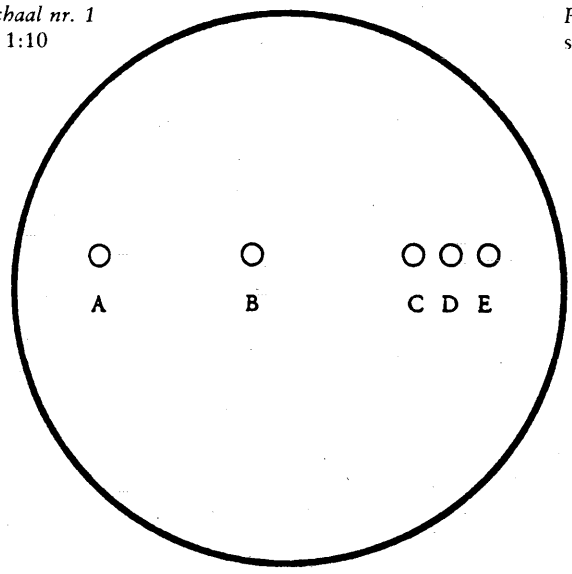
Procedure:

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

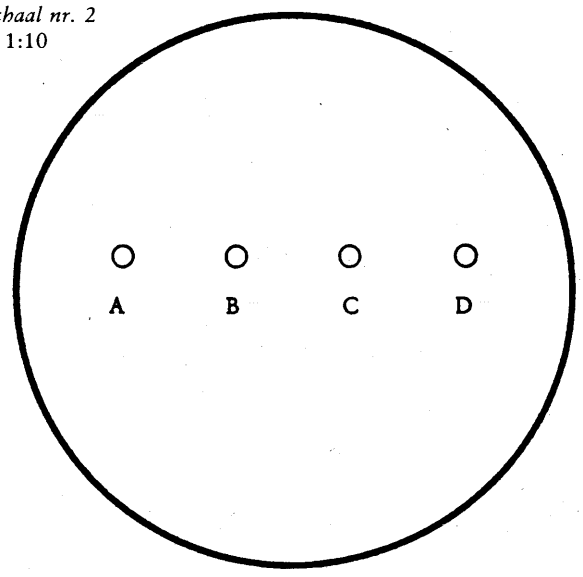
Vervolgens 15 ml van de agaroplossing (56 °C) vermengen met de 15 ml runderleukoseserum (1:10), snel schudden en het mengsel in twee petrischaaltjes gieten, 15 ml in elk schaaltje. Deze procedure herhalen met het runderleukoseserum in de verdunning 1:5.

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

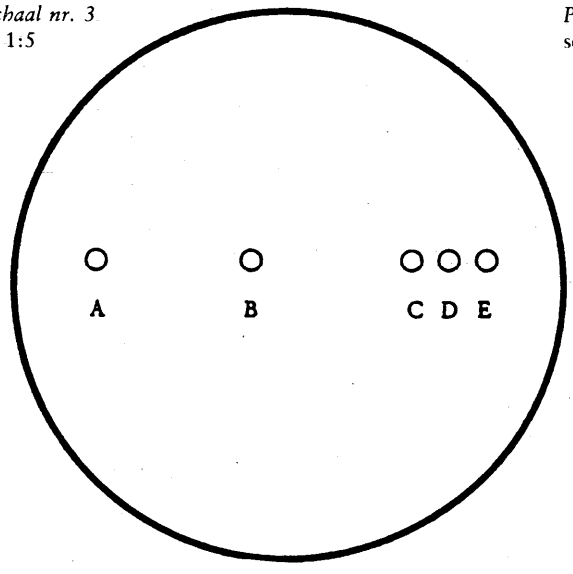
Petrischaal nr. 1
serum 1:10



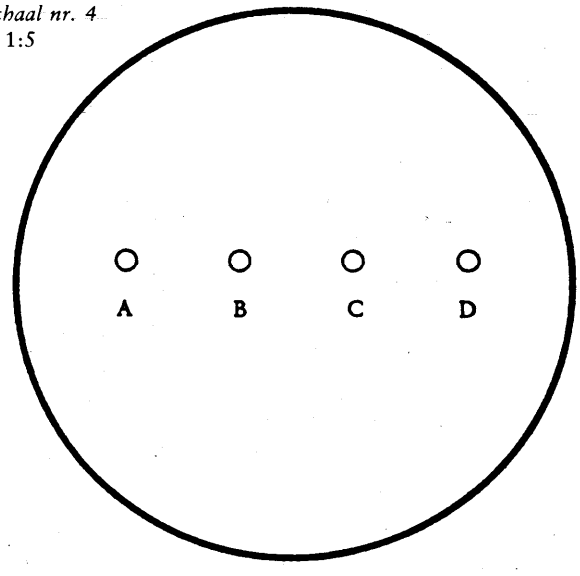
Petrischaal nr. 2
serum 1:10



Petrischaal nr. 3
serum 1:5



Petrischaal nr. 4
serum 1:5



Toevoeging van antigeen:

I. Petrischaaltjes 1 + 3

A = onverdund referentie-antigeen
B = referentie-antigeen in de verdunning 1:2
C + E = referentie-antigeen
D = onverdund antigeen dat moet worden gestandaardiseerd

II. Petrischaaltjes 2 + 4

A = onverdund te standaardiseren antigeen
B = te standaardiseren antigeen in de verdunning 1:2
C = te standaardiseren antigeen in de verdunning 1:4
D = te standaardiseren antigeen in de verdunning 1:8.

Aanvullende aanwijzingen

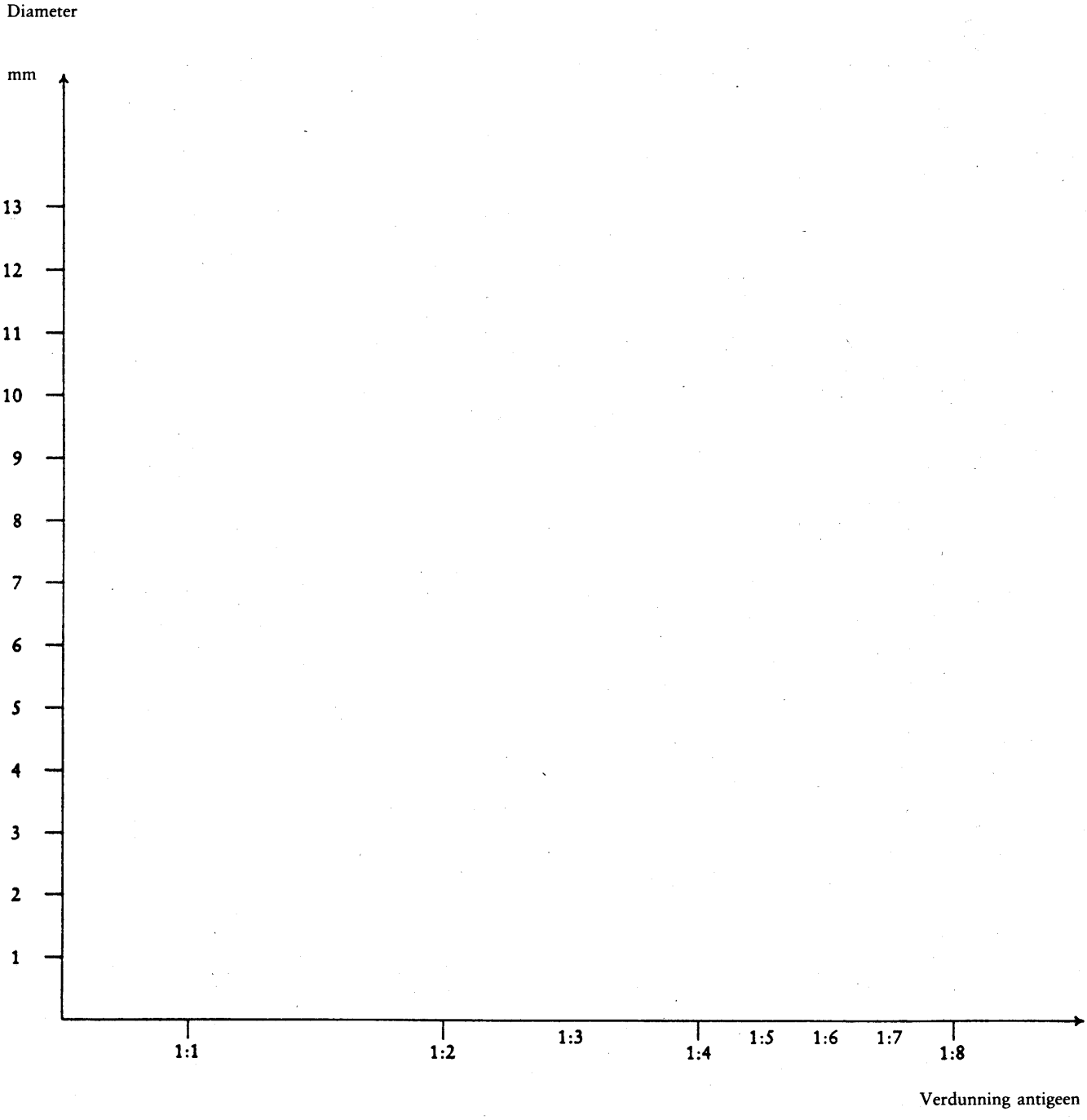
1. Met het oog op een optimale precipitatie moet het experiment worden uitgevoerd met twee verschillende verdunningen van het serum (1:5 en 1:10).

2. Indien de precipitatiediameter met beide verdunningen te klein is moet het serum verder worden verdund.

3. Indien de precipitatiediameter met beide verdunningen te groot is en te onduidelijk moet een minder sterke verdunning van het serum worden genomen.

4. De uiteindelijke concentratie van de agar bedraagt 0,8 %, die van de sera 5 respectievelijk 10 %.

5. De gemeten diameters dienen op bijgevoegd coördinatenstelsel te worden geplot. De verdunning van het te standaardiseren antigeen die dezelfde diameter heeft als het referentie-antigeen is de aan te houden verdunning.



C. **Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) voor het opsporen van endemische runderleukose**

1. Bij toepassing van de Elisa-methode moet gebruik worden gemaakt van de volgende materialen en reagentia:

   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 met behulp van een controleantigeen opnieuw worden onderzocht. Behalve wanneer met runderleukosevirus-antigenen wordt gewerkt, moet het controleantigeen steeds identiek zijn aan het gebruikte antigeen. Indien coating van de vaste drager met antilichamen wordt toegepast, mogen de antilichamen alleen reacties aangaan met runderleukosevirus-antigenen, en niet met andere antigenen;

   c) de te testen biologische vloeistof (serum of melk);

   d) een positief en negatief controleserum;

   e) een conjugaat, namelijk een conjugaat van een antibovine-immunoglobuline met biotine of een enzymconjugaat, of een conjugaat van een anti-runderleukosevirus-immunoglobuline met biotine of een enzymconjugaat;

   f) avidine — een enzym voor testmethoden waarbij gebruik wordt gemaakt van immunoglobuline--biotinepreparaten;

   g) een op het gebruikte enzym afgestemd substraat;

   h) een remmingsoplossing;

   i) bufferoplossingen voor de verdunning van de te onderzoeken monsters, de bereiding van reagentia en het spoelen van de vaste dragers;

   j) een afleessysteem met adequate, op het gebruikte substraat afgestemde filters.

2. *Standaardisatie en gevoeligheid van de testmethode*

   De gebruikte Elisa-testmethode moet zo gevoelig zijn dat E 4-serum een positieve reactie te zien geeft, wanneer het (voor serummonsters) tien 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 (serum- en melk-) monsters individueel worden onderzocht, moet het E 4-serum in de verdunning 1:10 (in negatief serum) of 1:250 (in negatieve melk) een positieve reactie te zien geven, wanneer het in een zelfde verdunningsgraad wordt onderzocht als de individuele monsters.

   Het E 4-serum moet bij het nationale veterinaire laboratorium in Kopenhagen worden betrokken.

3. *Voorwaarden voor het gebruik van de Elisa-test*

   De Elisa-methode kan worden gebruikt aan de hand van een melkmonster uit de melkaanvoer van een bedrijf dat ten minste voor 30 % uit melkkoeien in de lactatieperiode bestaat, en wel op voorwaarde dat het monster betrekking heeft op de melkproduktie van ten minste 50 koeien en op een concentratie van melkwei van melk die is ingezameld op een aantal koeien dat tussen de 20 en maximaal 50 ligt, en dat, wanneer de melkaanvoer afkomstig is van meer dan 50 koeien, het aantal monsters evenredig wordt verhoogd.

   De Elisa-methode kan ook worden uitgevoerd aan de hand van een bloedmonster dat op maximaal 50 dieren wordt genomen.

   Indien gebruik wordt gemaakt van deze mogelijkheid, moeten maatregelen getroffen worden om een verband te kunnen leggen tussen de genomen monsters en de dieren waarvan de onderzochte melk of sera afkomstig zijn.

   Indien een van de monsters positief reageert, moet het beslag onder officieel toezicht blijven totdat een negatief resultaat is geconstateerd voor ten minste twee individuele tests die, met een tussenpoos van ten minste vier maanden, zijn uitgevoerd op alle runderen ouder dan zes maanden, zulks overeenkomstig voornoemde bepalingen en in een laboratorium dat onder rechtstreeks toezicht staat van het onder A vermelde laboratorium."