II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

CONSEJO

DIRECTIVA DEL CONSEJO

de 14 de junio de 1988

por la que se modifica la Directiva 64/432/CEE y por la que se deroga la Directiva 80/1102/CEE en lo referente a la leucosis enzoótica bovina

(88/406/CEE)

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y, en particular, su artículo 43,

Vista la propuesta de la Comisión (1),

Visto el dictamen del Parlamento Europeo (2),

Visto el dictamen del Comité Económico y Social (3),

Considerando que una de las tareas de la Comunidad en el ámbito veterinario consiste en la mejora del estado sanitario del ganado a fin de asegurar una mejor rentabilidad de la ganadería;

Considerando que, a este respecto, resulta necesario proteger a la Comunidad contra la leucosis enzoótica bovina; que, además, la Comunidad ha emprendido ya una acción dirigida a la erradicación de dicha enfermedad, en las Directivas 77/391/CEE (4) y 78/52/CEE (5) y en la Decisión 87/58/CEE (6);

Considerando que este tipo de acción debe contribuir a que desaparezcan las trabas que subsisten en los intercambios intracomunitarios de animales vivos y que se deben a las diferencias de situación sanitaria;

Considerando que a este fin, han sido introducidas, hasta el 31 de diciembre de 1987, las medidas de protección contra la leucosis enzoótica bovina en la Directiva 64/432/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina (7), modificada en último término por el Reglamento (CEE) n° 3805/87 (8);

Considerando que conviene prorrogar dichas medidas, reconociendo al mismo tiempo nuevos métodos de detección de la leucosis enzoótica bovina;

Considerando que conviene, tras un período transitorio, poner fin a las reglas particulares previstas por el régimen actual para los países que aplicaban programas nacionales de lucha contra dicha enfermedad;

Considerando que es oportuno establecer normas relativas a la calificación del ganado con respecto a la leucosis enzoótica bovina;

Considerando que los Estados miembros deben, para calificar su ganado, poner en práctica un programa a fin de someter su ganado a una de las pruebas de detección de la leucosis previstas en el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE;

Considerando que a excepción de los animales de abasto de menos de 30 meses, los animales destinados a los intercambios intracomunitarios deberán proceder de un ganado examinado y haber sido sometidos a una prueba individual,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Con efectos del 1 de julio de 1988, la Directiva 64/432/CEE queda modificada como sigue:

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

1. En el artículo 2 se añadirá la letra siguiente:

«s) Ganado indemne de leucosis enzoótica bovina: un ganado en el que:

i) no se haya manifestado ni confirmado ningún caso de leucosis enzoótica bovina, ya sea clínicamente o a continuación de una de las pruebas practicadas conforme al Anexo G, en el curso de los dos últimos años;

ii) los animales mayores de 24 meses hayan reaccionado negativamente a dos pruebas que les hayan sido practicadas con arreglo al Anexo G, durante los 12 últimos meses, con un intervalo de 4 meses como mínimo o, en el caso de un ganado que ya haya cumplido esta exigencia, a una sola prueba practicada conforme a dicho Anexo;

iii) a partir de la fecha del primer control solamente se encuentren animales que hayan nacido en dicha ganadería o que procedan de una ganadería indemne de leucosis enzoótica bovina».

2. En el apartado 2 del artículo 3 se añadirá la letra siguiente:

«j) en la medida en que se trate de bovinos de reproducción, reproductores de raza pura, como están definidos en el artículo 1 de la Directiva 77/504/CEE, estrictamente reservados a la reproducción y que tengan un gran valor, proceder de una ganadería:

i) en el que ningún hecho que permita llegar a la conclusión de la existencia de leucosis enzoótica bovina haya sido puesto en conocimiento del veterinario oficial en el transcurso de los dos últimos años;

ii) cuyo propietario haya declarado no haber tenido conocimiento de tales hechos y, además, haya declarado por escrito, que el animal o los animales destinados a los intercambios intracomunitarios han nacido y se han criado en la mencionada ganadería o han formado parte integrante de dicha ganadería durante los 12 meses anteriores»;

3. El apartado 3 del artículo 3 se completará con la letra siguiente:

«d) proceder de una ganadería en la que nada haya permitido llegar a la conclusión de la existencia de casos de leucosis enzoótica bovina en el transcurso de los dos últimos años y, si tienen más de 12 meses, haber sido sometidos, con resultado negativo en los treinta días anteriores a su embarque, a una prueba individual practicada con arreglo al Anexo G.

No obstante, no se exigirá dicha prueba para los bovinos machos y los bovinos castrados de menos de 30 meses y destinados a la producción de carne, con tal que dichos animales vayan identificados con una señal especial en el momento de su embarque y que el Estado miembro adopte las disposiciones necesarias para evitar la contaminación de las ganaderías autóctonas».

4. En el apartado 1 del artículo 7 se añadirá la letra siguiente:

«G) En lo referente a las hembras de bovino de menos de 30 meses y destinadas a la producción de carne, aquellas que, no obstante lo dispuesto en la letra d) del apartado 3 del artículo 3, no hubieren sido sometidas a una prueba individual. Dichos animales deberán llevar una marca especial. El Estado miembro destinatario tomará cuantas disposiciones fueren necesarias para evitar la contaminación de las ganaderías autóctonas».

5. El apartado 2 del artículo 8 se completará con el párrafo siguiente:

«En lo referente especialmente a la leucosis enzoótica bovina y tratándose de los animales mencionados en la letra j) del apartado 2 del artículo 3, los Estados miembros estarán autorizados a exigir además, respetando las disposiciones generales del Tratado, que todos los animales de la ganadería de referencia, de más de 24 meses en la fecha de la prueba, hayan reaccionado negativamente a una prueba realizada con arreglo al Anexo G, en el transcurso de los 12 últimos meses. No obstante, no podrán exigirse tales garantías para la introducción de animales procedentes de un Estado miembro al que se le ha reconocido, según el procedimiento previsto en el artículo 12, que ofrece garantías suficientes respecto a la leucosis enzoótica bovina».

6. Se insertará el artículo siguiente:

«Artículo 8 bis

1. Los Estados miembros que apliquen desde 1980 un programa obligatorio nacional de profilaxis de la leucosis enzoótica bovina podrán supeditar la introducción en su territorio de bovinos de reproducción y de producción para su integración en ganaderías bovinas no sospechosas de leucosis, a la presentación de un certificado expedido el día del embarque por un veterinario oficial competente y redactado por lo menos en la o las lenguas del país destinatario, certificando que:

a) el citado veterinario no ha tenido conocimientos de hechos que permitan establecer la existencia de leucosis enzoótica bovina en el transcurso de los tres últimos años en la ganadería de procedencia y que el propietario del ganado ha declarado no haber tenido conocimiento de tales hechos, y que, además, ha declarado por escrito que el animal o los animales destinados a los intercambios en el seno de la Comunidad han nacido y han sido criados en dicha ganadería y han formado parte integrante de la misma durante los 12 últimos meses;

b) en el transcurso de los 12 últimos meses, todos los animales de más de 24 meses en la fecha en que se les hizo la prueba y pertenecientes a la ganadería de origen han reaccionado negativamente a una prueba llevada a cabo con arreglo al Anexo G.

2. Según el procedimiento previsto en el artículo 12, los Estados miembros no contemplados en el apartado 1 podrán ser autorizados a que apliquen las mismas exigencias para su territorio o, en lo referente al Reino Unido, para Irlanda del Norte, si se pusiera en marcha un plan de erradicación de la leucosis enzoótica bovina en aplicación de la Decisión 87/58/CEE, o si se demuestra que, en la fecha del recurso al Comité veterinario permanente, aplican al menos desde hace dos años un programa mínimo de erradicación que comprenda los siguientes requisitos mínimos:

— todos los tumores de los órganos y el sistema linfático de los bovinos deberán notificarse y ser examinados desde un punto de vista histológico por un laboratorio veterinario directamente supervisado por uno de los laboratorios mencionados en el Anexo G,

— todos los bovinos de las ganaderías que hayan estado en un contacto contagioso con un animal que tenga un tumor leucósico estarán sometidos a una prueba de investigación de la leucosis enzoótica bovina efectuada con arreglo a lo dispuesto en el Anexo G y en un laboratorio directamente supervisado por uno de los laboratorios mencionados en dicho Anexo,

— en una ganadería donde se haya detectado un animal aquejado de un tumor leucósico y en el que se haya confirmado el diagnóstico de leucosis enzoótica bovina, los animales infectados podrán salir de dicha ganadería sólo para el matadero y ello bajo control de las autoridades veterinarias competentes. La ganadería deberá permanecer bajo control oficial hasta que se dé un resultado negativo de por lo menos dos pruebas efectuadas con un intervalo de al menos cuatro meses, en todos los bovinos de más de 24 meses, de acuerdo con el Anexo G y en un laboratorio directamente supervisado por un laboratorio mencionado en dicho Anexo.

Las condiciones complementarias a las que podrá supeditarse dicha extensión para cada Estado miembro o parte de territorio correspondiente podrán precisarse en la decisión prevista en el párrafo primero».

7. En el Anexo E, al final de la letra a), se añadirá el siguiente guión:

«— leucosis enzoótica bovina».

8. En el Anexo F, modelo I:

a) En el punto V;

aa) después de la letra d), se insertará el texto siguiente:

«e) — se les hubiere mantenido durante los doce últimos meses (5) o, si tuvieren menos de 12 meses de edad, desde su nacimiento en una ganadería en la que, según consta al infraescrito y el propietario lo hubiere asegurado, no se hubiere detectado ningún caso de leucosis enzoótica bovina en el transcurso de los tres últimos años (2) (12),

— procedieren de una ganadería en la que nada permita asegurar la existencia de leucosis enzoótica bovina en el transcurso de los tres últimos años (2),

— en la fecha del examen, todos los bovinos de más de 24 meses, se hubieren sometido (2) (12), en el transcurso de los doce últimos meses (5), a una prueba serológica, con resultado negativo (13),

— en el plazo prescrito de treinta días (5), hubieren reaccionado negativamente (2) (5) (11) a una prueba individual (13) de detección de la leucosis enzoótica bovina,

— se destinaren al engorde (2) (11)»,

bb) las letras e) a i) pasarán a ser f) a j) respectivamente;

b) Después de la nota a pie de página (10), se añadirán las notas a pie de página siguientes:

«(11) Dicha excepción sólo se aplicará a los animales machos, de menos de 30 meses, destinados al engorde, en la medida en que dichos animales estén marcados de forma clara y estén sometidos a un control especial en el país de destino.

(12) Dicha indicación se necesitará sólo para los animales reproductores de raza pura estrictamente reservados a la reproducción y que sean muy valiosos.

(13) La prueba individual se habrá practicado con arreglo a lo dispuesto en el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE».

9. Se añadirá el Anexo G que figura en el Anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Con efectos desde el 1 de julio de 1990, la Directiva 64/432/CEE queda modificada como sigue:

1. Queda suprimida la letra j) del apartado 2 del artículo 3.

2. La letra d) del apartado 3 del artículo 3 se sustituirá por la letra d) que figura a continuación y se añadirán las letras e) y f):

«d) proceder de un ganado indemne de leucosis enzoótica bovina en el sentido de la letra s) del artículo 2;

e) además del requisito previsto en la letra d), en el caso de que tengan más de 12 meses, haber reaccionado negativamente a una prueba individual realizada con arreglo al Anexo G, durante los 30 días anteriores al embarque de los mismos;

f) no se someterán a los requisitos de las letras d) y e), cuando se trate de bovinos que tengan menos de 30 meses y estén destinados a la producción de carne, si:

i) proceden de un ganado en el que no se haya notificado ni confirmado ningún caso de leucosis enzoótica bovina durante los dos últimos años;

ii) están provistos de una marca especial en el momento de su embarque y se mantengan bajo control hasta su sacrificio,

siempre que el Estado miembro de destino adopte todas las medidas adecuadas para evitar la contaminación de las ganaderías autóctonas»;

3. El punto G del apartado 1 del artículo 7 queda suprimido.

4. Queda suprimido el último párrafo del apartado 2 del artículo 8.

5. Queda suprimido el artículo 8 *bis*.

6. En el modelo I del Anexo F:

— La letra e) del punto V se sustituirá por el texto siguiente:

«e) — se hayan mantenido durante los últimos doce meses (5) o, si tienen menos de 12 meses (5), desde su nacimiento en un ganado indemne de leucosis enzoótica bovina (2) (11),

— hayan reaccionado negativamente a una prueba individual (12) de detección de leucosis enzoótica bovina (2) (11) realizada dentro del plazo prescrito de 30 días (5),

— se hayan destinado al engorde (11)».

— La nota a pie de página (11) se sustituirá por el texto siguiente:

«(11) Dicha excepción sólo se autorizará para bovinos que tengan menos de 30 meses destinados al engorde, siempre que estos animales:

— provengan de una ganadería en la que no se haya notificado ni confirmado durante los dos últimos años ningún caso de leucosis enzoótica bovina,

— estén marcados de forma clara y estén sometidos a un control especial en el país de destino».

— Queda suprimida la nota a pie de página (12),

— La nota a pie de página (13) pasará a ser la nota (12).

Artículo 3

1. Para calificar su ganadería como indemne de leucosis enzoótica bovina, los Estados miembros aplicarán un programa de manera que sus ganados se sometan a una de las pruebas contempladas en el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE.

2. Los Estados miembros informarán a la Comisión al menos una vez al año del desarrollo de su programa, así como de los resultados obtenidos en la aplicación del mismo.

Artículo 4

El Consejo, a propuesta de la Comisión, establecerá, antes del 1 de enero de 1990, los criterios que permitan a un Estado miembro o a una parte del territorio de un Estado miembro el ser reconocidos como indemnes de leucosis enzoótica bovina y los requisitos a aplicar para garantizar el mantenimiento de este estatuto, así como las reglas aplicables a los intercambios a partir de regiones o de Estados miembros indemnes de leucosis enzoótica bovina.

Artículo 5

Los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones necesarias para ajustarse a los requisitos:

— de los artículos 1 y 3 a más tardar el 1 de julio de 1988,

— del artículo 2 a más tardar el 1 de julio de 1990.

Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 6

Queda derogada la Directiva 80/1102/CEE (1).

Artículo 7

Los destinatarios de la presente Directiva son los Estados miembros.

Hecho en Luxemburgo, el 14 de junio de 1988.

Por el Consejo

El Presidente

I. KIECHLE

(1) DO n° L 325 de 1. 12. 1980, p. 18.

ANEXO

«ANEXO G

PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE LA LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA

«La detección de la leucosis enzoótica bovina se realizará mediante la prueba de inmunodifusión, en las condiciones descritas en las letras A y B, o mediante la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) en las condiciones descritas en la letra C. El método de inmunodifusión sólo se aplicará en las pruebas individuales.

En el caso de que se cuestionaren los resultados de las pruebas se llevará a cabo una prueba de inmunodifusión como control suplementario.

A. **Pruebas de inmunodifusión en placas de gelosa**

1. El antígeno que habrá de utilizarse en esta prueba deberá contener glicoproteínas de virus de la leucosis bovina. El antígeno deberá estar estandarizado en relación a un suero patrón (Suero E 1) suministrado por el Statens Veterinaere Serum Laboratorium de Copenhague.

2. Los institutos estatales designados a continuación deberán encargarse de contrastar el antígeno estándar de trabajo del laboratorio en relación al suero patrón oficial CEE (suero E 1) suministrado por el Statens Veterinaere Serum Laboratorium de Copenhague.

   a) Alemania (RF): Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen;

   b) Bélgica: Instituto Nacional de Investigaciones Veterinarias, Bruselas;

   c) Francia: Laboratorio nacional de patología bovina, Lyon;

   d) Gran Ducado de Luxemburgo: —

   e) Italia: Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Perugia;

   f) Países Bajos: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;

   g) Dinamarca: Statens Veterinaere Serum Laboratorium, Køpenhavn;

   h) Irlanda: Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin;

   i) Reino Unido:

      1. Gran Bretaña: The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Inglaterra;

      2. Irlanda del Norte: The Veterinar Research Laboratory, Stormont, Belfast;

   j) España: Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Barcelona;

   k) Portugal: Laboratório nácional de Investigação Veterinária — Lisboa».

3. Los antígenos patrón utilizados en el laboratorio deberán ser presentados, por lo menos una vez al año, en los laboratorios de referencia CEE enumerados en el apartado 2 arriba citado, para someterlos a prueba en relación con el suero patrón CEE. Independientemente de dicha estandarización, el antígeno utilizado podrá ser contrastado con arreglo a lo dispuesto en la letra B.

4. La prueba aplicará los reactivos siguientes:

   a) antígeno: el antígeno deberá contener glicoproteínas específicas del virus de leucosis enzoótica bovina que haya sido estandarizado respecto al suero oficial CEE;

   b) el suero para prueba;

   c) un suero de control positivo conocido;

   d) gelosa:

      0,8 % agar,

      8,5 % NaCL,

      tampón Tris 0,05 M, pH 7,2

      deberán introducirse 15 milímetros de dicha gelosa en una placa de Petri de 85 milímetros de diámetro, lo que dará una profundidad de 2,6 milímetros de gelosa.

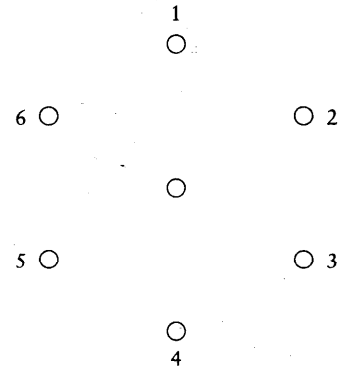
5. Se deberá hacer un dispositivo experimental de siete oquedades exentas de humedad mediante perforación de la gelosa hasta el fondo de la placa; dicha red consistirá en una oquedad central alrededor de la cual se ordenarán seis oquedades periféricas dispuestas en círculo.

   Diametro de la oquedad central: 4 milímetros

   Diametro de las oquedades periféricas: 6 milímetros

   Distancia entre las oquedades centrales y periféricas: 3 milímetros.

6. Se deberá llenar de antígeno patrón la oquedad central. Las oquedades periféricas 1 y 4 (ver esquema inferior) se llenarán con el suero positivo conocido, las oquedades 2, 3, 5 y 6 con los sueros de prueba. Las oquedades deberán llenarse hasta la desaparición del menisco.



7. Las cantidades obtenidas serán las siguientes:

antígeno:	32 microlitros,
suero control:	73 microlitros,
suero de prueba:	73 microlitros.

8. La incubación deberá durar 72 horas a temperatura ambiente (20-27 °C) en un recinto húmedo cerrado.

9. La prueba podrá leerse 24 horas después, luego, 48 horas más tarde pero no se podrá obtener ningún resultado final antes de 72 horas:

   a) un suero de prueba será positivo si forma una curva de precipitación específica con el antígeno del virus de la leucosis bovina y si dicha curva coincidiera con la del suero control;

   b) un suero de prueba será negativo si no da una curva de precipitación específica con el antígeno del virus de la leucosis bovina y si no desvía la curva del suero control;

   c) la reacción no podría considerarse como concluyente si:

      (i) desviara la curva del suero control hacia la oquedad del antígeno del virus de la leucosis bovina sin forma unar curva de precipitación que se pueda considerar con el antígeno, o

      (ii) si no fuera posible interpretarlo como negativo o positivo.

   Para las reacciones no concluyentes, se podrá repetir la prueba y utilizar suero concentrado.

B. **Método de estandarización del antígeno**

Soluciones y materiales necesarios:

1. 40 mililitros de gelosa de 1,6 % en un tampón Tris 0,05 M/HCL, pH 7,2, con 8,5 % de NaCL;
2. 15 mililitros de un suero de leucosis bovina que sólo tenga anticuerpos respecto a las glicoproteínas del virus de la leucosis bovina, suero diluido al 1/10 en un tampón Tris 0,05 M/HCL, pH 7,2 con 8,5 % de NaCL;
3. 15 mililitros de un suero de la leucosis bovina que sólo contenga anticuerpos respecto a las glicoproteínas del virus de la leucosis bovina, suero diluido a 1/5 en un tampón Tris 0,05 M/HCL, pH 7,2 con 8,5 % de NaCL;
4. cuatro placas de Petri de plástico, de un diámetro de 85 milímetros;
5. un punzón de un diámetro de 4 a 6 milímetros;
6. un antígeno de referencia;
7. el antígeno de estandarizar;
8. un baño de agua caliente (56 °C).

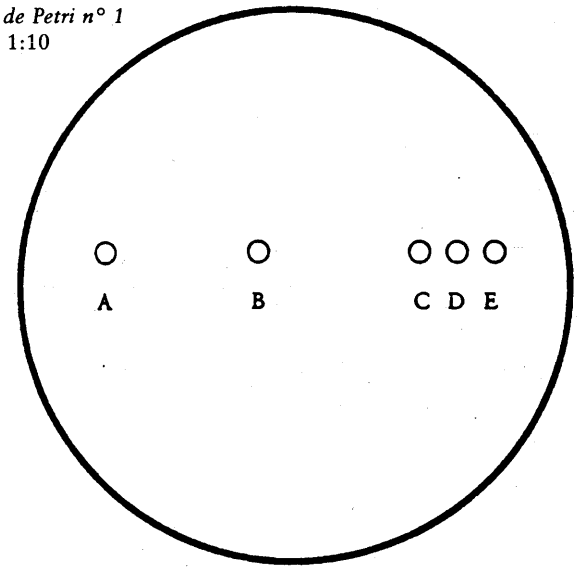
Procedimiento:

Disolver la gelosa (1,6 %) en el tampón Tris/HCL calentando con precaución hasta 100 °C. Colocar el baño de agua a 56 °C durante una hora aproximadamente. Colocar además las soluciones de suero de la leucosis bovina en el baño de agua a 56 °C.

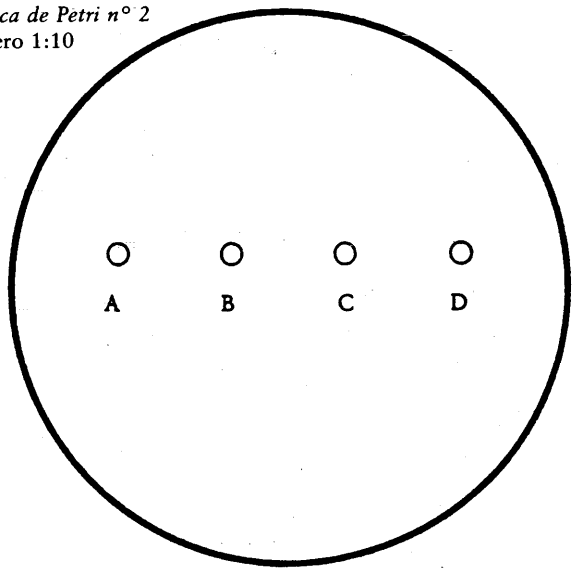
Mezclar, a continuación 15 mililitros de la solución de gelosa a 56 °C con los 15 mililitros de suero de la leucosis bovina (1:10), agitar rápidamente y verter en dos placas de Petri a razón de 15 mililitros por placa. Volver a comenzar las operaciones descritas anteriormente con el suero de la leucosis bovina diluida al 1/5.

Cuando la gelosa haya endurecido, los agujeros se practicarán de la forma siguiente:

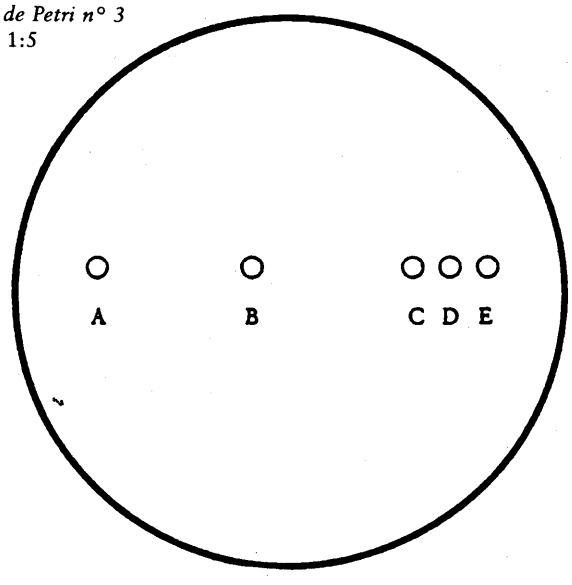
Placa de Petri n° 1
Suero 1:10



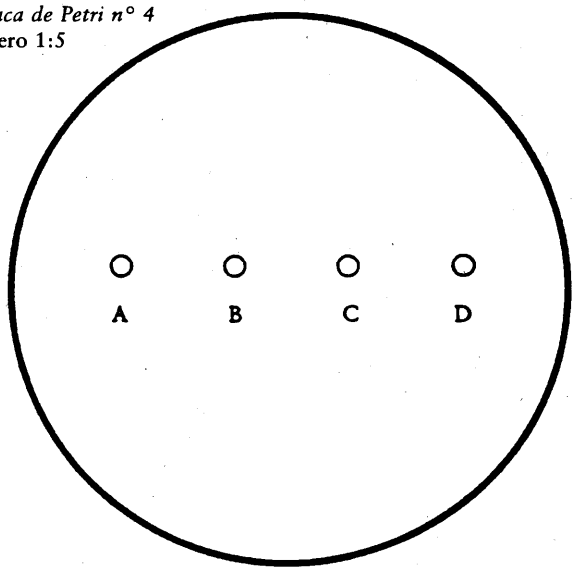
Placa de Petri n° 2
Suero 1:10



Placa de Petri n° 3
Suero 1:5



Placa de Petri n° 4
Suero 1:5



Añadido de antígenos:

I. Placas de Petri n^{os} 1 y 3:

oquedad A = antígeno de referencia no diluido,
oquedad B = antígeno de referencia diluido a 1/2,
oquedad C + E = antígeno de referencia,
oquedad D = antígeno de prueba no diluido.

II. Placas de Petri n^{os} 2 y 4

oquedad A = antígeno de prueba no diluido,
oquedad B = antígeno de prueba diluido a 1/2,
oquedad C = antígeno de prueba diluido a 1/4,
oquedad D = antígeno de prueba diluido a 1/8.

Instrucciones complementarias:

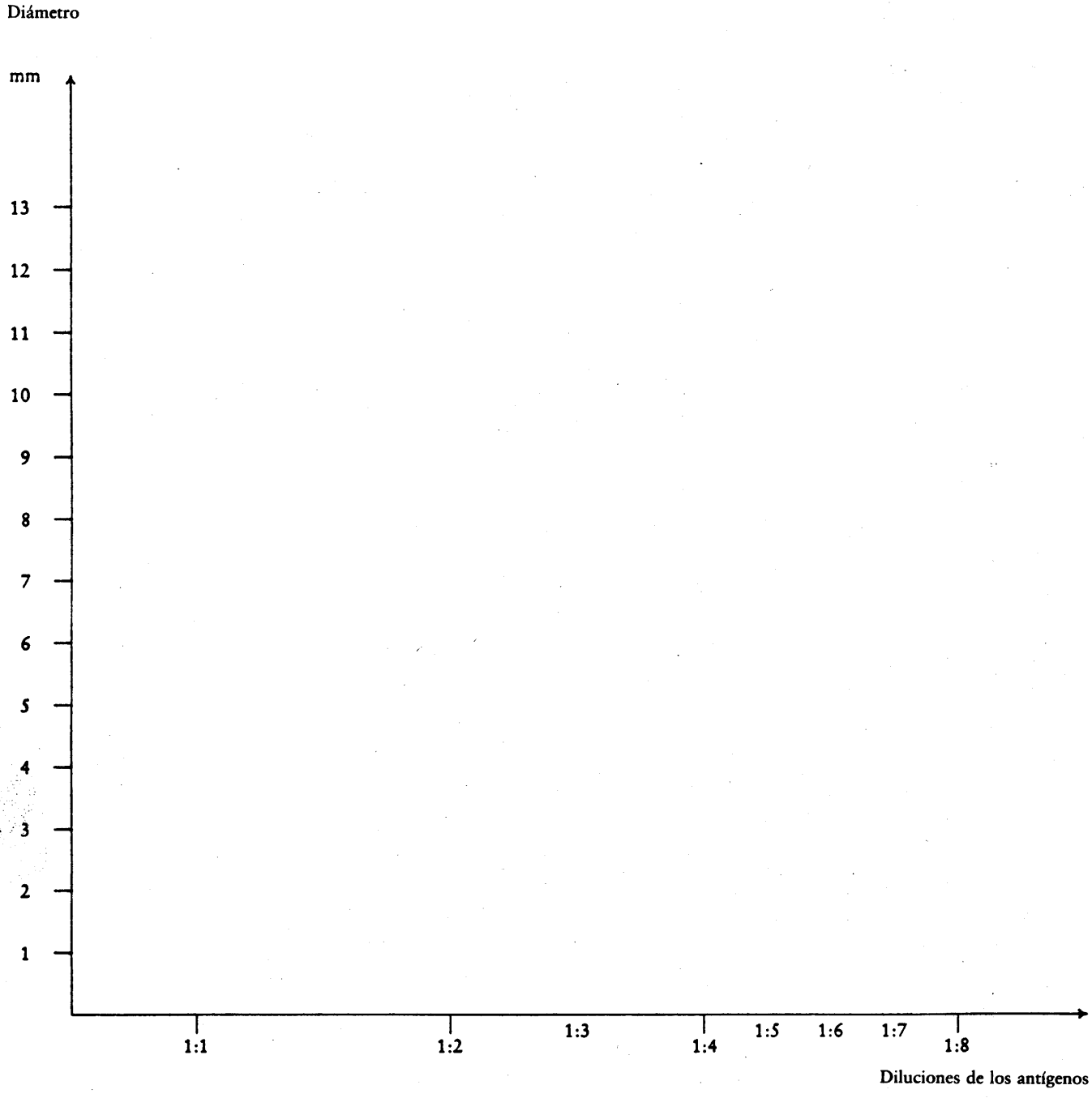
1. El experimento deberá realizarse con dos grados de dilución del suero (1:5 y 1:10) a fin de obtener la precipitación óptima.

2. Si el diámetro de precipitación fuere excesivamente débil para cada uno de los dos grados de dilución, el suero deberá ser objeto de una dilución suplementaria.

3. Si el diámetro de precipitación fuera excesivo para los dos grados de dilución y si el precipitado desapareciere, se deberá escoger un grado más débil de dilución para el suero.

4. La concentración final de la gelosa deberá establecerse en 0,8 % y la de los sueros en 5 % y en 10 % respectivamente.

5. Anotar los diámetros medidos en el sistema coordinado siguiente. La dilución de trabajo será aquella en la que se registre el mismo diámetro para el antígeno de prueba que para el antígeno de referencia.



C. **Prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para la detección de la leucosis enzoótica bovina**

1. Los materiales y reactivos que han de utilizarse en el método ELISA son los siguientes:

   a) microplacas de fase sólida, platillos o cualquier otra fase sólida;

   b) el antígeno se fijará a la fase sólida con o sin ayuda de anticuerpos captores policlonales o monoclonales. Si el antígeno se asocia directamente a la fase sólida, todas las muestras de ensayo que den reacciones positivas deberán someterse a nuevas pruebas con el antígeno de control. El antígeno de control deberá ser idéntico al antígeno examinado, excepto en el caso de los antígenos VLB (virus de la leucosis bovina). Si los anticuerpos captores están asociados a la fase sólida, los anticuerpos sólo deben reaccionar ante antígenos VLB;

   c) el líquido biológico a examinar (suero o leche);

   d) un control positivo y negativo;

   e) conjugados: una inmunoglobulina antibovina con biotina o una enzima conjugada o una inmunoglobulina anti-VLB con biotina o una enzima conjugada;

   f) avidina: enzima para ensayos donde se usen preparaciones de inmunoglobulina con biotina;

   g) un sustrato adaptado a los enzimas utilizados;

   h) una solución de interrupción;

   i) soluciones tamponadas para la dilución de las muestras de ensayo, para las preparaciones de reactivos y el lavado;

   j) un sistema de lectura con filtros apropiados que corresponda al sustrato utilizado.

2. *Prueba de normalización y de sensibilidad*

   La sensibilidad del ensayo ELISA deberá ser de un nivel tal que el suero E4 dé positivo tras diluirse 10 veces (muestras de suero) ó 250 veces (muestras de leche) más que la dilución obtenida a partir de muestras puestas en común.

   En ensayos en los que las muestras (suero y leche) sean sometidas a pruebas por separado, el suero E4 diluido en una proporción de 1 a 10 (suero negativo) o de 1 a 250 (leche negativa) deberá dar positivo cuando se le haga la prueba en la misma dilución de ensayo que la utilizada para las pruebas individuales.

   El laboratorio veterinario nacional de Copenhague suministrará el suero E4.

3. *Condiciones de utilización de la prueba ELISA*

   El método ELISA podrá aplicarse a una muestra de leche tomada de la leche de recogida procedente de una explotación donde al menos 30 % de las vacas lecheras estén en período de lactación siempre que la muestra se refiera a la leche producida por menos de 50 vacas y a una concentración de lactosuero de la leche recogida entre un número de 20 y 50 vacas como máximo y que, cuando la recogida de leche proceda de más de 50 vacas, el número de muestras se incremente proporcionalmente.

   El método ELISA podrá aplicarse asimismo a una muestra de sangre procedente de 50 animales como máximo.

   Cuando se utilice una de las posibilidades antes citadas, deberán adoptarse medidas que garanticen la relación entre las muestras tomadas y los animales de los que procedan la leche o el suero que se examinan.

   Si una de las muestras diere una reacción positiva, el ganado debe quedar bajo control oficial hasta que haya podido registrarse un resultado negativo en al menos dos pruebas individuales efectuadas, con un intervalo de cuatro meses como mínimo, en todos los bovinos de más de seis meses, de conformidad con las disposiciones anteriormenete citadas y en un laboratorio directamente supervisado por un laboratorio mencionado en la letra A».