

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 15ης Δεκεμβρίου 2009

για την τροποποίηση του παραρτήματος Δ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τις
διαγνωστικές δοκιμές για την ενζωτική λεύκωση των βοοειδών

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό Ε(2009) 9951]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2009/976/ΕΕ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

την οδηγία 64/432/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 26ης Ιουνίου 1964, περί προβλημάτων υγειονομικού ελέγχου στον τομέα των ενδοκοινοτικών συναλλαγών βοοειδών και χοιροειδών⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 16 παράγραφος 2,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Η οδηγία 64/432/ΕΟΚ εφαρμόζεται στο ενδοεθνικό εμπόριο των βοοειδών και στο κεφάλαιο II του παραρτήματος Δ καθορίζονται οι διαγνωστικές δοκιμές για την ενζωτική λεύκωση των βοοειδών (ΕΛΒ) που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και την εκρίζωση της εν λόγω νόσου και για την επιτήρηση και παρακολούθηση, καθώς και για τη δημιουργία και τη διατήρηση επίσημου καθεστώτος και πιστοποίησης αγέλης απαλλαγμένης από την ενζωτική λεύκωση των βοοειδών που απαιτείται για το ενδοεθνικό εμπόριο βοοειδών.
- (2) Το κεφάλαιο II του παραρτήματος Δ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ προβλέπει ότι οι δοκιμές για την ΕΛΒ πρέπει να πραγματοποιούνται είτε μέσω της δοκιμασίας ανοσοδιάχυσης σε γέλη άγαρ (AGID) με τη χρήση τυποποιημένου αντιγόνου σε σχέση με τον επίσημο πρότυπο ορό ΕΕ (ορός ΕΙ), ή μέσω δοκιμής ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης (ELISA) τυποποιημένης σύμφωνα με τον ορό Ε4. Αμφότεροι οι οροί παρέχονται από το Εθνικό Κτηνιατρικό Ινστιτούτο του Τεχνικού Πανεπιστημίου της Δανίας.
- (3) Ένα νέο πρότυπο ορού για την ΕΛΒ (ορός Ε05) έχει αναπτυχθεί πρόσφατα από το εργαστήριο αναφοράς για την ενζωτική λεύκωση των βοοειδών στη Γερμανία (Friedrich-Loeffler-Institute) του Διεθνούς Οργανισμού για την Υγεία των Ζώων (ΟΙΕ) σε συνεργασία με τα εργαστήρια αναφοράς του ΟΙΕ στο Ηνωμένο Βασίλειο (Veterinary Laboratories Agency) και στην Πολωνία (National Veterinary Research Institute), αφού δοκιμάστηκε με δοκιμή δακτυλίου μεταξύ αυτών των εργαστηρίων. Ο ορός Ε05 έχει επικυρωθεί σε σχέση με τους ορούς ΕΙ και Ε4 με διάφορες δοκιμές AGID και ELISA και συνεπώς συμπεριλήφθηκε ως διαπι-

στευμένο πρότυπο ορού του ΟΙΕ στο τμήμα Β(2) του κεφαλαίου 2.4.11 του Εγχειριδίου Διαγνωστικών Δοκιμών και Εμβολίων για χερσαία ζώα του ΟΙΕ, έκτη έκδοση, 2008. Αυτός ο ορός διατίθεται από το εργαστήριο αναφοράς για την ενζωτική λεύκωση των βοοειδών του ΟΙΕ στη Γερμανία.

- (4) Επιπλέον, το Εθνικό Κτηνιατρικό Ινστιτούτο, του Τεχνικού Πανεπιστημίου της Δανίας ενημέρωσε την Επιτροπή ότι δεν είναι πλέον σε θέση να εκπληρώσει τις υποχρεώσεις του για την προμήθεια με τα πρότυπα ορών τα οποία προβλέπονται σήμερα στο κεφάλαιο II παράρτημα Δ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ.
- (5) Οι αρμόδιες γερμανικές αρχές και το Ινστιτούτο Friedrich-Loeffler συμφώνησαν να είναι οι προμηθευτές του ορού Ε05, ο οποίος συνεπώς θα καταστεί το νέο επίσημο πρότυπο ορού της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) για την ΕΛΒ.
- (6) Συνεπώς, η οδηγία 64/432/ΕΟΚ πρέπει να τροποποιηθεί ανάλογα.
- (7) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων,

ΕΞΕΛΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Το κεφάλαιο II του παραρτήματος Δ της οδηγίας 64/432/ΕΚ αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος της παρούσας απόφασης.

Άρθρο 2

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 15 Δεκεμβρίου 2009.

Για την Επιτροπή
Ανδρούλλα ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ
Μέλος της Επιτροπής

⁽¹⁾ ΕΕ 121 της 29.7.1964, σ. 1977/64.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το κεφάλαιο II του παραρτήματος Δ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΖΩΟΤΙΚΗ ΛΕΥΚΩΣΗ ΒΟΟΕΙΔΩΝ

Οι έλεγχοι για ενζωοτική λεύκωση βοοειδών πραγματοποιούνται με τη βοήθεια της δοκιμασίας ανοσοδιάχυσης σε γέλη άγαρ (AGID) σε συνθήκες που περιγράφονται στα τμήματα Α και Β ή με τη δοκιμή ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης (Elisa) υπό τους όρους που περιγράφονται στο τμήμα Γ. Η δοκιμασία ανοσοδιάχυσης σε γέλη άγαρ μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για δοκιμασίες σε μεμονωμένα δείγματα. Αν υπάρξει δεόντως αιτιολογημένη αμφισβήτηση των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών, διενεργείται συμπληρωματικός έλεγχος με τη μέθοδο της δοκιμασίας ανοσοδιάχυσης με γέλη άγαρ.

Οι δοκιμασίες AGID και Elisa θα τυποποιηθούν σε σχέση με τον ορό Ε05, που θα είναι το επίσημο πρότυπο ορού της ΕΕ, που χορηγείται από το:

Friedrich-Loeffler-Institut

Ομοσπονδιακό Ερευνητικό Ινστιτούτο για την Υγεία των Ζώων

Εργαστήριο Αναφοράς για την Ενζωοτική Λεύκωση Βοοειδών (ΕΛΒ) του ΟΙΕ

Südufer 10

17493 Greifswald — Insel Riems

Germany.

Α. Δοκιμασία ανοσοδιάχυσης σε γέλη άγαρ για ενζωοτική λεύκωση των βοοειδών

1. Το αντιγόνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία περιέχει γλυκοπρωτείνες του ιού της λεύκωσης των βοοειδών. Το αντιγόνο τυποποιείται σε σχέση με τον ορό Ε05.
2. Τα κρατικά ιδρύματα, τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς ή τα επίσημα ινστιτούτα που έχουν οριστεί σύμφωνα με το άρθρο 6α για το συντονισμό των προτύπων και των μεθόδων διάγνωσης των δοκιμασιών για την ενζωοτική λεύκωση των βοοειδών είναι αρμόδια για τη βαθμονόμηση του τυποποιημένου αντιγόνου ανίχνευσης του εργαστηρίου έναντι του ορού Ε05.
3. Τα πρότυπα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο υποβάλλονται τουλάχιστον μία φορά το χρόνο στα κρατικά ιδρύματα, τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς ή τα επίσημα ινστιτούτα που έχουν οριστεί σύμφωνα με το άρθρο 6α για δοκιμασίες σε σχέση με τον ορό Ε05. Εκτός από την τυποποίηση αυτή, το αντιγόνο που χρησιμοποιείται μπορεί να βαθμονομείται με τη μέθοδο που περιγράφεται στο τμήμα Β.
4. Τα αντιδραστήρια των δοκιμασιών αποτελούνται από:
 - α) αντιγόνο: το αντιγόνο περιέχει ειδική γλυκοπρωτεΐνη του ιού της ενζωοτικής λεύκωσης των βοοειδών που έχει τυποποιηθεί σε σχέση με τον ορό Ε05·
 - β) τον ορό δοκιμασίας·
 - γ) τον γνωστό θετικό ορό ελέγχου·
 - δ) γέλη άγαρ:
 - 0,8 % άγαρ,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 Μ Ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 7,2·
 - 15 ml του εν λόγω άγαρ τοποθετείται σε τρυβλίο petri διαμέτρου 85 mm, το οποίο έχει βάθος σε γέλη 2,6 mm.
5. Ένα σχέδιο δοκιμασίας επτά κοιλοτήτων απαλλαγμένων από την υγρασία κόβεται μέσα στο άγαρ στον πυθμένα του τρυβλίου· το σχέδιο αποτελείται από μια κεντρική κοιλότητα καθώς και έξι κοιλοτήτες κυκλικά γύρω από αυτή.

Διάμετρος της κεντρικής κοιλότητας: 4 mm

Διάμετρος των περιφερειακών κοιλοτήτων: 6 mm

Απόσταση μεταξύ της κεντρικής κοιλότητας και των περιφερειακών κοιλοτήτων: 3 mm

6. Η κεντρική κοιλότητα πληρούται με το τυποποιημένο αντιγόνο. Οι περιφερειακές κοιλότητες 1 και 4 που περιγράφονται στο σημείο B.3 πληρούνται με τον γνωστό θετικό ορό· οι κοιλότητες 2, 3, 5 και 6 με τους δοκιμαστικούς ορούς. Οι κοιλότητες πληρούνται μέχρι εξαφάνισης του μηνίσκου.
7. Προκύπτουν οι κάτωθι ποσότητες:
- αντιγόνο: 32 μl,
 - ορός ελέγχου: 73 μl,
 - ορός δοκιμασίας: 73 μl.
8. Η επώαση διαρκεί 72 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-27 °C) μέσα σε κλειστό υγρό θάλαμο.
9. Η ανάγνωση της δοκιμασίας μπορεί να γίνει μετά από 24 έως 48 ώρες, αλλά τελικό αποτέλεσμα δεν δύναται να επιτευχθεί πριν από 72 ώρες:
- α) ο ορός δοκιμασίας είναι θετικός όταν σχηματίζει μια ειδική γραμμή ιζήματος με το αντιγόνο του ιού λεύκωσης των βοοειδών (IAB) και όταν σχηματίζει πλήρη γραμμή ταυτοποίησης με τον ορό ελέγχου·
 - β) ο ορός δοκιμασίας είναι αρνητικός εάν δεν σχηματίζει μια ειδική γραμμή ιζήματος με το αντιγόνο IAB και δεν κάμπτεται τη γραμμή του ορού ελέγχου·
 - γ) η αντίδραση θεωρείται ότι έχει αμφίβολο αποτέλεσμα αν:
 - i) κάμπτεται τη γραμμή του ορού ελέγχου προς την κοιλότητα με το αντιγόνο του ιού της λεύκωσης των βοοειδών (IAB) δίχως να σχηματίζει ορατή καμπύλη ιζήματος με το αντιγόνο· ή
 - ii) αν δεν είναι δυνατόν να ερμηνευθεί ως αρνητική ή θετική.
- Για αντιδράσεις με αμφίβολα αποτελέσματα, δύναται να επαναληφθεί η δοκιμασία και να χρησιμοποιηθεί συμπυκνωμένος ορός.
10. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε άλλος σχηματισμός ή διάταξη των κοιλοτήτων, υπό την προϋπόθεση ότι η αραιώση του ορού E4 1:10 σε αρνητικό ορό ανιχνεύεται ως θετική.

B. Μέθοδος τυποποίησης του αντιγόνου

1. Απαιτούμενα διαλύματα και υλικά:

- α) 40 ml αгарόζης 1,6 % σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 % M Tris/HCl, pH 7,2 με 8,5 % NaCl·
- β) 15 ml ενός ορού λεύκωσης των βοοειδών που έχει αντισώματα μόνον κατά των γλυκοπρωτεϊνών του ορού του ιού της λεύκωσης των βοοειδών, ορού σε διάλυση 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 με 8,5 % NaCl·
- γ) 15 ml ενός ορού λεύκωσης των βοοειδών που έχει αντισώματα μόνο κατά των γλυκοπρωτεϊνών του ορού του ιού της λεύκωσης των βοοειδών, ορού σε διάλυση 1:5 σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 με 8,5 % NaCl·
- δ) τέσσερα τρυβλία του Petri από πλαστική ύλη, διαμέτρου 85 mm·
- ε) ένας στιγεύς (τρυπητήρι) διαμέτρου 4-6 mm·
- στ) ένα αντιγόνο αναφοράς·
- ζ) το αντιγόνο προς τυποποίηση·
- η) λουτρό θερμού ύδατος (56 °C).

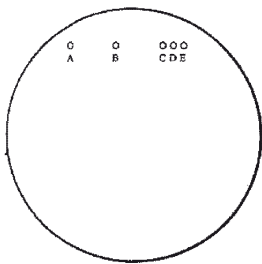
2. Διαδικασία:

Διαλύεται η αгарόζη (1,6 %) στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl θερμαίνοντας προσεκτικά μέχρι τους 100 °C. Τοποθετείται στο λουτρό ύδατος 56 °C για μια ώρα περίπου. Επίσης, τοποθετούνται στο λουτρό ύδατος 56 °C τα διαλύματα του ορού της λεύκωσης των βοοειδών.

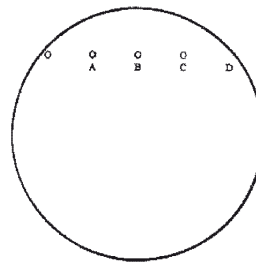
Εν συνεχεία, αναμειγνύονται 15 ml του διαλύματος της αгарόζης 56 °C με 15 ml του ορού της λεύκωσης των βοοειδών (1:10), ανακινούνται γρήγορα και χύνονται στα δύο τρυβλία του Petri, από 15 ml στο καθένα. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία αυτή με τον ορό της λεύκωσης των βοοειδών σε αραιώση 1:5,

Όταν η αγαρόζη έχει σκληρύνει, οι κοιλότητες σ' αυτήν γίνονται ως εξής:

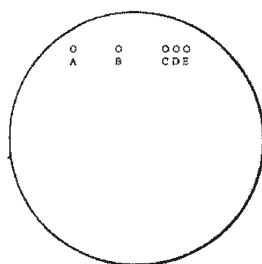
Τρυβλίο Petri αριθ. 1
Ορός 1:10



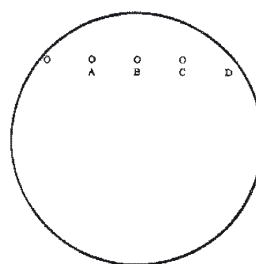
Τρυβλίο Petri αριθ. 2
Ορός 1:10



Τρυβλίο Petri αριθ. 3
Ορός 1:5



Τρυβλίο Petri αριθ. 4
Ορός 1:5



3. Προσθήκη αντιγόνου:

α) Τρυβλία petri 1 και 3:

- i) κοιλότητα A — αδιάλυτο αντιγόνο αναφοράς,
- ii) κοιλότητα B — αντιγόνο αναφοράς αραιωμένο 1:2,
- iii) κοιλότητες Γ και E — αντιγόνο αναφοράς,
- iv) κοιλότητα Δ — αδιάλυτο αντιγόνο δοκιμής,

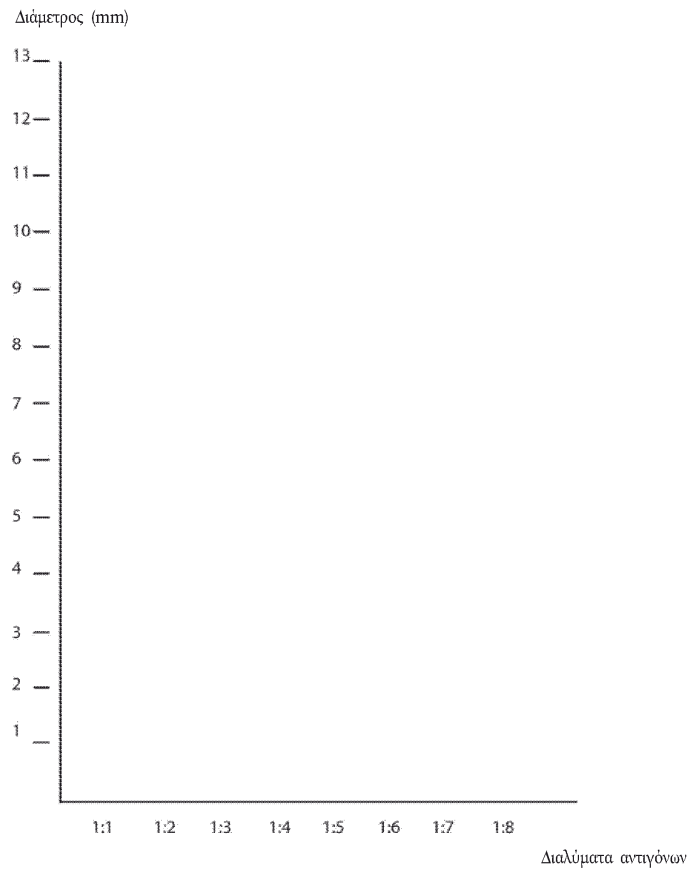
β) Τρυβλία petri 2 και 4:

- i) κοιλότητα A — αδιάλυτο αντιγόνο δοκιμής,
- ii) κοιλότητα B — αντιγόνο δοκιμής αραιωμένο 1:2,
- iii) κοιλότητα B — αντιγόνο δοκιμής αραιωμένο 1:4,
- iv) κοιλότητα B — αντιγόνο δοκιμής αραιωμένο 1:8,

4. Πρόσθετες οδηγίες:

- α) Το πείραμα πρέπει να διεξαχθεί με δύο βαθμούς αραιώσης του ορού (1:5 και 1:10) για να επιτευχθεί η πλέον ευνοϊκή καθίζηση·
- β) Αν η διάμετρος καθίζησης είναι πολύ μικρή και για τους δύο βαθμούς αραιώσης, τότε ο ορός πρέπει να αραιωθεί περαιτέρω·
- γ) Αν η διάμετρος της ολικής καθίζησης είναι πολύ μεγάλη και αμυδρή και για τους δύο βαθμούς αραιώσης, επιλέγεται μικρότερος βαθμός αραιώσης·
- δ) Η τελική συγκέντρωση της αγαρόζης πρέπει να είναι 0,8 % των δε ορών 5 % και 10 % αντιστοίχως·

- ε) Να σημειωθούν οι μετρημένες διαμέτροι στο ακόλουθο σύστημα συντεταγμένων. Το διάλυμα του αντιγόνου προς δοκιμή με την ίδια διάμετρο όπως το αντιγόνο αναφοράς είναι το διάλυμα εργασίας.



Γ. Δοκιμή ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης (Elisa) για την ανίχνευση της ενζωστικής λεύκωσης των βοοειδών

1. Το υλικό και τα αντιδραστήρια που πρέπει να χρησιμοποιηθούν έχουν ως εξής:

- α) μικροπλάκες στερεάς μορφής, κυαθίσκοι ή οποιοδήποτε άλλο στερεό υλικό·
- β) το αντιγόνο καθιλώνεται στη στερεά φάση με ή χωρίς τη βοήθεια πολυκλωνικού ή μονοκλωνικού δεσμευτικού αντισώματος. Σε περίπτωση που γίνεται το επίχρισμα του αντιγόνου απευθείας στη στερεά φάση, όλα τα δείγματα της δοκιμής που αντιδρούν θετικά πρέπει να επανεξεταστούν σε σχέση με το αντιγόνο ελέγχου. Το αντιγόνο ελέγχου πρέπει να είναι ακριβώς το ίδιο με το εξεταζόμενο αντιγόνο, με τη διαφορά ότι λείπουν τα αντιγόνα του ιού της ΕΛΒ. Εάν τα δεσμευτικά αντισώματα είναι επιχρισμένα στη στερεά φάση, τα αντισώματα δεν πρέπει να αντιδρούν σε άλλα αντιγόνα εκτός των αντιγόνων ιού της λεύκωσης των βοοειδών·
- γ) το βιολογικό υγρό που πρόκειται να δοκιμαστεί·
- δ) αντίστοιχος θετικός ή αρνητικός μάρτυρας·
- ε) συζυγές·
- στ) υπόστρωμα κατάλληλο για το χρησιμοποιούμενο υλικό·
- ζ) ανασχετικό διάλυμα, εφόσον αυτό είναι αναγκαίο·
- η) διαλύματα για την αραιώση των υπό δοκιμασία δειγμάτων, την παρασκευή των αντιδραστηρίων και την πλύση·
- θ) σύστημα ανάγνωσης κατάλληλο για το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα.

2. Τυποποίηση και βαθμός ευαισθησίας της δοκιμής

Η ευαισθησία της δοκιμής Elisa πρέπει να είναι τέτοιου βαθμού ώστε ο ορός E05 να αντιδρά θετικά όταν αραιώνεται στο δεκαπλάσιο (δείγματα ορού) ή στο 250πλάσιο (δείγματα γάλακτος) της αραιώσης που προέρχεται από την ανάμειξη των επιμέρους δειγμάτων, αν αυτά περιλαμβάνονται σε μεγάλες συλλογές. Στις αναλύσεις όπου τα δείγματα (ορού και γάλακτος) υποβάλλονται σε δοκιμασία ξεχωριστά, ο ορός E05, αραιωμένος σε αναλογία 1:10 (αν πρόκειται για αρνητικό ορό) ή σε αναλογία 1:250 (αν πρόκειται για αρνητικό γάλα) πρέπει να αντιδρά θετικά κατόπιν δοκιμής με την ίδια αραιώση που χρησιμοποιείται για τις δοκιμές των επιμέρους ορών. Τα ινστιτούτα που αναφέρονται στο σημείο 2 του τμήματος Α είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της ποιότητας της μεθόδου Elisa και ιδίως, για τον καθορισμό, για την κάθε παρτίδα παραγωγής, του αριθμού των δειγμάτων που πρέπει να συγκεντρωθούν βάσει του τίτλου που προκύπτει από τον E05 ορό.

3. Προϋποθέσεις για τη χρησιμοποίηση της Elisa για την ανίχνευση της ενζωτικής λεύκωσης των βοοειδών

α) Η δοκιμή Elisa μπορεί να χρησιμοποιείται σε δείγματα ορού και γάλακτος.

β) Όταν η δοκιμή Elisa χρησιμοποιείται για σκοπούς πιστοποίησης σύμφωνα με το άρθρο 6 παράγραφος 2 στοιχείο γ) ή για τη δημιουργία και διατήρηση καθεστώτος αγέλης σύμφωνα με το παράρτημα Δ (I), η συλλογή δειγμάτων ορού ή γάλακτος πραγματοποιείται με τρόπο ώστε τα δείγματα που λαμβάνονται για εξέταση να μπορούν αναμφισβήτητα να σχετίζονται με τα επιμέρους ζώα που περιλήφθηκαν στη συλλογή. Κάθε επιβεβαιωτική δοκιμασία πραγματοποιείται σε δείγματα που λαμβάνονται από επιμέρους ζώα.

γ) Όταν η δοκιμή Elisa χρησιμοποιείται σε δείγμα χύδην γάλακτος, το δείγμα αυτό λαμβάνεται από το γάλα που έχει συλλεχθεί από αγέλη που περιλαμβάνει τουλάχιστον 30 % αγελάδες γαλακτοπαραγωγής σε περίοδο θηλασμού. Κάθε επιβεβαιωτική δοκιμασία πραγματοποιείται σε δείγματα ορού ή γάλακτος που λαμβάνονται από επιμέρους ζώα.»
