

KOMMISSIONENS BESLUT

av den 15 december 2009

om ändring av bilaga D till rådets direktiv 64/432/EEG när det gäller diagnostiska tester för
enzootisk bovin leukos

[delgivet med nr K(2009) 9951]

(Text av betydelse för EES)

(2009/976/EU)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DETTA BESLUT

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktions-
sätt,

med beaktande av rådets direktiv 64/432/EEG av den 26 juni
1964 om djurhälsoproblem som påverkar handeln med nöt-
kreatur och svin inom gemenskapen ⁽¹⁾, särskilt artikel 16 andra
stycket, och

av följande skäl:

- (1) Direktiv 64/432/EEG tillämpas på handeln inom unionen med nötkreatur och i kapitel II i bilaga D till det direktivet föreskrivs de metoder för diagnos av enzootisk bovin leukos som ska användas för bekämpning och utrotning av sjukdomen, för kontroll och uppföljning samt för såväl säkerställande av att besättningar är och förblir fria från enzootisk bovin leukos som utställande av intyg som krävs för handeln inom unionen med nötkreatur.
- (2) I kapitel II i bilaga D till direktiv 64/432/EEG föreskrivs att testning av enzootisk bovin leukos ska utföras med hjälp av antingen immundiffusionstest i agargel (Agid) med ett antigen som standardiserats i förhållande till det officiella EU-standardserumet (EI-serum), eller ett Elisaprov (*enzyme-linked immunosorbent assay*) som standardiserats i förhållande till E4-serum. Båda standardserumen tillhandahålls av Veterinärinstitutet vid Danmarks Tekniske Universitet.
- (3) Ett nytt standardserum för enzootisk bovin leukos (E05-serum) har nyligen utvecklats av OIE:s (Världsförbundet för djurhälsa) referenslaboratorium för enzootisk bovin leukos i Tyskland (*Friedrich-Loeffler-Institut*) i samarbete med OIE:s referenslaboratorier i Förenade kungariket (*Veterinary Laboratories Agency*) och Polen (*Państwowy Instytut Weterynaryjny*, nationella institutet för forskning inom veterinärmedicin), efter att ha testats med hjälp av ett ringtest där de berörda laboratorierna medverkade. E05-serumet har validerats i förhållande till EI- och E4-serumen med olika Agid- och Elisatester och har följaktligen införts som ett ackrediterat OIE-standardse-

rum i kapitel 2.4.11 avsnitt B.2 i OIE:s *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, sjätte upplagan, 2008. Detta serum tillhandahålls av OIE:s referenslaboratorium för enzootisk bovin leukos i Tyskland.

- (4) Dessutom har Veterinärinstitutet vid Danmarks Tekniske Universitet meddelat kommissionen att det inte längre kan uppfylla sina skyldigheter när det gäller att tillhandahålla de standardserum som för närvarande omfattas av kapitel II i bilaga D till direktiv 64/432/EEG.
- (5) Behöriga myndigheter i Tyskland och Friedrich-Loeffler-Institut har accepterat att tillhandahålla det E05-serum som följaktligen ska bli Europeiska unionens nya officiella standardserum för enzootisk bovin leukos.
- (6) Direktiv 64/432/EEG bör därför ändras i enlighet med detta.
- (7) De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Kapitel II i bilaga D till direktiv 64/432/EEG ska ersättas med
texten i bilagan till detta beslut.

Artikel 2

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 15 december 2009.

På kommissionens vägnar
Androulla VASSILIOU
Ledamot av kommissionen

⁽¹⁾ EGT 121, 29.7.1964, s. 1977/64.

BILAGA

Kapitel II i bilaga D till direktiv 64/432/EEG ska ersättas med följande:

"KAPITEL II

PROV FÖR ATT PÅVISA ENZOOTISK BOVIN LEUKOS

Undersökningar för påvisande av enzootisk bovin leukos ska utföras med hjälp av immunodiffusionstest i agargel (Agid) under de villkor som beskrivs i avsnitt A och B eller genom Elisametoden (*enzyme-linked immunosorbent assay*) under de villkor som beskrivs i avsnitt C. Immundiffusionstestet i agargel får endast användas för testning av individuella prover. Om testresultaten ifrågasätts av välgrundade skäl ska en ytterligare kontroll utföras med hjälp av ett immundiffusionstest i agargel.

Agid- och Elisatesterna ska standardiseras mot E05-serumet, vilket ska vara det officiella EU-standardserumet och tillhandahållas av

Friedrich-Loeffler-Institut

Federal Research Institute for Animal Health (*Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit*)

OIE Reference Laboratory for Enzootic Bovine Leukosis (EBL)

Südufer 10

17493 Greifswald — Insel Riems

Tyskland

A. Prov för påvisande av enzootisk bovin leukos genom immunodiffusionstest i agargel

1. Det antigen som ska användas vid detta test ska innehålla glykoprotein från bovint leukosvirus. Antigenen ska standardiseras i förhållande till E05-serumet.
2. De statliga institut, nationella referenslaboratorier eller officiella institut som utsetts i enlighet med artikel 6a för att samordna standarder och metoder för diagnos rörande tester av enzootisk bovin leukos ska ansvara för kalibreringen av laboratoriets standardantigen i förhållande till E05-serumet.
3. De standardantigener som används i laboratoriet ska minst en gång om året sändas till de statliga institut, nationella referenslaboratorier eller statliga inrättningar som utsetts i enlighet med artikel 6a för att där analyseras i förhållande till E05-serumet. Oberoende av denna standardisering kan det antigen som används kalibreras enligt metoden i avsnitt B.
4. Vid provet ska följande reagenser användas:
 - a) Antigen: antigenet ska innehålla specifikt glykoprotein från enzootiskt bovint leukosvirus (BLV) som har standardiserats i förhållande till E05-serumet.
 - b) Det serum som ska analyseras.
 - c) Ett känt positivt kontrollserum.
 - d) Agargel:
 - 0,8 % agar,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M Tris-buffert, pH 7,2,
 - 15 ml av denna agar ska hällas i en petriskål med 85 mm diameter, vilket ger ett 2,6 mm tjockt lager av agar.
5. En experimentanordning bestående av sju fuktfria brunnar ska skäras ut i agarn ända till botten; denna formation ska bestå av en central brunn och sex perifer brunnar ordnade i cirkel runt den centrala brunnen.

Den centrala brunnens diameter: 4 mm.

De perifera brunnarnas diameter: 6 mm.

Avståndet mellan den centrala och de perifera brunnarna: 3 mm.

6. Den centrala brunnen ska fyllas med standardantigenet. De perifera brunnarna 1 och 4 enligt beskrivningen i B.3 ska fyllas med det kända positiva serumet; brunnarna 2, 3, 5 och 6 med de serum som ska analyseras. Brunnarna ska fyllas tills menisken försvinner.
 7. Detta ger följande reagensmängder:
 - Antigen: 32 mikroliter.
 - Kontrollserum: 73 mikroliter.
 - Det serum som ska analyseras: 73 mikroliter.
 8. Inkubationen ska ske under 72 timmar i rumstemperatur (20–27 °C) i en sluten fuktig kammare.
 9. Provresultatet får avläsas efter 24 timmar och sedan efter 48 timmar, men ett slutgiltigt resultat kan inte erhållas förrän efter 72 timmar:
 - a) Ett serum som ska analyseras är positivt om det bildar en specifik precipitationslinje med antigenet för bovin leukosvirus och denna kurva är identisk med kontrollserumets.
 - b) Ett serum som ska analyseras är negativt om det inte bildar en specifik precipitationslinje med antigenet för bovin leukosvirus och om det inte böjer av kontrollserumets linje.
 - c) Reaktionen kan inte betraktas som tillförlitlig om
 - i) serumet böjer av kontrollserumets linje mot brunnen med antigenet för bovin leukosvirus utan att bilda en iakttagbar precipitationslinje med antigenet, eller
 - ii) om det inte är möjligt att tolka den som vare sig positiv eller negativ.
- När det gäller otillförlitliga reaktioner kan man utföra analysen en gång till och använda koncentrerat serum.
10. Andra konfigurationer eller en annan anordning av brunnarna får användas under förutsättning att E05-serum i utspädning 1:10 i det negativa serumet kan identifieras som positivt.

B. Metod för standardisering av antigenet

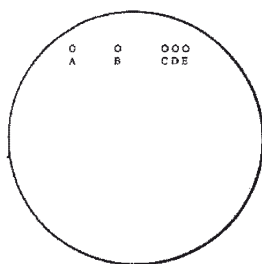
1. Följande lösningar och material krävs:
 - a) 40 ml agar på 1,6 i 0,05 M Tris/HCl buffert, pH 7,2 med 8,5 % NaCl.
 - b) 15 ml bovin leukos-serum som endast har antikroppar mot glykoproteinerna i bovin leukosvirus, i utspädning 1:10 i 0,05 M Tris/HCl buffert, pH 7,2 med 8,5 % NaCl.
 - c) 15 ml av ett bovin leukos-serum som endast har antikroppar mot glykoproteinerna i bovin leukosvirus, i utspädning 1:5 i 0,05 M Tris/HCl buffert, pH 7,2 med 8,5 % NaCl.
 - d) Fyra petriskålar av plast med en diameter på 85 mm.
 - e) En stans med en diameter på 4–6 mm.
 - f) Ett referensantigen.
 - g) Det antigen som ska standardiseras.
 - h) Ett varmt vattenbad (56 °C).
2. Metod:

Agar (1,6 %) löses i Tris/HCl buffert under försiktig uppvärmning till 100 °C. Placera det i vattenbad med en temperatur på 56 °C i ca en timme. Även lösningarna av bovin leukos-serum placeras i vattenbadet på 56 °C.

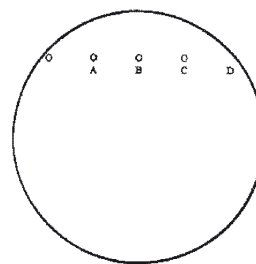
Därefter blandas 15 ml av agarlösningen med en temperatur på 56 °C med 15 ml bovin leukos-serum (1:10), omskakas hastigt och hålls i två petriskålar, 15 ml per skål. De ovan beskrivna förfarandena upprepas med bovin leukos-serumet i utspädning 1:5.

När agaret har stelnat görs hål i det på följande sätt:

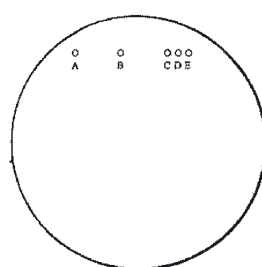
Petriskål nr 1
Serum 1:10



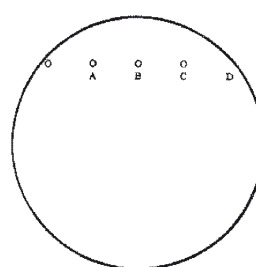
Petriskål nr 2
Serum 1:10



Petriskål nr 3
Serum 1:5



Petriskål nr 4
Serum 1:5



3. Tillsättning av antigen:

a) Petriskålarna 1 och 3:

- i) Brunn A = utspädd referensantigen.
- ii) Brunn B = referensantigen i utspädning 1:2.
- iii) Brunnarna C + E = referensantigen.
- iv) Brunn D = utspädd antigen som ska analyseras.

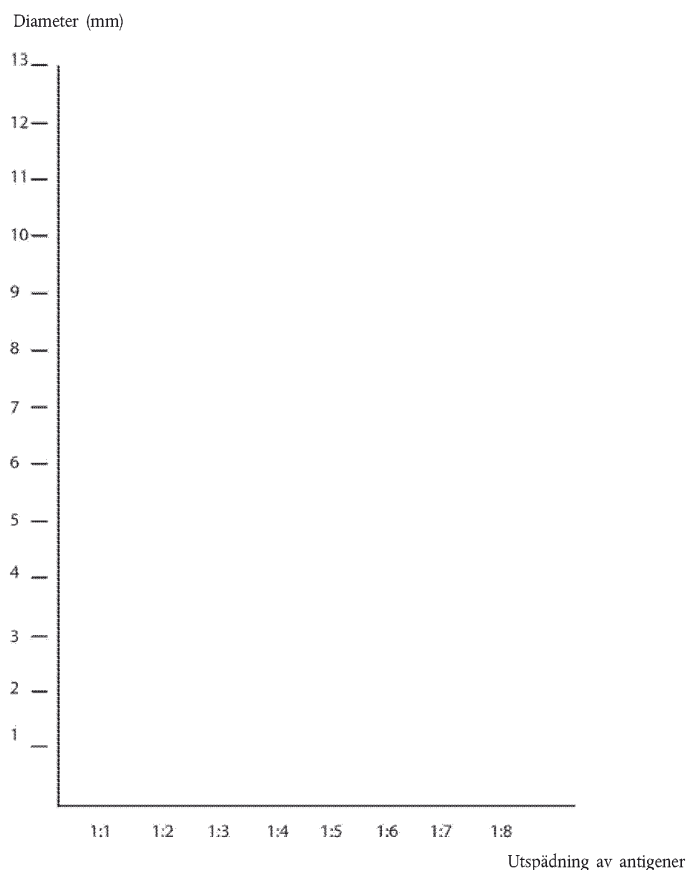
b) Petriskålarna 2 och 4:

- i) Brunn A = utspädd antigen som ska analyseras.
- ii) Brunn B = antigen som ska analyseras, i utspädning 1:2.
- iii) Brunn C = antigen som ska analyseras, i utspädning 1:4.
- iv) Brunn D = antigen som ska analyseras, i utspädning 1:8.

4. Ytterligare anvisningar

- a) För optimal precipitation bör testet göras med serum i två spädningar (1:5 och 1:10).
- b) Om precipitationsdiametern är för liten med båda spädningarna ska serumet spädas ut ytterligare.
- c) Om precipitationsdiametern är för hög med båda spädningarna och om precipitationen försvinner ska en lägre serumutspädning väljas.
- d) Agarens slutliga koncentration ska stabiliseras vid 0,8 % och serumens vid 5 % respektive 10 %.

- e) De uppmätta diametrarna ska ritas in i nedanstående koordinatsystem. Den utspädning som ska användas är den som har samma diameter för det antigen som ska analyseras som för referensantigenet.



C. Elisametoden (*enzyme-linked immunosorbent assay*) för påvisande av enzootisk bovin leukos

1. Följande material och reagenser ska användas:

- Mikroplattor för den fasta fasen, skålar eller varje annan fast fas.
- Antigenet ska bindas till den fasta fasen med eller utan hjälp av polyklonala eller monoklonala fästade antikroppar. Om man i fråga om enzootisk bovin leukos låter antigenet fästa direkt till den fasta fasen ska alla undersökta prov som uppvisar positiv reaktion undersökas i förhållande till kontrollantigenet. Kontrollantigenet ska vara identiskt med antigenet men sakna antigenet för bovin leukos. Om fästade antikroppar fästes till den fasta fasen får dessa antikroppar inte reagera med andra antigen än antigenet för bovin leukos.
- Den biologiska vätska som ska undersökas.
- Motsvarande positiva och negativa kontroller.
- Konjugatet.
- Ett substrat som är anpassat till det enzym som används.
- Vid behov en stopplösning.
- Lösningar för utspädning av de prov som ska undersökas, beredning av reagensen och tvättning.
- Ett avläsningsystem som lämpar sig för det substrat som används.

2. Standardisering och metodens känslighet

Elisametodens känslighet ska vara av så hög grad att E05-serum uppvisar en positiv reaktion när det späds ut 10 gånger (serumprov) eller 250 gånger (mjölkprov) mer än den utspädning som fås vid poolning av proven. Vid försök där prov (serum och mjölk) analyseras individuellt ska E05-serum i utspädning 1:10 (negativt serum) eller 1:250 (negativ mjölk) uppvisa en positiv reaktion när det analyseras i samma utspädning som den som används vid de individuella proven. De institut som avses i avsnitt A.2 ska vara ansvariga för kvalitetskontrollen av Elisametoden, särskilt när det gäller att för varje parti bestämma hur många prov som ska ingå i ett samlingsprov på grundval av den titer som har erhållits för E05-serumet.

3. Följande villkor ska gälla för användningen av Elisatestet vid påvisandet av enzootisk bovin leukos:

- a) Elisatest får användas på prover från mjölk och serum.
 - b) När Elisatest används för utfärdande av intyg i enlighet med artikel 6.2 c eller för fastställande av besättningsstatus i enlighet med bilaga D.I ska sammanslagningar av serum- eller mjölkprover ske på ett sådant sätt att de prover som tagits för att undersökas utan minsta tvivel kan hänföras till de enskilda djur som ingår i samlingsprovet. Alla kontrolltester ska utföras på prover från enskilda djur.
 - c) När Elisatest används på ett prov från opaketerad mjölk ska detta prov tas från en besättning med minst 30 % lakterande mjölkkor. Alla kontrolltester ska utföras på serum- eller mjölkprover från enskilda djur.”
-