

KOMISIJOS SPRENDIMAS

2009 m. gruodžio 15 d.

iš dalies keisti Tarybos direktyvos 64/432/EEB D priedo nuostatas dėl enzootinės galvijų leukozės diagnostinių tyrimų

(pranešta dokumentu Nr. C(2009) 9951)

(Tekstas svarbus EEE)

(2009/976/ES)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 1964 m. birželio 26 d. Tarybos direktyvą 64/432/EEB dėl gyvūnų sveikatos problemų, turinčių įtakos Bendrijos vidaus prekybai galvijais ir kiaulėmis ⁽¹⁾, ypač į jos 16 straipsnio 2 pastraipą,

kadangi:

- (1) Direktyva 64/432/EEB taikoma Sąjungos vidaus prekybai galvijais, o jos D priedo II skyriuje nustatyti enzootinės galvijų leukozės (EGL) diagnostiniai tyrimai, kurie turi būti atliekami šiai ligai kontroliuoti ir likviduoti, ir priešžiūrai bei stebėsenai vykdyti, taip pat norint nustatyti ir išlaikyti oficialiai leukozės neapimtos bandos statusą bei atliekant sertifikavimą Sąjungos vidaus prekybos galvijais reikmėms.
- (2) Direktyvos 64/432/EEB D priedo II skyriuje nustatyta, kad EGL nustatyti turi būti atliekami šie tyrimai: arba agarų gelio imunodifuzinis tyrimas (AGID) naudojant antigeną, standartizuotą pagal oficialų EB standartinį serumą (EI serumą), arba imunofermentinė analizė (ELISA), standartizuota pagal E4 serumą. Abu standartinius serumus tiekia Danijos technikos universiteto Nacionalinis veterinarijos institutas.
- (3) Vokietijoje įsikūrusi Pasaulinės gyvūnų sveikatos organizacijos (OIE) Etaloninė enzootinės galvijų leukozės laboratorija (Friedrich-Loeffler-Institute), bendradarbiaudama su OIE etaloninėmis laboratorijomis Jungtinėje Karalystėje (Veterinarijos laboratorijų agentūra) ir Lenkijoje (Nacionaliniu veterinarijos tyrimų institutu) neseniai sukūrė naują EGL standartinį serumą, atlikusios jo tarplaboratorinį tyrimą. E05 serumas buvo patvirtintas pagal EI ir E4 serumus atlikus skirtingus AGID ir ELISA tyrimus ir įtrauktas OIE Sausumos gyvūnų diagnostinių tyrimų ir vakcinų vadovo 2008 m. šeštojo leidimo 2.4.11 skyriaus

B(2) skirsnį kaip akredituotas OIE standartinis serumas. Šį serumą tiekia Vokietijoje įsikūrusi OIE Etaloninė enzootinės galvijų leukozės laboratorija.

- (4) Be to, Danijos technikos universiteto Nacionalinis veterinarijos institutas pranešė Komisijai nebegalįs vykdyti įsipareigojimų, šiuo metu nustatytų Direktyvos 64/432/EEB D priedo II skyriuje, tiekti standartinius serumus.
- (5) Vokietijos kompetentingos institucijos ir Friedrich-Loeffler institutas sutiko tiekti E05 serumą, todėl jis turi tapti nauju oficialiu Europos Sąjungos (ES) EGL serumu.
- (6) Todėl Direktyva 64/432/EEB turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeista.
- (7) Šiame sprendime numatytos priemonės atitinka Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatinio komiteto nuomonę.

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

1 straipsnis

Direktyvos 64/432/EB D priedo II skyrius pakeičiamas šio sprendimo priedo tekstu.

2 straipsnis

Šis sprendimas skirtas valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje 2009 m. gruodžio 15 d.

Komisijos vardu
Androulla VASSILIOU
Komisijos narė

⁽¹⁾ OL 121, 1964 7 29, p. 1977/64.

PRIEDAS

Direktyvos 64/432/EEB D priedo II skyrius pakeičiamas taip:

„II SKYRIUS

ENZOOTINĖS GALVIJŲ LEUKOZĖS TYRIMAI

Enzootinė galvijų leukozė nustatoma atliekant agaro gelio imunodifuzinį tyrimą (AGID) pagal A ir B skirsniuose aprašytas sąlygas arba atliekant imunofermentinę analizę (ELISA) pagal C skirsnyje aprašytas sąlygas. Agaro gelio imunodifuzinis tyrimas gali būti atliekamas tik pavieniams mėginiams tirti. Jeigu tyrimų rezultatais pagrįstai abejojama, jie papildomai patikrinami, atliekant agaro gelio imunodifuzinį tyrimą.

AGID ir ELISA tyrimai standartizuojami pagal E05 serumą – oficialų ES serumą, kurį tiekia:

Friedrich-Loeffler-Institut
Federal Research Institute for Animal Health
OIE Reference Laboratory for Enzootic Bovine Leukosis
Südufer 10
17493 Greifswald — Insel Riems
Vokietija

A. Agaro gelio imunodifuzinis tyrimas, atliekamas enzootinei galvijų leukozei nustatyti

1. Tyrimui naudojamame antigene turi būti galvijų leukozės viruso glikoproteinų. Antigenas standartizuotas pagal E05 serumą.
2. Valstybiniai institutai, nacionalinės etaloninės laboratorijos ar oficialūs institutai, pagal 6a straipsnį paskirti enzootinės galvijų leukozės tyrimų standartams ir diagnostikos metodams koordinuoti, yra atsakingi už laboratorijos standartinio darbinio antigeno kalibravimą pagal E05 standartinį serumą.
3. Laboratorijoje naudojami standartiniai antigenai mažiausiai kartą per metus pateikiami valstybiniams institutams, nacionalinėms etaloninėms laboratorijoms ar oficialiems institutams, pagal 6a straipsnį paskirtiems atlikti tyrimus pagal E05 serumą. Be šios standartizacijos, naudojamas antigenas gali būti kalibruojamas pagal B skirsnyje nurodytą metodą.
4. Tyrimui naudojamus reagentus sudaro:
 - a) antigenas: antigene turi būti specifiniai enzootinės galvijų leukozės viruso glikoproteinai, standartizuoti pagal E05 serumą;
 - b) bandomasis serumas;
 - c) žinomas teigiamas kontrolinis serumas;
 - d) agaro gelis:
 - 0,8 % agaro,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M Tris buferinis tirpalas, pH 7,2,
 - 15 ml šio agaro įdedama į 85 mm skersmens Petri lėkštelę taip, kad agaro storis būtų 2,6 mm.
5. Agare padaromos tyrimui skirtos septynios drėgmės nepraleidžiančios duobutės, siekiančios lėkštelės dugną. Duobučių išsidėstymas: viena centrinė su šešiomis ją supančiomis duobutėmis.

Centrinės duobutės skersmuo: 4 mm.

Periferinių duobučių skersmuo: 6 mm.

Atstumas tarp centrinės ir periferinių duobučių: 3 mm.

6. Centrinė duobutė pripildoma standartiniu antigenu. 1 ir 4 periferinės duobutės (žr. B.3) pripildomos žinomu teigiamu serumu, o 2, 3, 5 ir 6 duobutės pripildomos bandomaisiais serumais. Duobutės pripildomos iki pat viršaus, kad nebūtų menisko.
7. Tokiu būdu gaunami šie kiekiai:
 - antigeno: 32 μ l,
 - kontrolinio serumo: 73 μ l,
 - bandomojo serumo: 73 μ l.
8. Inkubuojama 72 valandas uždarytoje drėgnoje kameroje, kambario temperatūros sąlygomis (20–27 °C).
9. Tyrimo rodmenys gali būti tikrinami po 24 ir 48 valandų, tačiau galutinis rezultatas gaunamas ne anksčiau po 72 valandų:
 - a) bandomasis serumas yra teigiamas, jeigu jame susiformuoja savitoji nuosėdų linija su galvijų leukozės viruso (GLV) antigenu ir susiformuoja linija, kuri yra visiškai identiška kontroliniam serumui;
 - b) bandomasis serumas yra neigiamas, jeigu jame nesusiformuoja savitoji nuosėdų linija su GLV viruso antigenu ir neiškreipiama kontrolinio serumo linija;
 - c) reakcija negali būti laikoma galutine, jeigu:
 - i) iškreipiama kontrolinio serumo linija – ji pritraukiama prie GLV antigeno duobutės, bet nesusiformuoja aiškiai matoma nuosėdų linija su antigenu; arba
 - ii) negalima nustatyti, ar jos rezultatas yra neigiamas ar teigiamas.

Kai reakcija yra negalutinė, tyrimas gali būti kartojamas, panaudojant koncentruotą serumą.
10. Galima naudoti bet kokią kitą duobučių konfigūraciją ar išdėstymą, jeigu įmanoma nustatyti, kad neigiamame serume 1:10 santykiu praskiestas E05 serumas yra teigiamas.

B. Antigeno standartizacijos metodas

1. Reikalingi tirpalai ir medžiagos:

- a) 40 ml 1,6 % agarozės 0,05 M Tris/HCl buferiniame tirpale, pH 7,2 su 8,5 % NaCl;
- b) 15 ml galvijų leukozės serumo, kuriame yra tik galvijų leukozės viruso glikoproteinų antikūnai, praskiesto 1:10 santykiu 0,05 M Tris/HCl buferiniame tirpale, pH 7,2 su 8,5 % NaCl;
- c) 15 ml galvijų leukozės serumo, kuriame yra tik galvijų leukozės viruso glikoproteinų antikūnai, praskiesto 1:5 santykiu 0,05 M Tris/HCl buferiniame tirpale, pH 7,2 su 8,5 % NaCl;
- d) keturios plastikinės Petri lėkštelės, kurių skersmuo 85 mm;
- e) spaudiklis, kurio skersmuo 4–6 mm;
- f) etaloninis antigenas;
- g) standartizuotinas antigenas;
- h) vandens vonelė (56 °C).

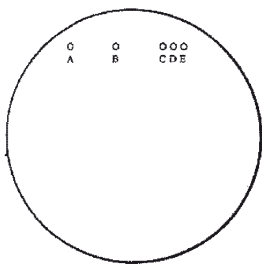
2. Darbo tvarka

Agarozė (1,6 %) ištirpinama Tris/HCl buferiniame tirpale, pamažu kaitinant iki 100 °C. Įdedama į 56 °C vandens vonelę ir ten laikoma maždaug vieną valandą. Galvijų leukozės serumo tirpalas taip pat įdedamas į 56 °C vandens vonelę.

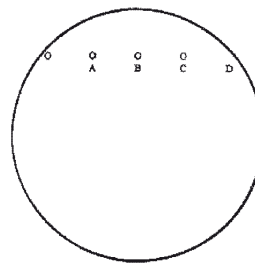
Po to 15 ml 56 °C agarozės tirpalas sumaišomas su 15 ml galvijų leukozės serumu (1:10), greitai supurtomas ir jo įpilama po 15 ml į dvi Petri lėkšteles. Ši procedūra taip pat taikoma 1:5 santykiu praskiestam galvijų leukozės serumui.

Agarozei sukietėjus, duobutės joje padaromos taip:

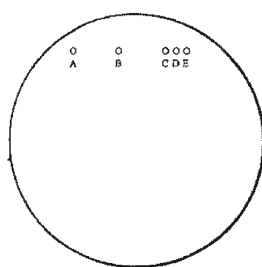
Petri lėkštelė Nr.1
Serumas 1:10



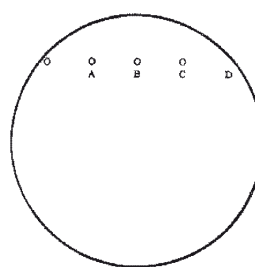
Petri lėkštelė Nr.2
Serumas 1:10



Petri lėkštelė Nr. 3
Serumas 1:5



Petri lėkštelė Nr.4
Serumas 1:5



3. Antigeno pridėjimas:

a) 1 ir 3 Petri lėkštelės:

- i) A duobutė – neatskiestas etaloninis antigenas;
- ii) B duobutė – 1:2 santykiu praskiestas etaloninis antigenas;
- iii) C ir E duobutės – etaloninis antigenas;
- iv) D duobutė – neatskiestas bandomasis antigenas.

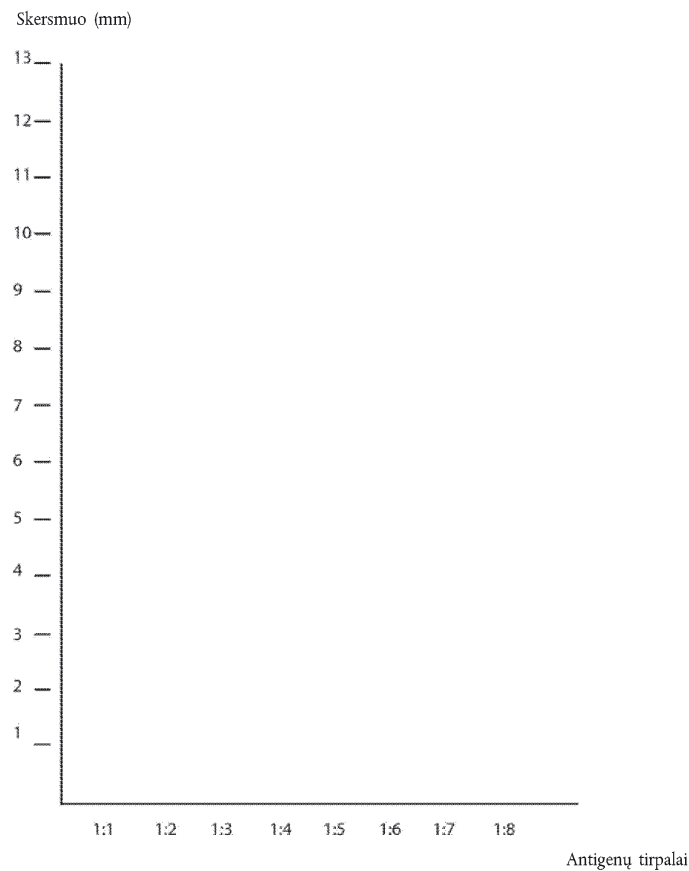
b) 2 ir 4 Petri lėkštelės:

- i) A duobutė – neatskiestas bandomasis antigenas;
- ii) B duobutė – 1:2 santykiu praskiestas bandomasis antigenas;
- iii) C duobutė – 1:4 santykiu praskiestas bandomasis antigenas;
- iv) D duobutė – 1:8 santykiu praskiestas bandomasis antigenas.

4. Papildomos instrukcijos

- a) Eksperimentas atliekamas naudojant du serumo tirpalus (1:5 ir 1:10), siekiant optimalaus nusodinimo.
- b) Jeigu nusodinimo ploto skersmuo abiejuose tirpaluose yra per mažas, serumas vėl skiedžiamas.
- c) Jeigu nusodinimo ploto skersmuo abiejuose tirpaluose yra per didelis ir nežymus, parenkamas didesnės koncentracijos serumas.
- d) Galutinė agarozės koncentracija turi būti 0,8 %; galutinė serumų koncentracija turi būti atitinkamai 5 % ir 10 %.

- e) Išmatuoti skersmenys pažymimi toliau nurodytoje koordinacių sistemoje. Bandomojo antigeno tirpalas, kai skersmuo yra toks pat kaip etaloninio antigeno atveju, yra darbinis tirpalas.



C. Imunofermeninė analizė (ELISA), atliekama enzootinei galvijų leukozei nustatyti

1. Naudojamos šios medžiagos ir reagentai:

- a) kietosios fazės mikrolėkštelės, kiuvetės ar kitos kietosios fazės;
- b) antigenas pritvirtinamas prie kietosios fazės, panaudojant polikloninius arba monokloninius jungiančius antikūnus arba jų nenaudojant. Jeigu kietoji fazė tiesiogiai padengiama antigenu, visi bandiniai, kurie reaguoja teigiamai, turi būti ištirti dar kartą naudojant kontrolinį antigeną. Kontrolinis antigenas turi būti identiškas antigenui, išskyrus tai, kad jame nėra GLV antigenų. Jeigu kietoji fazė padengiama jungiančiais antikūnais, antikūnai neturi reaguoti į kitus nei GLV antigenus;
- c) bandomasis biologinis skystis;
- d) atitinkama teigiama ir neigiama kontrolinė medžiaga;
- e) konjugatas;
- f) substratas, pritaikytas naudojamam fermentui;
- g) prireikus, užpildantis tirpalas;
- h) tirpalai, skirti tiriamų bandinių skiedimui, reagentų gamybai, o taip pat plovimui;
- i) rodmenų tikrinimo sistema, tinkama naudojamam substratui.

2. Tyrimo standartizavimas ir jautrumas

ELISA tyrimo jautrumas turi būti tokio laipsnio, kad būtų galima nustatyti, kad E05 serumas yra teigiamas, kai jis praskiedžiamas 10 kartų (serumo bandiniai) arba 250 kartų (pieno bandiniai) daugiau negu pavienių bandinių tirpalas, kai šie bandiniai sujungiami. Atskirai tiriant (serumo ir pieno) bandinius 1:10 santykiu (neigiamame serume) arba 1:250 santykiu (piene, kurio tyrimo rezultatai neigiami) praskiesto E05 serumo reakcija turi būti teigiama, kai tyrimas atliekamas tame pačiame tirpale, kuris naudojamas pavieniams bandiniams. A skirsnio 2 punkte paminėti institutai atsako už ELISA metodo kokybės patikrinimą, visų pirma už bandinių, kurie turi būti sujungiami remiantis skaičiavimais, gautais tiriant E05 serumą, skaičiaus nustatymą kiekvienoje pagamintoje partijoje.

3. ELISA naudojimo sąlygos enzootinei galvijų leukozei nustatyti

- a) ELISA tyrimai gali būti naudojami serumo ir pieno bandiniams tirti.
 - b) Kai ELISA tyrimai naudojami sertifikavimo tikslais pagal 6 straipsnio 2 dalies c punktą arba siekiant nustatyti ir išlaikyti bandos statusą pagal D priedo I skyrių, jungtiniai serumo arba pieno mėginiai sudaromi taip, kad ištirti paimti mėginiai galėtų neabejotinai būti susieti su konkrečiais gyvūnais, kurių mėginiai yra sujungti. Atliekamas atskirų gyvūnų mėginių patvirtinamasis tyrimas.
 - c) Kai ELISA tyrimai naudojami maišyto pieno mėginiams tirti, pienas mėginiams turi būti surinktas iš ūkio, kuriame ne mažiau kaip 30 % karvių yra melžiamosios. Atliekamas iš atskirų gyvūnų paimto serumo ar pieno mėginių patvirtinamasis tyrimas."
-