

## ROZHODNUTIE KOMISIE

z 15. decembra 2009,

ktorým sa mení a dopĺňa príloha D k smernici Rady č. 64/432/EHS, pokiaľ ide o diagnostické testy na enzootickú leukózu hovädzieho dobytku

[oznámené pod číslom K(2009) 9951]

(Text s významom pre EHP)

(2009/976/EÚ)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na smernicu Rady 64/432/EHS z 26. júna 1964 o zdravotných problémoch zvierat ovplyvňujúcich obchod s hovädzím dobytkom a ošípanými vo vnútri Spoločenstva <sup>(1)</sup>, a najmä na jej článok 16 druhý odsek,

keďže:

- (1) Smernica 64/432/EHS sa uplatňuje na obchod s hovädzím dobytkom vnútri Únie a jej kapitola II prílohy D stanovuje diagnostické testy na enzootickú leukózu hovädzieho dobytku, ktoré sa majú použiť na kontrolu a eradikáciu tejto choroby a dohľad a monitorovanie, ako aj stanovenie a zachovanie úradne vyhláseného štatútu stáda hovädzieho dobytku bez výskytu enzootickej leukózy a osvedčovanie požadované pre obchod s hovädzím dobytkom vnútri Únie.
- (2) Kapitola II prílohy D k smernici 64/432/EHS stanovuje, že testy na enzootickú leukózu hovädzieho dobytku sa majú uskutočniť buď pomocou imunodifúzneho testu v agarovom géli (AGID) s použitím antigénu štandardizovaného v porovnaní s úradne uznaným štandardným sérom ES (EI sérum) alebo pomocou enzymoimunoanalýzy (ELISA) štandardizovanej v porovnaní so sérom E4. Obidve štandardné séra dodáva Národný veterinárny ústav, Dánska technická univerzita (National Veterinary Institute, Technical University of Denmark).
- (3) Nové štandardizované sérum pre enzootickú leukózu hovädzieho dobytku (E05 sérum) bolo nedávno vyvinuté referenčným laboratóriom Svetovej organizácie pre zdravie zvierat (ďalej len „OIE“) pre enzootickú leukózu hovädzieho dobytku v Nemecku (Friedrich-Loeffler-Institute) v spolupráci s referenčnými laboratóriami OIE v Spojenom kráľovstve (Veterinary Laboratories Agency) a v Poľsku (National Veterinary Research Institute) po tom, čo bolo predmetom kruhového testu v týchto laboratóriách. Sérum E05 bolo schválené vzhľadom na séra EI a E4 prostredníctvom rôznych testov AGID a ELISA a následne pridané ako štandardné sérum akreditované

OIE do oddielu B bodu 2 kapitoly 2.4.11 Príručky diagnostických testov a vakcín pre suchozemské zvieratá, šieste vydanie, 2008. Toto sérum dodáva referenčné laboratórium OIE pre enzootickú leukózu hovädzieho dobytku v Nemecku.

- (4) Okrem toho Národný veterinárny ústav, Dánska technická univerzita, informoval Komisiu, že už nie je schopný plniť si svoje povinnosti týkajúce sa dodávky štandardného séra v súčasnosti stanoveného v kapitole II prílohy D k smernici 64/432/EHS.
- (5) Príslušné nemecké orgány a Friedrich-Loeffler-Institute súhlasili, že budú dodávať sérum E05, ktoré sa následne stane novým úradne uznaným štandardným sérom Európskej únie (ďalej len „EÚ“) pre enzootickú leukózu hovädzieho dobytku.
- (6) Smernica 64/432/EHS by sa preto mala zodpovedajúcim spôsobom zmeniť a doplniť.
- (7) Opatrenia stanovené v tomto rozhodnutí sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

## Článok 1

Kapitola II prílohy D k smernici 64/432 EHS sa nahrádza znením prílohy k tomuto rozhodnutiu.

## Článok 2

Toto rozhodnutie je určené členským štátom.

V Bruseli 15. decembra 2009

Za Komisiu  
Androulla VASSILIOU  
členka Komisie

<sup>(1)</sup> Ú. v. ES 121, 29.7.1964, s. 1977/64.

## PRÍLOHA

Kapitola II prílohy D k smernici 64/432/EHS sa nahrádza takto:

## „KAPITOLA II

**TESTY NA ENZOOTICKÚ LEUKÓZU HOVÄDZIEHO DOBYTKA**

Testy na enzootickú leukózu hovädzieho dobytku sa uskutočnia pomocou imunodifúzneho testu v agarovom géli (AGID) za podmienok uvedených v oddieloch A a B alebo pomocou enzymoimunoanalýzy (ELISA) za podmienok uvedených v oddiele C. Imunodifúzny test v agarovom géli sa môže použiť iba na testovanie individuálnych vzoriek. Ak sú výsledky testov odôvodnene spochybnené, urobí sa dodatočná kontrola pomocou imunodifúzneho testu v agarovom géli.

Testy AGID a ELISA sú štandardizované vzhľadom na sérum E05, ktoré je úradne uznaným štandardným sérom EÚ a dodáva ho:

Friedrich-Loeffler-Institut  
Federal Research Institute for Animal Health  
OIE Reference Laboratory for Enzootic Bovine Leukosis (EBL)  
Südufer 10  
17493 Greifswald – Insel Riems  
Nemecko

**A. Imunodifúzny test v agarovom géli na enzootickú leukózu hovädzieho dobytku**

1. Antigén, ktorý sa použije na testovanie, obsahuje glykoproteín vírusu leukózy hovädzieho dobytku. Antigén je štandardizovaný vzhľadom na sérum E05.
2. Za kalibrovanie štandardného pracovného antigénu laboratória vzhľadom na sérum E05 sú zodpovedné štátne ústavy, národné referenčné laboratória alebo úradne schválené ústavy určené v súlade s článkom 6a na koordináciu noriem a diagnostických metód na testovanie enzootickej leukózy hovädzieho dobytku.
3. Štandardné antigény používané v laboratóriu sa minimálne raz za rok predložia štátnym ústavom, národným referenčným laboratóriám alebo úradne schváleným ústavom určeným v súlade s článkom 6a na testovanie vzhľadom na sérum E05. Okrem takej štandardizácie sa používaný antigén môže kalibrovať v súlade s metódou opísanou v oddiele B.
4. Reagenty testov musia pozostávať:
  - a) z antigénu: antigén musí obsahovať špecifický glykoproteín vírusu enzootickej leukózy hovädzieho dobytku, ktorý bol štandardizovaný vzhľadom na sérum E05;
  - b) z testovaného séra;
  - c) zo známeho pozitívneho kontrolného séra;
  - d) z agarového gélu:
    - 0,8 % agar,
    - 8,5 % NaCl,
    - 0,05 M Tris-pufer pH 7,2,
    - 15 ml tohto agaru sa dá do Petriho misky s priemerom 85 mm, pričom sa dosiahne hrúbka agaru 2,6 mm.
5. Do agaru na dne doštičky sa vykrojí testovacia vzorka siedmich priehlbínok bez vlhkosti; vzorka pozostáva z jednej strednej priehlbinky a zo šiestich priehlbínok okolo nej.

Priemer strednej priehlbinky: 4 mm.

Priemer okrajových priehlbínok: 6 mm.

Vzdialenosť medzi strednou priehlbinkou a okrajovými priehlbinkami: 3 mm.

6. Stredná priehlbinka sa vyplní štandardným antigénom. Okrajové priehlbinky 1 a 4 opísané v B.3 sa naplnia známym pozitívnym sérom; priehlbinky 2, 3, 5 a 6 testovaným sérom. Priehlbinky sa plnia až dovtedy, kým nezmizne meniskus.
7. Výsledkom toho sú tieto získané množstvá:
  - antigén: 32  $\mu$ l,
  - kontrolné sérum: 73  $\mu$ l,
  - testované sérum: 73  $\mu$ l.
8. Inkubuje sa 72 hodín pri izbovej teplote (20 až 27 °C) v zatvorenej vlhkej miestnosti.
9. Reakcia sa môže odčítať po 24 hodinách, potom po 48 hodinách, avšak konečný výsledok sa nezíska skôr ako po 72 hodinách:
  - a) testované sérum je pozitívne, ak vytvorí špecifickú precipitačnú čiaru s antigénom vírusu leukózy hovädzieho dobytká a ak sa táto čiara zhoduje s čiarou kontrolného séra;
  - b) testované sérum je negatívne, ak nevytvorí špecifickú precipitačnú čiaru s antigénom vírusu leukózy hovädzieho dobytká a ak nezakríví čiaru kontrolného séra;
  - c) reakcia sa nepokladá za jednoznačnú, ak:
    - i) zakríví čiaru kontrolného séra smerom k priehlbinke s antigénom vírusu leukózy hovädzieho dobytká bez vytvorenia viditeľnej precipitačnej čiary s antigénom alebo
    - ii) ak sa nedá považovať reakcia ani za negatívnu, ani za pozitívnu.

Pri nejednoznačných reakciách sa test môže opakovať a môže sa využiť koncentrované sérum.
10. Môže sa využiť akákoľvek iná konfigurácia priehlbínok alebo vzorky za predpokladu, že sérum E05 zriedené 1:10 v negatívnom sére môže byť preukázané ako pozitívne.

## B. Metóda štandardizácie antigénu

### 1. Potrebné roztoky a materiály:

- a) 40 ml 1,6 % agarózy v pufré 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 s 8,5 % NaCl;
- b) 15 ml leukózneho séra hovädzieho dobytká, ktoré obsahuje protilátku iba proti glykoproteínom vírusu leukózy hovädzieho dobytká, zriedené 1: 10 v pufré 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 s 8,5 % NaCl;
- c) 15 ml leukózneho séra hovädzieho dobytká, ktoré obsahuje protilátku iba proti glykoproteínom vírusu leukózy hovädzieho dobytká, zriedené 1: 5 v pufré 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2 s 8,5 % NaCl;
- d) štyri Petriho misky z umelej hmoty s priemerom 85 mm;
- e) dierovač s priemerom 4 až 6 mm;
- f) referenčný antigén;
- g) antigén, ktorý sa má štandardizovať;
- h) vodný kúpeľ (56 °C).

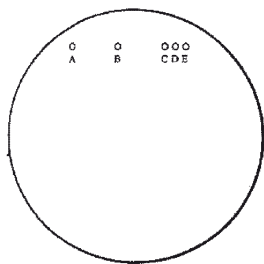
### 2. Postup:

Agaróza (1,6 %) sa rozpustí v pufrí Tris/HCl opatrným ohrievaním na 100 °C. Vloží sa do 56 °C teplého vodného kúpeľa približne na jednu hodinu. Riedenia leukózneho séra hovädzieho dobytká sa rovnako vložia do 56 °C teplého vodného kúpeľa.

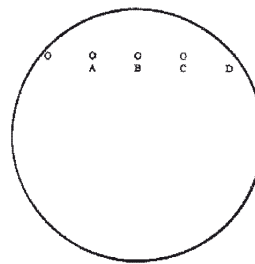
Potom sa zmieša 15 ml roztoku agarózy, ktorý má teplotu 56 °C, s 15 ml leukózneho séra hovädzieho dobytká (1: 10), rýchlo sa potrasie a naleje po 15 ml do každej z dvoch Petriho misiek. Rovnako sa postupuje s leukóznym sérom hovädzieho dobytká zriedeným 1: 5.

Po stuhnutí agarózy sa pripravujú jamky týmto postupom:

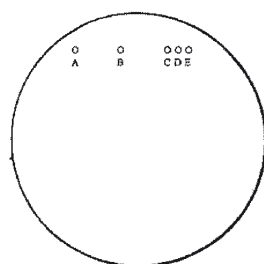
Petriho miska 1  
Sérum 1 : 10



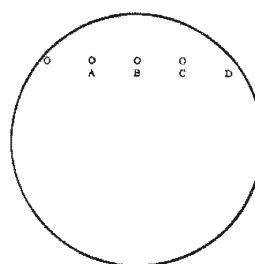
Petriho miska 2  
Sérum 1 : 10



Petriho miska 3  
Sérum 1 : 5



Petriho miska 4  
Sérum 1 : 5



### 3. Pridanie antigénu:

#### a) Petriho misky 1 a 3:

- i) priehlbinka A – nezriedený referenčný antigén;
- ii) priehlbinka B – referenčný antigén zriedený 1: 2;
- iii) priehlbinky C a E – referenčný antigén;
- iv) priehlbinka D – nezriedený testovaný antigén.

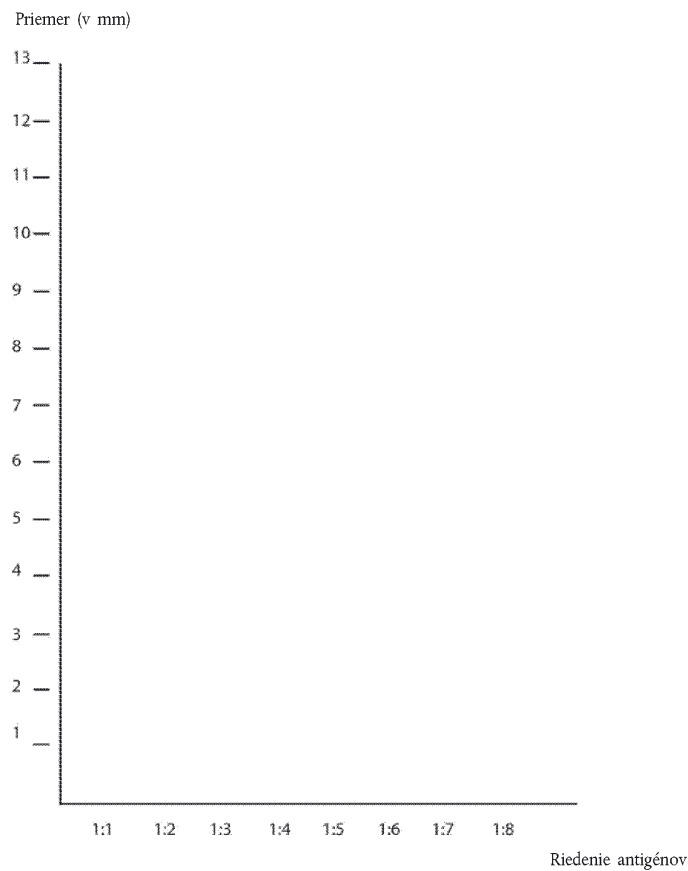
#### b) Petriho misky 2 a 4:

- i) priehlbinka A – nezriedený testovaný antigén;
- ii) priehlbinka B – testovaný antigén zriedený 1: 2;
- iii) priehlbinka C – testovaný antigén zriedený 1: 4;
- iv) priehlbinka D – testovaný antigén zriedený 1: 8.

### 4. Doplňujúce pokyny:

- a) pokus sa musí urobiť s dvomi riedeniami séra (1: 5 a 1: 10), aby sa dosiahla optimálna precipitácia;
- b) ak je priemer precipitácie pri oboch riedeníach príliš malý, potom sa sérum musí ďalej riediť;
- c) ak je priemer precipitácie pri oboch riedeníach príliš veľký a precipitát príliš slabý, potom sa musí zvoliť slabšie riedenie;
- d) konečná koncentrácia agarózy je 0,8 %; konečná koncentrácia séra 5 % a 10 %;

- e) namerané priemery sa zaznamenávajú do nasledujúceho systému súradníc. Pracovné riešenie je také, pri ktorom sa zaznamená rovnaký priemer pre testovaný antigén, aj pre referenčný antigén.



### C. Enzymoimunoanalýza (ELISA) na zisťovanie enzootickej leukózy hovädzieho dobytká

#### 1. Použijú sa tieto materiály a reagenty:

- a) mikroplatne pre pevnú fázu, nádobky alebo iné vybavenie pre pevnú fázu;
- b) antigén sa naviaže na pevnú fázu za pomoci alebo bez pomoci polyklonálnych alebo monoklonálnych protilátok. Ak sa antigén naviaže priamo na pevnú fázu, musia sa všetky testové vzorky vykazujúce pozitívne reakcie znovu testovať voči kontrolnému antigénu. Kontrolný antigén by mal byť identický s testovaným antigénom s výnimkou prípadu, keď antigény vírusu leukózy hovädzieho dobytká chýbajú. Ak sú protilátky naviazané na pevnú fázu, nesmú reagovať na antigény iné ako antigény vírusu leukózy hovädzieho dobytká;
- c) biologická tekutina, ktorá sa má testovať;
- d) príslušná pozitívna a negatívna kontrola;
- e) konjugát;
- f) substrát prispôbený použitému enzýmu;
- g) zastavujúci roztok, ak je potrebný;
- h) roztoky na zriedenie testových vzoriek na prípravu reagentov a na umývanie;
- i) systém odčítavania vhodný pre použitý substrát.

## 2. Štandardizácia a citlivosť testu

Citlivosť ELISA testu je na takej úrovni, aby sérum E05 malo pozitívny výsledok, keď sa zriedi 10-krát (vzorky séra) alebo 250-krát (vzorky mlieka) viac, ako riedenie získané z jednotlivých vzoriek, ak sú tieto zmiešané dohromady. Pri analýzach, kde sa vzorky (sérum a mlieko) testujú individuálne, sérum E05 zriedené 1 k 10 (pri negatívnom sére) alebo 1 ku 250 (pri negatívnom mlieku) musí dosiahnuť pozitívny výsledok, ak sa testuje v rovnakom pokusnom riedení, aké sa použilo pre individuálne testované vzorky. Ústavy uvedené v bode 2 oddielu A sú zodpovedné za kontrolu kvality testov ELISA a najmä za stanovenie, v prípade každej výrobnéj šarže, počtu vzoriek, ktoré sa majú zmiešať podľa titru získaného pre sérum E05.

## 3. Podmienky na použitie testu ELISA na enzootickú leukózu hovädzieho dobytku

- a) Metóda ELISA sa môže použiť na vzorkách séra a mlieka.
  - b) Ak sa ELISA testy použijú na certifikačné účely v súlade s článkom 6 ods. 2 písm. c) alebo na stanovenie a udržanie štatútu stáda v súlade s kapitolou I prílohy D, odber vzoriek séra alebo mlieka sa vykoná tak, aby sa vzorky odobraté na preskúmanie mohli bez pochyb priradiť k jednotlivým zvieratám, ktorých sa odber vzoriek týka. Každý potvrdzujúci test sa uskutoční na vzorkách odobratých z jednotlivých zvierat.
  - c) Keď sa ELISA testy použijú na vzorke nebaleného mlieka, táto vzorka sa odoberie z mlieka pochádzajúceho zo stáda pozostávajúceho z minimálne 30 % kráv v období laktácie. Každý potvrdzujúci test sa uskutoční na vzorkách séra alebo mlieka odobratých od jednotlivých zvierat.“
-