

DECYZJA KOMISJI**z dnia 15 grudnia 2009 r.****zmieniająca załącznik D do dyrektywy Rady 64/432/EWG w odniesieniu do testów diagnostycznych na obecność enzoootycznej białaczki bydła***(notyfikowana jako dokument nr C(2009) 9951)***(Tekst mający znaczenie dla EOG)****(2009/976/UE)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając dyrektywę Rady 64/432/EWG z dnia 26 czerwca 1964 r. w sprawie problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na handel wewnątrzspółnotowy bydłem i trzodą chlewną ⁽¹⁾, w szczególności jej art. 16 akapit drugi,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Dyrektywa 64/432/EWG ma zastosowanie w wewnątrzunijnym handlu bydłem, a rozdział II jej załącznika D ustala testy diagnostyczne na obecność enzoootycznej białaczki bydła (EBL) stosowane w celu kontroli i zwalczania tej choroby oraz nadzoru nad nią i jej monitorowania, jak również w celu ustalenia i utrzymania statusu stada oficjalnie uznanego za wolne od enzoootycznej białaczki bydła oraz certyfikacji wymaganej w wewnątrzunijnym handlu bydłem.
- (2) W rozdziale II załącznika D do dyrektywy 64/432/EWG przewidziano, że testy na obecność EBL mają być przeprowadzane przez wykonanie testu immodyfuzji w żelu agarowym (AGID), z użyciem antygeny poddanego normalizacji względem oficjalnej surowicy standardowej WE (surowicy E1), lub przez wykonanie metody immunosorpcji skoniugowanych enzymów (ELISA), poddanego normalizacji względem surowicy E4. Obie surowice standardowe są dostarczane przez Krajowy Instytut Weterynaryjny, Duński Uniwersytet Techniczny.
- (3) Nowa surowica standardowa EBL (surowica E05) została ostatnio opracowana przez niemieckie Laboratorium Referencyjne ds. Enzoootycznej Białaczki Bydła (Friedrich-Loeffler Institute) Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) we współpracy z laboratoriami referencyjnymi OIE w Zjednoczonym Królestwie (Veterinary Laboratories Agency) i w Polsce (Państwowy Instytut Weterynaryjny), w następstwie próby pierścieniowej przeprowadzonej między tymi laboratoriami. Surowica E05 została poddana walidacji względem surowic E1 i E4 poprzez różne testy AGID i ELISA i ostatecznie włączona jako akredytowana przez OIE surowica standardowa do sekcji

B(2) rozdziału 2.4.11 Podręcznika OIE testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych, wydanie szóste, 2008 r. Surowica ta jest dostępna w Laboratorium Referencyjnym ds. Enzoootycznej Białaczki Bydła OIE w Niemczech.

- (4) Ponadto Krajowy Instytut Weterynaryjny, Duński Uniwersytet Techniczny, poinformował Komisję, że nie jest już w stanie wypełniać swoich obowiązków w zakresie dostawy surowic standardowych, przewidzianych obecnie w rozdziale II załącznika D do dyrektywy 64/432/EWG.
- (5) Właściwe niemieckie organy i Friedrich Loeffler Institute zgodziły się zostać dostawcą surowicy E05, która będzie w konsekwencji nową oficjalną surowicą standardową Unii Europejskiej (UE) w zakresie EBL.
- (6) W związku z tym należy odpowiednio zmienić dyrektywę 64/432/EWG.
- (7) Środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

Artykuł 1

Rozdział II załącznika D do dyrektywy 64/432/EWG zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku do niniejszej decyzji.

Artykuł 2

Niniejsza decyzja skierowana jest do państw członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 15 grudnia 2009 r.

W imieniu Komisji
Androulla VASSILIOU
Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. 121 z 29.7.1964, s. 1977/64.

ZAŁĄCZNIK

Rozdział II załącznika D do dyrektywy 64/432/EWG otrzymuje brzmienie:

„ROZDZIAŁ II

TESTY DO WYKRYWANIA ENZOOTYCZNEJ BIAŁACZKI BYDŁA

Wykrywanie enzootycznej białaczki bydła polega na wykonaniu testu immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID) zgodnie z warunkami opisanymi w sekcjach A i B lub metody immunosorpcji skoniugowanych enzymów (ELISA) zgodnie z warunkami opisanymi w sekcji C. Metoda immunodyfuzji w żelu agarowym może być stosowana jedynie do testów indywidualnych. Jeżeli wyniki testu są przedmiotem uzasadnionego sporu, wykonuje się dodatkową próbę za pomocą testu immunodyfuzji w żelu agarowym.

Testy AGID i ELISA powinny zostać poddane normalizacji względem surowicy E05, która zostanie oficjalną surowicą standardową UE, dostarczaną przez:

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

A. Test immunodyfuzji w żelu agarowym do wykrywania enzootycznej białaczki bydła

1. Antygen stosowany w tym teście powinien zawierać glikoproteiny wirusa białaczki bydła. Antygen powinien zostać poddany normalizacji względem surowicy E05.
2. Instytuty państwowe, krajowe laboratoria referencyjne lub instytuty publiczne, wyznaczone zgodnie z art. 6a do koordynacji norm i metod diagnozy w odniesieniu do testów wykrywających enzootyczną białaczkę bydła, są odpowiedzialne za kalibrację standardowego antygenu roboczego stosowanego w laboratoriach względem surowicy E05.
3. Przynajmniej raz w roku standardowe antygeny stosowane w laboratoriach przedkłada się instytutom państwowym, krajowym laboratoriom referencyjnym lub instytutom publicznym wyznaczonym zgodnie z art. 6a w celu ich zbadania względem surowicy E05. Oprócz tej normalizacji stosowany antygen może zostać poddany kalibracji zgodnie z metodą opisaną w sekcji B.
4. Do wykonania testu konieczne są następujące odczynniki:
 - a) antygen: antygen musi zawierać specyficzne glikoproteiny wirusa enzootycznej białaczki bydła, normalizowane względem surowicy E05;
 - b) badaną surowicę;
 - c) znaną pozytywną surowicę kontrolną;
 - d) żel agarowy:
 - 0,8 % agaru,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M buforu Tris pH 7,2,
 - 15 ml agaru należy umieścić na płytce Petriego o średnicy 85 mm, uzyskując warstwę agaru o grubości 2,6 mm.
5. W agarze należy wyciąć siedem wolnych od wilgoci baseników sięgających dna płytki; wzór powinien składać się z jednego basenika centralnego i otaczających go sześciu baseników tworzących koło.

Średnica basenika centralnego: 4 mm

Średnica baseników peryferyjnych: 6 mm

Odległość między basenikiem centralnym a basenikami peryferyjnymi: 3 mm

6. Basenik centralny należy wypełnić antygenem standardowym. Baseniki peryferyjne 1 i 4 opisane w sekcji B.3 wypełnia się znaną surowicą pozytywną; baseniki 2, 3, 5 i 6 wypełnia się surowicami testowymi. Baseniki należy wypełnić do zniknięcia menisku.
7. W ten sposób uzyskuje się następujące ilości:
 - antygen: 32 μ l,
 - surowica kontrolna: 73 μ l,
 - surowica testowa: 73 μ l.
8. Płytki należy inkubować przez 72 godziny w temperaturze pokojowej (20 do 27 °C), w zamkniętej wilgotnej komorze.
9. Test można odczytać po 24 i 48 godzinach, jednak końcowy wynik nie może zostać uzyskany przed upływem 72 godzin:
 - a) surowica testowa jest pozytywna, jeżeli tworzy swoisty prążek precypitacyjny z antygenem wirusa białaczki bydła (BLV) i tworzy linię w pełni zgodną z surowicą kontrolną;
 - b) surowica testowa jest negatywna, jeżeli nie tworzy swobodnego prążka precypitacyjnego z antygenem BLV i jeżeli nie zakrzywia linii surowicy kontrolnej;
 - c) odczyn jest niejednoznaczny, jeżeli:
 - (i) zakrzywia linię surowicy kontrolnej w stronę basenika z antygenem BLV, ale nie tworzy widocznego prążka precypitacyjnego z antygenem; lub
 - (ii) nie można go odczytać ani jako odczynu negatywnego, ani pozytywnego.

W przypadku odczynów niejednoznacznych test można powtórzyć, stosując stężoną surowicę.
10. Można stosować każdy inny układ lub wzór baseników, o ile surowica E05, rozcieńczona w stosunku 1:10 w surowicy negatywnej, może zostać wykryta jako pozytywna.

B. Metoda normalizacji antygeny

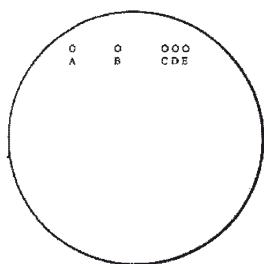
1. Wymagane roztwory i materiały:
 - a) 40 ml 1,6 % agaroz w 0,05 buforze Tris-HCl, pH 7,2 z dodatkiem 8,5 % NaCl;
 - b) 15 ml surowicy z białaczką bydła, jedynie z antygenem przeciwko glikoproteinom wirusa białaczki bydła, rozcieńczonej 1:10 w 0,05 M buforze Tris-HCl, pH 7,2 z dodatkiem 8,5 % NaCl;
 - c) 15 ml surowicy z białaczką bydła, jedynie antygenem przeciwko glikoproteinom wirusa leukozy bydła, rozcieńczonej 1:5 w 0,05 M buforze Tris-HCl, pH 7,2 z dodatkiem 8,5 % NaCl;
 - d) cztery plastikowe płytki Petriego o średnicy 85 mm;
 - e) dziurkacz o średnicy 4–6 mm;
 - f) antygen odniesienia;
 - g) antygen do normalizacji;
 - h) łaźnia wodna (56 °C).
2. Procedura:

Rozpuścić agarozę (1,6 %) w buforze Tris-HCl, podgrzewając ostrożnie do 100 °C. Umieścić w łaźni wodnej w 56 °C na około godzinę. W łaźni wodnej w 56 °C umieścić również rozcieńczenia surowicy z białaczką bydła.

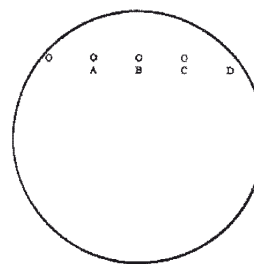
Następnie mieszać 15 ml roztworu agarozy o temperaturze 56 °C z 15 ml surowicy z białaczką bydła (1:10), szybko wstrząsnąć i wylać po 15 ml na dwie płytki Petriego. Powtórzyć procedurę z surowicą z białaczką bydła rozcieńczoną w proporcji 1:5.

Po zestaleniu się agarozy wykonać w niej baseniki w następujący sposób:

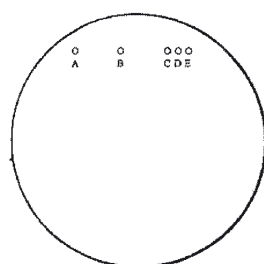
Płytki Petriego nr 1
Surowica 1:10



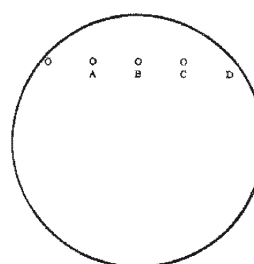
Płytki Petriego nr 2
Surowica 1:10



Płytki Petriego nr 3
Surowica 1:5



Płytki Petriego nr 4
Surowica 1:5



3. Dodanie antygeny:

a) płytki Petriego nr 1 i 3:

- (i) basenik A – nierozcieńczony antygen referencyjny;
- (ii) basenik B – antygen referencyjny rozcieńczony w proporcji 1:2;
- (iii) baseniki C i E – antygen referencyjny;
- (iv) basenik D – nierozcieńczony antygen testowy;

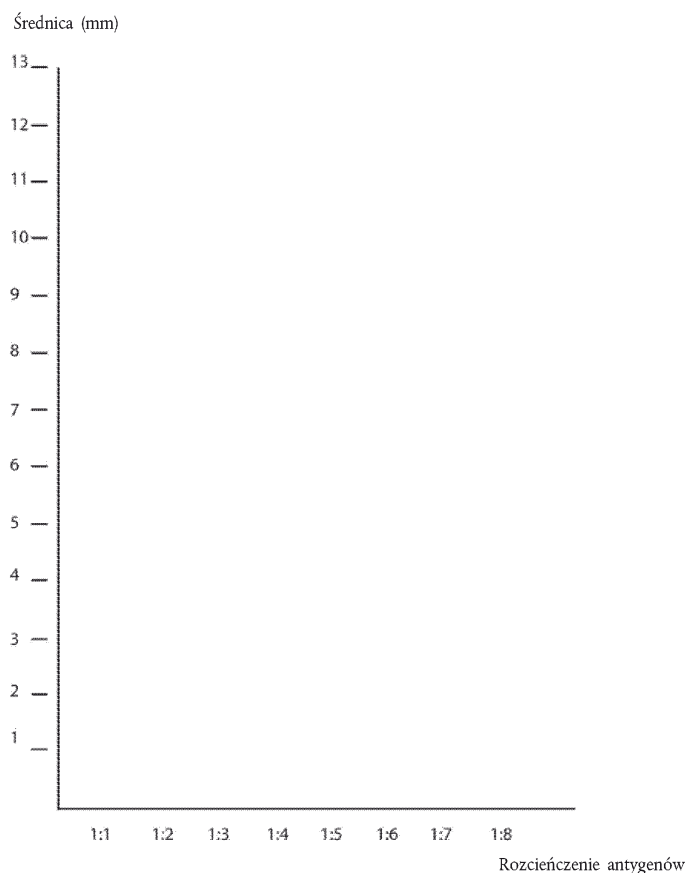
b) płytki Petriego nr 2 i 4:

- (i) basenik A – nierozcieńczony antygen testowy;
- (ii) basenik B – antygen testowy rozcieńczony w proporcji 1:2;
- (iii) basenik C – antygen testowy rozcieńczony w proporcji 1:4;
- (iv) basenik D – antygen testowy rozcieńczony w proporcji 1:8.

4. Dodatkowe wskazówki:

- a) aby uzyskać optymalną precypitację, doświadczenie należy wykonać z dwoma rozcieńczeniami surowicy (1:5 i 1:10);
- b) jeżeli średnica precypitacji jest zbyt mała w przypadku obu rozcieńczeń, surowicę można bardziej rozcieńczyć;
- c) jeżeli średnica precypitacji w przypadku obu rozcieńczeń jest zbyt duża i słaba, należy wybrać mniejsze rozcieńczenie surowicy;
- d) stężenie końcowe agarozy musi wynosić 0,8 %; stężenia surowic odpowiednio 5 i 10 %;

- e) zmierzone średnice należy nanieść na stosowny układ współrzędnych. Rozcieńczony roztwór antygeny testowego o tej samej średnicy co antygen referencyjny jest rozcieńczeniem roboczym.



C. Metoda immunosorpcji skoniugowanych enzymów (ELISA) do wykrywania enzoootycznej białaczki bydła

1. Do wykonania testu potrzebne są następujące materiały i odczynniki:
 - a) mikropłytki z fazy stałej, kuwety lub inna faza stała;
 - b) antygen wiązany do fazy stałej za pomocą lub bez pomocy poliklonalnych lub monoklonalnych antygenów wiążących. Jeżeli faza stała jest pokrywana bezpośrednio antygenem, wszystkie badane próbki dające wynik pozytywny należy ponownie przebadać względem antygeny kontrolnego w przypadku enzoootycznej białaczki bydła. Antygen kontrolny powinien być identyczny w porównaniu z antygenem, z tą różnicą, że antygeny BLV są nieobecne. Jeżeli faza stała jest pokryta antygenami wiążącymi, antygeny te nie powinny reagować z antygenami innymi niż antygeny BLV;
 - c) testowy płyn biologiczny;
 - d) odpowiednia kontrola pozytywna i negatywna;
 - e) konjugat;
 - f) substrat dostosowany do użytego enzymu;
 - g) roztwór zatrzymujący reakcję, w razie potrzeby;
 - h) roztwory do rozcieńczenia badanych próbek, do przygotowania odczynników oraz do mycia;
 - i) system odczytu odpowiedni do stosowanego substratu.

2. Normalizacja i czułość testu

Czułość odczynu ELISA powinna być takiego rzędu, aby surowica E05 dawała pozytywny wynik w rozcieńczeniu dziesięciokrotnie (próbki surowicy) lub 250-krotnie (próbki mleka) większym niż rozcieńczenie uzyskane z pojedynczych próbek, jeżeli są one łączone. W odczynach, gdzie próbki (surowica i mleko) są badane indywidualnie, surowica E05 rozcieńczona w proporcji 1 do 10 (w surowicy negatywnej) lub 1 do 250 (w mleku negatywnym) powinna dawać wynik pozytywny, jeżeli jest badana w tym samym rozcieńczeniu doświadczalnym jak zastosowane do pojedynczych badanych próbek. Instytuty publiczne wymienione w pkt 2 sekcji A odpowiedzialne są za sprawdzanie jakości metody ELISA, w szczególności za określenie liczby próbek, które należy połączyć na podstawie wyniku miana surowicy E05, dla każdej serii produkcyjnej.

3. Warunki stosowania testu ELISA w odniesieniu do enzoptycznej białaczki bydła:

- a) metodę ELISA można stosować w odniesieniu do próbek surowicy i mleka;
 - b) w przypadku gdy metody ELISA są wykorzystywane do celów certyfikacyjnych zgodnie z art. 6 ust. 2 lit. c) lub do ustalenia i utrzymania statusu stada zgodnie z załącznikiem D pkt I, połączenie próbek surowicy lub mleka musi zostać wykonane w taki sposób, aby pobrane do badania próbki można było bez wątpliwości odnieść do konkretnego zwierzęcia należącego do zbioru. Wszelkie testy potwierdzające należy przeprowadzić na surowicy pobranej z pojedynczego zwierzęcia;
 - c) w przypadku gdy metody ELISA są wykorzystywane przy użyciu zbiorczej próby mleka, próba ta musi być pobrana z mleka pochodzącego od stada, w którym przynajmniej 30 % krów mlecznych jest przeznaczonych do produkcji mleka. Wszelkie testy potwierdzające należy przeprowadzić na surowicy lub mleku pobranych z pojedynczego zwierzęcia.”
-