

32002D0160

23.2.2002

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 53/37

ROZHODNUTÍ KOMISE**ze dne 21. února 2002,****kterým se mění příloha D směrnice Rady 90/426/EHS, pokud jde o diagnostické testy na mor koní**

(oznámeno pod číslem K(2002) 556)

(Text s významem pro EHP)

(2002/160/ES)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 90/426/EHS ze dne 26. června 1990 o veterinárních předpisech pro přesun koňovitých a jejich dovoz ze třetích zemí⁽¹⁾, naposledy pozměněnou rozhodnutím 2001/298/ES⁽²⁾, a zejména na článek 23 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Příloha D směrnice 90/426/EHS popisuje test reakce vazby komplementu, který se provádí při diagnóze moru koní.
- (2) V listopadu 2000 pořádala referenční laboratoř Společenství v Algete ve Španělsku výroční setkání národních referenčních laboratoří pro mor koní z členských států EU. Během tohoto setkání byl předložen vědecký důkaz toho, že test reakce vazby komplementu, jak je v současnosti popsán v příloze D směrnice 90/426/EHS, má vážná omezení zejména proto, že je vhodný pouze pro zjišťování protilátek v případě nedávné infekce nebo očkování. Navíc je tento test téměř ve všech laboratořích Společenství a také v hlavních vývozních zemích v praxi nahrazován moderními testy ELISA.
- (3) Mezinárodně uznané laboratorní testy pro zjišťování protilátek proti viru moru koní jsou popsány v *Příručce norem pro diagnostické testy a očkovací látky*⁽³⁾ Mezinárodního úřadu pro nákazy zvířat (OIE); současné vydání však zmiňuje pouze jeden z dostupných testů ELISA.

(4) Proto se jeví jako potřebné pozměnit přílohu D směrnice 90/426/EHS tak, aby zohlednila technický vývoj a mezinárodně schválené normy.

(5) Opatření tohoto rozhodnutí jsou v souladu se stanoviskem Stálého veterinárního výboru,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

Příloha D směrnice 90/426/EHS se nahrazuje přílohou tohoto rozhodnutí.

Článek 2

Toto rozhodnutí je určeno členskými státy.

V Bruselu dne 21. února 2002.

Za Komisi
David BYRNE
člen Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 42.⁽²⁾ Úř. věst. L 102, 12.4.2001, s. 63.⁽³⁾ Kapitola 2.1.11, čtvrté vydání 2000.

PŘÍLOHA

„PŘÍLOHA D

MOR KONÍ

DIAGNOSTIKA

Níže popsaná činidla pro enzymový imunotest (*enzyme-linked immunosorbent assays*, ELISA) mohou být získána z referenční laboratoře Evropského společenství nebo z referenčních laboratoří OIE pro mor koní.

1. KOMPETITIVNÍ TEST ELISA PRO ZJIŠTĚNÍ PROTILÁTEK VIRU MORU KONÍ (AHSV) (PŘEDEPSANÝ TEST)

Kompetitivní test ELISA je používán ke zjišťování protilátek viru AHSV v séru všech druhů koňovitých. Širokospektrální, polyklonální, imunní sérum proti AHSV získané z morčat (dále jen antisérum z morčat) je specifické pro séro skupinu a je schopno zjistit všechny známé sérotypy viru AHSV.

Podstatou testu je přerušení reakce mezi protilátkami AHSV a antisérem z morčat pomocí vzorku testovaného séra. Protilátky AHSV v testovaném vzorku séra budou soutěžit s protilátkami v antiséru z morčat, přičemž dojde k odbarvení (po přidání enzymem značkové protilátky z morčat a substrátu). Séra mohou být testována v jednom roztoku 1 ku 5 (metoda kapkového testu) nebo mohou být titrována (sérová titrační metoda) za účelem zjištění koncových bodů roztoku. Hodnoty inhibice vyšší než 50 % mohou být považovány za pozitivní.

Níže popsaný protokol testu je používán v oblastní referenční laboratoři pro mor koní v Pirbright ve Spojeném království.

1.1 Postup při testu**1.1.1 Příprava destiček**

1.1.1.1 Destičky ELISA se pokryjí antigenem AHSV získaným z infikovaných buněčných kultur a zředěným karbonátovým/bikarbonátovým pufrem, pH 9,6. Destičky ELISA se inkubují přes noc při teplotě 4 °C.

1.1.1.2 Destičky se vypláchnou třikrát tak, že se okénka zaplní fosfátovým pufrem (PBS), pH 7,2 až 7,4, vyprázdní se a vysuší se pomocí savého papíru.

1.1.2 Kontrolní okénka

1.1.2.1 Pozitivní kontrolní sérum se titruje v dvojité sérii roztoků v koncentracích od 1 ku 5 do 1 ku 640 v sloupci 1 v tlumicím roztoku (PBS obsahující 0,05 % (obj.) látky Tween-20, 5,0 % (hmot./obj.) sušeného odstředěného mléka (Cadbury's Marvel™) a 1 % (obj.) séra dospělého skotu) tak, aby byl získán výsledný objem 50 µl/okénko.

1.1.2.2 Do okének A a B sloupce 2 se přidá 50 µl negativního kontrolního séra v roztoku 1 ku 5 (10 µl séra + 40 µl tlumicího roztoku).

1.1.2.3 Do okének C a D sloupce 2 (prázdne) se přidá 100 µl tlumicího roztoku na okénko.

1.1.2.4 Do okének E, F, G a H sloupce 2 (kontrolní vzorky séra morčat) se přidá 50 µl tlumicího roztoku.

1.1.3 Metoda kapkového testu

1.1.3.1 Roztok 1 ku 5 každého testovaného séra v tlumicím roztoku se přidá do duplikovaných okének ve sloupcích 3 až 12 (10 µl séra + 40 µl tlumicího roztoku).

nebo

1.1.4 Sérová titrační metoda

1.1.4.1 Připraví se dvojitá série roztoků každého testovaného vzorku (1 ku 5 až 1 ku 640) v tlumicím roztoku v osmi okénkách jednotlivých sloupců (3 až 12).

poté

1.1.5 50 µl antiséra z morčat, předředěného v tlumicím roztoku, se přidá do všech okének kromě prázdných okének destičky ELISA (všechna okénka nyní obsahují výsledný objem 100 µl).

1.1.5.1 Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C v orbitální třepačce.

1.1.5.2 Destičky se třikrát propláchnou a vysuší tak, jak je popsáno výše.

1.1.5.3 Do každého okénka se přidá 50 µl králičího antiséra z morčat konjugovaného s křenovou peroxidázou (HRP) předředěného v tlumícím roztoku.

1.1.5.4 Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C v orbitální třepačce.

1.1.5.5 Destičky se třikrát propláchnou a vysuší tak, jak je popsáno výše.

1.1.6 Chromogen

Těsně před použitím se připraví roztok chromogenu OPD (orto-fenyldiamin) podle návodu výrobce (0,4 mg/ml ve sterilní destilované vodě). Přidá se substrát (peroxid vodíku – H₂O₂) pro dosažení výsledné koncentrace 0,05 % (obj.) (1 ku 2000 v 30 % roztoku H₂O₂). Do každého okénka se přidá 50 µl roztoku OPD a destičky se ponechají na pracovní ploše po dobu 10 minut při okolní teplotě. Reakce se zastaví přidáním 50 µl kyseliny sírové (H₂SO₄ – 1M) na okénko.

1.1.7 Vyhodnocení

Vzorek se vyhodnotí spektrofotometricky na vlnové délce 492 nm.

1.2 Vyjádření výsledků

1.2.1 S použitím programového nástroje se vytisknou hodnoty optické hustoty (OH) a procentuální inhibice (PI) pro testovaná a kontrolní séra vztažené ke střední hodnotě zaznamenané u čtyř kontrolních okének s antisérem z morčat. Údaje vyjádřené jako hodnoty OH a PI se použijí k určení toho, zda byl test proveden v rámci přijatelných mezí. Horní kontrolní hodnoty (upper control limits, UCL) a spodní kontrolní hodnoty (lower control limits, LCL) pro kontrolní vzorky protilátek z morčat jsou mezi hodnotami OH 1,4 a 0,4. Koncový bod titrace pro pozitivní kontrolu založenou na 50 % PI by měl být 1 ku 240 (v rámci rozmezí od 1 ku 120 do 1 ku 480). Každá destička, jež není v souladu s výše uvedenými kritérii, nesmí být přijata. Jestliže je však titrace pozitivního kontrolního séra větší než 1 ku 480 a testované vzorky jsou stále negativní, pak mohou být negativní testované vzorky přijaty.

Duplicitní okénka s negativním kontrolním sérem a duplicitní prázdná okénka by měla vykazovat hodnoty PI mezi +25 % a –25 %, resp. mezi +95 % a +105 %. Hodnoty mimo toto rozmezí destičku nevyřazují, ale naznačují, že barva pozadí se vyvíjí.

1.2.2 Diagnostický práh (rozhodovací úroveň) pro testované sérum je 50 % (PI 50 %). Vzorky vykazující hodnoty PI vyšší než 50 % jsou zaznamenány jako pozitivní. Vzorky vykazující hodnoty PI nižší než 50 % jsou zaznamenány jako negativní.

Vzorky, které vykazují hodnoty PI mimo rozmezí pro duplicitní okénka, jsou považovány za nejisté. Takové vzorky mohou být znovu testovány kapkovým testem a titrací. Pozitivní vzorky mohou také být titrovány k zjištění stupně positivity.

Rozmístění kapkového testu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+kont.		Testované sérum									
A	1:5	– kont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	– kont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	Prázdné										
D	1:40	Prázdné										
E	1:80	M. kont.										
F	1:160	M. kont.										
G	1:320	M. kont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	M. kont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

–kont. = negativní kontrola.

+kont. = pozitivní kontrola.

M. kont = kontrolní vzorky protilátek z morčat.

Testované sérum

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+kont.		Testované sérum									
A	1:5	– kont.	1:5									1:5
B	1:10	– kont.	1:10									1:10
C	1:20	Prázdné	1:20									1:20
D	1:40	Prázdné	1:40									1:40
E	1:80	M. kont.	1:80									1:80
F	1:160	M. kont.	1:160									1:160
G	1:320	M. kont.	1:320									1:320
H	1:640	M. kont.	1:640									1:640

–kont. = negativní kontrola.

+kont. = pozitivní kontrola.

M. kont = kontrolní vzorky protilátek z morčat.

2. NEPŘÍMÝ TEST ELISA PRO ZJIŠTĚNÍ PROTILÁTEK VIRU MORU KONÍ (AHSV) (PŘEDEPSANÝ TEST)

Níže popsaný test je v souladu s popisem testu v kapitole 2.1.11 *Příručky norem pro diagnostické testy a očkovací látky* OIE, čtvrté vydání, 2000.

Pro určení protilátky viru AHS byl použit rekombinantní protein VP7 jako antigen s vysokým stupněm senzitivity a specificity. Dalšími jeho výhodami je, že je stabilní a není infekční.

2.1 Postup testu

2.1.1 Pevná fáze

2.1.1.1 Destičky ELISA se pokryjí rekombinantem AHSV-4 VP7 rozpuštěným v karbonátovém/bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Destičky se inkubují přes noc při teplotě 4 °C.

2.1.1.2 Destičky se pětkrát propláchnou destilovanou vodou obsahující 0,01 % (obj.) látky Tween 20 (mycí roztok). Destičky se jemně poklepu savým materiálem, aby byl odstraněn veškerý zbytkový mycí roztok.

2.1.1.3 Destičky se tlumí fosfátovým pufrem (PBS) + 5 % (hmot./obj.) roztokem odstředěného mléka (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl/okénko, 1 hodinu při teplotě 37 °C.

2.1.1.4 Tlumicí roztok se odstraní a destičky se jemně poklepu savým materiálem.

2.1.2 Testované vzorky

2.1.2.1 Vzorky séra, které mají být testovány, a pozitivní a negativní kontrolní sérum se rozpustí 1 ku 25 v PBS + 5 % (hmot./obj.) roztoku odstředěného mléka + 0,05 % (obj.) látky Tween 20, 100 µl na okénko. Inkubují se 1 hodinu při teplotě 37 °C.

Pro titraci se připraví dvojitá série roztoků od 1 ku 25 (100 µl/okénko), jedno sérum v každém sloupci destičky, a totéž se provede s pozitivními a negativními kontrolními vzorky. Vzorky se inkubují 1 hodinu při teplotě 37 °C.

2.1.2.2 Destičky se propláchnou, jak je popsáno v kroku 2.1.1.2.

2.1.3 Konjugát

2.1.3.1 Antikoňský gama-globulin konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRP) rozpuštěný v PBS + 5 % mléka + 0,05 % látky Tween 20, pH 7,2 se rozdělí v množstvích 100 µl/okénko. Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C.

2.1.3.2 Destičky se propláchnou, jak je popsáno v kroku 2.1.1.2.

2.1.4 Chromogen/Substrát

- 2.1.4.1 Přidá se 200 µl/okénko roztoku chromogenu/substrátu (10 ml 80,6 mM DMAB (dimethyl amino-benzal-dehyd) +10 ml 1,56 mM MBTH (3-metyl-2-benzo-thiazolin hydrazon hydrochlorid) +5 µl H₂O₂).

Zabarvení se zastaví přidáním 50 µl 3N H₂ SO₄ asi po 5 až 10 minutách (předtím, než se začnou zbarvovat negativní kontrolní vzorky).

Mohou být použity také další chromogeny, např. ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]), TMB (tetra-metyl benzidin), nebo OPD (orto-fenyldiamin).

- 2.1.4.2 Destičky se vyhodnotí na vlnové délce 600 nm (nebo 620 nm).

2.2 Interpretace výsledků

- 2.2.1 Prahová hodnota se vypočte přidáním 0,6 k hodnotě negativní kontroly (0,6 je směrodatná odchylka odvozená ze skupiny 30 negativních sér).
- 2.2.2 Testované vzorky vykazující hodnoty absorpce nižší než prahová hodnota jsou považovány za negativní.
- 2.2.3 Testované vzorky vykazující hodnoty absorpce vyšší než prahová hodnota +0,15 jsou považovány za pozitivní.
- 2.2.4 Testované vzorky vykazující střední hodnoty absorpce jsou nejisté a musí být provedena druhá metoda k potvrzení výsledku.

3. TLUMICÍ TESTY ELISA PRO ZJIŠTĚNÍ PROTILÁTEK VIRU MORU KONÍ (AHSV) (PŘEDEPSANÝ TEST)

Tlumicí test ELISA je zaměřen na zjištění specifických protilátek AHSV v séru z jakýchkoli náchylných druhů. VP7 je hlavní, antigenický, virový protein AHSV, obsažený v rámci devíti sérotypů. Protože je monoklonální protilátka (Mab) také zaměřena proti VP7, test poskytne vysokou úroveň senzitivity a specifity. Navíc je rekombinantní antigen VP7 zcela neškodný, a proto zajišťuje vysoký stupeň bezpečnosti.

Podstatou testu je přerušení reakce mezi rekombinantem VP7 jako antigenem vázaným na destičku ELISA a konjugovaným Mab specifickým na VP7. Protilátka v testovaném séru zablokuje reakci mezi antigenem a Mab a v důsledku toho dojde k odbarvení.

Níže popsaný test se provádí v referenční laboratoři pro mor koní Evropského společenství v Algete ve Španělsku.

3.1 Postup testu

3.1.1 Destičky ELISA

- 3.1.1.1 Destičky ELISA se pokryjí rekombinantem AHSV-4 VP7 rozpuštěným v karbonátovém/bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Inkubují se přes noc při teplotě 4 °C.
- 3.1.1.2 Destičky se pětkrát propláchnou fosfátovým pufrům (PBS) obsahujícím 0,05 % (obj.) látky Tween 20 (PBST).
- 3.1.1.3 Destička se stabilizuje ošetřením stabilizačním roztokem (aby bylo zajištěno dlouhodobé skladování při teplotě 4 °C bez ztráty aktivity) a vysuší se savým materiálem.

3.1.2 Testované a kontrolní vzorky

- 3.1.2.1 Pro screening: testované sérum a kontrolní vzorky se rozpustí 1 ku 10 přímo na destičce v PBST tak, aby byl získán výsledný objem 100 µl/okénko. Vzorky se inkubují 1 hodinu při teplotě 37 °C.
- 3.1.2.2 Pro titraci: připraví se dvojitá série roztoků testovaných sér a pozitivních kontrolních vzorků (100 µl/okénko) od 1 ku 10 do 1 ku 1 280 v osmi okénkách. Negativní kontrola je testována v roztoku 1 ku 10.

3.1.3. Konjugát

Do každého okénka se přidá 50 µl/okénko předředěného roztoku Mab (monoklonální protilátky specifické na VP7) konjugovaného s křenovou peroxidázou (HRP) a vzorek se jemně promíchá, aby byla zajištěna homogenita. Inkubuje se 30 minut při teplotě 37 °C.

3.1.4 Destičky se pětikrát propláchnou PBST a vysuší se tak, jak je uvedeno výše.

3.1.5 Chromogen/Substrát

Přidá se 100 µl/okénko roztoku chromogen/substrát (1 ml ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]), 5 mg/ml + 9 ml substrátového pufru (0,1 M fosfáto-citrátový pufr pH 4 obsahující 0,03 % H₂O₂) a inkubuje se 10 minut při pokojové teplotě. Zabarvení se zastaví přidáním 100 µl/okénko 2 % (hmot./obj.) roztoku SDS (natriumdodecylsulfát).

3.1.6 Vyhodnocení

Vzorek se vyhodnotí na vlnové délce 405 nm.

3.2 Interpretace výsledků

3.2.1 Platnost testu

Test je platný, jestliže je optická hustota (OH) negativního kontrolního vzorku (NK) vyšší než 1,0 a OH pozitivního kontrolního vzorku (PK) je nižší než 0,2.

3.2.2 Výpočet prahové hodnoty

Pozitivní prahová hodnota = $NK - [(NK - PK) \times 0,3]$

negativní prahová hodnota = $NK - [(NK - PK) \times 0,2]$,

kde NK je OH negativního kontrolního vzorku a PK je OH pozitivního kontrolního vzorku.

3.2.3 Interpretace výsledků

Vzorky s OH nižší, než je pozitivní prahová hodnota, by měly být považovány za pozitivní na protilátky AHSV.

Vzorky s OH vyšší, než je negativní prahová hodnota, by měly být považovány za negativní na protilátky AHSV.

Vzorky s OH mezi těmito dvěma hodnotami by měly být považovány za nejisté a u dotyčných zvířat by měl být proveden nový odběr vzorků po dvou až třech týdnech.“
