

DURCHFÜHRUNGSBESCHLUSS (EU) 2016/1840 DER KOMMISSION**vom 14. Oktober 2016****zur Änderung von Anhang IV der Richtlinie 2009/156/EG des Rates hinsichtlich der Verfahren zur Diagnose der afrikanischen Pferdepest***(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen C(2016) 6509)***(Text von Bedeutung für den EWR)**

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

gestützt auf die Richtlinie 2009/156/EG des Rates vom 30. November 2009 zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Vorschriften für das Verbringen von Equiden und für ihre Einfuhr aus Drittländern ⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 20,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In Anhang IV der Richtlinie 2009/156/EG sind Verfahren beschrieben, die, falls erforderlich, zur Diagnose der afrikanischen Pferdepest bei Equiden vor deren Verbringung innerhalb der Union oder der Einfuhr aus Drittländern anzuwenden sind.
- (2) Seit der Annahme der Richtlinie 2009/156/EG wurden Laborkapazitäten zur Durchführung fortgeschrittener, hochempfindlicher und wirksamer Tests für die Diagnose der afrikanischen Pferdepest entwickelt. Parallel dazu wurde das Kapitel des Handbuchs des Internationalen Tierseuchenamtes (OIE) mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere ⁽²⁾, das sich mit der Diagnose der afrikanischen Pferdepest befasst, geändert, um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen.
- (3) Im Rahmen seines Arbeitsprogramms 2014 erstellte das Referenzlaboratorium der Europäischen Union für die afrikanische Pferdepest ⁽³⁾ einen Bericht über die fachliche Bewertung der in Anhang IV der Richtlinie 2009/156/EG beschriebenen Diagnoseverfahren. Die Bewertung, die der Kommission im Mai 2015 vorgelegt wurde, kam zu dem Schluss, dass der kompetitive Enzym-Immuntests (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) nicht länger verfügbar ist, dass der indirekte ELISA nicht gebräuchlich ist, jedoch innerhalb von 4-6 Monaten nach Anfrage geliefert werden kann, und dass der Blocking-ELISA im Handel erhältlich ist und bei den vom Referenzlaboratorium der Europäischen Union für die afrikanische Pferdepest organisierten Eignungstests üblicherweise für die Analyse der Proben verwendet wird.
- (4) Ferner wird in dem Bericht darauf hingewiesen, dass die Nukleinsäureerkennung durch Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) Vorteile gegenüber serologischen Diagnostikverfahren hat, da sie die Erkennung der Krankheit in einem frühen Stadium der Infektion ermöglicht. Zudem verwenden die meisten nationalen Referenzlaboratorien der Mitgliedstaaten der Europäischen Union Echtzeit-RT-PCR-Verfahren, unter anderem für die Diagnose der afrikanischen Pferdepest, da diese Verfahren sich im Rahmen der jährlichen Eignungsprüfungen im Zeitraum 2009-2014 als zweckmäßig erwiesen haben. Aus dem Bericht geht ferner hervor, dass es außerhalb der Union mehrere Referenzlaboratorien des OIE sowie weitere Laboratorien mit besonderem Fachwissen über die afrikanische Pferdepest gibt, die mindestens eines der Echtzeit-RT-PCR-Verfahren zum Nachweis des Genoms der afrikanischen Pferdepest umgesetzt haben.
- (5) Auf dem gemeinsamen Workshop der Referenzlaboratorien der Europäischen Union für die afrikanische Pferdepest/Blauzungenkrankheit und nationaler Referenzlabors, der am 24. und 25. November 2015 in Ascot (Vereinigtes Königreich) stattfand, wurde empfohlen, Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionsverfahren (RRT-PCR) zum Nachweis des Virus der afrikanischen Pferdepest in Anhang IV der Richtlinie 2009/156/EG aufzunehmen.

⁽¹⁾ ABl. L 192 vom 23.7.2010, S. 1.

⁽²⁾ http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.01_AHS.pdf.

⁽³⁾ Richtlinie 92/35/EWG des Rates vom 29. April 1992 zur Festlegung von Kontrollregeln und Maßnahmen zur Bekämpfung der Pferdepest (ABl. L 157 vom 10.6.1992, S. 19).

- (6) Obwohl alle verfügbaren Echtzeit-RT-PCR-Verfahren zum Nachweis des Genoms der afrikanischen Pferdepest ausreichend empfindlich sind, wird das von Agüero et al. (2008) ⁽⁴⁾ beschriebene Verfahren am häufigsten von den Labors verwendet. Das von Guthrie et al. (2013) ⁽⁵⁾ beschriebene Verfahren wurde ausdrücklich entwickelt, um zu gewährleisten, dass Pferde aus Gebieten, die von der afrikanischen Pferdepest bedroht sind, nach Ablauf der gemäß dem Gesundheitskodex für Landtiere ⁽⁶⁾ der OIE vorgeschriebenen Mindestquarantäne sicher transportiert werden können.
- (7) Es ist daher angezeigt, Verfahren zur Erreger-Identifizierung und zum Nachweis von Antikörpern als ergänzende Verfahren zur raschen Diagnose der afrikanischen Pferdepest in Anhang IV der Richtlinie 2009/156/EG aufzunehmen.
- (8) Anhang IV der Richtlinie 2009/156/EG sollte deshalb dahingehend geändert werden, dass das kompetitive ELISA-Verfahren gestrichen wird und der indirekte ELISA und der Blocking-ELISA aktualisiert werden gemäß Kapitel 2.5.1 der Ausgabe 2016 des Handbuchs des OIE mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, Ausgabe 2016 in der von der Weltversammlung der OIE-Delegierten im Mai 2012 angenommenen Fassung ⁽⁷⁾. Außerdem sollten die von Agüero et al. (2008) und von Guthrie et al. (2013) beschriebenen Echtzeit-RT-PCR-Verfahren in den Anhang aufgenommen werden, damit diese Erreger-Identifizierungstests für Untersuchungen vor der Verbringung verfügbar gemacht werden.
- (9) Die Richtlinie 2009/156/EG sollte daher entsprechend geändert werden.
- (10) Die in diesem Beschluss vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für Pflanzen, Tiere, Lebensmittel und Futtermittel —

HAT FOLGENDEN BESCHLUSS ERLASSEN:

Artikel 1

Anhang IV der Richtlinie 2009/156/EG erhält die Fassung des Anhangs dieses Beschlusses.

Artikel 2

Dieser Beschluss ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 14. Oktober 2016

Für die Kommission
Vytenis ANDRIUKAITIS
Mitglied der Kommission

⁽⁴⁾ Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. and Jimenez-Clavero A. (2008). Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 325-328.

⁽⁵⁾ Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *Journal of Virological Methods*. 2013;189(1):30-35.

⁽⁶⁾ http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_ahs.pdf.

⁽⁷⁾ Siehe Fußnote 2.

ANHANG

„ANHANG IV

AFRIKANISCHE PFERDEPEST**DIAGNOSTIK**

TEIL A

Serologische Tests

Bei den nachstehend beschriebenen serologischen Verfahren handelt es sich um Enzym-Immuntests (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA) auf der Grundlage von Kapitel 2.5.1 Abschnitt B Punkt 2 des Handbuchs mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, Ausgabe 2016 in der von der Weltversammlung der OIE-Delegierten im Mai 2012 angenommenen Fassung.

Das virale Protein VP7 ist ein wichtiges immundominantes Antigen des Virus der afrikanischen Pferdepest (APV) und ist innerhalb der neun Serotypen konserviert. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante AHSV-VP7-Proteine stabil und unschädlich sind und sich zur Verwendung als Antigene in ELISA-Verfahren zur Bestimmung der AHSV-Antikörper eignen, wobei ein hohes Maß an Empfindlichkeit und Spezifität gewährleistet ist (Laviada et al., 1992b ⁽¹⁾; Maree und Paweska, 2005). Der indirekte ELISA und der Blocking-ELISA sind die zwei für die serologische Diagnostik der afrikanischen Pferdepest (AP) geeigneten AP-VP7-ELISA-Tests.

1. Indirekter ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der afrikanischen Pferdepest (APV)

Als Konjugat bei diesem Verfahren wird ein Meerrettichperoxidase-Anti-Pferd-Gammaglobulin verwendet, das mit dem Serum von Pferden, Maultieren und Eseln reagiert. Bei dem von Maree & Paweska (2005) ⁽²⁾ beschriebenen Verfahren wird das G-Protein als Konjugat verwendet, das auch mit dem Serum von Zebras reagiert.

Das Antigen kann beim Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), Spanien, innerhalb von 4-6 Monaten nach Anfrage bezogen werden.

1.1. Testverfahren**1.1.1. Festphase**

1.1.1.1. Platten mit rekombinantem APV-4 VP7, in Karbonat-Bikarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,6 verdünnt beschichten und über Nacht bei 4 °C inkubieren.

1.1.1.2. Platten fünfmal mit destilliertem Wasser, dem 0,01 % (v/v) Tween 20 zugesetzt wurde (Waschlösung), waschen. Platten auf saugfähigem Material leicht abklopfen, um restliche Waschlösung zu entfernen.

1.1.1.3. Platten (200 µl/Vertiefung) mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 + 5 % (w/v) Magermilch (Nestle Dry Skim Milk™) für eine Stunde bei 37 °C blockieren.

1.1.1.4. Blocking-Lösung wegschütten, und Platten auf saugfähigem Material leicht abklopfen.

1.1.2. Testproben

1.1.2.1. Serumtestproben sowie positive und negative Kontrollseren im Verhältnis 1:25 in PBS + 5 % (w/v) Magermilch + 0,05 % (v/v) Tween 20 verdünnen, 100 µl je Vertiefung. Für eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

Zur Titrierung eine zweifache Verdünnungsreihe, beginnend mit 1:25 (100 µl/Vertiefung und ein Serum je Plattenreihe), anlegen. Mit den positiven und negativen Kontrollen ebenso verfahren. Für eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

⁽¹⁾ Laviada M.D., Roy P. and Sanchez-Vizcaino J.M (1992b). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium. Walton T.E. & Osburn B.L., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646-650.

⁽²⁾ Maree S. and Paweska J.T. (2005). Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. J. Virol. Methods, 125 (1), 55-65.

1.1.2.2. Platten fünfmal mit destilliertem Wasser, dem 0,01 % (v/v) Tween 20 zugesetzt wurde (Waschlösung), waschen. Die Platten auf saugfähigem Material leicht abklopfen, um restliche Waschlösung zu entfernen.

1.1.3. Konjugat

1.1.3.1. In jede Vertiefung 100 µl Meerrettichperoxidase-Anti-Pferd-Gammaglobulin-Konjugat, in PBS + 5 % Milch + 0,05 % Tween 20 mit einem pH-Wert von 7,2 verdünnt, einpipettieren. Für eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

1.1.3.2. Platten fünfmal mit destilliertem Wasser, dem 0,01 % (v/v) Tween 20 zugesetzt wurde (Waschlösung), waschen. Platten auf saugfähigem Material leicht abklopfen, um restliche Waschlösung zu entfernen.

1.1.4. Chromogen/Substrat

1.1.4.1. In jede Vertiefung 200 µl Chromogen-/Substratlösung [10 ml 80,6 DMAB (Dimethylaminobenzyldehyd) + 10 ml 1,56 MBTH (3-methyl-2-benzo-thiazolinehydrazon hydrochlorid) + 5 µl H₂O₂] geben.

Nach ungefähr 5 bis 10 Minuten (bevor sich die negativen Kontrollen zu verfärben beginnen) die Farbentwicklung durch Zugabe von 50 µl 3N H₂SO₄ stoppen.

Andere Substrate wie ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure]), TMB (Tetramethylbenzidin) oder OPD (Orthophenyldiamin) können ebenfalls benutzt werden.

1.1.4.2. Platten bei 600 nm (oder 620 nm) ablesen.

1.2. *Auswertung der Ergebnisse*

1.2.1. Durch Addition von 0,06 zum Wert der Negativkontrolle den Grenzwert (cut-off value) berechnen (0,06 entspricht der aus einer Gruppe von 30 negativen Seren abgeleiteten Standardabweichung).

1.2.2. Testproben mit Absorptionswerten unter dem Grenzwert gelten als negativ.

1.2.3. Testproben mit Absorptionswerten + 0,15 über dem Grenzwert gelten als positiv.

1.2.4. Testproben mit intermediären Absorptionswerten gelten als ergebnislos; zur Bestätigung des Testergebnisses muss der Test wiederholt werden.

2. **Blocking-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der afrikanischen Pferdepest (APV)**

Der Blocking-ELISA ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer APV-Antikörper in Seren von Equiden, d. h. Pferden, Eseln, Zebras und ihren Kreuzungen, mit dem das bisweilen beim indirekten ELISA auftretende Spezifitätsproblem vermieden werden kann.

Testprinzip ist das Blockieren der Reaktion zwischen dem an die ELISA-Platte adsorbierten, rekombinanten VP7-Protein und einem AP-spezifischen konjugierten monoklonalen Antikörper (MAK). Antikörper in den Testseren blockieren die Reaktion zwischen Antigen und MAK. Dieser Vorgang manifestiert sich als Abschwächung der Farbintensität. Da der MAK gegen das VP7 gerichtet ist, gewährleistet der Test ein hohes Niveau an Empfindlichkeit und Spezifität.

Der Blocking-ELISA ist im Handel verfügbar.

2.1. *Testverfahren*

2.1.1. Festphase

2.1.1.1. ELISA-Platten mit 50-100 ng rekombinantem APV-4-VP7, in Karbonat-Bikarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,6 verdünnt, beschichten und über Nacht bei 4 °C inkubieren.

2.1.1.2. Platten dreimal mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) 0,1 × mit einem Gehalt von 0,135 M NaCl, der 0,05 % (v/v) Tween 20 zugesetzt wurde (PBST), waschen. Platten auf saugfähigem Material leicht abklopfen, um restliche Waschlösung zu entfernen.

2.1.2. Testproben und Kontrollen

2.1.2.1. Serumtestproben sowie positive und negative Kontrollseren im Verhältnis 1:5 in Verdünnungsmittel + 0,35 M NaCl + 0,05 % (v/v) Tween 20 + 0,1 % Kathon verdünnen, 100 µl je Vertiefung. Für eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

Zur Titrierung eine zweifache Verdünnungsreihe der Testserien von 1:10 bis 1:280 in acht Vertiefungen (100 µl/Vertiefung und ein Serum je Plattenreihe), anlegen. Mit den positiven und negativen Kontrollen ebenso verfahren. Für eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

2.1.2.2. Platten fünfmal mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) 0,1 × mit einem Gehalt von 0,135 M NaCl, der 0,05 % (v/v) Tween 20 zugesetzt wurde (PBST), waschen. Platten auf saugfähigem Material leicht abklopfen, um restliche Waschlösung zu entfernen.

2.1.3. Konjugat

2.1.3.1. In jede Vertiefung 100 µl des Meerrettich-Peroxidase-konjugierten MAK-VP7 geben. Dieser MAK wurde in einer 1:1-Lösung von StabiliZymeSelect® (SurModics. Referenz: SZ03) und destilliertem Wasser auf 1:5 000-1:15 000 vorverdünnt. Für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.

2.1.3.2. Platten fünfmal mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) 0,1 × mit einem Gehalt von 0,135 M NaCl, der 0,05 % (v/v) Tween 20 zugesetzt wurde (PBST), waschen. Platten auf saugfähigem Material leicht abklopfen, um restliche Waschlösung zu entfernen.

2.1.4. Chromogen/Substrat

100 µl Chromogen-/Substratlösung, d. h. 1 ml ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure]) 5 mg/ml + 9 ml Substrat-Puffer (0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer mit pH 4 und einem Gehalt an 0,03 % H₂O₂, in jede Vertiefung geben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Farbentwicklung durch Zugabe von 100 µl 2 %igem (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat) in jede Vertiefung stoppen.

2.1.5. Ablesen

Das Testergebnis bei 405 nm in einem ELISA-Ablesegerät ablesen.

2.2. Auswertung der Ergebnisse

2.2.1. Bestimmen des Prozentsatzes der Inhibition (PI) für jede Probe durch Anwenden der folgenden Formel, wobei „Ak“ für Antikörper steht:

$$PI = \frac{Ak(\text{control}^-) - Ak(\text{Probe})}{Ak(\text{control}^-) - Ak(\text{control}^+)} \times 100$$

2.2.2. Proben mit einem höheren PI als 50 % gelten als positiv auf APV-Antikörper.

2.2.3. Proben mit einem niedrigeren PI als 45 % gelten als negativ auf APV-Antikörper.

2.2.4. Proben mit einem PI zwischen 45 % und 50 % gelten als ergebnislos und müssen erneut getestet werden. Ist der Test erneut ergebnislos, sollten die Tiere erneut anhand von Proben getestet werden, die nicht früher als zwei Wochen nach den Proben entnommen werden, die als ergebnislos erachtet wurden.

TEIL B

Identifizierung des Erregers

Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rRT-PCR)

Erreger-Identifizierungstests auf der Grundlage von Nukleinsäureverfahren müssen Referenzstämme der neun APV-Serotypen nachweisen.

Das unter Punkt 2.1 beschriebene Verfahren beruht auf Kapitel 2.5.1 Abschnitt B Punkt 1.2 des Handbuchs mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, Ausgabe 2016 in der von der Weltversammlung der OIE-Delegierten im Mai 2012 angenommenen Fassung.

Jedes RT-PCR-Verfahren, das zur Untersuchung von Blut- oder Milzproben gemäß der Richtlinie 2009/156/EG verwendet wird, muss mindestens die gleiche Leistung im Hinblick auf die Empfindlichkeit der unter Punkt 2 beschriebenen Verfahren aufweisen.

Referenzstämme inaktivierter Viren der Serotypen 1 bis 9 können vom Referenzlabor der Europäischen Gemeinschaft oder vom OIE-Referenzlaboratorium für Afrikanische Pferdepest in Algete (Spanien) bezogen werden.

1. Extraktion viraler RNA

Um eine gute Reaktion zu erhalten, muss die aus der Probe extrahierte APV-RNA von hoher Qualität sein. Die Extraktion von Nukleinsäuren aus klinischen Proben kann mittels unterschiedlicher laborinterner oder im Handel erhältlicher Verfahren erfolgen.

Die im Handel erhältlichen Kits verwenden unterschiedliche Ansätze zur RNA-Isolierung. Die meisten beruhen auf den folgenden Verfahren:

- Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren;
- Adsorption der Nukleinsäuren an ein Filtersystem;
- Adsorption der Nukleinsäuren an magnetische Partikel.

Es folgt ein Beispiel für ein laborinternes Verfahren zur RNA-Extraktion:

- 1.1. 1 g der Gewebeprobe in 1 ml des Denaturierungsmittels (4 M Guanidiniumthiocyanat + 25 mM Natriumcitrat + 0,1 M 2-Mercaptoethanol + 0,5 % Sarkosyl) homogenisieren.
- 1.2. Nach der Zentrifugation dem Überstand 1 µg Hefe-RNA, 0,1 ml 2 M Natriumacetat mit einem pH-Wert von 4, 1 ml Phenol und 0,2 ml einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (49:1) hinzufügen.
- 1.3. Die Suspension kräftig schütteln und 15 Minuten lang auf Eis abkühlen.
- 1.4. Nach der Zentrifugation die in der wässrigen Phase vorhandene RNA mittels Phenol extrahieren, mit Ethanol ausfällen und in sterilem Wasser resuspendieren.

2. Echtzeit-RT-PCR-Verfahren

- 2.1. *Gruppenspezifisches Echtzeit-RT-PCR-Verfahren nach Agüero et al., 2008 ⁽¹⁾*

Dieses gruppenspezifische Echtzeit-RT-PCR zielt auf das VP7 des APV ab und ist in der Lage, alle bekannten APV-Serotypen und derzeit zirkulierenden Stränge nachzuweisen. Es wurde mit sehr guten Ergebnissen von den teilnehmenden nationalen Referenzlaboratorien der EU-Mitgliedstaaten im Zuge der Eignungstests verwendet, die vom Referenzlabor der Europäischen Union im Zeitraum 2009-2015 jährlich organisiert wurden. Außerdem erzielte dieses Protokoll in einem 2015 im Rahmen des Netzes der OIE-Referenzlaboratorien organisierten Ringversuch eines der besten Ergebnisse.

Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von Viren der APV-Art:

- Vorwärtsprimer 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- Rückwärtsprimer 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'
- MGB-TaqMan-Sonde 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3'

- 2.1.1. Die Primer-Stammkonzentration auf eine Arbeitskonzentration von 8 µM („8 µM-Primer-Arbeitsstamm“) verdünnen, die Sonde auf 50 µM („50 µM-Sonden-Arbeitsstamm“). Es sollte eine Test-Plattenanordnung angelegt und in die Software des Echtzeit-PCR-Thermostyklus eingegeben werden. Entsprechend der Plattenanordnung 2,5 µl eines jeden 8 µM-Primer-Arbeitsstamm in jede Vertiefung geben, die RNA-Proben, positive und/oder negative Kontrollen enthält (die Endkonzentration des Primers beträgt 1 µM in der 20 µM RT-PCR-Mischung). Die Platte auf Eis legen.

⁽¹⁾ Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. and Jimenez-Clavero A. (2008). Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, S. 325-328.

- 2.1.2. 2 µl isolierter RNA (Testproben und positive Kontrolle) oder bei negativen Reaktionskontrollen 2 µl RNase-freies Wasser mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern mischen. Diese Mischung durch Erhitzen auf 95 °C während 5 Minuten und einer schnellen Abkühlung auf Eis während mindestens 5 Minuten denaturieren.
- 2.1.3. Eine für die Zahl der zu testenden Proben ausreichende Menge an Ein-Schritt-Echtzeit-RT-PCR-Master-Mix entsprechend den Anweisungen des Herstellers ansetzen. 0,1 µl des 50 µM-Sonden-Arbeitsstamms in jede Vertiefung mit RNA-Proben geben (die Endkonzentration der Sonde beträgt 0,25 µM in jeder Vertiefung mit RNA-Proben). 13 µl des Ein-Schritt-Echtzeit-RT-PCR-Master-Mix in jede Vertiefung der PCR-Platte geben, die denaturierte Primer und RNA enthält.
- 2.1.4. Die Platte in einen auf reverse Transkription und cDNA-Amplifikation/Fluoreszenzdetektion programmierten Echtzeit-Thermozykler platzieren. Die Amplifikationsbedingungen bestehen aus einem ersten Schritt der reversen Transkription bei 48 °C für 25 Minuten, gefolgt von 10 Minuten bei 95 °C („Warmstart“) und 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C, 35 Sekunden bei 55 °C und 30 Sekunden bei 72 °C (oder 40 Zyklen von 2 Sekunden bei 97 °C und 30 Sekunden bei 55 °C, wenn die verwendeten Reagenzien und Thermozykler schnelle Reaktionen ermöglichen). Die Fluoreszenzdaten werden am Ende des 55 °C-Schritts erfasst.
- 2.1.5. Der Assay gilt als ungültig, wenn das Ergebnis untypische Amplifikationskurven sind; in diesem Fall muss er wiederholt werden.

Die Probe gilt als positiv, wenn der Ct-Wert (d. h. der Zyklus, an dem die Fluoreszenz innerhalb einer Reaktion den Fluoreszenz-Schwellenwert übersteigt) den festgelegten Ct-Schwellenwert (35) innerhalb von 40 PCR-Zyklen nicht übersteigt ($Ct \leq 35$).

Die Probe gilt als ergebnislos, wenn der Ct-Wert den festgelegten Ct-Schwellenwert (35) innerhalb von 40 PCR-Zyklen übersteigt ($Ct \geq 35$).

Die Probe gilt als negativ, wenn das Ergebnis eine horizontale Amplifikationskurve ist, die den Schwellenwert innerhalb von 40 PCR-Zyklen nicht übersteigt.

2.2. Gruppenspezifisches Echtzeit-RT-PCR-Verfahren nach Guthrie et al., 2013 ⁽¹⁾

Echtzeit-RT-PCR-Verfahren, das Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-Sonden (FRET) zum Nachweis von APV-Nukleinsäuren verwendet.

Der beschriebene APV-RT-PCR-Assay wurde unter Verwendung von Sequenzen einer Vielzahl derzeit zirkulierender Feldstämme des APV entwickelt (Quan et al., 2010 ⁽²⁾). Er umfasst zudem einen patentrechtlich geschützten, synthetischen externen Kontrollassay, um das ordnungsgemäße Funktionieren der Komponenten des Assays zu überprüfen.

Kits für Einschritt-Echtzeit-PCR sind im Handel erhältlich. Es folgen einige grundlegende, von Guthrie et al. (2013) beschriebene Schritte, die jeweils an die lokalen oder fallspezifischen Gegebenheiten, die verwendeten Kits und die verfügbare Ausrüstung angepasst werden können.

Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von Viren der APV-Art:

— Vorwärtsprimer 5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'

— Rückwärtsprimer 5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'

— MGB-TaqMan-Sonde 5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

- 2.2.1. Primer- und Sonden-Misch-Stammlösungen in 25-facher Konzentration bei 5 µM (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) bzw. 3 µM (Sonde) ansetzen. Eine Test-Plattenanordnung anlegen und in die Software des Echtzeit-PCR-Thermozyklers eingeben. Unter Beachtung der Plattenanordnung 5 µl der RNA-Proben, einschließlich Testproben sowie positive und negative Kontrollen, in die entsprechenden Vertiefungen geben.
- 2.2.2. Die RNA durch Erhitzen auf 95 °C während 5 Minuten und eine schnelle Abkühlung auf Eis während mindestens 3 Minuten denaturieren.

⁽¹⁾ Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *Journal of Virological Methods*. 2013;189(1):30-5.

⁽²⁾ Quan, M., Lourens, C.W., MacLachlan, N.J., Gardner, I.A., Guthrie, A.J., 2010. Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods* 167, 45-52.

- 2.2.3. Eine für die Zahl der zu testenden Proben ausreichende Menge an Ein-Schritt-Echtzeit-PCR-Master-Mix entsprechend den Anweisungen des Herstellers ansetzen. 1 µl der 25-fachen Primer-Sonden-Misch-Stammlösung (siehe Punkt 2.2.1) dem Master-Mix hinzufügen, sodass die Endkonzentration in jeder Vertiefung 200 nM für jeden Primer und 120 nM für die Sonde beträgt. In jede Vertiefung der PCR-Platte, die denaturierte RNA enthält, werden 20 µl des Master-Mix geben.
- 2.2.4. Die Platte in einen vom Hersteller empfohlenen, auf reverse Transkription und cDNA-Amplifikation/Fluoreszenzdetektion programmierten Echtzeit-Thermozykler platzieren. Die Amplifikationsbedingungen bestehen beispielsweise aus einem ersten Schritt der reversen Transkription bei 48 °C für 10 Minuten, gefolgt von 10 Minuten bei 95 °C und 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C und 45 Sekunden bei 60 °C.
- 2.2.5. Die Probe gilt als positiv, wenn die normalisierte Fluoreszenz des APV-RT-PCR-Assays eine Schwelle von 0,1 innerhalb von 36 PCR-Zyklen in allen Replikaten einer Probe übersteigt.

Die Probe gilt als ergebnislos, wenn die normalisierte Fluoreszenz des APV-RT-PCR-Assays zwischen 36 und 40 PCR-Zyklen eine Schwelle von 0,1 in einem Replikat einer Probe übersteigt.

Die Probe gilt als negativ, wenn die normalisierte Fluoreszenz des APV-RT-PCR-Assays eine Schwelle von 0,1 innerhalb von 40 PCR-Zyklen in allen Replikaten einer Probe nicht übersteigt und wenn die normalisierte Fluoreszenz des patentrechtlich geschützten, synthetischen externen Kontrollassays innerhalb von 33 PCR-Zyklen eine Schwelle von 0,1 übersteigt.“
