

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 21. Februar 2002

zur Änderung des Anhangs D der Richtlinie 90/426/EWG des Rates hinsichtlich der Diagnosemethoden zum Nachweis der Afrikanischen Pferdepest

(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 556)

(Text von Bedeutung für den EWR)

(2002/160/EG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 90/426/EWG des Rates vom 26. Juni 1990 zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Vorschriften für das Verbringen von Equiden und für ihre Einfuhr aus Drittländern ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Entscheidung 2001/298/EG ⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 23,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Anhang D der Richtlinie 90/426/EWG sieht als Testmethode zum Nachweis der Afrikanischen Pferdepest die Komplementbindungsreaktion vor.
- (2) Im November 2000 hat unter der Schirmherrschaft des gemeinschaftlichen Referenzlabors in Algete, Spanien, die jährliche Tagung der einzelstaatlichen Referenzlaboratorien für Afrikanische Pferdepest stattgefunden. Im Rahmen dieser Zusammenkunft wurden wissenschaftliche Belege dafür erbracht, dass der Komplementbindungstest im Sinne von Anhang D der Richtlinie 90/426/EWG ernsthafte Schwächen aufweist, da sich nach diesem Verfahren Antikörper nur nach einer frischen Infektion oder Impfung nachweisen lassen. Darüber hinaus wurde diese Testmethode in nahezu allen Laboratorien der Gemeinschaft und in den wichtigsten Ausfuhrländern bereits durch moderne ELISA-Testmethoden ersetzt.
- (3) Die international anerkannten Labormethoden zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Afrikanischen Pferdepest sind im Handbuch des Internatio-

nal Tierseuchenamtes (OIE) mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen (Manual of Standards for Diagnosis and Vaccines) ⁽³⁾ festgelegt. In der letzten Ausgabe dieses Handbuchs wird jedoch nur auf eine der verfügbaren ELISA-Methoden verwiesen.

- (4) Daher empfiehlt es sich, Anhang D der Richtlinie 90/426/EWG zu ändern, um der technischen Entwicklung und international anerkannten Standards Rechnung zu tragen.
- (5) Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Veterinärausschusses —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Anhang D der Richtlinie 90/426/EWG wird durch den Anhang dieser Entscheidung ersetzt.

Artikel 2

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 21. Februar 2002

Für die Kommission

David BYRNE

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. L 224 vom 18.8.1990, S. 42.

⁽²⁾ ABl. L 102 vom 12.4.2001, S. 63.

⁽³⁾ Kapitel 2.1.11, vierte Ausgabe 2000.

ANHANG

„ANHANG D

AFRIKANISCHE PFERDEPEST

DIAGNOSTIK

Reagenzien für die nachstehend beschriebenen Enzym-Immuntests (enzyme-linked immunosorbent assays — ELISA) können vom Referenzlabor der Europäischen Gemeinschaft oder von den OIE-Referenzlaboratorien für Afrikanische Pferdepest bezogen werden.

1. KOMPETITIVER ELISA ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS VIRUS DER AFRIKANISCHEN PFERDEPEST (APV) (PFLICHTTEST)

Die kompetitive ELISA-Methode wird zum Nachweis spezifischer APV-Antikörper in Equidenseren angewandt. Das Breitspektrum-, polyklonale Meerschweinchen-Anti-APV Immuneserum (im Folgenden ‚Meerschweinchen-Antiserum‘ genannt) ist serogruppenspezifisch und eignet sich zum Nachweis aller bekannten Serotypen des AP-Virus.

Testprinzip ist die Unterbrechung der Reaktion zwischen dem APV-Antigen und einem Meerschweinchen-Antiserum mit einer Testserumprobe. APV-Antikörper im Testserum konkurrieren mit den Antikörpern im Meerschweinchen-Antiserum und bewirken so eine Abschwächung der erwarteten Farbreaktion (nach Zugabe von enzymmarkiertem Anti-Meerschweinchen-Antikörper und Substrat). Seren können bei einer einfachen Verdünnung von 1:5 getestet (Test einer Serum-Einfachverdünnung) oder, um Verdünnungsendpunkte zu erhalten, titriert werden (Test von Serumtitrationen). Hemmwerte von über 50 % gelten als positiv.

Das im Folgenden beschriebene Testprotokoll wird vom Regionalen Referenzlabor für Afrikanische Pferdepest in Pirbright, Vereinigtes Königreich, angewandt.

1.1. Testverfahren

1.1.1. Vorbereitung der Platten

1.1.1.1. ELISA-Platten mit Antigen, aus infizierten Zellkulturen extrahiert und in Karbonat-Bikarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,6 verdünnt, beschichten und über Nacht bei 4 °C inkubieren.

1.1.1.2. Vertiefungen leeren und Platten dreimal mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,2-7,4 abspülen und auf Saugpapier abklopfen.

1.1.2. Kontrollvertiefungen

1.1.2.1. Positive Kontrollseren in zweifachen Verdünnungsreihen, von 1:5 bis 1:640 über Reihe 1 verteilt in Blocking-Puffer (PBS mit einem Gehalt an 0,5 % (v/v) Tween 20, 5 % (w/v) Magermilchpulver (Cadbury's Marvel™) und 1 % (v/v) Serum ausgewachsener Rinder) titrieren, bis ein Endvolumen von 50 µl/Vertiefung erreicht ist.

1.1.2.2. 50 µl des negativen Kontrollserums, 1:5 verdünnt (10 µl Serum + 40 µl Blocking-Puffer), in Vertiefungen A und B der Reihe 2 geben.

1.1.2.3. 100 µl/Vertiefung Blocking-Puffer in Vertiefungen C und D der Reihe 2 geben (BLANK).

1.1.2.4. 150 µl Blocking-Puffer in Vertiefungen E, F, G und H der Reihe 2 geben (Meerschweinchen-Kontrolle).

1.1.3. Test einer Serum-Einfachverdünnung

1.1.3.1. Jedes Testserum, im Verhältnis 1:5 in Blocking-Puffer verdünnt, in Doppelvertiefungen der Reihen 3 bis 12 geben (10 µl Seren + 40 µl Blocking-Puffer).

oder

1.1.4. Test von Serumtitrationen

1.1.4.1. Eine zweifache Verdünnungsreihe von jeder Testprobe (1:5 bis 1:640) in Blocking-Puffer anlegen, über acht Vertiefungen einzelner Reihen (3 bis 12) verteilt.

anschließend

1.1.5. 50 µl Meerschweinchen-Antiserum, in Blocking-Puffer vorverdünnt, in alle Vertiefungen geben, ausgenommen die BLANK-Vertiefungen der ELISA-Platte (alle Vertiefungen haben jetzt ein Endvolumen von 100 µl).

1.1.5.1. Bei 37 °C für eine Stunde auf einem Orbitalschüttler inkubieren.

1.1.5.2. Platten dreimal waschen und wie vorstehend vorgegeben abklopfen.

- 1.1.5.3. 50 µl Kaninchen-Anti-Meerschweinchen-Meerrettichperoxidase-Konjugat, in Blocking-Puffer vorverdünnt, in jede Vertiefung geben.
- 1.1.5.4. Bei 37 °C für eine Stunde im Orbitalschüttler inkubieren.
- 1.1.5.5. Platten dreimal waschen und wie vorstehend vorgegeben abklopfen.

1.1.6. *Substrat — Chromogen*

Die Chromogen OPD-Lösung (OPD = Orthophenyldiamin) unmittelbar vor der Verwendung nach Herstellerspezifikationen (0,4 mg/ml in sterilem destilliertem Wasser) anlegen. Substrat (Wasserstoffperoxid = H₂O₂) zugeben, bis eine Endkonzentration von 0,05 % (v/v) (1:2 000 bei einer 30%igen H₂O₂-Lösung) erreicht ist. 50 µl der OPD-Lösung in jede Vertiefung geben, und die Platten auf dem Arbeitstisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Reaktion durch Zugabe von 50 µl/Vertiefung 1M Schwefelsäure (H₂SO₄) stoppen.

1.1.7. *Ablesen*

Ergebnis spektrophotometrisch bei 492 nm ablesen.

1.2. **Ergebnisauswertung**

1.2.1. Mittels geeigneter Software die OD-Werte (OD = optische Dichte) und, ausgehend von dem für die vier Meerschweinchenserum-Kontrollvertiefungen verzeichneten Durchschnittswert, den Hemmungsprozentsatz (percentage inhibition — PI) für Test- und Kontrollseren, ausdrucken. Anhand der als OD- und PI-Werte ausgedrückten Daten lässt sich bestimmen, ob der Test innerhalb akzeptabler Grenzen durchgeführt wurde. Die oberen Kontrollgrenzen (upper control limits — UCL) und die unteren Kontrollgrenzen (lower control limits — LCL) für die Meerschweinchenserum-Kontrolle liegen zwischen den OD-Werten 1,4 bzw. 0,4. Der auf einem Hemmungsprozentsatz (PI) von 50 % basierende Endpunkttiter für die Positivkontrolle sollte (innerhalb eines Bereichs von 1:120 bis 1:480) 1:240 betragen. Testplatten, die die genannten Kriterien nicht erfüllen, werden verworfen. Ist der Seruntiter der Positivkontrolle jedoch größer als 1 in 480 und sind die Testproben nach wie vor negativ, so können die negativen Testproben akzeptiert werden.

Die doppelt angelegten Vertiefungen der Negativkontrolle und doppelt angelegten Vertiefungen der BLANK-Kontrolle sollten PI-Werte zwischen + 25 % und - 25 % bzw. zwischen + 95 % und + 105 % zeigen. Werte außerhalb dieser Grenzbereiche machen das Plattenergebnis zwar nicht ungültig, lassen jedoch absehen, dass sich eine Hintergrundfärbung ausbildet.

1.2.2. Der diagnostische Schwellenwert (Grenzwert) für Testseren ist 50 % (PI 50 %). Proben mit PI-Werten über 50 % sind positiv, Proben mit PI-Werten unter 50 % sind negativ.

Proben mit PI-Werten unter und über dem Schwellenwert bei doppelt angelegten Vertiefungen gelten als zweifelhaft. Sie können in einer Einfachverdünnung und durch Titrierung neu analysiert werden. Auch Positivproben sollten titriert werden, um einen Anhaltspunkt über den Grad der Positivität zu erhalten.

Schema der Einfachverdünnung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ Kontr.		Testseren									
A	1:5	- Kontr.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	- Kontr.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	BLANK										
D	1:40	BLANK										
E	1:80	MS-Kontr.										
F	1:160	MS-Kontr.										
G	1:320	MS-Kontr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	MS-Kontr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- Kontr. = Negativkontrolle
 + Kontr. = Positivkontrolle
 MS-Kontr. = Meerschweinchenkontrolle

Schema der Serumtitrierung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ Kontr.		Testseren									
A	1:5	- Kontr.	1:5									1:5
B	1:10	- Kontr.	1:10									1:10
C	1:20	BLANK	1:20									1:20
D	1:40	BLANK	1:40									1:40
E	1:80	MS-Kontr.	1:80									1:80
F	1:160	MS-Kontr.	1:160									1:160
G	1:320	MS-Kontr.	1:320									1:320
H	1:640	MS-Kontr.	1:640									1:640

- Kontr. = Negativkontrolle

+ Kontr. = contrôle positif.

MS-Kontr. = Meerschweinchenkontrolle

2. INDIREKTER ELISA ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS VIRUS DER AFRIKANISCHEN PFERDEPEST (APV) (PFLICHTTEST)

Der nachstehend beschriebene Test entspricht den Verfahrensvorschriften gemäß Kapitel 2.1.11 des Handbuchs der OIE mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen, vierte Ausgabe, 2000.

Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit und Spezifität wurde zum Nachweis von APV-Antikörpern das rekombinante VP7 Protein verwendet. Es ist außerdem stabil und nicht infektiös.

2.1. Testverfahren:

2.1.1. Festphase:

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

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

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

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

2.1.2. Testproben:

2.1.2.1. 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.

2.1.2.2. Platten wie unter 2.1.1.2 vorgegeben waschen.

2.1.3. Konjugat:

2.1.3.1. 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.

2.1.3.2. Platten wie unter 2.1.1.2 vorgegeben waschen.

2.1.4. Chromogen/Substrat:

2.1.4.1. 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.

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

2.2. Auswertung der Ergebnisse:

2.2.1. Durch Addition von 0,6 zum Wert der Negativkontrolle den Grenzwert (cut-off value) berechnen. (0,6 entspricht der aus einer Gruppe von 30 negativen Seren abgeleiteten Standardabweichung).

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

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

2.2.4. Testproben mit intermediären Absorptionswerten sind zweifelhaft; zur Bestätigung des Testergebnisses muss der Test wiederholt werden.

3. BLOCKING-ELISA ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS VIRUS DER AFRIKANISCHEN PFERDEPEST (APV) (PFLICHTTEST)

Der Blocking-ELISA ist eine serologische Methode zum Nachweis spezifischer APV-Antikörper in Seren empfänglicher Arten. VP7 ist das wichtigste antigene APV-Protein und ist innerhalb der neun Serotypen konserviert. Da der monoklonale Antikörper (MAK) ebenfalls gegen das VP7 gerichtet ist, gewährleistet der Test ein hohes Niveau an Empfindlichkeit und Spezifität. Außerdem ist das rekombinante VP7-Antigen vollkommen unschädlich und garantiert somit ein hohes Maß an Sicherheit.

Testprinzip ist die Unterbrechung der Reaktion zwischen dem rekombinanten VP7 als an die ELISA-Platte gebundenem Antigen und dem VP7-spezifischen konjugierten monoklonalen Antikörper. Antikörper in den Testseren blockieren die Reaktion zwischen Antigen und MAK. Dieser Vorgang manifestiert sich als Abschwächung der Farbintensität.

Der im Folgenden beschriebene Test wird vom Referenzlabor der Europäischen Gemeinschaft für Afrikanische Pferdepest in Algete, Spanien, angewandt.

3.1. Testverfahren:

3.1.1. ELISA-Platten

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

3.1.1.2. Platten fünfmal mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) mit einem Gehalt an 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST) waschen.

3.1.1.3. Platten mit einer Stabilisierungslösung behandeln (um eine langfristige Lagerung bei + 4 °C ohne Aktivitätsverlust zu ermöglichen), und auf Saugpapier trocknen klopfen.

3.1.2. Testproben und Kontrollen

3.1.2.1. Für Screening-Tests: Testseren und Kontrollen im Verhältnis 1:10 direkt auf der Platte in PBST verdünnen, so dass ein Endvolumen von 100 µl/Vertiefung vorliegt. Für eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

3.1.2.2. Für die Titrierung: Eine Verdünnungsreihe von Testseren und positiven Kontrollen (100 µl/Vertiefung) von 1:10 bis 1:1280 in 2 Verdünnungsschritten anlegen (über acht Vertiefungen verteilt). Die Negativkontrolle in einer Verdünnung von 1:10 testen.

3.1.3. Konjugat

In jede Vertiefung 50 µl der Gebrauchsverdünnung der Meerrettich-Peroxidase-konjugierten monoklonalen Antikörper (mAk reaktiv gegen VP7), geben und vorsichtig mischen, um ein homogenes Ergebnis zu gewährleisten. Für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.

3.1.4. Platten fünfmal mit PBST waschen und auf Saugpapier trocknen.

3.1.5. Chromogen/Substrat

100 µl Chromogen-/Substratlösung [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.

3.1.6. Ablesen

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

3.2. Auswertung der Ergebnisse

3.2.1. Testgültigkeit

Der Test ist gültig, wenn die optische Dichte (OD) der negativen Kontrolle (NK) über 1,0 und die OD der positiven Kontrolle (PK) unter 0,2 liegt.

3.2.2. Grenzwertberechnung

Positiver Grenzwert = $NK - ((NK - PK) \times 0,3)$

Negativer Grenzwert = $NK - ((N - PK) \times 0,2)$,

wobei NK der OD der negativen Kontrolle und PK der OD der positiven Kontrolle entspricht.

3.2.3. Auswertung der Ergebnisse

Proben mit einem OD-Wert unter dem positiven Grenzwert sollten als APV-positiv gewertet werden.

Proben mit einem OD-Wert über dem negativen Grenzwert sollten als APV-negativ gewertet werden.

Proben mit einem OD-Wert zwischen den beiden Grenzwerten gelten als zweifelhaft und nach zwei bis drei Wochen sollte neues Serum der betreffenden Tiere wieder getestet werden.“
