ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΗ ΑΠΟΦΑΣΗ (ΕΕ) 2016/1840 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 14ης Οκτωβρίου 2016

για την τροποποίηση του παραρτήματος IV της οδηγία 2009/156/ΕΚ του Συμβουλίου όσον αφορά τις μεθόδους διάγνωσης της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό C(2016) 6509]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη την οδηγία 2009/156/ΕΚ του Συμβουλίου, της 30ής Νοεμβρίου 2009, σχετικά με τους όρους υγειονομικού ελέγχου που διέπουν τη διακίνηση των ιπποειδών και τις εισαγωγές ιπποειδών προέλευσης τρίτων χωρών ([1]), και ιδίως το άρθρο 20,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Το παράρτημα IV της οδηγίας 2009/156/ΕΚ καθορίζει τις διαγνωστικές μεθόδους για την αφρικανική πανώλη των ιπποειδών που πρέπει να χρησιμοποιούνται, όταν είναι αναγκαίο, για τη δοκιμή ιπποειδών πριν από τη διακίνηση εντός της Ένωσης ή την εισαγωγή τους από τρίτες χώρες.

(2) Έπειτα από την έκδοση της οδηγίας 2009/156/ΕΚ, έχουν αναπτυχθεί εργαστηριακές ικανότητες που επιτρέπουν τη διεξαγωγή εξελιγμένων, εξαιρετικά ευαίσθητων και αποτελεσματικών δοκιμών για τη διάγνωση της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών. Παράλληλα, το κεφάλαιο σχετικά με τη διάγνωση της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών στο εγχειρίδιο διαγνωστικών δοκιμασιών και εμβολίων για χερσαία ζώα του Παγκόσμιου Οργανισμού για την Υγεία των Ζώων (OIE) ([2]) έχει τροποποιηθεί ώστε να αντικατοπτρίζει αυτή την εξέλιξη.

(3) Στο πλαίσιο του προγράμματος εργασίας του για το 2014, το εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την αφρικανική πανώλη των ιπποειδών ([3]) συνέταξε έκθεση για την τεχνική αξιολόγηση των διαγνωστικών μεθόδων που περιγράφονται στο παράρτημα IV της οδηγίας 2009/156/ΕΚ. Η αξιολόγηση, που παρουσιάστηκε στην Επιτροπή τον Μάιο του 2015, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ανταγωνιστική ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (ELISA) δεν είναι πλέον διαθέσιμη, ότι η έμμεση δοκιμή ELISA δεν είναι σε κοινή χρήση αλλά θα μπορούσε να παρασχεθεί σε 4-6 μήνες μετά την υποβολή της αίτησης και ότι η παρεμποδιστική δοκιμή ELISA είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση δειγμάτων κατά τους διεργαστηριακούς ελέγχους ικανοτήτων που οργανώνονται από το εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την αφρικανική πανώλη των ιπποειδών.

(4) Επιπλέον, η έκθεση επισημαίνει ότι η αναγνώριση νουκλεϊκού οξέος με μεθόδους αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με τις ορολογικές διαγνωστικές μεθόδους, επειδή επιτρέπει την ανίχνευση της ασθένειας σε αρχικό στάδιο της μόλυνσης. Επίσης, τα περισσότερα από τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης χρησιμοποιούν μεθόδους RT-PCR πραγματικού χρόνου, μεταξύ άλλων για τη διάγνωση της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι ανταποκρίνονται στις ανάγκες κατά τους ετήσιους διεργαστηριακούς ελέγχους ικανοτήτων που πραγματοποιήθηκαν από το 2009 έως το 2014. Η έκθεση επισημαίνει επίσης ότι εκτός της Ένωσης υπάρχουν ορισμένα εργαστήρια αναφοράς του Παγκόσμιου Οργανισμού για την Υγεία των Ζώων και άλλα εργαστήρια με ειδική εμπειρογνωμοσύνη για την πανώλη των ίππων που έχουν εφαρμόσει τουλάχιστον μία από τις μεθόδους RT-PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του γονιδιώματος της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών.

(5) Στις 24-25 Νοεμβρίου 2015 η κοινή συνάντηση εργασίας των εργαστηρίων αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την αφρικανική πανώλη των ιπποειδών και τον καταρροϊκό πυρετό των προβάτων από κοινού με τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς, που πραγματοποιήθηκε στο Ascot, στο Ηνωμένο Βασίλειο, συνέστησε να συμπεριληφθούν στο παράρτημα IV της οδηγίας 2009/156/ΕΚ μέθοδοι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο (RRT) για την ανίχνευση του ιού της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών.

([1]) ΕΕ L 192 της 23.7.2010, σ. 1.
([2]) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.01_AHS.pdf
([3]) Οδηγία 92/35/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 1992, για τη θέσπιση των κανόνων ελέγχου και των μέτρων καταπολέμησης της πανώλης των ίππων (ΕΕ L 157 της 10.6.1992, σ. 19).

(6) Παρόλο που όλες οι διαθέσιμες μέθοδοι RT-PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του γονιδιώματος της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών είναι επαρκώς ευαίσθητες, η διαδικασία που περιγράφεται από τους Agüero κ.ά. (2008) ([4]) είναι εκείνη που χρησιμοποιείται ευρύτερα από τα εργαστήρια. Η μέθοδος που περιγράφεται από τους Guthrie κ.ά. (2013) ([5]) είναι ειδικά σχεδιασμένη για να εξασφαλίζει ότι οι ίπποι από περιοχές όπου εμφανίζεται κίνδυνος αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών μπορούν να μεταφέρονται με ασφάλεια μετά την απαιτούμενη ελάχιστη περίοδο καραντίνας σύμφωνα με τον κώδικα υγείας χερσαίων ζώων του OIE ([6]).

(7) Επομένως, είναι σκόπιμο να συμπεριληφθούν στο παράρτημα IV της οδηγίας 2009/156/ΕΚ μέθοδοι ταυτοποίησης παραγόντων και ανίχνευσης αντισωμάτων ως συμπληρωματικές μέθοδοι για ταχεία διάγνωση της αφρικανικής πανώλης των ιπποειδών.

(8) Το παράρτημα IV της οδηγίας 2009/156/ΕΚ θα πρέπει συνεπώς να τροποποιηθεί με τη διαγραφή της ανταγωνιστικής δοκιμής ELISA και την επικαιροποίηση των διαδικασιών για την έμμεση δοκιμή ELISA και την παρεμποδιστική δοκιμή ELISA σύμφωνα με το κεφάλαιο 2.5.1 του εγχειριδίου διαγνωστικών δοκιμασιών και εμβολίων για χερσαία ζώα του OIE, έκδοση 2016, με βάση την έκδοση που εγκρίθηκε από τη Παγκόσμια Συνέλευση Αντιπροσώπων του OIE τον Μάιο του 2012 ([7]). Ταυτόχρονα, οι διαδικασίες RT-PCR πραγματικού χρόνου όπως περιγράφονται από τους Agüero κ.ά. (2008) καθώς και από τους Guthrie κ.ά. (2013) θα πρέπει να συμπεριληφθούν σε αυτό το παράρτημα ώστε αυτές οι δοκιμασίες ταυτοποίησης παραγόντων να καταστούν διαθέσιμες για χρήση σε δοκιμές που προηγούνται της μετακίνησης.

(9) Επομένως, η οδηγία 2009/156/ΕΚ θα πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.

(10) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής φυτών, ζώων, τροφίμων και ζωοτροφών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα IV της οδηγίας 2009/156/ΕΚ αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος της παρούσας απόφασης.

Άρθρο 2

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 14 Οκτωβρίου 2016.

Για την Επιτροπή

Vytenis ANDRIUKAITIS

Μέλος της Επιτροπής

([4]) Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. και 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]) Βλέπε υποσημείωση 2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΗ ΠΑΝΩΛΗ ΤΩΝ ΙΠΠΟΕΙΔΩΝ

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΜΕΡΟΣ Α

Ορολογικές δοκιμασίες

Η ορολογική μέθοδος που περιγράφεται κατωτέρω συνίσταται σε ενζυμικές δοκιμασίες ανοσοπροσρόφησης (ELISA) βάσει του σημείου 2 του τμήματος Β του κεφαλαίου 2.5.1 του εγχειριδίου διαγνωστικών δοκιμασιών και εμβολίων για χερσαία ζώα, έκδοση 2016, όπως εγκρίθηκε από τη συνέλευση των αντιπροσώπων του OIE τον Μάιο του 2012.

Η πρωτεΐνη VP7 του ιού είναι ανοσοκυρίαρχο μείζον αντιγόνο του ιού της αφρικανικής πανώλης των ίππων (AHSV), που διατηρείται και στους εννέα ορότυπους του AHSV. Έχει αποδειχθεί ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες AHSV-VP7 είναι σταθερές, αβλαβείς και κατάλληλες για να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα σε διαδικασίες ELISA για τον προσδιορισμό αντισωμάτων κατά του ιού AHSV, με υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας (Laviada κ.ά., 1992b ([1])· Maree και Paweska, 2005). Η έμμεση ELISA και η παρεμποδιστική ELISA είναι δύο δοκιμασίες ELISA AHS-VP7 κατάλληλες για την ορολογική διάγνωση της AHS.

1. **Έμμεση μέθοδος ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού AHSV**

Το σύζευγμα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο αυτή είναι υπεροξειδάση του αγριοράπανου με γ-σφαιρίνη εναντίον πρωτεϊνών αλόγου που αντιδρά με τον ορό αλόγου, ημίονου και όνου. Η μέθοδος που περιγράφεται από τους Maree & Paweska (2005) ([2]) χρησιμοποιεί πρωτεΐνη G ως σύζευγμα που αντιδρά επίσης με ορό ζέβρας.

Το αντιγόνο μπορεί να παρασχεθεί από το ισπανικό Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), μέσα σε 4 έως 6 μήνες από την υποβολή του αιτήματος.

1.1. *Διαδικασία δοκιμασίας*

1.1.1. Στερεά φάση

1.1.1.1. Επιστρώνονται πλάκες ELISA με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη VP7 από AHSV-4, αραιωμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού/διττανθρακικού με pH 9,6. Οι πλάκες επωάζονται επί μία νύκτα σε θερμοκρασία 4 °C.

1.1.1.2. Οι πλάκες εκπλένονται πέντε φορές με απεσταγμένο νερό που περιέχει Tween 20 σε αναλογία 0,01 % (κ.ό.) (διάλυμα έκπλυσης). Οι πλάκες κτυπώνται ελαφρά σε απορροφητικό υλικό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα έκπλυσης.

1.1.1.3. Οι πλάκες παρεμποδίζονται (μπλοκάρονται) με την προσθήκη, σε κάθε κοιλότητα, 200 μl αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) με pH 7,2 + αποκορυφωμένο γάλα (Nestlé Dry Skim Milk™), σε αναλογία 5 %, επί μία ώρα σε θερμοκρασία 37 °C.

1.1.1.4. Απομακρύνεται το παρεμποδιστικό διάλυμα και οι πλάκες κτυπώνται ελαφρά σε απορροφητικό υλικό.

1.1.2. Δείγματα δοκιμασίας

1.1.2.1. Τα δείγματα ορού που πρόκειται να υποβληθούν σε δοκιμασία, καθώς και οι οροί θετικού ή αρνητικού μάρτυρα, αραιώνονται σε 1 προς 25 με PBS + αποκορυφωμένο γάλα σε αναλογία 5 % (κ.β.) + Tween 20 σε αναλογία 0,05 % (κ.ό.), και κατόπιν προστίθενται σε κάθε κοιλότητα 100 μl. Ακολουθεί επώαση επί μία ώρα σε θερμοκρασία 37 °C.

Για την τιτλοδότηση, δημιουργείται σειρά αραιώσεων 1:1, αρχίζοντας από 1 προς 25 (100 μl/κοιλότητα), με έναν ορό ανά στήλη πλάκας, και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες. Ακολουθεί επώαση επί μία ώρα σε θερμοκρασία 37 °C.

([1]) Laviada M.D., Roy P. και Sanchez-Vizcaino J.M (1992b). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. Στο: 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. και 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. Οι πλάκες εκπλένονται πέντε φορές με απεσταγμένο νερό που περιέχει Tween 20 (διάλυμα έκπλυσης) σε αναλογία 0,01 % (κ.ό.). Οι πλάκες κτυπώνται ελαφρά σε απορροφητικό υλικό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα έκπλυσης.

1.1.3. Σύζευγμα

1.1.3.1. Διανέμονται 100 μl/κοιλότητα γ-σφαιρίνης εναντίον πρωτεϊνών αλόγου συζευγμένης με υπεροξειδάση του αγριοράπανου (HRP), αφού αραιωθούν με PBS + γάλα 5 % + Tween 20 σε αναλογία 0,05 %, με pH 7,2. Ακολουθεί επώαση επί μία ώρα σε θερμοκρασία 37 °C.

1.1.3.2. Οι πλάκες εκπλένονται πέντε φορές με απεσταγμένο νερό που περιέχει Tween 20 (διάλυμα έκπλυσης) σε αναλογία 0,01 % (κ.ό). Οι πλάκες κτυπώνται ελαφρά σε απορροφητικό υλικό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα έκπλυσης.

1.1.4. Χρωμογόνο/υπόστρωμα

1.1.4.1. Προστίθενται 200 μl/κοιλότητα διαλύματος χρωμογόνου/υποστρώματος [10 ml διαλύματος DMAB (διμεθυλαμινοβενζαλδεΰδη) 80,6 mM + 10 ml διαλύματος MBTH (υδροχλωρική 3-μεθυλο-2-βενζοθειαζολινοϋδραζόνη) 1,56 mM + 5 μl H_2O_2].

Ύστερα από 5-10 λεπτά περίπου (πριν αρχίσει να χρωματίζεται ο αρνητικός μάρτυρας), η εμφάνιση χρώματος διακόπτεται με την προσθήκη 50 μl 3N H_2SO_4.

Επίσης, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλα χρωμογόνα, όπως ABTS (2,2′-αζινο-δις[3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ]), TMB (τετραμεθυλοβενζιδίνη) ή OPD (ορθο-φαινυλοδιαμίνη).

1.1.4.2. Ανάγνωση των αποτελεσμάτων σε μήκος κύματος 600 nm (ή 620 nm).

1.2. *Ερμηνεία των αποτελεσμάτων*

1.2.1. Υπολογίζεται η τιμή αποκοπής, προσθέτοντας τον αριθμό 0,06 στην τιμή που αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα (0,06 είναι η τυπική απόκλιση που προκύπτει από ομάδα 30 αρνητικών ορών).

1.2.2. Τα δείγματα της δοκιμασίας που δίνουν τιμές απορρόφησης χαμηλότερες από την τιμή αποκοπής θεωρούνται αρνητικά.

1.2.3. Τα δείγματα της δοκιμασίας που δίνουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από την τιμή αποκοπής + 0,15 θεωρούνται θετικά.

1.2.4. Από τα δείγματα της δοκιμασίας που δίνουν ενδιάμεσες τιμές απορρόφησης θεωρείται ότι δεν συνάγονται ασφαλή συμπεράσματα και πρέπει να χρησιμοποιείται δεύτερη μέθοδος για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

2. **Παρεμποδιστική μέθοδος ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού AHSV**

Η ανταγωνιστική παρεμποδιστική δοκιμή ELISA έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά του AHSV σε ορούς όλων των ιπποειδών, δηλαδή άλογα, όνοι, ζέβρες και απόγονοι διασταυρώσεών τους, ώστε να αποφεύγεται το πρόβλημα της ειδικότητας που αντιμετωπίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις κατά τη χρήση της έμμεσης ELISA.

Η αρχή αυτής της δοκιμασίας συνίσταται στην παρεμπόδιση της αντίδρασης μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης VP7 που απορροφάται από την πλάκα ELISA, και ενός ειδικού συζευγμένου μονοκλωνικού αντισώματος (Mab). Το αντίσωμα που περιέχει ο ορός δοκιμής θα παρεμποδίσει την αντίδραση αντιγόνου-Mab, προκαλώντας εξασθένηση του χρώματος. Δεδομένου ότι το Mab στρέφεται εναντίον της VP7, η δοκιμασία χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας.

Η ανταγωνιστική παρεμποδιστική ELISA είναι διαθέσιμη στο εμπόριο.

2.1. *Διαδικασία δοκιμασίας*

2.1.1. Στερεά φάση

2.1.1.1. Επιστρώνονται πλάκες ELISA με 50-100 ng ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης VP7 από AHSV-4, αραιωμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού/διττανθρακικού, με pH 9,6. Επωάζονται επί μία νύκτα σε θερμοκρασία 4 °C.

2.1.1.2. Οι πλάκες εκπλένονται τρεις φορές με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,1 × που περιέχει 0,135 M NaCl και Tween 20 σε αναλογία 0,05 % (κ.ό.) (PBST). Οι πλάκες κτυπώνται ελαφρά σε απορροφητικό υλικό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα έκπλυσης.

2.1.2. Δείγματα δοκιμασίας και μάρτυρες

2.1.2.1. Τα δείγματα ορού που θα υποβληθούν σε δοκιμασία, καθώς και οι θετικοί και αρνητικοί οροί μάρτυρα, αραιώνονται σε αναλογία 1 προς 5 με διάλυμα αραίωσης που περιέχει 0,35 M NaCl, Tween 20 σε αναλογία 0,05 % (κ.ό.) και 0,1 % Kathon, και κατόπιν προστίθενται 100 μl σε κάθε κοιλότητα. Ακολουθεί επώαση επί μία ώρα σε θερμοκρασία 37 °C.

Για την τιτλοδότηση, δημιουργείται σειρά αραιώσεων 1:1 των δοκιμαστικών ορών, αρχίζοντας από 1 προς 10 έως 1 προς 280, σε 8 κοιλότητες (100 μl/κοιλότητα), έναν ορό ανά στήλη πλάκας, και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες. Ακολουθεί επώαση επί μία ώρα σε θερμοκρασία 37 °C.

2.1.2.2. Οι πλάκες εκπλένονται πέντε φορές με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,1 × που περιέχει 0,135 M NaCl και Tween 20 σε αναλογία 0,05 % (κ.ό.) (PBST). Οι πλάκες κτυπώνται ελαφρά σε απορροφητικό υλικό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα έκπλυσης.

2.1.3. Σύζευγμα

2.1.3.1. Διανέμονται 100 μl/κοιλότητα Mab εναντίον της πρωτεΐνης VP7 συζευγμένου με υπεροξειδάση αγριοράπανου. Εκ των προτέρων, το Mab έχει αραιωθεί σε αναλογία 1/5 000 – 1/15 000 σε διάλυμα 1/1 σταθεροποιητή StabiliZyme Select® (SurModics, αριθ. αναφοράς: SZ03) σε απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C.

2.1.3.2. Οι πλάκες εκπλένονται πέντε φορές με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,1 × που περιέχει 0,135 M NaCl και Tween 20 σε αναλογία 0,05 % (κ.ό.) (PBST). Οι πλάκες κτυπώνται ελαφρά σε απορροφητικό υλικό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα έκπλυσης.

2.1.4. Χρωμογόνο/υπόστρωμα

Προστίθενται 100 μl/κοιλότητα διαλύματος χρωμογόνου/υποστρώματος, δηλαδή 1 ml διαλύματος ABTS (2,2′-αζινο-δισ[3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ]) συγκέντρωσης 5 mg/ml + 9 ml ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών 0,1M με pH 4 που περιέχει H_2O_2 σε αναλογία 0,03 %)] και ακολουθεί επώαση επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η εμφάνιση χρώματος διακόπτεται με την προσθήκη, σε κάθε κοιλότητα, 100 μl SDS (δωδεκυλοθειικού νατρίου) συγκέντρωσης 2 % (κ.β.).

2.1.5. Ανάγνωση

Ανάγνωση σε μήκος κύματος 405 nm με συσκευή ανάγνωσης ELISA.

2.2. *Ερμηνεία των αποτελεσμάτων*

2.2.1. Προσδιορίζεται το ποσοστό παρεμπόδισης (BP) κάθε δείγματος βάσει του ακόλουθου τύπου, όπου «Abs» συμβολίζει τα αντισώματα:

$$\mathrm{BP} = \frac{\mathrm{Abs}(\text{αρνητικός μάρτυρας}) - \mathrm{Abs}(\text{δείγμα})}{\mathrm{Abs}(\text{αρνητικός μάρτυρας}) - \mathrm{Abs}(\text{θετικός μάρτυρας})} \times 100$$

2.2.2. Τα δείγματα που εμφανίζουν τιμή BP που υπερβαίνει το 50 % θα πρέπει να θεωρούνται θετικά ως προς τα αντισώματα κατά του AHSV.

2.2.3. Τα δείγματα που εμφανίζουν τιμή BP κάτω από το 45 % θα πρέπει να θεωρούνται αρνητικά ως προς τα αντισώματα κατά του AHSV.

2.2.4. Τα δείγματα που εμφανίζουν τιμή BP μεταξύ 45 % και 50 % θα πρέπει να θεωρείται ότι δεν μπορούν να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα και πρέπει να υποβάλλονται εκ νέου σε δοκιμασία. Αν βάσει του αποτελέσματος πάλι δεν συνάγονται ασφαλή συμπεράσματα, τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται εκ νέου σε δοκιμασία με δειγματοληψία που πραγματοποιείται τουλάχιστον δύο εβδομάδες μετά τη δειγματοληψία που θεωρήθηκε ότι δεν οδήγησε σε ασφαλή συμπεράσματα.

ΜΕΡΟΣ Β

Ταυτοποίηση του παράγοντα

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή σε πραγματικό χρόνο (rRT-PCR)

Οι δοκιμασίες ταυτοποίησης παράγοντα με βάση μεθόδους νουκλεϊκού οξέος πρέπει να ανιχνεύουν στελέχη αναφοράς από τους εννέα ορότυπους του ιού AHSV.

Η μέθοδος που περιγράφεται στο σημείο 2.1 βασίζεται στο σημείο 1.2 του τμήματος Β του κεφαλαίου 2.5.1 του εγχειριδίου διαγνωστικών δοκιμασιών και εμβολίων για χερσαία ζώα, έκδοση 2016, όπως εγκρίθηκε από τη συνέλευση των αντιπροσώπων του OIE τον Μάιο του 2012.

Κάθε μέθοδος ανίχνευσης RT-PCR που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή των δειγμάτων, είτε αίματος είτε σπλήνα, στο πλαίσιο της οδηγίας 2009/156/ΕΚ, πρέπει να επιτυγχάνει ίση ή μεγαλύτερη ευαισθησία από τις μεθόδους που περιγράφονται στο σημείο 2.

Αδρανοποιημένοι ιοί των οροτύπων 1 έως 9 των στελεχών αναφοράς μπορούν να ληφθούν από το εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης ή από το εργαστήριο αναφοράς του OIE για την αφρικανική πανώλη των ιπποειδών, στην Algete της Ισπανίας.

1. **Εξαγωγή ιικού RNA**

Για να διασφαλιστεί η ορθή αντίδραση πρέπει να εξαχθεί υψηλής ποιότητας RNA του AHSV από το δείγμα. Η εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων από κλινικά δείγματα μπορεί να διεξαχθεί με διάφορες εσωτερικές μεθόδους και μεθόδους διαθέσιμες στο εμπόριο.

Τα κιτ που κυκλοφορούν στο εμπόριο χρησιμοποιούν διαφορετικές προσεγγίσεις για την απομόνωση του RNA. Οι περισσότερες βασίζονται σε μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

— εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη-χλωροφόρμιο·

— προσρόφηση νουκλεϊκών οξέων σε σύστημα διήθησης·

— προσρόφηση νουκλεϊκών οξέων σε σύστημα μαγνητικών σφαιριδίων.

Ένα παράδειγμα εσωτερικής μεθόδου εξαγωγής RNA παρατίθεται κατωτέρω:

1.1. 1 g δείγματος ιστού ομογενοποιείται σε 1 ml διαλύματος μετουσίωσης (θειοκυανικό άλας γουανιδίου 4 M, κιτρικό νάτριο 25 mM, 2-μερκαπτοαιθανόλη 0,1 M, λαουροϋλοσαρκοσινικό νάτριο 0,5 %).

1.2. Μετά από φυγοκέντρηση, 1 μg RNA ζυμομύκητα, 0,1 ml διαλύματος οξικού νατρίου 2 M με pH 4, 1 ml φαινόλης και 0,2 ml μείγματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (σε αναλογία 49/1) προστίθενται στο υπερκείμενο υγρό.

1.3. Το υπερκείμενο υγρό ανακινείται ζωηρά και ψύχεται με πάγο για 15 λεπτά.

1.4. Μετά από φυγοκέντρηση, το RNA που βρίσκεται στην υδατική φάση εκχυλίζεται με φαινόλη, κατακρημνίζεται με αιθανόλη και επανεναιωρείται σε αποστειρωμένο νερό.

2. **Διαδικασία RT-PCR σε πραγματικό χρόνο**

2.1. *Ειδική ανά ομάδα RT-PCR σε πραγματικό χρόνο, από Agüero κ.ά., 2008* ([1])

Αυτή η ειδική ανά ομάδα RT-PCR σε πραγματικό χρόνο στοχεύει την πρωτεΐνη VP7 του AHSV και μπορεί να ανιχνεύσει όλους τους γνωστούς ορότυπους και τα στελέχη του AHSV που κυκλοφορούν σήμερα. Έχει χρησιμοποιηθεί με πολύ καλά αποτελέσματα από τα συμμετέχοντα εργαστήρια αναφοράς των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε ετήσια βάση στους ετήσιους διεργαστηριακούς ελέγχους ικανότητας που οργανώθηκαν από το εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την περίοδο 2009-2015. Επιπλέον, σε διεθνή διεργαστηριακό έλεγχο που διοργανώθηκε το 2015 στο πλαίσιο του δικτύου εργαστηρίων αναφοράς του OIE, το πρωτόκολλο αυτό κατατάχθηκε σε πολύ υψηλή θέση, μεταξύ άλλων.

Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή για την ανίχνευση ειδών ιών AHSV:

— πρόσθιος εκκινητής 5′-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3′

— αντίστροφος εκκινητής 5′-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3′

— ανιχνευτής MGB-TaqMan 5′-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3′

2.1.1. Η συγκέντρωση αποθέματος εκκινητών αραιώνεται μέχρι μια συγκέντρωση εργασίας στα 8 μM («απόθεμα εργασίας εκκινητή στα 8 μM») ενώ ο ανιχνευτής αραιώνεται μέχρι μια συγκέντρωση εργασίας στα 50 μM («απόθεμα εργασίας ανιχνευτή στα 50 μM»). Μια διάταξη πλάκας δοκιμής θα πρέπει να σχεδιαστεί και να φορτωθεί στο λογισμικό του μηχανήματος PCR σε πραγματικό χρόνο. Με τη χρήση της διάταξης ως οδηγού, 2,5 μl από κάθε απόθεμα εργασίας εκκινητή στα 8 μM προστίθενται σε κάθε κοιλότητα που πρόκειται να περιέχει δείγματα RNA, θετικού και/ή αρνητικού μάρτυρα (η τελική συγκέντρωση του εκκινητή θα είναι 1 μM στα 20 μl μείγματος RT-PCR). Η πλάκα φυλάσσεται σε πάγο.

([1]) Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. και 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.

2.1.2. 2 μl απομονωμένου RNA (δείγματα δοκιμής και θετικός μάρτυρας), ή 2 μl νερού απαλλαγμένου από ριβονουκλεάση σε μάρτυρες αρνητικής αντίδρασης, αναμειγνύονται με πρόσθιους και αντίστροφους εκκινητές. Αυτό το μείγμα μετουσιώνεται με θέρμανση στους 95 °C επί 5 λεπτά και κατόπιν ψύχεται ταχέως σε πάγο για 5 λεπτά τουλάχιστον.

2.1.3. Παρασκευάζεται όγκος διαλύματος Master Mix για RT-PCR ενός βήματος σε πραγματικό χρόνο, κατάλληλος για τον αριθμό δειγμάτων προς δοκιμή, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Προστίθενται 0,1μl αποθέματος εργασίας του ανιχνευτή στα 50 μM σε κάθε κοιλότητα που περιέχει δείγματα RNA (η τελική συγκέντρωση του ανιχνευτή πρόκειται να είναι 0,25 μM σε κάθε κοιλότητα που περιέχει δείγματα RNA). 13 μl διαλύματος Master Mix για RT-PCR ενός βήματος κατανέμονται σε κάθε κοιλότητα στην πλάκα PCR που περιέχει τους μετουσιωμένους εκκινητές και το RNA.

2.1.4. Η πλάκα τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου που έχει προγραμματιστεί για αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση συμπληρωματικού DNA/ανίχνευση φθορισμού. Οι συνθήκες ενίσχυσης συνίσταται σε ένα πρώτο βήμα αντίστροφης μεταγραφής στους 48 °C επί 25 λεπτά, που ακολουθείται από 10 λεπτά στους 95 °C («hot start») και 40 κύκλους 15 δευτερολέπτων στους 95 °C, 35 δευτερολέπτων στους 55 °C και 30 δευτερολέπτων στους 72 °C (ή 40 κύκλους στους 97 °C επί 2 δευτερόλεπτα και στους 55 °C επί 30 δευτερόλεπτα εάν χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια και θερμικός κυκλοποιητής που επιτρέπουν ταχείες αντιδράσεις). Τα δεδομένα για τον φθορισμό συλλέγονται στο τέλος του βήματος των 55 °C.

2.1.5. Εάν προκύπτουν άτυπες καμπύλες ενίσχυσης, η δοκιμή δεν θεωρείται έγκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

Τα δείγματα θεωρούνται θετικά εάν η τιμή Ct (αριθμός κύκλου στον οποίον ο φθορισμός που παράγεται από μια αντίδραση υπερβαίνει το όριο φθορισμού) είναι μικρότερη ή ίση με το καθορισμένο όριο Ct (35) εντός 40 κύκλων PCR (Ct ≤ 35).

Τα δείγματα θεωρείται ότι δεν οδηγούν σε ασφαλή συμπεράσματα εάν η τιμή Ct είναι υψηλότερη από το καθορισμένο όριο Ct (35) εντός 40 κύκλων PCR (Ct ≥ 35).

Τα δείγματα θεωρούνται αρνητικά εάν προκύπτει οριζόντια καμπύλη ενίσχυσης η οποία δεν τέμνει τη γραμμή ορίου εντός 40 κύκλων PCR.

2.2. *Ειδική ανά ομάδα RT-PCR σε πραγματικό χρόνο, από Guthrie κ.ά., 2013* ([1])

RT-PCR σε πραγματικό χρόνο που χρησιμοποιεί μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET) για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων του AHSV.

Η δοκιμασία RT-PCR AHSV που περιγράφεται σχεδιάστηκε με τη χρήση αλληλουχιών από μεγάλη ποικιλία στελεχών του AHSV που κυκλοφορούν σήμερα (Quan κ.ά., 2010 ([2])). Επίσης, ενσωματώνει κατοχυρωμένη συνθετική εξωτερική δοκιμή μάρτυρα για την επαλήθευση της ορθής λειτουργίας των στοιχείων της δοκιμασίας.

Τα κιτ για την PCR ενός βήματος σε πραγματικό χρόνο είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Παρατίθενται παρακάτω ορισμένα βασικά βήματα όπως περιγράφονται από τους Guthrie κ.ά. (2013), τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν ανάλογα με τις τοπικές/ειδικές απαιτήσεις, τα κιτ που χρησιμοποιούνται και τον διαθέσιμο εξοπλισμό.

Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή για την ανίχνευση ειδών ιών AHSV:

— πρόσθιος εκκινητής 5′-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3′

— αντίστροφος εκκινητής 5′-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3′

— ανιχνευτής MGB-TaqMan 5′-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3′

2.2.1. Το μείγμα διαλυμάτων παρακαταθήκης εκκινητή και ανιχνευτή παρασκευάζεται με συγκέντρωση 25 × σε 5 μM για τον πρόσθιο και τον αντίστροφο εκκινητή και 3 μM για τον ανιχνευτή. Μια διάταξη πλάκας δοκιμής θα πρέπει να σχεδιαστεί και να φορτωθεί στο λογισμικό του μηχανήματος PCR σε πραγματικό χρόνο. Χρησιμοποιώντας τη διάταξη ως οδηγό, 5 μl δειγμάτων RNA, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων δοκιμασίας και των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, προστίθενται στις κατάλληλες κοιλότητες της πλάκας σύμφωνα με τη διάταξη.

2.2.2. Το RNA μετουσιώνεται με θέρμανση στους 95 °C επί 5 λεπτά, και κατόπιν ταχεία ψύξη σε πάγο επί 3 λεπτά τουλάχιστον.

([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. Methods, 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. Παρασκευάζεται όγκος διαλύματος Master Mix RT-PCR ενός βήματος σε πραγματικό χρόνο, κατάλληλος για τον αριθμό δειγμάτων που πρέπει να υποβληθούν σε δοκιμασία, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 1 μl μείγμα διαλυμάτων παρακαταθήκης εκκινητών και ανιχνευτή 25 × (από το ανωτέρω σημείο 2.2.1) προστίθενται στο Master Mix ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση σε κάθε κοιλότητα 200 nM για κάθε εκκινητή και 120 nM για τον ανιχνευτή. Τα 20 μl του Master Mix κατανέμονται σε κάθε κοιλότητα στην πλάκα PCR που περιέχει μετουσιωμένο RNA.

2.2.4. Η πλάκα τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου που έχει προγραμματιστεί για αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση συμπληρωματικού DNA/ανίχνευση φθορισμού όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή. Οι συνθήκες ενίσχυσης συνίστανται σε ένα πρώτο στάδιο αντίστροφης μεταγραφής στους 48 °C επί 10 λεπτά, που ακολουθείται από 10 λεπτά στους 95 °C και 40 κύκλους 15 δευτερολέπτων στους 95 °C και 45 δευτερολέπτων στους 60 °C.

2.2.5. Τα δείγματα θεωρούνται θετικά εάν ο κανονικοποιημένος φθορισμός για τη δοκιμασία RT-PCR AHSV υπερβαίνει το όριο του 0,1 εντός 36 κύκλων PCR σε όλες τις επαναλήψεις ενός δείγματος.

Τα δείγματα θεωρείται ότι δεν οδηγούν σε ασφαλή συμπεράσματα εάν ο κανονικοποιημένος φθορισμός για τη δοκιμασία RT-PCR AHSV υπερβαίνει το όριο του 0,1 μεταξύ 36 και 40 κύκλων PCR σε οποιαδήποτε επανάληψη του δείγματος.

Τα δείγματα θεωρούνται αρνητικά εάν ο κανονικοποιημένος φθορισμός για τη δοκιμασία RT-PCR AHSV δεν υπερέβη το όριο του 0,1 εντός 40 κύκλων PCR σε όλες τις επαναλήψεις ενός δείγματος και εάν ο κανονικοποιημένος φθορισμός για την κατοχυρωμένη δοκιμή συνθετικού εξωτερικού μάρτυρα υπερέβη το όριο του 0,1 εντός 33 κύκλων PCR.»