

32002D0160

23.2.2002

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

L 53/37

KOMISJONI OTSUS,**21. veebruar 2002,****millega muudetakse nõukogu direktiivi 90/426/EMÜ D lisa hobuste aafrika katku diagnostiliste testide kohta***(teatavaks tehtud numbri K(2002) 556 all)***(EMPs kohaldatav tekst)**

(2002/160/EÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 26. juuni 1990. aasta direktiivi 90/426/EMÜ (hobuslaste liikumist ja kolmandatest riikidest importimist reguleerivate loomatervishoiu nõuete kohta, ⁽¹⁾ viimati muudetud komisjoni direktiiviga 2001/298/EÜ), ⁽²⁾ eriti selle artiklit 23,

ning arvestades järgmist:

- (1) Direktiivi 90/426/EMÜ D lisa kirjeldab komplemendi sidumise testi, mida tehakse hobuste aafrika katku diagnoosimiseks.
- (2) Novembris 2000 korraldas ühenduse referentlabor Hispaanias Algetes EL liikmesriikide hobuste aafrika katku riigi tugilaborite aastakoosoleku. Koosolekul esitati teaduslikud tõendid selle kohta, et direktiivi 90/426/EMÜ D lisa kirjeldatud komplemendi sidumise testil on tõsised puudused, eelkõige kuna ta sobib ainult antikehade avastamiseks lühikese aja jooksul pärast nakkust või vaksineerimist. Lisaks sellele on test praktikas juba asendatud nüüdisaegse ELISA testidega peaaegu kõikides ühenduse laborites ja samuti suuremates ekspordiriikides.
- (3) Rahvusvaheliselt aktsepteeritud laboriteste antikehade avastamiseks hobuste aafrika katku viiruse vastu kirjeldatakse Office International des Epizooties (OIE) diagnostiliste testide ja vaktsiinide standardite käsiraamatus

(Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines) ⁽³⁾; viimases väljaandes mainitakse siiski ainult ühte kasutatavat ELISA testi.

- (4) Seetõttu on vaja muuta direktiivi 90/426/EMÜ D lisa, et võtta arvesse tehnilist arengut ja rahvusvaheliselt heakskiidetud norme.
- (5) Käesoleva otsusega ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise veterinaarkomitee seisukohaga,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA OTSUSE:

Artikkel 1

Direktiivi 90/426/EMÜ D lisa asendatakse käesoleva otsuse lisaga.

Artikkel 2

Käesolev otsus on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 21. veebruar 2002

Komisjoni nimel
komisjoni liige
David BYRNE

⁽¹⁾ EÜT L 224, 18.8.1990, lk 42.

⁽²⁾ EÜT L 102, 12.4.2001, lk 63.

⁽³⁾ 2. peatükk, 1. jagu, 11. punkt, neljas väljaanne 2000.

LISA

"D LISA

HOBUSTE AAFRIKA KATK

DIAGNOSTIKA

Reaktiive allpool kirjeldatud ensüümse immuunosorbenttesti (ELISA) jaoks võib saada Euroopa Ühenduse hobuste aafrika katku referentlaborist või OIE hobuste aafrika katku referentlaboritest.

1. KONKURENTSIVÕIMELINE ELISA TEST ANTIKEHADE AVASTAMISEKS HOBUSTE AAFRIKA KATKU VIIRUSE (HAKV) VASTU (ETTENÄHTUD TEST)

Konkurentsi põhimõttel töötavat ELISA testi kasutatakse spetsiifiliste HAKV antikehade avastamiseks hobuslaste kõikide liikide seerumites. Laia spektriga, polüklooraalne, immuunne anti-HAKV meriseaseerum (edaspidi "merisea antiseerum") on spetsiifiline serogrupile ja võimeline avastama kõiki tuntud HAK viiruse serotüüpe.

Testi põhimõtteks on reaktsiooni katkestamine HAKV antigeeni ja merisea antiseerumi vahel uuritava seerumi prooviga. HAKV antikehad uuritava seerumi proovis hakkavad konkureerima merisea antiseerumis olevate antikehadega, mis põhjustab värvaine vähenemise (pärast ensüümiga märgistatud antimerisea antikeha ja substraadi lisamist). Seerumit võib testida ühekordselt lahjendatud lahuses 1:5 (tilktestmeetod) või tiitrimise teel (seerumi tiitrimise meetod), et saada lahuse lõpptiitrid. 50 % ületavaid inhibitsiooniväärtusi võib pidada positiivseks.

Allpool kirjeldatud katseprotokolli kasutatakse Ühendkuningriigis asuva Pirbrighti hobuste aafrika katku piirkondlikus referentlaboris.

1.1 Katse käik

1.1.1 *Plaatide ettevalmistamine*

1.1.1.1 ELISA plaadid kaetakse HAKV antigeenidega, mis on ekstraheeritud nakatunud rakukultuuridest ja lahjendatud karbonaadi/vesinikkarbonaadi puhverlahuses, pH 9,6. ELISA plaate inkubeeritakse üleöö 4 °C juures.

1.1.1.2 Plaat pestakse kolm korda, uhtudes ja tühjendades auke fosfaadiga puhverdatud soolalahusega (FPK), pH 7,2–7,4, ning kuivatatakse absorbeeriva paberiga.

1.1.2 *Kontrollaugud*

1.1.2.1 Positiivne kontrollseerum tiitritakse kahekordsete lahjenduste reas veerus 1, lahjendusastmelt 1:5 kuni astmeni 1:640, blokeerivas puhverlahuses (FPK, mis sisaldab 0,05 (massi/mahu)protsenti Tween 20, 5,0 (massi/mahu)protsenti lõssipulbrit (Cadbury's Marvel™) ja 1 (massi/mahu)protsenti täiskasvanud veise seerumit), nii et lõplik maht moodustaks 50 µl augu kohta.

1.1.2.2 Lisatakse 50 µl negatiivset kontrollseerumit lahjendusastmel 1:5 (10 µl seerumit + 40 µl blokeerivat puhverlahust) veeru 2 aukudesse A ja B.

1.1.2.3 Lisatakse blokeerivat puhverlahust 100 µl augu kohta veeru 2 aukudesse C ja D (tühikatsed).

1.1.2.4 Lisatakse 50 µl blokeerivat puhverlahust veeru 2 aukudesse E, F, G ja H (meriseakontroll).

1.1.3 *Tilktestmeetod*

1.1.3.1 Blokeerivasse puhverlahusesse lisatakse iga uuritava seerumi lahust lahjendusastmel 1:5, selleks et dubleerida auke veergudes 3–12 (10 µl seerumit + 40 µl blokeerivat puhverlahust).

või

1.1.4 *Seerumi tiitrimise meetod*

1.1.4.1 Blokeerivas puhverlahuses valmistatakse iga uuritava proovi kahekordsete lahjenduste rida, (lahjendusastmelt 1:5 astmeni 1:640), iga veeru (3-12) kaheksas augus.

seejärel

1.1.5 Lisatakse 50 µl eelnevalt blokeerivas puhverlahuses lahjendatud merisea antiseerumit kõikidesse aukudesse, välja arvatud ELISA plaadi tühikatsed aukudesse (kõik augud sisaldavad nüüd 100 µl).

1.1.5.1 Inkubeeritakse orbitaalsegistil 37 °C juures 1 tund.

1.1.5.2 Plaat pestakse kolm korda ja kuivatatakse nagu enne.

1.1.5.3 Igasse auku lisatakse 50 µl eelnevalt blokeerivas puhverlahuses lahjendatud, määrõika peroksidaasiga (MRP) konjugeeritud küüliku-antimerisea seerumit.

1.1.5.4 Inkubeeritakse orbitaalsegisti 37 °C juures 1 tund.

1.1.5.5 Plaatte pestakse kolm korda ja kuivatatakse nagu enne.

1.1.6 Kromogeen

Valmistatakse kromogeeni OFD (OFD = ortofenüüldiamiin) lahus vastavalt tootja juhtnööridele (0,4 mg/ml steriilses destilleeritud vees) vahetult enne kasutamist. Lisatakse substraat (vesinikperoksiid = H₂O₂), nii et lõplik kontsentratsioon oleks 0,05-(massi/mahu)protsendiline (1:2 000 30-protsendilise H₂O₂ lahusest). Igasse auku lisatakse 50 µl OFD lahust ja plaadid jäetakse 10 minutiks laborilauale ümbritseva õhu temperatuuril seisma. Peatatakse reaktsioon, lisades 50 µl 1M väävelhapet (H₂SO₄) augu kohta.

1.1.7 Näit

Leitakse spektrofotomeetriselt 492 nm juures.

1.2 Tulemuste esitamine

1.2.1 Arvutiprogrammi abil prinditakse välja uuritava ja kontrollseerumi optilise tiheduse (OT) väärtused ja inhibitsiooni protsent (IP) lähtuvalt neljas augus registreeritud merisea kontrollseerumi keskmisest väärtusest. OT ja IP väärtusi kasutatakse testi usaldatavuse üle otsustamiseks. Merisea kontrollseerumi ülemised (ÜPV) ja alumised piirväärtused (APV) jäävad vastavalt OT väärtuste 1,4 ja 0,4 vahele. Positiivse kontrolli lõpp-punkti tiiter, mille aluseks on 50 % IP, peaks olema 1:240 (1:120 ja 1:480 vahel). Plaadid, mis ei vasta nimetatud kriteeriumidele, tunnistatakse mitterahuldavaks. Kui positiivse kontrollseerumi tiiter on suurem kui 1:480 ja uuritavad proovid on endiselt negatiivsed, võib uuritavaid negatiivseid proove aktsepteerida.

Dubleeritud negatiivse kontrollseerumi augud ja dubleeritud tühikatse augud peaksid andma IP väärtuse vahemikus vastavalt + 25 % ja –25 % ning + 95 % ja + 105 %. Kui tulemus jääb väljapoole nimeetatud väärtusi, ei tähenda see, et plaat tunnistatakse kehtetuks, vaid seda, et taustavärvus veel muutub.

1.2.2 Uuritava seerumi diagnostika lävi (künnisväärtus) on 50 % (IP 50 %). Proovid, mille IP väärtused on üle 50 %, registreeritakse positiivsetena. Proovid, mille IP väärtused on alla 50 %, registreeritakse negatiivsetena.

Proove, mille IP väärtused on dubleeritud aukude künnisväärtusest ülal- või allpool, tuleb lugeda kahtlasteks. Selliseid proove võib uuesti testida tilktestmeetodil või tiitrimise teel. Positiivseid proove võib samuti tiitrida positiivsuse astme kindlaksmääramiseks.

Tilktesti skeem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	K+		Uuritavad seerumid									
A	1:5	– K–	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	– K–	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	Tühikatse										
D	1:40	Tühikatse										
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

K– = negatiivne kontroll.

K+ = positiivne kontroll.

MS kontr. = merisea kontroll.

Uuritavad seerumid

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	K+		Uuritavad seerumid									
A	1:5	– K–	1:5									1:5
B	1:10	– K–	1:10									1:10
C	1:20	Tühikatse	1:20									1:20
D	1:40	Tühikatse	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

K– = negatiivne kontroll.

K+ = positiivne kontroll.

MS kontr. = merisea kontroll.

2. KAUDNE ELISA TEST ANTIKEHADE AVASTAMISEKS HOBUSTE AAFRIKA KATKU VIIRUSE (HAKV) VASTU (ETTENÄHTUD TEST)

Järgnevalt kirjeldatud test on kooskõlas testikirjeldusega OIE diagnostiliste testide ja vaktsiinide standardite käsiraamatu 2. peatüki lõike 1 punktis 11, neljas väljaanne, 2000.

Rekombinantset VP7 proteiini on kasutatud antigeenina HAK viiruse antikehade avastamiseks; meetod on väga tundlik ja spetsiifiline. Selle proteiini muudeks eelisteks on stabiilsus ja nakkusohutus.

2.1 Testi käik

2.1.1 Tugev faas

2.1.1.1 ELISA plaadid kaetakse karbonaadi/vesinikkarbonaadi puhverlahuses, pH 9,6, lahjendatud rekombinantse HAKV-4 VP7-ga. Inkubeerida plaate üleöö 4 °C juures.

2.1.1.2 Pesta plaate viis korda destilleeritud veega, mis sisaldab 0,01 (massi/mahu)protsenti Tween 20 (pesemislahus). Pesemisjätkide eemaldamiseks suruda plaate õrnalt vastu kuivatuspaberit.

2.1.1.3 Plaadid blokeeritakse fosfaadiga puhverdatud keedusoolalahusega (FPK) + 5 (massi/mahu)protsendilise lõssipulbriga (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl augu kohta, ühe tunni jooksul 37 °C juures.

2.1.1.4 Eemaldatakse blokeeriv lahus ja plaadid surutakse ettevaatlikult vastu absorbeerivat materjali.

2.1.2 Uuritavad proovid

2.1.2.1 Uuritavad seerumiproovid ning positiivsed ja negatiivsed kontrollseerumid lahjendatakse vahekorras 1:25 FPK-s + 5 (massi/mahu)protsenti lõssi + 0,05 (massi/mahu)protsenti Tween 20, 100 µl augu kohta. Inkubeeritakse 1 tund 37 °C juures.

Tiitrimiseks teha kahekordsete lahjenduste rida alates lahjendusastmest 1:25 (100 µl augu kohta), üks seerum plaadi veeru kohta, ja teha sama positiivse ja negatiivse kontrollseerumiga. Inkubeeritakse 1 tund 37 °C juures.

2.1.2.2 Plaadid pestakse nii nagu kirjeldatud etapis 2.1.1.2.

2.1.3 Konjugaat

2.1.3.1 Jagatakse välja – 100 µl augu kohta – määrarõika peroksidaasiga (MRP) konjugeeritud antihobuse gammaglobuliini, mis on lahjendatud FPK lahuses + 5 % piima + 0,05 % Tween 20-ga, pH 7,2. Inkubeeritakse 1 tund 37 °C juures.

2.1.3.2 Plaadid pestakse nii nagu kirjeldatud etapis 2.1.1.2.

2.1.4 Kromogeen/Substraat

- 2.1.4.1 Lisada kromogeeni/substraadi lahust 200 µl augu kohta (10 ml 80,6 mM DMAB (dimetüül amino-bensaldehüüd) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-metüül-2-benso-tiasoliin hüdrasoon hüdrokloriid) + 5 µl H₂O₂).

Värvaine areng peatatakse umbes 5 kuni 10 minuti pärast (enne kui negatiivne kontrollproov hakkab värvuma), lisades 50 µl 3N H₂SO₄.

Võib kasutada ka teisi kromogeene nagu ABTS (2,2'-Asino-bis-[3-etüülbensotiasoliin-6-sulfoonhape]), TMB (tetrametüül bensidiin) või OFD (ortofenüüldiamiin).

- 2.1.4.2 Plaatide näitused loetakse 600 nm juures (või 620 nm).

2.2 Tulemuste tõlgendamine

- 2.2.1 Arvestatakse välja künnisväärtus, liites negatiivsele kontrollväärtusele 0,6 (0,6 on standardne kõrvalekalle, mis arvestatakse 30 negatiivse seerumiga grupist).

- 2.2.2 Uuritavaid proove, mille absorptsiooniväärtused on allpool künnisväärtust, loetakse negatiivseteks.

- 2.2.3. Uuritavaid proove, mille absorptsiooniväärtused on suuremad kui künnisväärtus + 0,15, loetakse positiivseteks.

- 2.2.4 Uuritavad proovid, mille absorptsiooniväärtused on negatiivse ja positiivse vahepeal, on kahtlased ja tulemuse kinnitamiseks tuleb rakendada teist meetodit.

3. BLOKEERIV ELISA TEST ANTIKEHADE AVASTAMISEKS HOBUSTE AAFRIKA KATKU VIIRUSE (HAKV) VASTU (ETTENÄHTUD TEST)

Blokeeriv ELISA test on ette nähtud spetsiifiliste HAKV antikehade avastamiseks kõikide haigusele vastuvõtlike loomaliikide seerumites. VP7 on HAKV peamine antigeeniline, viiruseline proteiin, mida leidub üheksas serotüübis. Kuna monoklonaalne antikeha (Mak) suunatakse ka VP7 vastu, on analüüs väga tundlik ja spetsiifiline. Pealegi on rekombinantne VP7 antigeen täiesti kahjutu ning tagab seetõttu kõrge ohutusastme.

Testi põhimõtteks on reaktsiooni katkestamine rekombinantse VP7 kui ELISA plaadiga seotud antigeeni ja konjugeeritud Mak'i vahel, mis on spetsiifiline VP7 vastu. Uuritavas seerumis sisalduvad antikehad peatavad reaktsiooni antigeeni ja Mak'i vahel, mille tulemuseks on värvaine vähenemine.

Allpool kirjeldatud testi tehakse Euroopa Ühenduse hobuste aafrika katku referentlabilis Hispaanias Algetes.

3.1 Testi käik

3.1.1 ELISA plaadid

- 3.1.1.1 ELISA plaadid kaetakse karbonaadi/vesinikkarbonaadi puhverlahuses, lahjendatud rekombinantse HAKV-4 VP7-ga, pH 9,6. Inkubeerida üleöö 4 °C juures.

- 3.1.1.2 Plaat pestakse viis korda fosfaadiga puhverdatud keedusoolalahusega (FPK), mis sisaldab 0,05 (massi/mahu)protsenti Tween 20 (FPKT).

- 3.1.1.3 Plaat stabiliseeritakse, töödeldes seda stabiliseeriva lahusega (et võimaldada plaadi pikaajalist hoidmist 4 °C juures aktiivsust kaotamata) ja kuivatatakse absorbeeriva materjaliga.

3.1.2 Uuritavad proovid ja kontroll

- 3.1.2.1 Varjestuseks: uuritav seerum lahjendatakse FPKT lahuses 1:10 otse plaadil, nii et lõplik maht oleks 100 µl augu kohta. Inkubeerida 1 tund 37 °C juures.

- 3.1.2.2 Tiitrimiseks: uuritavast seerumist ja positiivsetest kontrollidest valmistatakse kahekordsete lahjenduste rida (100 µl augu kohta) lahjendusastmelt 1:10 astmeni 1:1 280 kaheksas augus. Negatiivset kontrolli testitakse lahjendusastmel 1:10.

3.1.3. Konjugaat

Lisatakse eellahjendatud, määrarõika peroksidaasiga (MRP) konjugeeritud Mak'i (monoklonaalsed anti-kehad VP7 vastu) igasse auku 50 µl augu kohta ja segatakse ettevaatlikult homogeensuse tagamiseks. Inkubeeritakse 30 minutit 37 °C juures.

3.1.4. Plaatide pestakse viis korda FPKT lahusega ja kuivatatakse nagu eespool kirjeldatud.

3.1.5. Kromogeen/Substraat

Lisada – 100 µl augu kohta – kromogeen/substraadi lahust [1 ml ABTS (2,2'-Asino-bis-[3-etüülbenso-tiasoliin-6-sulfoonhape]) 5 mg/ml + 9 ml substraadi puhverlahust (0,1 M fosfaat-tsitraadi puhverlahus, pH 4, mis sisaldab 0,03 % H₂O₂)] ja inkubeerida 10 minutit toatemperatuuril. Värvuse muutumine peatatakse, lisades – 100 µl augu kohta – 2 (massi/mahu)protsenti SDS (naatriumdodetsüülsulfaati).

3.1.6. Näit

Näitused loetakse 405 nm juures ELISA lugeja abil.

3.2 Tulemuste tõlgendamine

3.2.1. Proovide kehtivus

Test on kehtiv, kui negatiivse kontrollproovi (NK) optiline tihedus (OT) on üle 1,0 ja positiivse kontrollproovi (PK) OT on alla 0,2.

3.2.2. Künnisväärtuse arvestamine

Positiivne künnisväärtus = $NK - ((NK - PK) \times 0,3)$

Negatiivne künnisväärtus = $NK - ((NK - PK) \times 0,2)$

kus NK on negatiivse kontrollproovi OT ja PK on positiivse kontrollproovi OT.

3.2.3. Tulemuste tõlgendamine

Proove, mille OT on positiivsest künnisväärtusest väiksem, loetakse HAKV antikehade suhtes positiivseteks.

Proove, mille OT on negatiivsest künnisväärtusest suurem, loetakse HAKV antikehade suhtes negatiivseteks.

Proove, mille OT jääb nende kahe väärtuse vahele, tuleb lugeda kahtlasteks ja loomadelt tuleb võtta uued proovid kahe või kolme nädala pärast."
