

32002D0160

2002 2 23

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

L 53/37

## KOMISIJOS SPRENDIMAS

2002 m. vasario 21 d.

## iš dalies keičiantis Tarybos direktyvos 90/426/EEB D priedo nuostatas dėl afrikinės arklių ligos diagnostinių tyrimų

(pranešta dokumentu Nr. C(2002) 556)

(tekstas svarbus EEE)

(2002/160/EB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1990 m. birželio 26 d. Tarybos direktyvą 90/426/EEB dėl gyvūnų sveikatos reikalavimų, reglamentuojančių arklinių šeimos gyvūnų importą iš trečiųjų šalių ir jų judėjimą<sup>(1)</sup>, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Sprendimu 2001/298/EB<sup>(2)</sup>, ypač į jos 23 straipsnį,

kadangi:

- (1) Direktyvos 90/426/EEB D priede aprašytas komplekto sujungimo tyrimas, skirtas afrikinei arklių ligai diagnozuoti.
- (2) 2000 m. lapkričio mėnesį Bendrijos etaloninėje laboratorijoje Algete, Ispanijoje vyko kasmetinis ES valstybių narių afrikinės arklių ligos nacionalinių etaloninių laboratorijų susirinkimas. Susirinkime buvo pateikti moksliniai įrodymai, kad Direktyvos 90/426/EEB D priede aprašytas komplekto sujungimo tyrimas turi rimtų trūkumų, ypač dėl to, kad juo galima aptikti antikūnus tik jei buvo apsikręsta ar skiepyta neseniai. Be to, šiuos tyrimus beveik visose Bendrijos ir pagrindinių šalių eksportuotojų laboratorijose praktiškai pakeitė šiuolaikiki ELISA tyrimai.
- (3) Tarptautiniu lygiu pripažinti laboratoriniai tyrimai antikūnams prieš afrikinio arklių maro virusą aptikti yra aprašyti Tarptautinio epizootijų biuro (OIE) *Diagnostinių tyrimų ir vakcinų standartų vadove*<sup>(3)</sup>; tačiau pastarajame leidinyje nurodytas tik vienas iš galimų ELISA tyrimų.

(4) Todėl reikia pakeisti Direktyvos 90/426/EEB D priedą atsižvelgiant į technikos pažangą ir tarptautiniu lygiu patvirtintus standartus.

(5) Šiame sprendime numatytos priemonės atitinka Veterinarijos nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

1 straipsnis

Direktyvos 90/426/EEB D priedas keičiamas šio sprendimo priedu.

2 straipsnis

Šis sprendimas skirtas valstybės narėms.

Priimta Briuselyje, 2002 m. vasario 21 d.

Komisijos vardu

David BYRNE

Komisijos narys

<sup>(1)</sup> OL L 224, 1990 8 18, p. 42.

<sup>(2)</sup> OL L 102, 2001 4 12, p. 63.

<sup>(3)</sup> 2000 m. ketvirtasis leidimas, 2.1.11. skyrius.

## PRIEDAS

„D PRIEDAS

## AFRIKINĖ ARKLIŲ LIGA

## DIAGNOZĖ

Toliau aprašytam imunofermentinės analizės tyrimui (ELISA) atlikti reagentų galima gauti iš Europos bendrijos etaloninės laboratorijos arba OIE afrikinės arklių ligos tyrimų etaloninių laboratorijų.

1. KONKURENCINIS ELISA TYRIMAS ANTIKŪNAMS PRIEŠ AFRIKINĖS ARKLIŲ LIGOS VIRUSĄ (AALV) NUSTATYTI (PRIVALOMASIS TYRIMAS)

Konkurencinis ELISA tyrimas naudojamas aptikti būdingus afrikinės arklių ligos AALV antikūnus bet kurios rūšies arklinių serume. Plataus spektro polikloninis imuninis anti-AALV jūrų kiaulytės serumas (toliau – jūrų kiaulytės anti-serumas) yra būdingas serogrupėms ir juo galima nustatyti visus žinomus AAL virusų serotipus.

Tyrimo principas yra reakcijos tarp AALV antigeno ir jūrų kiaulytės antiserumo nutraukimas tiriamojo serumo mėginiu. AALV antikūnai tiriamajame serume kovos su antikūnais, esančiais jūrų kiaulytės antiserume, dėl ko pasikeis spalva, kurios tikimasi (pridėjus fermentu žymėtų jūrų kiaulytės antikūnų ir substrato). Serumus galima iširti vienu praskiedimu 1:5 (taškinis tyrimo metodas) arba titruojant (serumo titravimo metodas) galutiniam praskiedimui nustatyti. Didesnės kaip 50 % nuslopinimo vertės laikomos teigiamomis.

Toliau aprašomas tyrimo protokolas yra naudojamas regioninėje etaloninėje laboratorijoje AAL ligai diagnozuoti Pirbright, Jungtinėje Karalystėje.

1.1. Tyrimo procedūra

1.1.1. Plokštelių paruošimas

1.1.1.1. ELISA plokštelės padengiamos AALV antigenu, iš infekuotų ląstelių kultūrų ir praskiestu karbonato-bikarbonato buferiu, kurio pH 9,6. ELISA plokštelės inkubuojamos per naktį 4 °C temperatūroje.

1.1.1.2. Plokštelės tris kartus praplaunamos pripildant duobutes fosfatinio buferio druskų tirpalo (PBS) ir ištuštinant juos, pH nuo 7,2 iki 7,4, ir nusausinamos sugeriamuoju popieriumi.

1.1.2. Kontrolinės duobutės

1.1.2.1. Teigiami kontroliniai serumai titruojami dvigubu atskiedimu nuo 1:5 iki 1:640 pirmajame stulpelyje su blokuojančiu buferiu (PBS su 0,05 % (v/v) Tween-20, 5,0 % (w/v) nugriebto pieno milteliais (Cadbury's Marvel™) ir 1 % (v/v) – suaugusio jaučio serumu), į duobutę įpilant 50 μl.

1.1.2.2. Į antrojo stulpelio A ir B duobutes pripilama 50 μl neigiamo kontrolinio serumo, praskiesto santykiu 1:5 (10 μl serumo + 40 μl blokuojančio buferio).

1.1.2.3. Į antrojo stulpelio C ir D (tuščia) duobutes pripilama po 100 μl blokuojančio buferio.

1.1.2.4. Į antrojo stulpelio E, F, G ir H (jūrų kiaulytės kontrolė) duobutes pripilama po 50 μl blokuojančio buferio.

1.1.3. Taškinis tyrimo metodas

1.1.3.1. Blokuojančiame buferyje atskiedžiami kiekvieno tiriamo serumo santykiu 1:5 mėginiai įlašinant į dvigubas 3–12 stulpelių duobutes (10 μl serumo + 40 μl blokuojančio buferio)

arba

1.1.4. Serumo titravimo metodas

1.1.4.1. Paruošiamos dvigubo skiedimo kiekvieno tiriamo mėginio eilutės (nuo 1:5 iki 1:640) blokuojančiame buferyje aštuoniose duobutėse atskiruose stulpeliuose (3–12).

tuomet

1.1.5. Į visas duobutes, išskyrus tuščias ELISA plokštelės duobutes, pripilama po 50 μl jūrų kiaulytės antiserumo, praskiesto blokuojančiu buferiu (visose duobutėse dabar yra po 100 μl).

1.1.5.1. Vieną valandą inkubuojama 37 °C temperatūroje ant rotacinio kratytuvo.

1.1.5.2. Plokštelės tris kartus nuplaunamos ir nusausinamos kaip anksčiau.

1.1.5.3. Į kiekvieną duobutę pripilama po 50 µl triušio prieš jūros kiaulytę krienų peroksidazės (HRP) konjugato, praskiesto blokuojančiu buferiu.

1.1.5.4. Vieną valandą inkubuojama orbitiniame kratytuve 37 °C temperatūroje.

1.1.5.5. Plokštelės tris kartus nuplaunamos ir nusausinamos kaip nurodyta pirmiau.

#### 1.1.6. Chromogenas

Prieš pat naudojimą pagal gamintojo nurodymus paruošiamas chromogeno OPD (orto-fenildiamino) tirpalas (0,4 mg/ml steriliame distiliuotame vandenyje). Pripilama substrato (vandenilio peroksido – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), kad galutinė koncentracija būtų 0,05 % tūrio (1:2000 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tirpalo). Į kiekvieną duobutę pripilama po 50 µl OPD tirpalo ir plokštelės paliekamos ant stalo 10 minučių aplinkos temperatūroje. Reakcija sustabdoma pripilant į kiekvieną duobutę po 50 µl 1M sieros rūgšties (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

#### 1.1.7. Vertinimas

Vertinama spektrofotometru prie 492 nm.

## 1.2. Rezultatų pateikimas

1.2.1. Pasinaudojant programine įranga išspausdinamos optinio tankio (OT) vertės ir tiriamojo bei kontrolinio serumo procentinės inhibicijos (PI) vidutinė vertė, gauta iš keturių jūrų kiaulytės kontrolinių duobučių. Duomenys, išreikšti kaip OT ir PI reikšmės, yra naudojami nustatyti, ar tyrimas atliktas tinkamai. Jūrų kiaulytės kontrolės viršutinės kontrolinės ribos (VKR) ir apatinės kontrolinės ribos (AKR) yra atitinkamai tarp 1,4 ir 0,4 OT reikšmių. Galutinis titras teigiamai kontrolei (50 % PI) turėtų būti 1:240 (nuo 1:120 iki 1:480 ribose). Bet kokia plokštelė, kuri neatitinka šių kriterijų, turi būti atmesta. Tačiau jeigu teigiamo kontrolinio serumo titras yra didesnis nei 1:480, o tiriamieji mėginiai išlieka neigiami, tokiu atveju tiriamus mėginius galima laikyti neigiamais.

PI vertės atsarginėse neigiamų kontrolinių serumų duobutėse ir atsarginėse tuščiose duobutėse turėtų būti atitinkamai nuo + 25 % iki - 25 % ir nuo + 95 % iki + 105 %. Jeigu vertės nėra tarp šių ribų, tai nereiškia, jog plokštelės negalioja, bet rodo, kad pagrindo spalva dar kinta.

1.2.2. Tiriamųjų serumų diagnostinė riba (ribinė vertė) yra 50 % (PI 50 %). Mėginiai, kurių PI vertės yra didesnės kaip 50 %, laikomi teigiamais. Mėginiai, kurių PI vertės yra mažesnės kaip 50 %, laikomi neigiamais.

Mėginiai, kurių PI vertės yra virš arba žemiau atsarginių duobučių ribinių verčių, yra laikomi abejotinais. Tokius mėginius galima tirti iš naujo taškiniu tyrimu ir titruojant. Teigiami mėginiai taip pat gali būti titruojami teigiamumo laipsniui nustatyti.

Takinio tyrimo schema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kontr.		Tiriamieji serumai									
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	Tuščia										
D	1:40	Tuščia										
E	1:80	JK kontr.										
F	1:160	JK kontr.										
G	1:320	JK kontr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	JK kontr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- kontr. = neigiama kontrolė

+ kontr. = teigiama kontrolė

JK kontr. = jūrų kiaulytės kontrolė

## Tiriamieji serumai

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kontr.		Tiriamieji serumai									
A	1:5	– kontr.	1:5									1:5
B	1:10	– kontr.	1:10									1:10
C	1:20	Tuščias	1:20									1:20
D	1:40	Tuščias	1:40									1:40
E	1:80	JK kontr.	1:80									1:80
F	1:160	JK kontr.	1:160									1:160
G	1:320	JK kontr.	1:320									1:320
H	1:640	JK kontr.	1:640									1:640

- kontr. = neigiama kontrolė

+ kontr. = teigiama kontrolė

JK kontr. = jūrų kiaulytės kontrolė

## 2. NETIESIOGINIS ELISA TYRIMAS ANTIKŪNAMS PRIEŠ AFRIKINĖS ARKLIŲ LIGOS VIRUSĄ (AALV) NUSTATYTI (PRIVALOMASIS TYRIMAS)

Toliau aprašytas metodas pateiktas pagal OIE Diagnostinių tyrimų ir vakcinų standartų vadovo 2000 m. ketvirto leidimo 2.1.11. skyrių.

Antigenų AAL viruso antikūnams nustatyti naudojamas rekombinantinis VP7 baltymas, kurio jautrumo ir specifškumo indeksas yra didelis. Kiti privalumai – jis yra stabilus ir nesukelia infekcijos.

### 2.1. Tyrimo procedūra

#### 2.1.1. Kietoji fazė

2.1.1.1. ELISA plokštelės yra padengiamos rekombinantiniu AALV-4 VP 7, praskiestu karbonato-bikarbonato buferiu, kurio pH 9,6. Plokštelės per naktį inkubuojamos 4 °C temperatūroje.

2.1.1.2. Plokštelės penkis kartus nuplaunamos distiliuotu vandeniu, kuriame yra 0,01 % tūrio Tween 20 (plau-namojo tirpalo). Apverstos plokštelės atsargiai patapšnojamos ant sugeriamosios medžiagos, kad nusikratytų ant jų likęs plaunamasis tirpalas.

2.1.1.3. Plokštelės vienai valandai 37 °C temperatūroje blokuojamos fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS) + 5 % (w/v) nugriebto pieno (Nestlé Dry Skim Milk™) po 200 µl duobutėje.

2.1.1.4. Blokuojantis tirpalas pašalinamas ir plokštelės atsargiai patapšnojamos ant sugeriamosios medžiagos.

#### 2.1.2. Tiriamieji mėginiai

2.1.2.1. Serumo mėginiai, kuriuos reikia ištirti, bei teigiami ir neigiami kontroliniai serumai praskiedžiami santykiu 1:25 PBS + 5 % (w/v) nugriebto pieno + 0,05 % (v/v) Tween 20, po 100 µl į duobutę. Vieną valandą inkubuojama 37 °C temperatūroje.

Titravimui paruošiamos dvigubo skiedimo eilutės nuo 1:25 (100 µl/duobutėje), po vieną serumų mėginį plokštelės stulpeliui, ir tą patį atlikite su teigiamais ir neigiamais kontroliniais mėginiais. Vieną valandą inkubuojama 37 °C temperatūroje.

2.1.2.2. Nuplaukite plokšteles kaip aprašyta aukščiau.

#### 2.1.3. Konjugatas

2.1.3.1. Paruošiama po 100 µl/duobutėje krienų peroksidaze (HRP) konjuguoto arklio gama globulino, pras-kiesto su PBS + 5 % pieno + 0,05 % Tween 20, kurių pH 7,2. Vieną valandą inkubuojama 37 °C temperatūroje.

2.1.3.2. Plokštelės nuplaunamos kaip aprašyta 2.1.1.2.

#### 2.1.4. *Chromogenas/Substratas*

- 2.1.4.1. Į duobutes pripilama po 200 µl chromogeno/substrato tirpalo (10 ml 80,6 mM DMAB (dimetilaminobenzaldehido) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-metil-2-benzo-tiazolino hidrazono hidroklorido) + 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Spalvos kaita sustabdoma maždaug po 5–10 minučių pripylus 50 µl 3N H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> (prieš neigiamam kontroliniam mėginiui pradedant nusidažyti).

Galima naudoti ir kitus chromogenus, pvz., ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis]), TMB (tetra-metil benzidinas) arba OPD (orto-fenildiaminas).

- 2.1.4.2. Plokštelės vertinamos prie 600 nm (arba 620 nm).

### 2.2. **Rezultatų vertinimas**

- 2.2.1. Ribinė reikšmė apskaičiuojama prie neigiamos kontrolės vertės pridant 0,6 (0,6 yra standartinis 30 neigiamų serumų grupės nuokrypis).
- 2.2.2. Tiriamieji mėginiai, kurių absorbcijos vertės yra mažesnės už ribinę vertę, laikomi neigiamais.
- 2.2.3. Tiriamieji mėginiai, kurių absorbcijos vertės yra didesnės už ribinę vertę + 0,15, laikomi teigiamais.
- 2.2.4. Tiriamieji mėginiai, kurių absorbcijos vertės yra tarp pirmiau nurodytų, yra abejotini, ir rezultatams patvirtinti reikia atlikti kitą tyrimą.

### 3. BLOKUOJAMASIS ELISA TYRIMAS ANTIKŪNAMS PRIEŠ AFRIKINĖS ARKLIŲ LIGOS VIRUSĄ (AALV) NUSTATYTI (PRIVALOMASIS TYRIMAS)

Blokuojamasis ELISA tyrimas skirtas nustatyti specifiniams AALV antikūnams bet kokių jam jautrių rūšių serumuose. VP7 yra pagrindinis antigeninis virusinis AALV devynių serotipų baltymas. Kadangi monokloninis antikūnas (Mab) taip pat veikia prieš VP7, tyrimo jautrumas ir specifiskumas yra labai dideli. Be to, rekombinantinis VP7 antigenas yra visiškai nežalingas, todėl užtikrinama didelė sauga.

Šio tyrimo principas yra reakcijos tarp rekombinantinio VP7, antigeno, prijungto prie ELISA plokštelės, ir VP7 būdingo konjuguoto Mab, nutraukimas. Tiriamojo serumo antikūnai stabdys reakciją tarp antigeno ir Mab, todėl pasikeis spalva.

Toliau aprašomas tyrimas atliekamas Europos bendrijos etaloninėje laboratorijoje afrikinei arklių ligai tirti Algete, Ispanija.

#### 3.1. **Tyrimo procedūra**

##### 3.1.1. *ELISA plokštelės*

- 3.1.1.1. ELISA plokštelės padengiamos rekombinantiniu AALV-4 VP7, praskiestu karbonato-bikarbonato buferiu, kurio pH 9,6. Inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje.
- 3.1.1.2. Plokštelės penkis kartus nuplaunamos fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS), kuriame yra 0,05 % tūrio Tween 20 (PBST).
- 3.1.1.3. Plokštelė stabilizuojama paveikiant ją stabilizuojančiu tirpalu (tam, kad būtų galima ilgai laikyti 4 °C temperatūroje neprarandant aktyvumo) ir nusausinama absorbuojančia medžiaga.

##### 3.1.2. *Tiriamieji ir kontroliniai mėginiai*

- 3.1.2.1. Tikrinimui: tiriamieji serumai ir kontrolės praskiedžiami santykiu 1:10 tiesiai plokštelėje su PBST, kad galutinis tūris būtų 100 µl/duobutėje. Vieną valandą inkubuojama 37 Code en erreur: 8eJC temperatūroje.
- 3.1.2.2. Titravimui: aštuoniose duobutėse nuo 1:10 iki 1:1 280 paruošiamas dvigubo skiedimo tiriamasis serumas ir teigiamos kontrolės eilutės (100 µl/duobutėje). Neigiama kontrolė tikrinama praskiedus santykiu 1:10.

**3.1.3. 3.1.3. Konjugatas**

Į visas duobutes pripilama po 50 µl prieš tai praskiesto krienų peroksidaze (HRP) – konjuguoto Mab (VP7 būdingi monokloniniai antikūnai) ir atsargiai išmaišoma, kad tirpalas būtų homogeniškas. 30 minučių inkubuojama 37 °C temperatūroje.

**3.1.4. Plokštelės penkis kartus nuplaunamos PBST ir nusausinamos kaip nurodyta pirmiau.****3.1.5. Chromogenas/Substratas**

Į kiekvieną duobutę pripilama po 100 µl chromogeno substrato tirpalo (1 ml ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis]) 5 mg/ml + 9 ml substrato buferio (0,1 M Fosfato-Citrato buferio, kurio pH 4 ir jame yra 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ir 10 minučių inkubuojama kambario temperatūroje. Spalvos kaita sustabdoma pripilant į kiekvieną duobutę 100 µl 2 % (w/v) SDS (natrio dodecilo sulfato).

**3.1.6. Vertinimas**

Vertiname ELISA analizatoriumi, nustatčius 405 nm.

**3.2. Rezultatų vertinimas****3.2.1. Tyrimo tinkamumas**

Tyrimas galioja, kai neigiamos kontrolės (NK) optinis tankis (OT) yra didesnis kaip 1,0 ir teigiamos kontrolės (TK) OT yra mažesnis kaip 0,2.

**3.2.2. Ribos apskaičiavimas**

$$\text{Teigiamoji riba} = \text{NK} - [(\text{NK} - \text{TK}) \times 0,3]$$

$$\text{Neigiamoji riba} = \text{NK} - [(\text{NK} - \text{TK}) \times 0,2]$$

Čia NK yra neigiamos kontrolės OT, o TK – teigiamos kontrolės OT.

**3.2.3. Rezultatų vertinimas**

Mėginiai, kurių OT yra mažesnis už teigiamąją ribą, laikomi teigiamais AALV antikūnams.

Mėginiai, kurių OT yra didesnis už neigiamąją ribą, laikomi neigiamais AALV antikūnams.

Mėginiai, kurių OT yra tarp minėtų dviejų verčių, laikomi abejotinais, ir gyvūnai turėtų būti pakartotinai tiriami po 2–3 savaitių.“

---