

UITVOERINGSBESLUIT (EU) 2016/1840 VAN DE COMMISSIE**van 14 oktober 2016****tot wijziging van bijlage IV bij Richtlijn 2009/156/EG van de Raad wat betreft diagnosemethoden voor paardenpest***(Kennisgeving geschied onder nummer C(2016) 6509)***(Voor de EER relevante tekst)**

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gezien het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gezien Richtlijn 2009/156/EG van de Raad van 30 november 2009 tot vaststelling van veterinairerechtelijke voorschriften voor het verkeer van paardachtigen en de invoer van paardachtigen uit derde landen ⁽¹⁾, en met name artikel 20,

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) In bijlage IV bij Richtlijn 2009/156/EG zijn diagnosemethoden voor paardenpest opgenomen die indien nodig moeten worden toegepast om paardachtigen voorafgaand aan het verkeer binnen de Unie of de invoer uit niet-EU-landen te testen.
- (2) Sinds de vaststelling van Richtlijn 2009/156/EG is laboratoriumcapaciteit ontwikkeld om geavanceerde, zeer gevoelige en doeltreffende tests voor de diagnose van paardenpest uit te voeren. Tegelijkertijd is het hoofdstuk over de diagnose van paardenpest in de Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals van de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE) ⁽²⁾ aan deze ontwikkeling aangepast.
- (3) Het referentielaboratorium van de Europese Unie voor paardenpest ⁽³⁾ heeft in het kader van zijn werkprogramma voor 2014 verslag uitgebracht over de technische beoordeling van de in bijlage IV bij Richtlijn 2009/156/EG beschreven diagnosemethoden. Uit die beoordeling, die in mei 2015 aan de Commissie werd voorgelegd, blijkt dat de competitieve enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) niet meer beschikbaar is, dat de indirecte Elisa niet algemeen gebruikt wordt maar op verzoek binnen vier tot zes maanden kan worden verstrekt, en dat de blokkerings-Elisa in de handel verkrijgbaar is en algemeen wordt gebruikt voor de analyse van monsters tijdens de proficiency tests die het referentielaboratorium van de Europese Unie voor paardenpest organiseert.
- (4) Bovendien wordt in het verslag vermeld dat de methoden waarbij nucleïnezuur wordt herkend door omgekeerde transcriptase-polymerasekettingreactie (RT-PCR), voordelen bieden ten opzichte van serologische diagnosemethoden, omdat de ziekte met RT-PCR in een vroeg infectiestadium kan worden opgespoord. De meeste nationale referentielaboratoria van de lidstaten van de Europese Unie passen al realtime RT-PCR-methoden toe, onder meer voor de diagnose van paardenpest, en deze methoden zijn doeltreffend gebleken voor de jaarlijkse proficiency tests die tussen 2009 en 2014 zijn uitgevoerd. Uit het verslag blijkt tevens dat er buiten de Unie al een aantal OIE-referentielaboratoria en andere laboratoria met specifieke deskundigheid op het gebied van paardenpest zijn die ten minste één van de realtime RT-PCR-methoden voor de opsporing van het paardenpestgenoom hebben toegepast.
- (5) Tijdens de gezamenlijke workshop van de referentielaboratoria van de Europese Unie voor paardenpest/bluetongue en nationale referentielaboratoria, die op 24 en 25 november 2015 in Ascot, Verenigd Koninkrijk, werd gehouden, werd aanbevolen in bijlage IV bij Richtlijn 2009/156/EG realtime omgekeerde transcriptase-polymerasekettingreactiemethoden (RRT-PCR) op te nemen voor de opsporing van het paardenpestvirus.

⁽¹⁾ PB L 192 van 23.7.2010, blz. 1.

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

⁽³⁾ Richtlijn 92/35/EEG van de Raad van 29 april 1992 tot vaststelling van controlevoorschriften en van maatregelen ter bestrijding van paardenpest (PB L 157 van 10.6.1992, blz. 19).

- (6) Hoewel alle beschikbare realtime RT-PCR-methoden voor de opsporing van het paardenpestgenoom voldoende gevoelig zijn, passen de meeste laboratoria de door Agüero et al. (2008) ⁽⁴⁾ beschreven procedure toe. De door Guthrie et al. (2013) ⁽⁵⁾ beschreven methode is speciaal ontworpen om te garanderen dat paarden uit risicogebieden voor paardenpest veilig kunnen worden vervoerd na afloop van de minimale quarantaineperiode die in de Terrestrial Animal Health Code ⁽⁶⁾ van de OIE is voorgeschreven.
- (7) Daarom is het passend om in bijlage IV bij Richtlijn 2009/156/EG methoden voor het opsporen van de ziekteverwekker en voor het aantonen van antilichamen op te nemen als aanvullende methoden voor een snelle diagnose van de paardenpest.
- (8) Bijlage IV bij Richtlijn 2009/156/EG moet bijgevolg worden gewijzigd door de competitie-Elisa te schrappen en de procedures voor de indirecte en blokkerings-Elisa aan te passen overeenkomstig hoofdstuk 2.5.1 van de Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals van de OIE, uitgave 2016 op basis van de versie die de World Assembly of Delegates van de OIE in mei 2012 heeft goedgekeurd ⁽⁷⁾. Tegelijkertijd moeten in die bijlage de realtime RT-PCR-procedures zoals beschreven door Agüero et al. (2008) en Guthrie et al. (2013), worden opgenomen om die tests voor het opsporen van ziekteverwekkers beschikbaar te maken voor het uitvoeren van tests voorafgaand aan het verkeer.
- (9) Richtlijn 2009/156/EG moet derhalve dienovereenkomstig worden gewijzigd.
- (10) De in dit besluit vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Comité voor planten, dieren, levensmiddelen en diervoeders,

HEEFT HET VOLGENDE BESLUIT VASTGESTELD:

Artikel 1

Bijlage IV bij Richtlijn 2009/156/EG wordt vervangen door de tekst in de bijlage bij dit besluit.

Artikel 2

Dit besluit is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 14 oktober 2016.

Voor de Commissie
Vytenis ANDRIUKAITIS
Lid van de Commissie

⁽⁴⁾ Agüero, M., Gomez-Tejedor, C., Angeles Cubillo, M., Rubio, C., Romero, E. en 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, A.J., MacLachlan, N.J., Joone, C., Lourens, C.W., Weyer, C.T., Quan, M., Monyai, M.S., Gardner, I.A., *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⁾ Zie voetnoot 2.

BIJLAGE

„BIJLAGE IV

PAARDENPEST

DIAGNOSE

DEEL A

Serologische tests

De hierna beschreven serologische methode is een enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) op basis van hoofdstuk 2.5.1, afdeling B, punt 2, van de Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, uitgave 2016 zoals goedgekeurd door de World Assembly of Delegates van de OIE in mei 2012.

De virusproteïne VP7 is een major immunodominant antigeen van het paardenpestvirus (AHSV) en wordt geconserveerd in alle negen AHSV-serotypen. Aangetoond is dat recombinante AHSV-VP7-proteïnen stabiel en onschadelijk zijn en geschikt zijn voor gebruik als antigenen in Elisa-procedures voor de bepaling van antilichamen tegen AHSV met een hoge mate van gevoeligheid en specificiteit (Laviada et al., 1992b ⁽¹⁾; Maree & Paweska, 2005). Indirecte Elisa en blokkerings-Elisa zijn de twee AHS-VP7-Elisa-tests die geschikt zijn voor serologische diagnose van paardenpest (AHS).

1. Indirecte Elisa voor het aantonen van antilichamen tegen het paardenpestvirus (AHSV)

Het conjugaat dat in deze methode wordt gebruikt, is een mierikswortelperoxidaseantipaard gamma-globuline dat reageert met het serum van paarden, muil dieren en ezels. Bij de door Maree & Paweska (2005) ⁽²⁾ beschreven methode wordt als conjugaat G-proteïne gebruikt, dat ook reageert met zebrasera.

Het antigeen kan op verzoek binnen vier tot zes maanden door het Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) in Spanje worden verstrekt.

1.1. Testprocedure

1.1.1. Vaste fase

1.1.1.1. Coat de Elisa-plaatjes met recombinant AHSV-4 VP7, voorverdund in carbonaat/bicarbonaatbuffer, Ph 9,6. Incubeer de plaatjes gedurende één nacht bij 4 °C.

1.1.1.2. Was de plaatjes vijfmaal met gedistilleerd water dat 0,01 % (v/v) Tween 20 (wasoplossing) bevat. Klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal om resten van het wassen te verwijderen.

1.1.1.3. Blokkeer de plaatjes met fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS), pH 7,2 + 5 % (w/v) magere melk (mageremelk-poeder van Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl per putje, gedurende één uur bij 37 °C.

1.1.1.4. Verwijder de blockingbuffer en klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal.

1.1.2. Testmonsters

1.1.2.1. De te testen serummonsters en de positieve en negatieve controlesera worden verdund in een verhouding 1 op 25 in PBS + 5 % (w/v) magere melk + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl per putje. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C.

Voor titrerings wordt een tweevoudige verdunningsreeks aangelegd te beginnen bij 1 op 25 (100 µl/putje), één serum per kolom, en wordt hetzelfde gedaan met de positieve en de negatieve controles. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C.

⁽¹⁾ Laviada, M.D., Roy, P. en 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. en 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. Was de plaatjes vijfmaal met gedistilleerd water dat 0,01 % (v/v) Tween 20 (wasoplossing) bevat. Klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal om resten van het wassen te verwijderen.

1.1.3. Conjugaat

- 1.1.3.1. Pipetteer in elk putje 100 µl met mierikswortelperoxidase (HRP) geconjugeerd antipaard gamma-globuline, verdund in PBS + 5 % melk + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C.

- 1.1.3.2. Was de plaatjes vijfmaal met gedistilleerd water dat 0,01 % (v/v) Tween 20 (wasoplossing) bevat. Klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal om resten van het wassen te verwijderen.

1.1.4. Chromogeen/Substraat

- 1.1.4.1. Pipetteer in elk putje 200 µl chromogeen/substraatoplossing (10 ml 80,6 mM DMAB (dimethylaminobenzaldehyde) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-methyl-2-benzo-thiazolinhydrazonhydrochloride) + 5 µl H₂O₂).

Kleurontwikkeling wordt gestopt door toevoeging van 50 µl 3N H₂SO₄ na 5 à 10 minuten (voordat de negatieve controle begint te kleuren).

Andere chromogenen, bv. ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonzuur]), TMB (tetramethylbenzidine) of OPD (ortho-fenyldiamine) mogen ook worden gebruikt.

- 1.1.4.2. Lees de plaatjes af bij een golflengte van 600 nm (of 620 nm).

1.2. Interpretatie van de resultaten

- 1.2.1. Bereken de afkapwaarde door 0,06 toe te voegen aan de waarde van de negatieve controle (0,06 is de afgeleide standaarddeviatie bij een groep van 30 negatieve sera).
- 1.2.2. Testmonsters met absorptiewaarden beneden de afkapwaarde worden als negatief beschouwd.
- 1.2.3. Testmonsters met absorptiewaarden boven de afkapwaarde + 0,15 worden als positief beschouwd.
- 1.2.4. Voor testmonsters met een tussenliggende absorptiewaarde wordt geen conclusie getrokken en in dat geval moet een tweede methode worden toegepast om het resultaat te bevestigen.

2. **Blokkerings-Elisa voor het aantonen van antilichamen tegen het paardenpestvirus (AHSV)**

De competitieve blokkerings-Elisa is ontworpen voor het aantonen van specifieke antilichamen tegen AHSV in sera van alle paardachtigen, d.w.z. paarden, ezels, zebra's en kruisingen daarvan, waardoor de specificiteitsproblemen die soms bij indirecte Elisa's optreden, worden vermeden.

De test is gebaseerd op het blokkeren van de reactie tussen de recombinante VP7-proteïne die aan het Elisa-plaatje is gebonden, en een geconjugeerd AHS-VP7-specifiek monoklonaal antilichaam (Mab). Antilichamen in het testserum blokkeren de reactie tussen het antigeen en het Mab, wat resulteert in vermindering van de kleurontwikkeling. Aangezien het Mab gericht is tegen het VP7, heeft de test een zeer grote gevoeligheid en specificiteit.

De competitieve blokkerings-Elisa is in de handel verkrijgbaar.

2.1. Testprocedure

2.1.1. Vaste fase

- 2.1.1.1. Coat de Elisa-plaatjes met 50-100 ng recombinant AHSV-4 VP7, voorverdund in carbonaat/bicarbonaatbuffer, pH 9,6. Incubeer de plaatjes gedurende één nacht bij 4 °C.

- 2.1.1.2. Was de plaatjes driemaal met fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) 0,1×, die 0,135 M NaCl en 0,05 % (v/v) Tween 20 bevat (PBST). Klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal om resten van het wassen te verwijderen.

2.1.2. Testmonsters en controles

- 2.1.2.1. De te testen serummonsters en de positieve en negatieve controlesera worden verdund in een verhouding 1 op 5 in een oplosmiddel dat 0,35 M NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 en 0,1 % Kathon bevat, 100 µl per putje. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C.

Voor titrerings wordt een tweevoudige verdunningsreeks van de testsera aangelegd van 1 op 10 tot 1 op 280 over acht putjes (100 µl/putje), één serum per kolom, en wordt hetzelfde gedaan met de positieve en de negatieve controles. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C.

- 2.1.2.2. Was de plaatjes vijfmaal met PBS 0,1×, die 0,135 M NaCl en 0,05 % (v/v) Tween 20 bevat (PBST). Klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal om resten van het wassen te verwijderen.

2.1.3. Conjugaat

- 2.1.3.1. Pipetteer in elk putje 100 µl mierikswortelperoxidasegeconjugeerde Mab anti-VP7. Dit Mab is tevoren 1/5 000-1/15 000 verdund in een 1:1-oplossing van StabiliZyme Select® Stabilizer (SurModics. Reference: SZ03) en gedistilleerd water. Incubeer gedurende dertig minuten bij 37 °C.

- 2.1.3.2. Was de plaatjes vijfmaal met PBS 0,1×, die 0,135 M NaCl en 0,05 % (v/v) Tween 20 bevat (PBST). Klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal om resten van het wassen te verwijderen.

2.1.4. Chromogeen/Substraat

Pipetteer 100 µl chromogeen/substraatoplossing in elk putje, d.w.z. 1 ml ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonzuur]), 5 mg/ml + 9 ml substraatbuffer (0,1 M fosfaat-citraatbuffer met pH 4 die 0,03 % H₂O₂ bevat) en incubeer gedurende tien minuten bij kamertemperatuur. Stop de kleurontwikkeling door toevoeging van 2 % (w/v) SDS (natriumdodecylsulfaat) (100 µl per putje).

2.1.5. Aflezen

Lees af bij een golflengte van 405 nm in een Elisa-leesapparaat.

2.2. Interpretatie van de resultaten

- 2.2.1. Bepaal het blokkeringspercentage (BP) van elk monster met de volgende formule, waarbij „Abs” staat voor antilichamen:

$$BP = \frac{Abs(\text{controle}^-) - Abs(\text{monster})}{Abs(\text{controle}^-) - Abs(\text{monster}^+)} \times 100$$

- 2.2.2. Monsters met een BP-waarde hoger dan 50 % worden als positief voor antilichamen tegen AHSV aangemerkt.

- 2.2.3. Monsters met een BP-waarde lager dan 45 % worden als negatief voor antilichamen tegen AHSV aangemerkt.

- 2.2.4. Voor monsters met een BP-waarde tussen 45 % en 50 % wordt geen conclusie getrokken; in dat geval moet een nieuwe test worden verricht. Indien opnieuw geen conclusie kan worden getrokken, moeten de dieren opnieuw worden getest op basis van monsters die ten minste twee weken later zijn genomen dan het monster waarvoor geen conclusie werd getrokken.

DEEL B

Opsporing van de ziekteverwekker

Realtime omgekeerde transcriptase-polymerasekettingreactie (rRT-PCR)

Tests voor de opsporing van de ziekteverwekker op basis van nucleïnezuurmethoden moeten referentiestammen detecteren van de negen virusserotypen van AHSV.

De in punt 2.1 beschreven methode is gebaseerd op hoofdstuk 2.5.1, afdeling B, punt 1.2, van de Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, uitgave 2016 zoals goedgekeurd door de World Assembly of Delegates van de OIE in mei 2012.

Elke RT-PCR-detectiemethode die in het kader van Richtlijn 2009/156/EG wordt toegepast voor het testen van monsters (bloed of milt), moet ten minste even gevoelig zijn als de in punt 2 beschreven methoden.

Geïnactiveerde virussen van referentiestammen van de serotypen 1 tot en met 9 kunnen worden betrokken bij het referentielaboratorium van de Europese Unie of het referentielaboratorium van het OIE voor paardenpest, Algete, Spanje.

1. Extractie van viraal RNA

Om een goede reactie te waarborgen, moet uit het monster een AHSV-RNA van hoge kwaliteit worden geëxtraheerd. Voor de extractie van nucleïnezuren uit klinische monsters kunnen uiteenlopende eigen of in de handel verkrijgbare methoden worden gebruikt.

Commerciële kits gebruiken uiteenlopende methoden voor de RNA-isolatie. De meeste berusten op een van de volgende procedures:

- fenol-chloroformextractie van nucleïnezuren,
- adsorptie van nucleïnezuren met filtersysteem,
- adsorptie van nucleïnezuren met magnetische kralen.

Hieronder wordt een voorbeeld van een eigen methode voor RNA-extractie gegeven:

- 1.1. Homogeniseer 1 g weefselmonster in 1 ml denatureringsoplossing (4 M guanidiumthiocynaat, 25 mM natriumcitraat, 0,1 M 2-mercaptoëthanol, 0,5 % sarcosyl).
- 1.2. Voeg na centrifugeren 1 µg gist-RNA, 0,1 ml 2 M natriumacetaat pH 4, 1 ml fenol en 0,2 ml chloroform/isoamylalcoholmengsel (49/1) toe aan het supernatant.
- 1.3. Schud de suspensie krachtig en koel gedurende 15 minuten op ijs.
- 1.4. Na centrifugeren wordt het in de waterfase aanwezige RNA met fenol geëxtraheerd, met ethanol geprecipiteerd en weer in suspensie gebracht in steriel water.

2. Realtime RT-PCR-procedure

- 2.1. *Groepspecifieke realtime RT-PCR door Agüero et al., 2008 ⁽¹⁾*

Deze groepspecifieke realtime RT-PCR is bedoeld voor VP7 van AHSV en is geschikt voor het opsporen van alle bekende AHSV-serotypen en -stammen die momenteel circuleren. De methode is met zeer goede resultaten toegepast door de nationale referentielaboratoria van de lidstaten van de Europese Unie die in de periode 2009-2015 aan de jaarlijks door het referentielaboratorium van de Europese Unie georganiseerde proficiency tests hebben deelgenomen. Bovendien scoorde dit protocol in 2015 duidelijk beter dan andere in een internationaal ringonderzoek van het netwerk van OIE-referentielaboratoria.

Primer- en probesequenties voor de detectie van AHSV:

- forward Primer 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- reverse Primer 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'
- MGB-TaqMan probe 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3'

- 2.1.1. Verdun de primerstock tot een werkconcentratie van 8 µM („primerwerkstock 8 µM”) en de probe tot een werkconcentratie van 50 µM („probewerkstock 50 µM”). Ontwerp een lay-out voor de testplaat en laad deze lay-out in de software van het realtime-PCR-apparaat. Pipetteer, met de lay-out als richtsnoer, in elk putje waarin RNA-monsters, positieve en/of negatieve controles zullen worden opgenomen, 2,5 µl van iedere primerwerkstock 8 µM (de uiteindelijke concentratie van de primer in de 20 µl RT-PCR-mix zal 1 µM zijn). Bewaar de plaat op ijs.

⁽¹⁾ Agüero, M., Gomez-Tejedor, C., Angeles Cubillo, M., Rubio, C., Romero, E. en 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. Meng de forward en reverse primers met 2 µl geïsoleerd RNA (testmonsters en positieve controle), of met 2 µl RNase-vrij water in de negatieve reactiecontroles. Denatureer het mengsel door gedurende vijf minuten bij 95 °C te verhitten en koel het vervolgens snel af op ijs gedurende ten minste vijf minuten.
- 2.1.3. Bereid een passende hoeveelheid realtime enkelstaps RT-PCR-mastermix voor het te testen aantal monsters volgens de instructies van de fabrikant. Pipetteer in elk putje waarin RNA-monsters zijn opgenomen 0,1 µl probewerkstock 50 µM (de uiteindelijke concentratie van de probe in elk putje dat RNA-monsters bevat zal 0,25 µM zijn). Pipetteer 13 µl realtime enkelstaps RT-PCR-mastermix in elk putje op de PCR-plaat dat de gedena-tureerde primers en het RNA bevat.
- 2.1.4. Plaats de plaat in een realtime-PCR-apparaat, dat geprogrammeerd is voor omgekeerde transcriptase en cDNA-amplificatie of fluorescentiedetectie. De amplificatie bestaat uit een eerste omgekeerde transcriptase van 25 minuten bij 48 °C, gevolgd door 10 minuten bij 95 °C („hete start”) en 40 cycli van 15 seconden bij 95 °C, 35 seconden bij 55 °C en 30 seconden bij 72 °C (of 40 cycli van 2 seconden bij 97 °C en 30 seconden bij 55 °C indien de gebruikte reagentia en het PCR-apparaat snelle reacties mogelijk maken). De fluorescentiegegevens worden verkregen aan het einde van de 55 °C-stap.
- 2.1.5. De proef wordt als ongeldig beschouwd indien atypische amplificatiecurven worden verkregen. In dat geval moet de proef worden herhaald.

Monsters worden als positieven beschouwd indien de Ct-waarde (het nummer van de cyclus waarin de in een reactie gegenereerde fluorescentie de fluorescentiedrempel overschrijdt) lager is dan of gelijk is aan de gedefinieerde Ct-drempel (35) binnen 40 PCR-cycli ($Ct \leq 35$).

Indien de Ct-waarde van een monster hoger is dan de gedefinieerde Ct-drempel (35) binnen 40 PCR-cycli ($Ct \geq 35$), wordt geen conclusie getrokken.

Monsters worden als negatief beschouwd indien een horizontale amplificatiecurve wordt verkregen die de drempellijn niet binnen 40 PCR-cycli snijdt.

2.2. Groepspecifieke realtime RT-PCR door Guthrie et al., 2013 ⁽¹⁾

Realtime RT-PCR waarbij FRET-probes worden gebruikt voor de detectie van nuceïnezuur van AHSV.

De beschreven RT-PCR-proef voor AHSV is ontworpen op basis van sequenties uit zeer uiteenlopende thans circulerende veldstammen van AHSV (Quan et al., 2010 ⁽²⁾). Om de goede werking van de proefonderdelen te verifiëren, wordt ook gebruikgemaakt van een synthetische externe controleproef waarop eigendomsrechten rusten.

De kits voor de realtime enkelstaps PCR zijn in de handel verkrijgbaar. Hieronder worden enkele basisstappen weergegeven zoals beschreven door Guthrie et al. (2013); deze kunnen aan de behoeften ter plaatse of per geval, de gebruikte kits en de beschikbare apparatuur worden aangepast.

Primer- en probesequenties voor de detectie van AHSV:

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

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

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

- 2.2.1. Bereid mengoplossingen van de primers en de probe in een 25×-concentratie: 5 µM voor de forward en reverse primers en 3 µM voor de probe. Ontwerp een lay-out voor de testplaat en laad deze lay-out in de software van het realtime-PCR-apparaat. Pipetteer, met de lay-out als richtsnoer, 5 µl van de RNA-monsters (zowel testmonsters als positieve en negatieve controles) in de relevante putjes van de plaat.
- 2.2.2. Denatureer het RNA door gedurende vijf minuten bij 95 °C te verhitten en koel het vervolgens snel af op ijs gedurende ten minste drie minuten.

⁽¹⁾ Guthrie, A.J., MacLachlan, N.J., Joone, C., Lourens, C.W., Weyer, C.T., Quan, M., Monyai, M.S., Gardner, I.A., *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. Bereid een passende hoeveelheid realtime enkelstaps RT-PCR-mastermix voor het te testen aantal monsters volgens de instructies van de fabrikant. Voeg 1 µl van de 25×-stockoplossing van het primer-probemengsel (uit punt 2.2.1) toe aan de mastermix, zodat in elk putje een uiteindelijke concentratie van 200 nM voor elke primer en 120 nM voor de probe wordt bereikt. Pipetteer 20 µl mastermix in elk putje op de PCR-plaat dat het gedena-tureerde RNA bevat.
- 2.2.4. Plaats de plaat in een realtime-PCR-apparaat, dat geprogrammeerd is voor omgekeerde transcriptase en cDNA-amplificatie of fluorescentiedetectie overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikanten. De amplificatie bestaat uit, bijvoorbeeld, een eerste omgekeerde transcriptase van tien minuten bij 48 °C, gevolgd door tien minuten bij 95 °C en 40 cycli van 15 seconden bij 95 °C en 45 seconden bij 60 °C.
- 2.2.5. Monsters worden als positieven beschouwd indien bij de RT-PCR-proef voor AHSV in alle replicaten de genormaliseerde fluorescentie binnen 36 PCR-cycli de drempel van 0,1 overschrijdt.

Indien voor monsters bij de RT-PCR-proef voor AHSV in een of meer replicaten de genormaliseerde fluorescentie tussen 36 en 40 PCR-cycli de drempel van 0,1 overschrijdt, wordt geen conclusie getrokken.

Monsters worden als negatief beschouwd indien bij de RT-PCR-proef voor AHSV in alle replicaten de genormaliseerde fluorescentie niet binnen 40 PCR-cycli de drempel van 0,1 overschrijdt en indien de genormaliseerde fluorescentie voor de synthetische externe controleproef waarop eigendomsrechten rusten, binnen 33 PCR-cycli de drempel van 0,1 overschrijdt.”
