

32002D0160

23.2.2002

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 53/37

DECYZJA KOMISJI

z dnia 21 lutego 2002 r.

zmieniająca załącznik D do dyrektywy Rady 90/426/EWG w odniesieniu do badań diagnostycznych dotyczących afrykańskiego pomoru koni

(notyfikowana jako dokument nr C(2002) 556)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

(2002/160/WE)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 90/426/EWG z dnia 26 czerwca 1990 r. w sprawie wymagań dotyczących zdrowia zwierząt, regulujących przemieszczanie i przywóz zwierząt z rodziny koniowatych z państw trzecich⁽¹⁾, ostatnio zmienioną decyzją 2001/298/WE⁽²⁾, w szczególności jej art. 23,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Załącznik D do dyrektywy 90/426/EWG opisuje badanie na odczyn wiązania dopełniacza, przeprowadzane w celu zdiagnozowania afrykańskiego pomoru koni.
- (2) W listopadzie 2000 r. laboratorium referencyjne Wspólnoty w Algete w Hiszpanii było gospodarzem corocznego spotkania przedstawicieli krajowych laboratoriów referencyjnych ds. afrykańskiego pomoru koni Państw Członkowskich UE. Podczas spotkania przedstawiono naukowe dowody, że odczyn wiązania dopełniacza opisany obecnie w załączniku D do dyrektywy 90/426/EWG charakteryzuje się poważnymi ograniczeniami, w szczególności ze względu na fakt, iż nadaje się jedynie do wykrywania przeciwciał po wystąpieniu infekcji lub po szczepieniu. Ponadto badania te zostały w praktyce wyparte przez nowoczesne testy ELISA w prawie wszystkich laboratoriach znajdujących się na terytorium Wspólnoty oraz w głównych krajach wywozu.
- (3) Zaakceptowane na szczeblu międzynarodowym badania laboratoryjne mające na celu wykrycie przeciwciał wirusa afrykańskiego pomoru koni zostały opisane w

Podręczniku norm do badań diagnostycznych i szczepionek⁽³⁾ Międzynarodowego Urzędu Epizootii (OIE); niemniej jednak aktualne wydanie wymienia tylko jeden z dostępnych testów ELISA.

- (4) W związku z powyższym właściwe wydaje się wprowadzenie zmian do załącznika D do dyrektywy 90/426/EWG celem uwzględnienia rozwoju technicznego i norm zatwierdzonych na szczeblu międzynarodowym.
- (5) Środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodne z opinią Stałego Komitetu Weterynaryjnego,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

Artykuł 1

Załącznik D do dyrektywy 90/426/EWG zastępuje się Załącznikiem do niniejszej decyzji.

Artykuł 2

Niniejsza decyzja skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 21 lutego 2002 r.

W imieniu Komisji

David BYRNE

Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. L 224 z 18.8.1990, str. 42.⁽²⁾ Dz.U. L 102 z 12.4.2001, str. 63.⁽³⁾ Rozdział 2.1.11, wydanie czwarte 2000.

ZAŁĄCZNIK

„ZAŁĄCZNIK D

AFRYKAŃSKI POMÓR KONI

DIAGNOZA

Odczynniki chemiczne niezbędne do wykonania testów immunoabsorpcji enzymozależnej (ELISA) opisanych poniżej można otrzymać z laboratorium referencyjnego Wspólnoty lub z laboratoriów referencyjnych OIE zajmujących się afrykańskim pomorem koni.

1. KOMPETYCYJNY TEST ELISA W CELU WYKRYCIA PRZECIWCIAŁ WIRUSA AFRYKAŃSKIEGO POMORU KONI (ASHV) (TEST ZALECANY)

Kompetycyjny test ELISA stosuje się w celu wykrycia szczególnego rodzaju przeciwciał ASHV w surowicy wszystkich gatunków zwierząt z rodziny koniowatych. Surowica odpornościowa świnki morskiej (zwana dalej surowicą odpornościową świnki morskiej) o szerokim zasięgu, poliklonalna, odporna na ASHV, umożliwi wykrycie wszystkich znanych serotypów wirusa AHSV.

Podstawę testu stanowi przerwanie reakcji między antygenem AHSV i surowicą odpornościową świnki morskiej przez próbkę testową surowicy. Przeciwciała AHSV w próbce surowicy będą konkurować z przeciwciałami pochodzącymi z surowicy odpornościowej świnki morskiej, w wyniku czego nastąpi osłabienie oczekiwanego koloru (następujące po dodaniu enzymu oznaczonego jako przeciwciało i substrat surowicy odpornościowej świnki morskiej). Surowica może być testowana w pojedynczym roztworze 1-5 (metodą testu plamkowego) lub za pomocą miareczkowania (metoda miareczkowania surowicy). Wartości wyhamowania procesu powyżej 50 % można potraktować jako wynik pozytywny.

Protokół testowy opisany poniżej jest wykorzystywany w regionalnym laboratorium referencyjnym zajmującym się afrykańskim pomorem koni w Pibright w Zjednoczonym Królestwie.

1.1. Procedura testowania

1.1.1. Przygotowanie płytek

1.1.1.1. Pokryć płytki ELISA antygenem AHSV, wyekstrahowanym z zainfekowanych hodowli komórek i rozpuszczonym w węglowym/dwuwęglowym roztworze buforowym o pH równym 9,6. Płytki inkubować przez całą noc w temperaturze 4 °C.

1.1.1.2. Umyć płytki trzykrotnie zanurzając w buforowanym roztworze chlorku sodu, fosforanu sodu i fosforanu potasu (PBS), pH 7,2-7,4, opróżniając jednocześnie baseniki, wysuszyć na materiale adsorpcyjnym.

1.1.2. Baseniki kontrolne

1.1.2.1. Miareczkować pozytywną kontrolę surowicy w podwójnych seriach rozcieńczenia 1 do 5 do 1 do 640 w poprzek kolumny 1 w buforze blokującym (PBS zawierającym 0,05 % (v/v) Tween-20, 5,0 % (v/v) odłuszczonego mleka w proszku (Cadbury's Marvel™) i 1 % (v/v) surowicy dorosłego żywca wołowego, co w rezultacie ma stanowić 50 µl/basenik.

1.1.2.2. Dodać 50 µl kontrolnej surowicy (wynik negatywny) w roztworze od 1 do 5 (10 µl surowicy + 40 µl buforu blokującego) do baseników A i B drugiej kolumny.

1.1.2.3. Dodać 100 µl/basenik buforu blokującego do baseników C i D w kolumnie 2 (obojętne).

1.1.2.4. Dodać 50 µl buforu blokującego do baseników E, F, G i H w kolumnie 2 (kontrola świnki morskiej).

1.1.3. Metoda testu plamkowego

1.1.3.1. Dodać roztwór 1 do 5 każdej z testowych surowic w buforze blokującym w celu zduplikowania baseników z kolumn 3-12 (10 µl surowicy + 40 µl buforu blokującego).

lub

1.1.4. Metoda miareczkowania surowicy

1.1.4.1. Przygotować podwójne serie roztworów każdej z próbek testowych (1 do 5 do 1 do 640) w roztworze buforowym w 8 basenikach każdej z kolumn 3-12.

następnie

1.1.5. Dodać 50 µl surowicy odpornościowej świnki morskiej, rozpuszczonej wcześniej w buforze blokującym do każdego baseniku, poza tymi obojętnymi przypisanymi do testu ELISA (w każdym baseniku powinno się znajdować 100 µl).

1.1.5.1. Inkubować przez godzinę w temperaturze 37 °C w wytrząsarce obrotowej.

1.1.5.2. Umyć płytki trzykrotnie i osuszyć jak poprzednio.

- 1.1.5.3. Dodać do każdego baseniku 50 µl królicze anty-IgG świnek morskich znaczone peroksydazą chrzanową, rozpuszczonej wcześniej w roztworze buforowym.
- 1.1.5.4. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C w wytrząsarce obrotowej.
- 1.1.5.5. Umyć płytki trzykrotnie i osuszyć jak poprzednio.

1.1.6. *Chromogen*

Przygotować roztwór chromogenu OPD (OPD = ortofenylo-diamina) zgodnie ze wskazówkami producenta (0,4 mg/ml w sterylnej destylowanej wodzie) bezpośrednio przed użyciem. Dodać substraty (wodę utlenioną = H₂O₂), aby otrzymać ostateczne stężenie 0,05 % (v/v) (1 do 2000 w 30-procentowym roztworze H₂O₂). Dodać 50 µl roztworu OPD do każdego baseniku i pozostawić płytki na 10 minut w umiarkowanej temperaturze. Powstrzymać reakcję, dodając 50 µl/basenik 1M kwasu siarkowego(H₂SO₄).

1.1.7. *Odczyt wyniku*

Odczytywać spektrofotometrycznie na 492 nm.

1.2. **Sposób prezentowania wyników**

- 1.2.1. Używając pakietu oprogramowania, wydrukować wartości gęstości optycznej (OD) oraz procent zahamowania (PI) dla testowanej i kontrolnej surowicy w odniesieniu do wartości średniej policzonej na podstawie odnotowanych wyników czterech basenikach kontrolnych świnki morskiej. Odnotowane wartości OD i PI pozwolą ustalić, czy wyniki testu mieszczą się w akceptowalnych granicach. Wartość górnej granicy kontrolnej (UCL) i niższej granicy kontrolnej (LCL) gęstości optycznej dla świnki morskiej to odpowiednio 1,4 i 0,4. Graniczne miano roztworu miareczkowanego dla pozytywnych próbek kontrolnych, gdzie bazą jest PI = 50 % powinno wynosić 1 do 240 (w zakresie od 1 do 120 do 1 do 480). Każda płytka, która nie spełnia powyższych kryteriów, musi zostać odrzucona. Niemniej jednak, gdy miano roztworu surowicy kontrolnej jest wyższe od 1 do 480, a próbki testowe dają w dalszym ciągu wyniki negatywne, mogą one zostać zaakceptowane.

Podwojenie baseników z negatywną surowicą kontrolną i podwojone baseniki obojętne powinny dawać odpowiednio wyniki PI między + 25 % i – 25 % oraz + 95 % i + 105 %. Niespełnienie powyższych kryteriów nie unieważnia wyniku pochodzącego z danej płytki, ale sugeruje, że kolor tła cały czas się zmienia.

- 1.2.2. Próg diagnozy (wartość zahamowania) dla testu surowicy to 50 % (PI 50 %). Próbki dające wynik PI powyżej 50 % należy uznać za pozytywne. Próbki, w przypadku gdy PI jest mniejsze od 50 %, są negatywne.

Próbki w przypadku, których wartości PI są różne w podwojonych basenikach, raz powyżej progu a innym razem poniżej, uznaje się za niewiarygodne. Takie próbki można testować ponownie metodą testu plamkowego bądź miareczkowania. Próbki pozytywne mogą zostać poddane miareczkowaniu w celu określenia stopnia, w jakim ich wynik jest pozytywny.

Wzór testu metoda plamkową

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kont.		Badane surowice									
A	1:5	– kont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	– kont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	próba ślepa										
D	1:40	próba ślepa										
E	1:80	ŚM kontrola										
F	1:160	ŚM kontrola										
G	1:320	ŚM kontrola	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	ŚM kontrola	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- kont. = kontrola negatywna
+ kont. = kontrola pozytywna
ŚM kontrola = kontrola świnki morskiej

Badane surowice

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kont.		Badane surowice									
A	1:5	– kont.	1:5									1:5
B	1:10	– kont.	1:10									1:10
C	1:20	próba ślepa	1:20									1:20
D	1:40	próba ślepa	1:40									1:40
E	1:80	ŚM kontrola	1:80									1:80
F	1:160	ŚM kontrola	1:160									1:160
G	1:320	ŚM kontrola	1:320									1:320
H	1:640	ŚM kontrola	1:640									1:640

- kont. = kontrola negatywna
+ kont. = kontrola pozytywna
ŚM kontrola = kontrola świniki morskiej

2. TEST POŚREDNI ELISA W CELU WYKRYCIA PRZECIWCIAŁ WIRUSA AFRYKAŃSKIEGO POMORU KONI (AHSV) (TEST ZALECANY)

Test opisany poniżej jest zgodny z opisem w rozdziale 2.1.11 *Podręcznika norm dla badań diagnostycznych i szczepionek OIE*, wydanie czwarte, 2000 r.

Zrekombinowane białko VP7 zostało wykorzystane jako antygen dla przeciwciał wirusa AHS ze względu na wysoki współczynnik czułości i specyficzności. Innymi zaletami są jego stabilność i to, że nie jest zaraźliwy.

2.1. Procedura testowania

2.1.1. Faza stała

2.1.1.1. Płytki ELISA pokrywa się odczynnikami AHSV-4 VP7, rozpuszczonym w węglowym/dwuwęglanym buforze, pH 9,6. Płytki inkubować przez całą noc w temperaturze 4 °C.

2.1.1.2. Umyć płytki pięć razy destylowaną wodą zawierającą 0,01 % (v/v) Tween 20 (roztwór do mycia). Delikatnie postukać o materiał adsorpcyjny, w celu usunięcia pozostałości po myciu.

2.1.1.3. Zblokować płytki buforowanym roztworem chlorku sodu, fosforanu sodu i fosforanu potasu (PBS) + 5 % (w/v) odtłuszczonego mleka (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl/basenik przez 1 godzinę, w temperaturze 37 °C.

2.1.1.4. Usunąć roztwór blokujący, delikatnie stukając o materiał adsorpcyjny.

2.1.2. Próbkki testowe

2.1.2.1. Próbkki surowicy przeznaczone do testowania oraz pozytywną i negatywną surowicę kontrolną rozpuszcza się w stosunku 1 do 25 w PBS + 5 % (w/v) odtłuszczonego mleka + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl/basenik. Inkubować przez godzinę w temperaturze 37 °C.

Do miareczkowania przygotować podwójne serie roztworów, poczynawszy od stosunku 1 do 25 (100 µl/basenik), jedna płytka z surowicą na kolumnę, te same czynności należy wykonać w przypadku kontroli negatywnych i pozytywnych. Inkubować przez godzinę w temperaturze 37 °C.

2.1.2.2. Umyć płytki zgodnie z opisem w pkt 2.1.1.2.

2.1.3. Koniugat

2.1.3.1. Sporządzić 100 µl/basenik perydorską chrzanową (HRP) – znaczną antykońską IgG gamma – globuliną rozpuszczoną w PBS + 5 % mleka + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Inkubować przez godzinę w temperaturze 37 °C.

2.1.3.2. Umyć płytki zgodnie z opisem w pkt 2.1.1.2.

2.1.4. Chromogen/substrat

- 2.1.4.1. Dodać 200 µl na basenik roztworu chromogenu/substratu (10 ml z 80,6 mM DMAB (dimetyloaminobenzaldehyd) + 10 ml w 1,56 mM MBTH (chlorowodorek hydrazonu 3-metylo-2-benzo-tiazoliny) + 5 µl H₂O₂).

Rozwój koloru zostanie powstrzymany poprzez dodanie 50 µl 3N H₂SO₄ po około 5-10 minutach (przed momentem, w którym negatywna kontrola zaczyna nabierać koloru).

Można stosować również inne chromogeny, takie jak ABTS (2,2'-azyno-bis-[3-etylbentotiazolina-6-kwasu sulfonowego]), TMB (tetrametylobebzydyna), lub OPD (orthofenyldiamina).

- 2.1.4.2. Odczytu płytek dokonywać na 600 nm (lub 620 nm).

2.2. Interpretacja wyników

- 2.2.1. Ustalić wartość krytyczną, dodając 0,6 do wartości negatywnej kontroli (0,6 to odchylenie standardowe policzone na 30-elementowej grupie próbek negatywnej surowicy).
- 2.2.2. Próbkę, których wartości absorpcji są niższe od wartości krytycznej, uznawane są za negatywne.
- 2.2.3. Próbkę, których wartości absorpcji są niższe od wartości krytycznej powiększonej o + 0,15, uznawane są za pozytywne.
- 2.2.4. Próbkę, których wartość absorpcji jest umiarkowana, są niewiarygodne i należy wtedy zastosować drugą technikę w celu potwierdzenia wyników.

3. TEST BLOKUJĄCY ELISA W CELU WYKRYCIA PRZECIWCIAŁ WIRUSA AFRYKAŃSKIEGO POMORU KONI (AHSV) (TEST ZALECANY)

Ten test został zaprojektowany w celu wykrywania określonych przeciwciał AHSV w surowicy dowolnego podejrzanego gatunku. VP7 jest głównym, antygenicznym, białkiem wirusowym AHSV i występuje w dziewięciu typach surowiczych. Przeciwciała monoklonalne (Mab) jest także skierowane przeciwko VP7, badanie charakteryzuje się wysokim poziomem czułości i specyficzności. Ponadto zrekombinowane przeciwciała VP7 jest całkowicie nieszkodliwe, co gwarantuje wysoki stopień bezpieczeństwa.

Test opiera się na przerwaniu reakcji między rekombinantem VP7, wraz z momentem skierowania antygeny na płytkę przeznaczoną na badanie ELISA, a zespolonym przeciwciałem monoklonalnym (Mab) właściwym dla VP7. Przeciwciała w testowej surowicy zablokuje reakcję między antygenem a przeciwciałem monoklonalnym (Mab), co w rezultacie zredukuję intensywność koloru.

Test opisany poniżej jest przeprowadzany w laboratorium referencyjnym Wspólnoty Europejskiej zajmującym się afrykańskim pomorem koni w Algete, w Hiszpanii.

3.1. Procedura testowania

3.1.1. Płytki ELISA

- 3.1.1.1. Pokryć płytkę substratem AHSV-4 VP7 rozpuszczonym w węglowym/dwuwęglowym buforze, pH 9,6. Inkubować przez całą noc w temperaturze 4 °C.
- 3.1.1.2. Umyć płytkę pięciokrotnie w buforowanym roztworze chlorku sodu, fosforanu sodu i fosforanu potasu (PBS) zawierającym 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST).
- 3.1.1.3. Ustabilizować płytkę, wykorzystując roztwór stabilizujący (w celu umożliwienia długotrwałego przechowywania w temperaturze 4 °C bez utraty aktywności) i wysuszyć na materiale absorpcyjnym.

3.1.2. Próbkę testowe i kontrole

- 3.1.2.1. W celu przesiewu: rozpuścić surowicę testową i kontrolną w stosunku 1 do 10 bezpośrednio na płytce w PBST tak, aby otrzymać 100 µl/basenik. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.
- 3.1.2.2. W celu miareczkowania: przygotować podwójne serie roztworów surowicy oraz kontroli pozytywnych (100 µl/basenik), poczynawszy od stosunku 1 w 10 do 1 w 280 w ośmiu basenikach. Kontrola negatywna testowana jest w roztworze 1 do 10.

3.1.3. *Koniugat*

Dodać 50 µl/basenik przed rozcieńczeniem peroksydozy chrzanowej (HRP) znaczonej Mab (monoklonalne przeciwciała właściwe dla VP7) do każdego baseniku i wymieszać delikatnie do uzyskania jednorodności. Inkubować przez 30 min w temperaturze 37 °C.

3.1.4. Umyć płytki pięciokrotnie w PBST i osuszyć jak wyżej.

3.1.5. *Chromogen/substrat*

Dodać 100 µl/basenik roztwór chromogenu/substratu (1ml ABTS (2,2'-Azyno-bis-[6-kwas sulfonowy 3-ethylbenzotiazoliny]) 5 mg/ml + 9 ml buforu substratu (0,1 M buforu cytrynianu fosforanu o pH = 4, zawierającego 0,03 % H₂O₂) i inkubować przez 10 min w temperaturze pokojowej. Rozwój koloru zatrzymuje się przez dodanie 100 µl/basenik 2 % (w/v) SDS (dodecylosiarczan sodu).

3.1.6. *Odczyt*

Odczytywać na 405 nm czytnika ELISA.

3.2. **Interpretacja wyników**

3.2.1. *Sprawdzanie ważności badania*

Test jest ważny, jeżeli optyczna gęstość (OD) kontroli negatywnej (NC) jest większa niż 1,0, a w przypadku pozytywnych (PC) OD jest mniejsze niż 0,2.

3.2.2. *Wskaźniki*

Pozytywny wskaźnik = $NC - [(NC - PC) \times 0,3]$

Negatywny wskaźnik = $NC - [(NC - PC) \times 0,2]$

Gdzie NC to wartość optycznej gęstości dla kontroli negatywnej (OD), a PC stanowi wartość (OD) dla kontroli pozytywnej.

3.2.3. *Interpretacja wyników*

W przypadku próbki z OD niższą od wartości pozytywnego wskaźnika, wynik należy uznać za pozytywny i przyjąć, że antyciała AHSV są obecne.

Próbki z OD wyższą od wartości negatywnego wskaźnika należy uznać za pozbawione przeciwciał AHSV (wynik negatywny).

Próbki, w przypadku których wyniki OD mieszczą się między wartościami pozytywnego i negatywnego wskaźnika, należy uznać za niewiarygodne i pobrać ponownie próbki od zwierząt po upływie od dwóch do trzech tygodni."
