32002D0160

23.2.2002 ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV L 53/37

ROZHODNUTIE KOMISIE

z 21. februára 2002,

ktorým sa mení a dopĺňa príloha D smernice Rady 90/426/EHS v oblasti diagnostických skúšok na africký mor koní

(oznámené pod číslom dokumentu C(2002) 556)

(Text s významom pre EHP)

(2002/160/ES)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 90/426/EHS z 26. júna 1990 o zdravotných podmienkach zvierat, ktorá upravuje pohyb a dovoz koní z tretích krajín ([1]), naposledy zmenenú a doplnenú rozhodnutím 2001/298/ES ([2]), najmä na jej článok 23,

keďže:

(1) príloha D k smernici 90/426/EHS opisuje doplnkový fixačný test, ktorý sa vykonáva pri diagnostike afrického moru koní;

(2) v novembri 2000 referenčné laboratórium spoločenstva v Algete v Španielsku zorganizovalo výročné stretnutie národných referenčných laboratórií členských štátov EÚ pre africký mor koní. Počas tohto stretnutia sa prezentoval vedecký dôkaz o tom, že doplnkový fixačný test, ktorý je v súčasnosti opísaný v prílohe D k smernici 90/426/EHS, má vážne nedostatky predovšetkým preto, lebo je vhodný len na zisťovanie protilátok po poslednej infekcii alebo vakcinácii. Okrem toho sa tento test v praxi nahrádza modernými skúškami ELISA v takmer všetkých laboratóriách v spoločenstve a tiež vo väčšine krajín vývozu;

(3) medzinárodne uznané laboratórne skúšky na zisťovanie protilátok proti vírusu afrického moru koní sú opísané v *Manuáli noriem pre diagnostické skúšky a vakcíny* ([3]) Medzinárodného epizootického úradu (OIE); aktuálne vydanie však uvádza len jednu z možných skúšok ELISA;

(4) preto je vhodné zmeniť alebo doplniť prílohu D k smernici 90/426/EHS tak, aby zohľadňovala technický vývoj a medzinárodne uznané normy;

(5) opatrenia v tomto rozhodnutí sú v súlade so stanoviskom Stáleho veterinárneho výboru,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

Článok 1

Príloha D k smernici 90/426/EHS sa nahrádza prílohou k tomuto rozhodnutiu.

Článok 2

Toto rozhodnutie je adresované členským štátom.

V Bruseli 21. februára 2002

Za Komisiu

David BYRNE

člen Komisie

([1]) Ú. v. ES L 224, 18.8.1990, s. 42.
([2]) Ú. v. ES L 102, 12.4.2001, s. 63.
([3]) Kapitola 2.1.11., štvrté vydanie 2000.

PRÍLOHA

„PRÍLOHA D

AFRICKÝ MOR KONÍ

DIAGNÓZA

Uvedené reagenty na metódu ELISA je možné získať z referenčného laboratória Európskeho spoločenstva alebo z referenčného laboratória OIE pre africký mor koní.

1. KONKURENČNÁ ELISA NA ZISŤOVANIE PROTILÁTOK PROTI VÍRUSU AFRICKÉHO MORU KONÍ (AHSV) (PREDPÍSANÁ SKÚŠKA)

Konkurenčná ELISA sa používa na zisťovanie špecifických protilátok AHSV v sére z ktoréhokoľvek druhu koní. Širokospektrálne polyklonálne imúnne anti-AHSV morčacie sérum (ďalej morčacie antisérum) je špecifickou séroskupinou a je schopné zistiť všetky známe sérotypy vírusu AHS.

Princípom skúšky je prerušenie reakcie medzi antigénom AHSV a morčacím antisérom vzorkou testovaného séra. Protilátky AHSV vo vzorke séra budú konkurovať tým v morčacom antisére, čoho výsledkom je zníženie očakávaného sfarbenia (po pridaní enzýmom označenej anti-morčacej protilátky a substrátu). Sérum sa môže vyšetriť v jedinom roztoku 1:5 (metóda kvapkovej skúšky) alebo sa môže titrovať (metóda titrácie séra) s cieľom stanovenia koncových bodov riedenia. Inhibičné hodnoty vyššie než 50 % je možné považovať za pozitívne.

Nižšie opísaný protokol sa používa v regionálnom referenčnom laboratóriu pre africký mor koní v meste Pirbright v Spojenom kráľovstve.

1.1. **Postup skúšky**

1.1.1. *Príprava platničiek*

1.1.1.1. Platničky ELISA pokryte antigénom AHSV extrahovaným z infikovaných bunkových kultúr a zriedeným v tlmiacom karbonátovom/bikarbonátovom roztoku, pH 9,6. Inkubujte platničky ELISA cez noc pri 4 °C.

1.1.1.2. Platničky trikrát premyte fosfátovým tlmivým soľným roztokom (PBS), pH 7,2 až 7,4 pH a vysušte na savom papieri.

1.1.2. *Kontrolné jamky*

1.1.2.1. V prvom stĺpci titrujte pozitívne kontrolné séra v dvojnásobných riedeniach od 1:5 až do 1:640 v blokujúcom tlmivom roztoku (PBS obsahujúce 0,05 % (v/v) Tween-20, 5,0 % (w/v) sušeného odstredeného mlieka (Cadbury's Marvel™) a 1 % (v/v) séra dospelého hovädzieho dobytka) na získanie konečného objemu 50 µl/jamka.

1.1.2.2. Pridajte 50 µl na jamku negatívneho kontrolného séra zriedeného na 1:5 (10 µl sérum + 40µl blokujúceho tlmivého roztoku) do jamiek A a B stĺpca 2.

1.1.2.3. Pridajte 100 µl na jamku blokujúceho tlmivého roztoku do jamiek C a D stĺpca 2 (prázdny).

1.1.2.4. Pridajte 50 µl blokujúceho tlmivého roztoku do jamiek E, F, G a H stĺpca 2 (kontrolné morčacie sérum).

1.1.3. *Metóda kvapkovej skúšky*

1.1.3.1. Pridajte z každého testovaného séra riedeného 1:5 v blokujúcom tlmivom roztoku do dvoch jamiek stĺpcov 3 až 12 (10 µl séra + 40 µl blokujúceho tlmivého roztoku).

alebo

1.1.4. *Metóda titrácie séra*

1.1.4.1. Pripravte dvojnásobné riedenia z každej vzorky (od 1:5 až do 1:640) v blokujúcom tlmivom roztoku cez osem jamiek jednotlivých stĺpcov (3 až 12),

potom

1.1.5. Pridajte 50 µl morčacieho antiséra rozpusteného v blokujúcom tlmivom roztoku do všetkých jamiek platničky ELISA okrem prázdnych (všetky jamky teraz obsahujú konečný objem 100 µl).

1.1.5.1. Inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C na orbitálnej trepačke.

1.1.5.2. Platničky trikrát premyte a vysušte ako predtým.

1.1.5.3. Do každej jamky pridajte 50 µl králičieho anti-morčacieho chrenového peroxidázového konjugátu (HRP) riedeného v blokujúcom tlmivom roztoku.

1.1.5.4. Inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C na orbitálnej trepačke.

1.1.5.5. Platničky trikrát opláchnite a vysušte ako predtým.

1.1.6. *Chromogén*

Tesne pred použitím pripravte chromogénový roztok OPD (OPD = orto-fenyldiamín) podľa návodu výrobcov (0,4 mg/ml v sterilnej destilovanej vode). Pridajte substrát (peroxid vodíka = H_2O_2), aby ste dostali konečnú koncentráciu 0,05 % (v/v) (1 v 2000 30 % roztoku H_2O_2). Pridajte 50µl roztoku OPD do každej jamky a ponechajte platničky na stole asi 10 minút pri izbovej teplote. Zastavte reakciu pridaním 50 µl 1 M kyseliny sírovej (H_2SO_4) do každej jamky.

1.1.7. *Odčítanie*

Odčítajte spektrofotometricky pri 492 nm.

1.2. **Interpretácia výsledkov**

1.2.1. Pomocou počítačového programu určite hodnoty optickej hustoty (OD) a percentuálnej inhibície problematických sér a kontrolných sér na základe strednej hodnoty, ktorá sa zaznamenala v štyroch kontrolných jamkách obsahujúcich sérum morčaťa. Údaje vyjadrené ako hodnoty OD a PI sa použijú na stanovenie toho, či sa skúška vykonala v prijateľnom rozmedzí. Horné kontrolné hodnoty (UCL) a dolné kontrolné hodnoty (LCL) kontrolných sér morčaťa sa pohybujú medzi hodnotami OD 1,4 a 0,4 v uvedenom poradí. Koncovým riedením pri pozitívnej skúške založenej na 50 % PI by mal byť 1:240 (v rámci intervalu od 1:120 do 1:480). Každá platnička, pri ktorej sa ukáže, že nevyhovuje horeuvedeným kritériám, sa musí odmietnuť. Ak je však titer pozitívneho skúšobného séra väčší než 1:80 a skúšobné vzorky sú stále negatívne, potom je možné negatívne skúšobné vzorky akceptovať.

Dvojice jamiek s negatívnym kontrolným sérom a dvojice prázdnych jamiek by mali zaznamenať hodnoty PI medzi + 25 % a – 25 % a medzi + 95 % a + 105 %. Chyba v rámci týchto limitov neznamená, že je výsledok nesprávny, ale vyjadruje, že sa podkladová farba vyvíja.

1.2.2. Diagnostickou medznou hodnotou (hodnota cut-off) pri skúšobných sérach je 50 % (PI 50 %). Vzorky, pri ktorých sa zaznamenali hodnoty PI väčšie než 50 %, sú pozitívne. Vzorky, pri ktorých sa zaznamenali hodnoty PI nižšie než 50 %, sú zaznamenané ako negatívne.

Vzorky, ktoré v dvojiciach jamiek zaznamenávajú hodnoty PI nad alebo pod medznou hodnotou, sa považujú za nejednoznačné. Takého vzorky je možné opätovne podrobiť kvapkovej skúške alebo titrácii. Pozitívne vzorky je možné tiež titrovať na stanovenie stupňa pozitivity.

Nákres kvapkovej skúšky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve cont		skúšobné séra									
A	1:5	– ve cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	– ve cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	slepý										
D	1:40	slepý										
E	1:80	GP cont.										
F	1:160	GP cont.										
G	1:320	GP cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	GP cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- ve cont = negatívna kontrola
+ ve cont = pozitívna kontrola
GP cont = kontrolné morčacie sérum

Skúšobné séra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve cont		skúšobné séra									
A	1:5	– ve cont.	1:5									1:5
B	1:10	– ve cont.	1:10									1:10
C	1:20	slepý	1:20									1:20
D	1:40	slepý	1:40									1:40
E	1:80	GP cont.	1:80									1:80
F	1:160	GP cont.	1:160									1:160
G	1:320	GP cont.	1:320									1:320
H	1:640	GP cont.	1:640									1:640

- ve cont = negatívna kontrola
+ ve cont = pozitívna kontrola
GP cont = kontrolné morčacie sérum

2. NEPRIAMA ELISA PRE ZISŤOVANIE PROTILÁTOK PROTI VÍRUSU AFRICKÉHO MORU KONÍ (AHSV) (PREDPÍSANÁ SKÚŠKA)

Opísaná skúška je v súlade so skúškou opísanou v kapitole 2.1.11. *Manuálu noriem pre diagnostické skúšky a vakcíny OIE*, štvrté vydanie, 2000.

Na stanovenie protilátok proti vírusu AHS sa ako antigén použije rekombinantný VP7 proteín s vysokým indexom citlivosti a osobitosti. Výhodou je aj jeho stabilita a neinfekčnosť.

2.1. **Postup skúšky**

2.1.1. *Fáza tuhosti*

2.1.1.1. Platničky ELISA pokryte rekombinantným AHSV-4 VP7 rozpusteným v karbonátovom/bikarbonátovom tlmivom roztoku, pH 9,6. Platničky inkubujte cez noc pri teplote 4 °C.

2.1.1.2. Platničky opláchnite päťkrát destilovanou vodou obsahujúcou 0,01 % (v/v) Tween 20 (čistiaci roztok). Na odstránenie zvyšnej vody platničky jemne pritlačte na savý materiál.

2.1.1.3. Platničky blokujte fosfátovým slaným tlmivým roztokom (PBS) + 5 % (w/v) odstredeného mlieka (sušené odstredené mlieko Nestlé™), 200 µl/jamka 1 hodinu pri teplote 37 °C.

2.1.1.4. Odstráňte blokujúci roztok a jemne pritlačte platničky na savý materiál.

2.1.2. *Skúšobné vzorky*

2.1.2.1. Testované vzorky séra, pozitívne a negatívne kontrolné séra sa rozpustia 1:25 v PBS + 5 % (w/v) odstredeného mlieka + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl/jamka. Inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

Pri titrácii urobte dvojnásobné riedenie 1:25 (100 µl/jamka), jedno sérum na jeden stĺpec platničky a to isté vykonajte s pozitívnou a negatívnou kontrolou. Inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

2.1.2.2. Platničky premyte tak, ako je to opísané v bode 2.1.1.2.

2.1.3. *Konjugácia*

2.1.3.1. Dajte 100 µl/jamka chrenovej peroxidázy (HRP) konjugovanej s anti-konským gama-globulínom rozpusteným v PBS + 5 % mlieku + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

2.1.3.2. Platničky premyte tak, ako je to opísané v bode 2.1.1.2.

2.1.4. *Chromogén/substrát*

2.1.4.1. Pridajte 200 µl/jamku chromogénového/substrátového roztoku (10 ml 80,6 mM DMAB (dimetyl aminobenzaldehyd) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-metyl-2-benzo-tiazolin hydrazon hydrochlorid) + 5 µl H_2O_2)

Vyvolávanie farby sa zastaví pridaním 50 µl 3N H_2SO_4 po približne 5 až 10 minútach (predtým, ako sa začne sfarbovať negatívna kontrola).

Tiež je možné použiť aj iné chromogény ako ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etylbenzotiazolin-6- kyselina sulfónová], TMB (tetrametyl benzidín) alebo OPD (orto-fenyldiamín).

2.1.4.2. Odčítajte pri 600 nm (alebo 620 nm).

2.2. **Interpretácia výsledkov**

2.2.1. Vypočítajte medznú hodnotu pripočítaním 0,6 k hodnote negatívnej kontroly (0,6 je štandardná odchýlka odvodená zo skupiny 30 negatívnych sér).

2.2.2. Skúšobné vzorky, uvádzajúce absorpčné hodnoty nižšie než je medzná hodnota, sa považujú za negatívne.

2.2.3. Skúšobné vzorky, uvádzajúce absorpčné hodnoty vyššie než je medzná hodnota + 0,15 sa považujú za pozitívne.

2.2.4. Skúšobné vzorky, uvádzajúce prostredné absorpčné hodnoty, sú nerozhodné a na potvrdenie výsledku je potrebné použiť inú metódu.

3. BLOKUJÚCA ELISA NA ZISŤOVANIE PROTILÁTOK PROTI VÍRUSU AFRICKÉHO MORU KONÍ (AHSV) (PREDPÍSANÁ SKÚŠKA)

Blokujúca ELISA je určená na zisťovanie špecifických protilátok AHSV v sérach rôznych vnímavých druhov. VP7 je najvýznamnejším antigénovým vírusovým proteínom AHSV a zachováva sa v rámci deviatich sérotypov. Keďže monoklonálna protilátka (Mab) je tiež namierená proti VP7, daná skúška poskytne vysokú hladinu citlivosti a osobitosti. Rekombinantný VP7 antigén je úplne neškodný, a preto zaručuje vysoký stupeň bezpečnosti.

Princípom skúšky je prerušenie reakcie medzi rekombinantným VP7 ako antigénom naviazaným na platničku ELISA a konjugovanou Mab špecifickou pre VP7. Protilátka v skúšobnom sére zablokuje reakciu medzi antigénom a Mab, čo vyústi do zníženia zafarbenia.

Opísaná skúška sa vykonáva v referenčnom laboratóriu Európskeho spoločenstva pre mor koní v Algete v Španielsku.

3.1. **Postup skúšky**

3.1.1. *Platničky ELISA*

3.1.1.1. Pokryte platničky ELISA rekombinantom AHSV-4 VP7 rozpusteným v karbonátovom/bikarbonátovom tlmivom roztoku, pH 9,6. Inkubujte cez noc pri teplote 4 °C.

3.1.1.2. Platničky päťkrát premyte vo fosfátovom soľnom tlmivom roztoku (PBS) obsahujúcom 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST).

3.1.1.3. Stabilizujte platničku stabilizujúcim roztokom (aby sa umožnilo dlhodobé skladovanie pri teplote 4 °C bez straty činnosti) a usušte savým materiálom.

3.1.2. *Skúšobné vzorky a kontroly*

3.1.2.1. Na preverenie: rozpustite skúšobné séra a kontroly 1:10 priamo na platničke v PBST na dosiahnutie konečného objemu 100 µl/jamka. Inkubujte hodinu pri teplote 37 °C.

3.1.2.2. Na titráciu: pripravte dvojnásobné riedenia skúšobných sér a pozitívnych kontrol (100 µl/jamka) od 1:10 do 1:1 280 cez osem jamiek. Skúška negatívnej kontroly prebieha v roztoku 1:10.

3.1.3. *Konjugácia*

Pridajte 50 µl/jamka riedeného Mab (monoklonálne protilátky špecifické pre VP7) konjugovanou s chrenovou peroxidázou (HRP) do každej jamky a jemne premiešajte, aby sa zaistila homogénnosť. Inkubujte 30 minút pri teplote 37 °C.

3.1.4. Platničky premyte päťkrát s PBST a usušte tak, ako je to opísané vyššie.

3.1.5. *Chromogén/substrát*

Pridajte 100 µl/jamka chromogénového/substrátového roztoku (1 ml ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etylbenzotiazolin-6-kyselina sulfónová]) 5 mg/ml + 9 ml substrátového tlmivého roztoku (0,1 M fosfátového citrátu pH 4 obsahujúci 0,03 % H_2O_2) a inkubujte 10 minút pri izbovej teplote. Vývoj farby sa zastaví pridaním 100 µl/jamka 2 % (w/v) SDS (dodecyl sulfát sodný).

3.1.6. *Odčítanie*

Odčítajte pri 405 nm v snímači ELISA.

3.2. **Interpretácia výsledkov**

3.2.1. *Potvrdenie skúšky*

Skúška je platná, ak je optická hustota (OD) negatívnej kontroly (NC) vyššia než 1,0 a OD pozitívnej kontroly (PC) nižšia než 0,2.

3.2.2. *Výpočet medznej hodnoty*

Pozitívna medzná hodnota = NC – [(NC – PC) x 0,3]

Negatívna medzná hodnota = NC – [(NC – PC) x 0,2]

kde NC je OD negatívnej kontroly a PC je OD pozitívnej kontroly.

3.2.3. *Interpretácia výsledkov*

Vzorky s OD nižším než je pozitívna medzná hodnota, by sa mali považovať za pozitívne k protilátkam AHSV.

Vzorky s OD vyšším než negatívna medzná hodnota by sa mali považovať za negatívne k protilátkam AHSV.

Vzorky s OD medzi týmito dvoma hodnotami by sa mali považovať za nejednoznačné a zvieratám by sa mali odobrať vzorky znovu po dvoch až troch týždňoch."