

KOMMISSIONENS BESLUT**av den 21 februari 2002****om ändring av bilaga D till rådets direktiv 90/426/EEG när det gäller test för diagnostisering av afrikansk hästpest***[delgivet med nr K(2002) 556]***(Text av betydelse för EES)**

(2002/160/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT
DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 90/426/EEG av den 26 juni 1990 om djurhälsovillkor vid förflyttning och import av hästdjur från tredje land ⁽¹⁾, senast ändrat genom direktiv 2001/298/EG ⁽²⁾, särskilt artikel 23 i detta, och

av följande skäl:

- (1) I bilaga D till direktiv 90/426/EEG anges att komplementbindningstesten skall användas för diagnostisering av afrikansk hästpest.
- (2) I november 2000 var gemenskapens referenslaboratorium i Algete i Spanien värd för det årliga mötet mellan medlemsstaternas nationella referenslaboratorier för afrikansk hästpest. Under mötet presenterades vetenskapliga rön som visar att komplementbindningstesten som för närvarande föreskrivs i bilaga D till direktiv 90/426/EEG har begränsningar av allvarlig art eftersom den endast lämpar sig för påvisande av antikroppar en kort tid efter infektion eller vaccination. Dessutom har testen i praktiken redan ersatts av moderna ELISA-tester vid nästan samtliga laboratorier i gemenskapen och även i de större exportländerna.
- (3) Internationellt erkända laboratorietester för påvisande av antikroppar mot afrikansk hästpestvirus finns beskrivna i OIE:s (Internationella byrån för epizootiska sjukdomar)

handbok för diagnostik och vaccination (*Manual of Standards for Diagnosis and Vaccines*) ⁽³⁾. I den nuvarande utgåvan anges emellertid bara en av de ELISA-tester som finns att tillgå.

- (4) Bilaga D till direktiv 90/426/EEG bör därför ändras mot bakgrund av den tekniska utvecklingen och internationellt erkända normer.
- (5) De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från Ständiga veterinärkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilaga D till direktiv 90/426/EEG skall ersättas med bilagan till detta beslut.

Artikel 2

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 21 februari 2002.

På kommissionens vägnar

David BYRNE

Ledamot av kommissionen

⁽¹⁾ EGT L 224, 18.8.1990, s. 42.

⁽²⁾ EGT L 102, 12.4.2001, s. 63.

⁽³⁾ Fjärde utgåvan, 2000, kapitel 2.1.11.

BILAGA

"BILAGA D

AFRIKANSK HÄSTPEST

DIAGNOSTISERING

Reagens till de ELISA-tester (enzyme-linked immunosorbent assays) som beskrivs nedan kan erhållas från Europeiska gemenskapens referenslaboratorium eller från OIE:s referenslaboratorium för afrikansk hästpest.

1. KOMPETITIV ELISA FÖR PÅVISANDE AV ANTIKROPPAR MOT AFRIKANSK HÄSTPESTVIRUS (AHSV) (FÖRE-SKRIVEN TEST)

Kompetitiv ELISA används för att påvisa specifika AHSV-antikroppar i serum från alla arter av hästdjur. Det breda spektriga polyklonala immuna anti-AHSV marsvinsserum (härefter benämmt marsvinsantisera) är serogrupspecifikt och kan påvisa alla kända serotyper av afrikansk hästpestvirus.

Testprincipen är att avbryta reaktionen mellan AHSV-antigen och ett marsvinsantisera med ett testserumprov. AHSV-antikropparna i testserumprovet kommer att konkurrera med antikropparna i marsvinsantisera vilket orsakar en färgreduktion (efter det att enzymermärta antimarsvinsantikroppar och substrat har tillsatts). Serum kan testas i en enkel spädning på 1:5 (spot test-metod) eller kan titreras (serumtitreringsmetod) så att en sluttiter erhålls. Inhibition på mer än 50 % skall ses som positiva.

Nedan beskrivna testprotokoll används vid Regional Reference Laboratory for African horse sickness i Pirbright, Förenade kungariket.

1.1 Testförfarande

1.1.1 Beredning av plattorna

1.1.1.1 Ladda ELISA-plattorna med AHSV-antigen från infekterade cellkulturer i en karbonat/natriumvätekarbonat buffert, pH 9,6. Inkubera ELISA-plattorna vid 4 °C över natten.

1.1.1.2 Tvätta plattorna tre gånger med fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS), pH 7,2–7,4, töm och avlägsna överskottsbuffert med läskpapper.

1.1.2 Kontrollbrunnar

1.1.2.1 Titrera positivt kontrollserum i en tvåfaldig spädningsserie, från 1:5 till 1:640, i kolumn 1 i en blockerande buffert (PBS innehållande 0,05 % (v/v) Tween 20, 5,0 % (w/v) skummjölkspulver (Cadburys Marvel™) och 1 % (v/v) serum från vuxet nötkreatur) så att en slutlig volym på 50 µl/brunn erhålls.

1.1.2.2 Tillsätt 50 µl av negativt kontrollserum i en spädning på 1:5 (10 µl serum + 40 µl blockerande buffert) i brunnarna A och B i kolumn 2.

1.1.2.3 Tillsätt 100 µl blockerande buffert per brunn i brunnarna C och D i kolumn 2 (BLANK).

1.1.2.4 Tillsätt 50 µl blockerande buffert i brunnarna E, F, G och H i kolumn 2 (marsvinskontroll).

1.1.3 Spot test-metod

1.1.3.1 Sätt en spädning på 1:5 av varje testserum i blockerande buffert till två brunnar i kolumnerna 3–12 (10 µl serum + 40 µl blockerande buffert).

eller

1.1.4 Serumtitreringsmetod

1.1.4.1 Preparera en tvåfaldig spädningsserie av varje prov (från 1:5 till 1:640) i blockerande buffert, en brunn per spädning i åtta brunnar i kolumnerna 3–12.

och

1.1.5 Sätt 50 µl marsvinsantisera, som späts i blockerande buffert, till alla brunnar på ELISA-plattorna utom brunnarna som är BLANK (varje brunn skall nu innehålla sammanlagt 100 µl).

1.1.5.1 Inkubera på skak vid 37 °C under en timme.

1.1.5.2 Tvätta plattorna tre gånger och avlägsna överskottsbuffert med läskpapper.

1.1.5.3 Tillsätt 50 µl HRP-konjugerat kanin-antimarsvin som späts med blockerande buffert i varje brunn.

1.1.5.4 Inkubera på skak vid 37 °C under en timme.

1.1.5.5 Tvätta plattorna tre gånger och avlägsna överskottsbuffert med läskpapper.

1.1.6 Kromogen

Preparera kromogen/substrat-lösningen OPD (ortho-phenyldiamine) i enlighet med tillverkarens instruktioner (0,4 mg/ml i sterilt destillerat vatten) strax innan den ska användas. Tillsätt en sådan mängd substrat (väteperoxid = H₂O₂) att den slutliga koncentrationen blir 0,05 % (v/v) (1:2 000 av en 30 %-ig lösning av H₂O₂). Sätt 50 µl OPD-lösning till varje brunn och låt plattorna stå i 10 minuter i rumstemperatur. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 50 µl 1M svavelsyra (H₂SO₄) per brunn.

1.1.7 Avläsning

Avläs spektrofotometriskt vid 492 nm.

1.2 Redovisning av resultaten

1.2.1 Använd ett dataprogram för att skriva ut värden för optisk täthet (optical density, OD) och den procentuella inhibitionen (PI) för test- och kontrollsera på grundval av det medelvärde som erhållits för de fyra marsvinskontrollerna. OD- och PI-värden används för att bedöma testens tillförlitlighet. De övre (UCL) och de undre kontrollgränserna (LCL) för marsvinskontrollen ligger mellan OD-värdena 1,4 respektive 0,4. Titern för den positiva kontrollen som baseras på 50 % PI skall vara 1:240 (mellan 1:120 och 1:480). Plattor som inte uppfyller dessa kriterier skall inte godkännas. Om titern för positivt kontrollserum är högre än 1:480 och proverna fortfarande är negativa kan negativa prover emellertid godtas.

De negativa kontrollerna och blank skall ge PI-värden på mellan + 25 % och - 25 % respektive mellan + 95 och + 105 %. Om resultaten ligger utanför dessa värden betyder detta inte att plattan inte kan godkännas, men att bakgrundsfärg håller på att utvecklas.

1.2.2 Det diagnostiska tröskelvärdet (cut-off-värdet) för testserum är 50 % (PI 50 %). Prov som ger PI-värden på mer än 50 % skall registreras som positiva. Prov som ger PI-värden på mindre än 50 % skall registreras som negativa.

Prov som ger resultat som ligger över eller under tröskelvärdena för kontrollerna skall betraktas som tveksamma. Sådana prov bör testas om med spot test-metoden eller genom titrering. Positiva prover kan också titreras för att bestämma sluttitern.

Spot test-schema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve. Cont		Testserum									
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	Blank										
D	1:40	Blank										
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 = negativ kontroll

+ ve. Cont. = positiv kontroll

GP Cont. = marsvinskontroll

Serumtitreringsschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve. Cont.		Testserum									
A	1:5	– ve. Cont.	1:5									1:5
B	1:10	– ve. Cont.	1:10									1:10
C	1:20	Blank	1:20									1:20
D	1:40	Blank	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. = negativ kontroll

+ ve. Cont. = positiv kontroll

GP Cont. = marsvinsk kontroll

2. INDIREKT ELISA FÖR PÅVISANDE AV ANTIKROPPAR MOT AFRIKANSK HÄSTPESTVIRUS (AHSV) (FÖRESKRIVEN TEST)

Denna test följer testbeskrivningen i kapitel 2.1.11 i OIE:s *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, fjärde utgåvan, 2000.

Rekombinant VP7-protein har använts som antigen för påvisande av antikroppar mot AHSV och ger hög sensitivitet och specificitet. Andra fördelar är att det är stabilt och inte infektiöst.

2.1 Testförfarande:

2.1.1 Fast fas:

2.1.1.1 ELISA-plattorna laddas med rekombinant AHSV-4 VP7 i en karbonat/natriumvätekarbonat buffert, pH 9,6. Inkubera plattorna vid 4 °C över natten.

2.1.1.2 Skölj plattorna fem gånger med destillerat vatten innehållande 0,01 % (v/v) Tween 20 (tvättlösning). Tryck försiktigt plattorna mot ett absorberande material så att eventuella tvättrester tas bort.

2.1.1.3 Blockera plattorna med fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS) och 5 % (w/v) skummjölk (torrmjölk från Nestlé™), 200 µl/brunn, under en timme vid 37 °C.

2.1.1.4 Avlägsna den blockerande lösningen och slå försiktigt plattorna mot ett absorberande material.

2.1.2 Prov:

2.1.2.1 De serumprov som skall testas och positiva och negativa kontrollsera späds 1:25 i PBS + 5 % (w/v) skummjölk + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl per brunn. Inkubera under en timme vid 37 °C.

Vid titreringen, gör en tvåfaldig spädningsserie från 1:25 (100 µl/brunn), ett serum per kolumn på plattan, och gör detsamma med de positiva och negativa kontrollsera. Inkubera under en timme vid 37 °C.

2.1.2.2 Tvätta plattorna i enlighet med steg 2.1.1.2.

2.1.3 Konjugat:

2.1.3.1 Fördela 100 µl per brunn av HRP-konjugerat antihästgammaglobulin som späts i PBS + 5 % mjölk + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Inkubera under en timme vid 37 °C.

2.1.3.2 Tvätta plattorna i enlighet med steg 2.1.1.2.

2.1.4 Kromogen/substrat:

- 2.1.4.1 Tillsätt 200 µl/brunn av kromogen/substratlösning [10 ml 80,6 mM DMAB (dimethyl aminobenzaldehyd) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone hydrochlorid) + 5 µl H₂O₂].

Färgutvecklingen stoppas genom tillsats av 50 µl 3N H₂SO₄ efter cirka 5–10 minuter (innan det negativa kontrollprovet börjar färgas).

Andra kromogener såsom ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]), TMB (tetramethyl benzidin), eller OPD (ortho-phenyldiamin) kan också användas.

- 2.1.4.2 Avläs plattorna vid 600 nm (eller 620 nm).

2.2 Tolkning av resultaten:

- 2.2.1 Beräkna cut-off-värdet genom att lägga till 0,6 till det negativa kontrollvärdet. (0,6 är standardavvikelsen för en grupp med 30 negativa serum).
- 2.2.2 Prov som ger absorbansvärden som är lägre än cut-off-värdet skall betraktas som negativa.
- 2.2.3 Prov som ger absorbansvärden som är högre än cut-off-värdet + 0,15 skall betraktas som positiva.
- 2.2.4 Prov som ger absorbansvärden som ligger mellan negativt och positivt skall betraktas som tveksamma och en annan metod måste tillämpas för att bekräfta resultatet.

3. BLOCKERANDE ELISA FÖR PÅVISANDE AV ANTIKROPPAR MOT AFRIKANSK HÄSTPEST-VIRUS (AHSV) (FÖRE-SKRIVEN TEST)

Den blockerande ELISA används för att påvisa specifika AHSV-antikroppar i serum från alla arter av djur som kan drabbas av AHS. VP7 är det dominerande antigenet hos AHSV och är konserverat hos alla nio serotyperna. Eftersom den monoklonala antikroppen (Mab) riktas mot VP7 har testen en hög sensitivitet och specificitet. Det rekombinanta VP7-antigenet är helt oskadlig vilket garanterar en hög grad av säkerhet.

Principen för testen är att avbryta reaktionen mellan det rekombinanta VP7, som är de antigen som är bundet till ELISA-plattan och den för VP7 specifika konjugerade Mab. Om antikroppar finns i serum kommer reaktionen mellan antikroppen och Mab att avbrytas, vilket ger en färgreduktion.

Nedan beskrivna test utförs av Europeiska gemenskapens referenslaboratorium för afrikansk hästpest i Algete i Spanien.

3.1 Testförfarande:

3.1.1 ELISA-plattor

- 3.1.1.1 Ladda plattorna med rekombinant AHSV-4 VP7 som späts i en karbonat/natriumvätekarbonat buffert, pH 9,6. Inkubera över natten vid 4 °C.
- 3.1.1.2 Tvätta plattorna fem gånger med fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS) innehållande 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST).
- 3.1.1.3 Stabilisera plattorna med en stabiliseringslösning (så att de kan förvaras under längre tid vid + 4 °C utan att förlora aktivitet) och torka dem mot ett absorberande material.

3.1.2 Prov och kontroller

- 3.1.2.1 Vid screening: Späd provsera och kontrollsera med PBST 1:10 direkt i plattorna så att en slutlig volym på 100 µl/brunn erhålles. Inkubera under en timme vid 37 °C.
- 3.1.2.2 Vid titrering: Bered en tvåfaldig spädningsserie med provserum och positiva kontroller (100 µl/brunn) från 1:10 till 1:1 280 i åtta brunnar. Negativa kontrollen testas i spädning 1:10.

3.1.3 Konjugat:

Sätt 50 µl/brunn av förspädd HRP-konjugerad Mab (monoklonala antikroppar specifika för VP7) i varje brunn och blanda försiktigt så att lösningen blir homogen. Inkubera under 30 minuter vid 37 °C.

3.1.4 Tvätta plattorna fem gånger med PBST, och torka enligt ovan.**3.1.5 Kromogen/substrat:**

Sätt 100 µl/brunn av kromogen/substratlösning (1 ml ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]) 5 mg/ml + 9 ml substratbuffert [0,1 M fosfatcitratbuffert, pH 4, innehållande 0,03 % H₂O₂]) och inkubera under tio minuter vid rumstemperatur. Färgutvecklingen stoppas genom tillsats av 100 µl/brunn av 2 % (w/v) SDS (natriumdodecylsulfat).

3.1.6 Avläsning

Avläs i ELISA-läsare vid 405 nm.

3.2 Tolkning av resultaten:**3.2.1 Validering av metoden**

Testen är giltig när de negativa kontrollprovens (NC) OD-värden är högre än 1,0 och den positiva kontrollens (PC) är lägre än 0,2.

3.2.2 Beräkning av cut-off-värdet

Positivt cut-off-värde = $NC - ([NC - PC] \times 0,3)$

Negativt cut-off-värde = $NC - ([NC - PC] \times 0,2)$

där NC är OD av den negativa kontrollen, och PC är OD av den positiva kontrollen.

3.2.3 Tolkning av resultaten

Prov vars OD-värde är lägre än det positiva cut-off-värdet skall anses vara positiva.

Prov vars OD-värde är högre än det negativa cut-off-värdet skall anses vara negativa.

Prov vars OD-värde ligger mellan dessa båda värden skall anses tveksamma och nya prov skall tas från djuren efter två till tre veckor."
