

KOMMISJONSVEDTAK

2005/EØS/9/09

av 21. februar 2002

om endring av vedlegg D til rådsdirektiv 90/426/EØF med hensyn til diagnostiske prøver for afrikansk hestepest(*)

[meddelt under nummer K(2002) 556]

(2002/160/EF)

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 90/426/EØF av 26. juni 1990 om krav til dyrehelse ved forflytning av dyr av hestefamilien og innførsel av slike dyr fra tredjestater⁽¹⁾, sist endret ved vedtak 2001/298/EF⁽²⁾, særlig artikkel 23, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Vedlegg D til direktiv 90/426/EØF beskriver komplementbindingsprøven som skal utføres for diagnostisering av afrikansk hestepest.
- 2) I november 2000 var Fellesskapets referanselaboratorium i Algete i Spania vert for det årlige møtet mellom EU-medlemsstatenes nasjonale referanselaboratorier for afrikansk hestepest. Under dette møtet ble det framlagt vitenskapelig bevis for at komplementbindingsprøven beskrevet i vedlegg D til direktiv 90/426/EØF, har alvorlige mangler, særlig fordi den er egnet bare for å påvise antistoffer etter en nylig infeksjon eller vaksinasjon. Dessuten er prøven i praksis erstattet av moderne ELISA-prøver i nesten alle laboratorier i Fellesskapet samt i de største eksportstatene.
- 3) Den internasjonalt anerkjente laboratorieundersøkelsen for påvisning av antistoffer mot afrikansk hestepestvirus er beskrevet i *Manual of Standards for Diagnostic*

Tests and Vaccines⁽³⁾ fra Det internasjonale kontor for epizootier (OIE); i gjeldende utgave nevnes imidlertid bare én av de tilgjengelige ELISA-prøvene.

- 4) Det synes derfor hensiktsmessig å endre vedlegg D til direktiv 90/426/EØF for å ta hensyn til den tekniske utviklingen og internasjonalt godkjente standarder.
- 5) Tiltakene fastsatt i dette vedtak er i samsvar med uttalelse fra Den faste veterinærkomité —

GJORT DETTE VEDTAK:

Artikkel 1

Vedlegg D til direktiv 90/426/EØF erstattes med vedlegget til dette vedtak.

Artikkel 2

Dette vedtak er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel, 21. februar 2002.

For Kommisjonen

David BYRNE

Medlem av Kommisjonen

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 53 av 23.2.2002, s. 37, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 25/2003 av 14. mars 2003 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitære forhold), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 29 av 5.6.2003, s. 7.

⁽¹⁾ EFT L 224 av 18.8.1990, s. 42.

⁽²⁾ EFT L 102 av 12.4.2001, s. 63.

⁽³⁾ Kapittel 2.1.11., fjerde utgave 2000.

VEDLEGG

«VEDLEGG D

AFRIKANSK HESTEPEST

DIAGNOSE

Reagenser til de enzymmerkede antistoffprøvene (ELISA) som er beskrevet nedenfor, kan fås fra Fellesskapets referanselaboratorium eller OIE-referanselaboratoriene for afrikansk hestepest.

1. KOMPETITIV ELISA TIL PÅVISNING AV ANTISTOFFER MOT AFRIKANSK HESTEPEST-VIRUS (AHSV) (OBLIGATORISK PRØVE)

Kompetitiv ELISA brukes for å påvise særlige antistoffer mot afrikanske hestepest-virus i serum fra alle arter dyr av hestefamilien. Bredspektret polyklont anti-AHSV-marsvinserum (heretter kalt «marsvin-anti-AHSV-serum») er serogruppespesifikt og kan påvise alle kjente serotyper av AHS-virus.

Prinsippet ved prøven er å avbryte reaksjonen mellom AHSV-antigenet og et marsvin-anti-AHSV-serum ved å ta en serumprøve. AHSV-antistoffene i serumprøven vil konkurrere med antistoffene i marsvin-anti-AHSV-serumet, noe som vil gi en svakere farge enn forventet (etter tilsetning av enzymmerket antimarsvin-antistoff og substrat). Sera kan prøves i en enkel fortykning på 1:5 (screening-prøvemethode) eller titreres (serumtitreringsmetode) til siste fortykning som gir positivt utslag. Hemmingsverdier over 50 % kan anses som positive.

Den prøveprotokollen som beskrives nedenfor, brukes i det regionale referanselaboratoriet for afrikansk hestepest i Pirbright i Det forente kongerike.

1.1. **Prøvmethode**

1.1.1 *Beredning av plater*

1.1.1.1 Påfør ELISA-platene AHSV-antigen som er utvunnet av infiserte cellekulturer og fortennet i karbonat-/bikarbonatbuffer, pH 9,6. Inkuber ELISA-platene natten over ved 4 °C.

1.1.1.2 Vask platene tre ganger ved å fylle og tømme brønnene med fosfatbufret saltløsning (PBS), pH 7,2-7,4, og tørk med absorberende papir.

1.1.2 *Kontrollbrønner*

1.1.2.1 Titrer de positive kontrollseraene i tofolds fortyninger fra 1:5 til 1:640 i kolonne 1 i blokkeringsbuffer (PBS som inneholder 0,05 % (v/v) Tween-20, 5,0 % (w/v) skummetmelkpulver (Cadbury's Marvel™) og 1 % (v/v) serum fra voksent storfe) for å få et sluttvolum på 50 µl/brønn.

1.1.2.2 Tilsett 50 µl negativt kontrollserum i en fortykning på 1:5 (10 µl serum + 40 µl blokkeringsbuffer) i brønn A og B i kolonne 2.

1.1.2.3 Tilsett 100 µl/brønn blokkeringsbuffer i brønn C og D i kolonne 2 (blindprøve).

1.1.2.4 Tilsett 50 µl blokkeringsbuffer i brønn E, F, G og H i kolonne 2 (marsvinkontroll).

1.1.3 *Screening-prøvemethode*

1.1.3.1 Tilsett en 1:5-fortynning av hver serumprøve i blokkeringsbuffer til doblede brønner i kolonne 3-12 (10 µl sera + 40 µl blokkeringsbuffer).

eller

1.1.4 *Serumtitreringsmetode*

1.1.4.1 Tilbered tofolds fortyninger av hver analyseprøve (1:5-1:640) i blokkeringsbuffer i åtte brønner i hver kolonne (3-12).

og

1.1.5 Tilsett 50 µl marsvinantiserum, som er fortennet i blokkeringsbuffer, i alle brønnene unntatt blindprøvebrønnene i ELISA-platen (alle brønner inneholder nå et sluttvolum på 100 µl).

1.1.5.1 Inkuber i 1 time ved 37 °C på et rotasjonsristeapparat.

1.1.5.2 Vask platene tre ganger og tørk som tidligere.

1.1.5.3. Tilsett 50 µl kanin-antimarsvin pepperrøtperoksidase (HRP)-konjugat fortynt i blokkeringsbuffer, i hver brønn.

1.1.5.4. Inkuber i 1 time ved 37 °C i et rotasjonsristeapparat.

1.1.5.5. Vask platene tre ganger og tørk som tidligere.

1.1.6. Kromogen

Tilbered kromogen-OPD-løsningen (OPD = orto-fenyldiamin) etter produsentens anvisninger (0,4 mg/ml i sterilt destillert vann) rett før bruk. Tilsett substrat (hydrogenperoksid = H₂O₂) for å få en sluttkonsentrasjon på 0,05 % (v/v) (1:2000 av en 30 % løsning av H₂O₂). Tilsett 50 µl av OPD-løsningen i hver brønn og la platene stå på benken i 10 minutter ved romtemperatur. Stopp reaksjonen ved å tilsette 50 µl/brønn 1M svovelsyre (H₂SO₄).

1.1.7. Avlesning

Les av spektrofotometrisk ved 492 nm.

1.2. Presentasjon av resultater

1.2.1. Bruk en programvarepakke til å skrive ut de optiske tetthetsverdiene (OD) og hemmingsprosenten (PI) for serumprøvene og kontrollseraene basert på den gjennomsnittsverdien som er registrert i de fire marsvinkontrollbrønnene. OD- og PI-verdiene brukes til å fastslå om prøven er utført innenfor akseptable grenser. De øvre og nedre kontrollgrensene for marsvinkontrollen ligger henholdsvis mellom OD-verdiene 1,4 og 0,4. Endepunktstiteren for den positive kontrollen basert på 50 % PI, bør være 1:240 (mellom 1:120 og 1:480). Plater som ikke oppfyller ovennevnte kriterier, må forkastes. Dersom titeren for det positive kontrollserumet er over 1:480, og analyseprøvene fremdeles er negative, kan imidlertid de negative analyseprøvene aksepteres.

De doblede negative kontrollserumbrønnene og de doblede blindprøvebrønnene skal ha PI-verdier på henholdsvis mellom + 25 % og - 25 %, og mellom + 95 % og + 105 %. Dersom verdiene ikke ligger innenfor disse grensene, betyr ikke det at resultatet fra platen må forkastes, men tyder på at en bakgrunnsfarge er under utvikling.

1.2.2. Den diagnostiske terskelen (grenseverdien) for serumprøver er 50 % (PI 50 %). Prøver som viser PI-verdier på over 50 %, anses som positive. Prøver som viser PI-verdier på under 50 %, anses som negative.

Prøver som viser PI-verdier over eller under terskelen for de doblede brønnene, anses som tvilsomme. Disse prøvene kan prøves på nytt ved screening-prøver og ved titrering. Positive prøver kan også titreres for å gi en indikasjon på hvor positive de er.

Skjema for screening-prøve

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	K +	Serumprøver										
A	1:5	K -	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	K -	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	Blind										
D	1:40	Blind										
E	1:80	MK										
F	1:160	MK										
G	1:320	MK	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	MK	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

K - = negativ kontroll.

K + = positiv kontroll.

MK = marsvinkontroll.

Serumtitrering

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	K +	Serumprøver										
A	1:5	K -	1:5									1:5
B	1:10	K -	1:10									1:10
C	1:20	Blind	1:20									1:20
D	1:40	Blind	1:40									1:40
E	1:80	MK	1:80									1:80
F	1:160	MK	1:160									1:160
G	1:320	MK	1:320									1:320
H	1:640	MK	1:640									1:640

K - = negativ kontroll.

K + = positiv kontroll.

MK = marsvinkontroll.

2. INDIREKTE ELISA TIL PÅVISNING AV ANTISTOFFER MOT AFRIKANSK HESTEPEST-VIRUS (AHSV) (OBLIGATORISK PRØVE)

Prøven beskrevet nedenfor, er i samsvar med beskrivelsen i kapittel 2.1.11 i OIEs *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, fjerde utgave, 2000.

Det rekombinante VP7-proteinet har vært brukt som antigen til påvisning av antistoffer mot AHS-virus; metoden har høy grad av følsomhet og spesifisitet. Dette proteinet har dessuten den fordelen at det er stabilt og ikke infeksjøst.

2.1. Prøvmingsmetode

2.1.1. Fast fase

2.1.1.1. ELISA-plater påføres rekombinant AHSV-4 VP7 fortynnet i karbonat-/bikarbonatbuffer, pH 9,6. Inkuber platene natten over ved 4 °C.

2.1.1.2. Vask platene fem ganger med destillert vann som inneholder 0,01 % (v/v) Tween 20 (vaskeløsning). Bank platene forsiktig mot absorberende materiale slik at det som måtte være igjen av vaskeløsning, fjernes.

2.1.1.3. Blokker platene med fosfatbufret saltløsning (PBS) + 5 % (w/v) skummetmelkpulver (melk fra Nestlé™), 200 µl/brønn, i 1 time ved 37 °C.

2.1.1.4. Fjern blokkeringsløsningen og bank platene forsiktig mot absorberende materiale.

2.1.2. Analyseprøver

2.1.2.1. De serumprøvene som skal prøves, samt positive og negative kontrollsera, fortynnes 1:25 i PBS + 5 % (w/v) skummet melk + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl per brønn. Inkuber i 1 time ved 37 °C.

Ved titrering lages tofolds fortynninger fra 1:25 (100 µl/brønn), ett serum per platekolonne, og det samme gjøres med positive og negative kontroller. Inkuber i 1 time ved 37 °C.

2.1.2.2. Vask platene som beskrevet i nr. 2.1.1.2.

2.1.3. Konjugat

2.1.3.1. Overfør 100 µl/brønn av pepperrotperoksidase (HRP)-konjugert antihestegamma-globulin fortynnet i PBS + 5 % melk + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Inkuber i 1 time ved 37 °C.

2.1.3.2. Vask platene som beskrevet i nr. 2.1.1.2.

2.1.4. Kromogen/substrat

- 2.1.4.1. Tilsett 200 µl/brønn kromogen/substrat-løsning [10 ml 80,6 mM DMAB (dimetylaminobenzaldehyd) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-metyl-2-benzo-tiazolin-hydrason-hydroklorid) + 5 µl H₂O₂].

Fargeutviklingen stoppes ved å tilsette 50 µl 3N H₂SO₄ etter om lag 5-10 minutter (før den negative kontrollen begynner å få farge).

Andre kromogener som ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre]), TMB (tetrametylbenzidin), eller OPD (orto-fenyldiamin) kan også brukes.

- 2.1.4.2. Les av platene ved 600 nm (eller 620 nm).

2.2. Tolkning av resultatene

- 2.2.1. Beregn grenseverdien ved å legge 0,6 til verdien av den negative kontrollen (0,6 er standardavvik for en gruppe på 30 negative sera).
- 2.2.2. Analyseprøver som gir absorbansverdier under grenseverdien, anses som negative.
- 2.2.3. Analyseprøver som gir absorbansverdier over grenseverdien + 0,15, anses som positive.
- 2.2.4. Analyseprøver som gir mellomliggende absorbansverdier, er tvilsomme, og en annen metode må brukes for å bekrefte resultatet.

3. BLOKKERENDE ELISA TIL PÅVISNING AV ANTISTOFFER MOT AFRIKANSK HESTEPST-VIRUS (AHSV) (OBLIGATORISK PRØVE)

Blokkerende ELISA er ment å skulle påvise særlige AHSV-antistoffer i sera fra alle mottakelige arter. VP7 er det viktigste AHSV-antigenvirusprotein og finnes innenfor de ni serotypene. Ettersom det monoklonale antistoffet (Mab) også er rettet mot VP7, har prøven høy grad av følsomhet og spesifisitet. Dessuten er det rekombinante VP7-antigenet helt uskadelig og garanterer derfor en høy grad av sikkerhet.

Prinsippet ved prøven er å avbryte reaksjonen mellom det rekombinante VP7, som er antigenet bundet til ELISA-platen, og det VP7-spesifikke konjugerte Mab. Antistoff i serumprøver vil blokkere reaksjonen mellom antigenet og Mab, noe som vil føre til at fargen svekkes.

Prøven som beskrives nedenfor, utføres i Fellesskapets referanselaboratorium for afrikansk hestepest i Algete i Spania.

3.1. Prøvmingsmetode

3.1.1. ELISA-plater

- 3.1.1.1. Påfør ELISA-platene rekombinant AHSV-4 VP7 fortynnet i karbonat-/bikarbonatbuffer, pH 9,6. Inkuber over natten ved 4 °C.
- 3.1.1.2. Vask platene fem ganger med fosfatbufret saltløsning (PBS) som inneholder 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST).
- 3.1.1.3. Stabiliser platene ved behandling med en stabiliseringsløsning (for å muliggjøre lagring over lang tid ved 4 °C uten tap av aktivitet), og tørk med absorberende materiale.

3.1.2. Analyseprøver og kontroller

- 3.1.2.1. Ved screening: fortynn serumprøver og kontroller 1:10 direkte på platen i PBST slik at sluttvolumet blir 100 µl/brønn. Inkuber i 1 time ved 37 °C.
- 3.1.2.2. Ved titrering: tilbered tofolds fortynninger med serumprøver og positive kontroller (100 µl/brønn) fra 1:10 til 1:1 280 i åtte brønner. Negative kontroller prøves med en fortynning på 1:10.

3.1.3. Konjugat

Tilsett 50 µl/brønn fortynnet pepperrotperoksidase (HRP)-konjugert Mab (VP7-spesifikke monoklonale antistoffer) i hver brønn og bland forsiktig for å sikre homogenitet. Inkuber i 30 minutter ved 37 °C.

3.1.4. Vask platene fem ganger med PBST og tørk som ovenfor.**3.1.5. Kromogen/substrat**

Tilsett 100 µl/brønn kromogen-/substratløsning (1 ml ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre]) 5 mg/ml + 9 ml substratbuffer (0,1 M fosfat-sitratbuffer med pH 4 som inneholder 0,03 % H₂O₂) og inkuber i 10 minutter ved romtemperatur. Fargeutviklingen stoppes ved å tilsette 100 µl/brønn 2 % (w/v) SDS (natriumdodecylsulfat).

3.1.6. Avlesning

Les av ved 405 nm i en ELISA-leser.

3.2. Tolking av resultatene**3.2.1. Validering av prøven**

Prøven er gyldig når den optiske tettheten (OD) av den negative kontrollen (NC) er over 1,0, og OD av den positive kontrollen (PC) er under 0,2.

3.2.2. Beregning av grenseverdi

Positiv grenseverdi = $NC - ((NC - PC) \times 0,3)$

Negativ grenseverdi = $NC - ((NC - PC) \times 0,2)$

der NC er OD av den negative kontrollen, og PC er OD av den positive kontrollen.

3.2.3. Tolking av resultatene

Prøver med OD under den positive grenseverdien skal anses som positive for AHSV-antistoffer.

Prøver med OD over den negative grenseverdien skal anses som negative for AHSV-antistoffer.

Prøver med OD mellom disse to verdiene skal anses som tvilsomme, og det bør tas nye prøver av dyrene etter 2-3 uker.»
