

KOMMISSJONENS GJENNOMFØRINGSBESLUTNING (EU) 2016/1840**2020/EØS/34/03****av 14. oktober 2016****om endring av vedlegg IV til rådsdirektiv 2009/156/EF med hensyn til metoder for diagnostisering av afrikansk hestepest***[meddelt under nummer K(2016) 6509](*)*

EUROPAKOMMISSJONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den europeiske unions virkemåte,

under henvisning til rådsdirektiv 2009/156/EF av 30. november 2009 om krav til dyrehelse ved forflytning av dyr av hestefamilien og import av slike dyr fra tredjestater⁽¹⁾, særlig artikkel 20, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Vedlegg IV til direktiv 2009/156/EF inneholder en beskrivelse av diagnostiske metoder for afrikansk hestepest som ved behov skal brukes til testing av dyr av hestefamilien før de forflyttes i Unionen eller importeres fra tredjestater.
- 2) Siden direktiv 2009/156/EF ble vedtatt, har laboratorienes kapasitet til å utføre avanserte, svært følsomme og effektive tester for å diagnostisere afrikansk hestepest utviklet seg. Samtidig er kapittelet om diagnostisering av afrikansk hestepest i landdyrhandboken fra Verdens dyrehelseorganisasjon (OIE)⁽²⁾ endret for å gjenspeile denne utviklingen.
- 3) Som en del av sitt arbeidsprogram for 2014 har Den europeiske unions referanselaboratorium for afrikansk hestepest⁽³⁾ utarbeidet en rapport om den tekniske vurderingen av de diagnostiske metodene som er beskrevet i vedlegg IV til direktiv 2009/156/EF. I vurderingen, som ble framlagt for Kommisjonen i mai 2015, konkluderes det med at den kompetitive enzymmerkede antistoffprøven (ELISA) ikke lenger er tilgjengelig, at indirekte ELISA ikke er i vanlig bruk, men på forespørsel kan leveres i løpet av 4–6 måneder, og at blokkerende ELISA er kommersielt tilgjengelig og vanlig å bruke til analysering av prøver i forbindelse med egnethetsprøvingene som organiseres av Den europeiske unions referanselaboratorium for afrikansk hestepest.
- 4) I rapporten understrekes det også at metodene for nukleinsyregjenkjenning ved revers transkripsjon-polymerasekjedereaksjon (RT-PCR) har fordeler sammenlignet med serologiske diagnostiske metoder, ettersom de gjør det mulig å påvise sykdommen i et tidlig stadium av infeksjonen. I tillegg bruker de fleste av de nasjonale referanselaboratoriene i EUs medlemsstater metoder for sanntids-RT-PCR, herunder til diagnostisering av afrikansk hestepest, som har vist seg å være egnet til formålet i de årlige egnethetsprøvingene utført i perioden 2009–2014. Rapporten peker også på at det utenfor Unionen finnes en rekke OIE-referanselaboratorier og andre laboratorier med særlig ekspertise på afrikansk hestepest som har innført minst én av metodene for sanntids-RT-PCR til påvisning av genomet for afrikansk hestepest.
- 5) På det felles seminaret om afrikansk hestepest / blåtunge som ble avholdt 24.–25. november 2015 i Ascot i Det forente kongerike, anbefalte Den europeiske unions referanselaboratorier og nasjonale referanselaboratorier å føre opp metoder for sanntids revers transkripsjon-polymerasekjedereaksjon (RRT-PCR) til påvisning av afrikansk hestepest-virus i vedlegg IV til direktiv 2009/156/EF.

(*) Denne unionsrettsakten, kunngjort i EUT L 280 av 18.10.2016, s. 33, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 70/2017 av 5. mai 2017 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitere forhold), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 11 av 7.2.2019, s. 5.

(¹) EUT L 192 av 23.7.2010, s. 1.

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

(³) Rådsdirektiv 92/35/EØF av 29. april 1992 om fastsettelse av kontrollregler og tiltak for å bekjempe afrikansk hestepest (EFT L 157 av 10.6.1992, s. 19).

- 6) Selv om alle tilgjengelige metoder for sanntids-RT-PCR til påvisning av genomet for afrikansk hestepest er tilstrekkelig følsomme, er metoden som beskrives av Agüero et al. (2008)⁽⁴⁾, den som er mest brukt av laboratoriene. Metoden som beskrives av Guthrie et al. (2013)⁽⁵⁾, er spesialutviklet for å sikre at hester fra områder med risiko for afrikansk hestepest trygt kan transporteres etter den korteste karantenetiden som kreves i samsvar med OIEs helseregulering for landdyr⁽⁶⁾.
- 7) Metoder for identifisering av sykdomsagens og antistoffpåvisning bør derfor oppføres i vedlegg IV til direktiv 2009/156/EF som kompletterende metoder for rask diagnostisering av afrikansk hestepest.
- 8) Vedlegg IV til direktiv 2009/156/EF bør derfor endres ved å stryke kompetitiv ELISA og oppdatere metodene for indirekte og blokkerende ELISA i samsvar med kapittel 2.5.1. i 2016-utgaven av OIEs landdyrhåndbok, som er basert på den versjonen som ble vedtatt av OIEs generalforsamling i mai 2012⁽⁷⁾. Samtidig bør metodene for sanntids-RT-PCR beskrevet av Agüero et al. (2008) og Guthrie et al. (2013) oppføres i nevnte vedlegg, slik at disse metodene for identifisering av sykdomsagens blir tilgjengelige i forbindelse med testing før forflytning.
- 9) Direktiv 2009/156/EF bør derfor endres.
- 10) Tiltakene fastsatt i denne beslutning er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for planter, dyr, næringsmidler og fôr —

TRUFFET DENNE BESLUTNING:

Artikkel 1

Vedlegg IV til direktiv 2009/156/EF erstattes med teksten i vedlegget til denne beslutning.

Artikkel 2

Denne beslutning er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel 14. oktober 2016.

For Kommisjonen

Vytenis ANDRIUKAITIS

Medlem av Kommisjonen

⁽⁴⁾ Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. and 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 AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. 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⁾ Se fotnote 2.

VEDLEGG

«VEDLEGG IV

AFRIKANSK HESTEPEST

DIAGNOSE

DEL A

Serologiske prøver

Den serologiske metoden beskrevet nedenfor består av enzymmerkede antistoffprøver (ELISA) basert på avsnitt B punkt 2 i kapittel 2.5.1 i 2016-utgaven av landdyrhandboken vedtatt av OIEs generalforsamling i mai 2012.

Virusproteinet VP7 er et betydelig immundominant antigen i afrikansk hestepest-viruset (AHSV) og forekommer i alle de ni AHSV-serotypene. Rekombinante AHSV-VP7-proteiner er vist å være stabile, ufarlige og egnet som antigener i ELISA-prosedyrer til bestemmelse av AHSV-antistoffer med høy grad av følsomhet og spesifisitet (Laviada et al., 1992b⁽¹⁾, Maree og Paweska, 2005). Indirekte og blokkerende ELISA er de to ELISA-prøvene for AHS-VP7 som er egnet til serologisk diagnostisering av afrikansk hestepest (AHS).

1. Indirekte ELISA til påvisning av antistoffer mot afrikansk hestepest-virus (AHSV)

Konjugatet som brukes i denne metoden, er et pepperrotperoksidasekonjugert antihest-gammaglobulin som reagerer med serum fra hest, muldyr og esel. I metoden som beskrives av Maree & Paweska (2005)⁽²⁾, brukes protein G som konjugat som også reagerer med serum fra sebra.

Antigenet kan fås hos Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) i Spania med en leveringstid på 4–6 måneder.

1.1. Prøvmingsmetode

1.1.1. Fast fase

1.1.1.1. Påfør ELISA-platene rekombinant AHSV-4 VP7 fortynnet i karbonat/bikarbonat-buffer, pH 9,6. Inkuber platene over natten ved 4 °C.

1.1.1.2. Vask platene fem ganger med destillert vann som inneholder 0,01 % (v/v) Tween 20 (vaskeløsning). Bank platene forsiktig mot et absorberende materiale, slik at eventuell gjenværende vaskeløsning fjernes.

1.1.1.3. Blokker platene med fosfatbufret saltløsning (PBS), pH 7,2 + 5 % (w/v) skummetmelkpulver (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl/brønn, i 1 time ved 37 °C.

1.1.1.4. Fjern blokkeringsløsningen og bank platene forsiktig mot et absorberende materiale.

1.1.2. Analyseprøver

1.1.2.1. Serumprøvene som skal analyseres, samt positivt og negativt kontrollserum, 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.

Til titreringen lages en tofolds fortynningsrekke 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.

⁽¹⁾ Laviada M.D., Roy P. and 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. and 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. Vask platene fem ganger med destillert vann som inneholder 0,01 % (v/v) Tween 20 (vaskeløsning). Bank platene forsiktig mot et absorberende materiale, slik at eventuell gjenværende vaskeløsning fjernes.

1.1.3. Konjugat

1.1.3.1. Tilsett 100 µl/brønn pepperrotperoksidasekonjugert (HRP-konjugert) antihest-gammaglobulin fortynnet i PBS + 5 % melk + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Inkuber i 1 time ved 37 °C.

1.1.3.2. Vask platene fem ganger med destillert vann som inneholder 0,01 % (v/v) Tween 20 (vaskeløsning). Bank platene forsiktig mot et absorberende materiale, slik at eventuell gjenværende vaskeløsning fjernes.

1.1.4. Kromogen/substrat

1.1.4.1. Tilsett 200 µl/brønn kromogen/substrat-løsning (10 ml 80,6 mM DMAB (dimetylaminobenzaldehyd) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-metyl-2-benzotiazolinhydrasonhydroklorid) + 5 µl H₂O₂).

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

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

1.1.4.2. Les av platene ved 600 nm (eller 620 nm).

1.2. *Tolking av resultatene*

1.2.1. Beregn cut-off-verdien ved å legge 0,06 til verdien av den negative kontrollen (0,06 er standardavviket beregnet ut fra en gruppe på 30 negative sera).

1.2.2. Prøver som gir absorbansverdier som er lavere enn cut-off-verdien, anses som negative.

1.2.3. Prøver som gir absorbansverdier som er høyere enn cut-off-verdien + 0,15, anses som positive.

1.2.4. Prøver som gir mellomliggende absorbansverdier, anses som usikre, og resultatet må bekreftes med en annen metode.

2. **Blokkerende ELISA til påvisning av antistoffer mot afrikansk hestepest-virus (AHSV)**

Den kompetitive blokkerende ELISA-prøven er utformet for å påvise spesifikke AHSV-antistoffer i serum fra dyr i hestefamilien, dvs. hest, esel, sebra og krysnings av disse, noe som gjør det mulig å unngå problemet med spesifisitet som noen ganger har forekommet ved bruk av indirekte ELISA.

Prinsippet for prøven er å blokkere reaksjonen mellom det rekombinante VP7-proteinet absorbert av ELISA-platen og et konjugert AHS-VP7-spesifikt monoklonalt antistoff (Mab). Antistoffet i testseraene vil blokkere reaksjonen mellom antigenet og det monoklonale antistoffet, noe som fører til redusert farge. Ettersom det monoklonale antistoffet er rettet mot VP7, vil analysen gi en høy grad av følsomhet og spesifisitet.

Den kompetitive blokkerende ELISA-prøven er kommersielt tilgjengelig.

2.1. *Prøvmetode*

2.1.1. Fast fase

2.1.1.1. Påfør ELISA-platene 50–100 ng rekombinant AHSV-4 VP7 fortynnet i karbonat/bikarbonat-buffer, pH 9,6. Inkuber over natten ved 4 °C.

2.1.1.2. Vask platene tre ganger med fosfatbufret saltløsning (PBS) 0,1× som inneholder 0,135 M NaCl og 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Bank platene forsiktig mot et absorberende materiale, slik at eventuell gjenværende vaskeløsning fjernes.

2.1.2. Analyseprøver og kontroller

- 2.1.2.1. Serumprøver som skal analyseres, samt positivt og negativt kontrollserum, fortynnes 1:5 i et fortynningsmiddel som inneholder 0,35 M NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 og 0,1 % Kathon, 100 µl per brønn. Inkuber i 1 time ved 37 °C.

Til titreringen lages en tofolds fortynningsrekke av testseraene fra 1:10 til 1:280 over åtte brønner (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 fem ganger med fosfatbufret saltløsning (PBS) 0,1× som inneholder 0,135 M NaCl og 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Bank platene forsiktig mot et absorberende materiale, slik at eventuell gjenværende vaskeløsning fjernes.

2.1.3. Konjugat

- 2.1.3.1. Tilsett 100 µl/brønn pepperrotperoksidasekonjugert monoklonalt antistoff mot VP7. Det monoklonale antistoffet skal på forhånd være fortynnet 1:5 000–1:15 000 i en 1:1 løsning av StabiliZyme Select® Stabilizer (SurModics., referanse: SZ03) i destillert vann. Inkuber i 30 minutter ved 37 °C.

- 2.1.3.2. Vask platene fem ganger med fosfatbufret saltløsning (PBS) 0,1× som inneholder 0,135 M NaCl og 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Bank platene forsiktig mot et absorberende materiale, slik at eventuell gjenværende vaskeløsning fjernes.

2.1.4. Kromogen/substrat

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

2.1.5. Avlesing

Les av ved 405 nm i en ELISA-leser.

2.2. *Tolking av resultatene*

- 2.2.1. Blokkeringsprosenten (BP) for hver prøve bestemmes ved å bruke følgende formel, der «Abs» står for antistoffer:

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

- 2.2.2. Prøver med en BP-verdi på over 50 % bør anses som positive for AHSV-antistoffer.

- 2.2.3. Prøver med en BP-verdi på under 45 % bør anses som negative for AHSV-antistoffer.

- 2.2.4. Prøver med en BP-verdi på mellom 45 % og 50 % bør anses som usikre og må analyseres på nytt. Dersom det nye resultatet også er usikkert, bør dyrene testes på nytt med prøver tatt tidligst to uker etter at prøven som ble ansett som usikker, ble tatt.

DEL B

Identifisering av sykdomsagenset

Sanntids revers transkripsjon-polymerasekjedereaksjon (rRT-PCR)

Prøver til identifisering av sykdomsagens basert på nukleinsyremetoder skal kunne påvise referansestammer fra de ni AHSV-serotypene.

Metoden beskrevet i nr. 2.1 er basert på avsnitt B punkt 1.2 i kapittel 2.5.1 i 2016-utgaven av landdyrhåndboken vedtatt av OIEs generalforsamling i mai 2012.

De RT-PCR-påvisningsmetodene som brukes til analysering av prøver (blod eller milt) innenfor rammen av direktiv 2009/156/EF, skal være minst like følsomme som metodene beskrevet i nr. 2.

Inaktiverte virus av referansestammer av serotype 1–9 kan fås fra Den europeiske unions referanselaboratorium eller OIEs referanselaboratorium for afrikansk hestepest i Algete (Spania).

1. Ekstraksjon av viralt RNA

For å sikre en god reaksjon må det ekstraheres AHSV-RNA av høy kvalitet fra prøven. Nukleinsyrer kan ekstraheres fra kliniske prøver ved hjelp av en rekke interne og kommersielt tilgjengelige metoder.

I kommersielle sett brukes det forskjellige metoder for å isolere RNA. De fleste er basert på en av følgende metoder:

- fenol-kloroform-ekstraksjon av nukleinsyrer,
- adsorpsjon av nukleinsyrer til filtersystem,
- adsorpsjon av nukleinsyrer til magnetkuler.

Nedenfor beskrives et eksempel på en intern metode for RNA-ekstraksjon:

- 1.1.1 1 g vevsprøve homogeniseres i 1 ml denatureringsløsning (4 M guanidiniumtiocyanat, 25 mM natriumsitrat, 0,1 M 2-merkaptoetanol, 0,5 % sarkosyl).
- 1.2. Etter sentrifugering tilsettes supernatanten 1 µg gjær-RNA, 0,1 ml 2 M natriumacetat (pH 4), 1 ml fenol og 0,2 ml kloroform/isoamylalkohol-blanding (49/1).
- 1.3. Suspensjonen ristes kraftig og avkjøles på is i 15 minutter.
- 1.4. Etter sentrifugering ekstraheres RNA-et som finnes i vannfasen, med fenol, utfelles med etanol og resuspenderes i sterilt vann.

2. Metode for sanntids-RT-PCR

2.1. Grupperespesifikk sanntids-RT-PCR i henhold til Agüero et al., 2008⁽¹⁾

Denne gruppespesifikke sanntids-RT-PCR er rettet mot VP7 i AHSV og gjør det mulig å påvise alle kjente serotyper og stammer av AHSV som er i omløp i dag. Metoden er blitt brukt med svært gode resultater av de nasjonale referanselaboratoriene i EUs medlemsstater som har deltatt i egnethetsprøvingene organisert årlig av Den europeiske unions referanselaboratorium i perioden 2009–2015. I en internasjonal ringprøving som ble organisert i 2015 innenfor rammen av OIEs nettverk av referanselaboratorier, ble denne protokollen også rangert svært høyt i forhold til andre protokoller.

Primer- og probesekvenser til påvisning av arter av AHS-viruset:

- foroverprimer 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- reversprimer 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. Primerstamløsningen fortynnes til en arbeidsløsning på 8 µM («primerarbeidsløsning 8 µM»), mens proben fortynnes til en arbeidsløsning på 50 µM («probearbeidsløsning 50 µM»). Det bør lages en testplatemal som lastes inn programvaren for sanntids-PCR-maskinen. Med denne malen som rettesnor tilsettes 2,5 µl av hver primerarbeidsløsning 8 µM i hver brønn som skal inneholde RNA-prøver, positive og/eller negative kontroller (sluttkonsentrasjonen av primeren vil være 1 µM i 20 µl RT-PCR-blandingen). Platen oppbevares på is.

⁽¹⁾ Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. and 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. 2 µl av det isolerte RNA (analyseprøver og positiv kontroll) eller 2 µl RNase-fritt vann i negative kontroller blandes med forover- og reversprimere. Blandingen denatureres ved oppvarming ved 95 °C i 5 minutter etterfulgt av rask avkjøling på is i minst 5 minutter.
- 2.1.3. Tilbered en passende mengde masterblanding for ettrinns sanntids-RT-PCR for det antall prøver som skal analyseres, i henhold til produsentens anvisninger. Tilsett 0,1 µl probearbeidsløsning 50 µM i hver brønn som inneholder RNA-prøver (probens sluttkonsentrasjon vil være 0,25 µM i hver brønn som inneholder RNA-prøver). 13 µl masterblanding for ettrinns sanntids-RT-PCR tilsettes i hver brønn på PCR-platen som inneholder de denaturerte primerne og RNA.
- 2.1.4. Platen plasseres i en sanntidstermosyklus programmert for revers transkripsjon og cDNA-amplifisering/fluorescens-påvisning. Amplifiseringsforholdene består av et første trinn med revers transkripsjon ved 48 °C i 25 minutter etterfulgt av 10 minutter ved 95 °C («varmstart») og 40 sykluser à 15 sekunder ved 95 °C, 35 sekunder ved 55 °C og 30 sekunder ved 72 °C (eller 40 sykluser ved 97 °C i 2 sekunder og 55 °C i 30 sekunder dersom det brukes reagenser og termosyklus som tillater raske reaksjoner). Fluorescensdata innhentes på slutten av 55 °C-trinnet.
- 2.1.5. Analysen anses som ugyldig dersom amplifiseringskurvene som genereres, er atypiske, og må da gjentas.

Prøvene anses som positive dersom Ct-verdien (syklusnummer der fluorescensen som genereres i en reaksjon, krysser terskelverdien for fluorescens) er lavere enn eller lik den definerte terskelverdien for Ct (35) i 40 PCR-sykluser (Ct ≤ 35).

Prøvene anses som usikre dersom Ct-verdien er høyere enn den definerte terskelverdien for Ct (35) i 40 PCR-sykluser (Ct > 35).

Prøvene anses som negative dersom det genereres en horisontal amplifiseringskurve som ikke krysser terskellinjen i 40 PCR-sykluser.

2.2. *Gruppespesifikk sanntids-RT-PCR i henhold til Guthrie et al., 2013⁽¹⁾*

Sanntids-RT-PCR med bruk av prober av typen FRET (fluorescensresonansenergioverføring) til påvisning av nukleinsyre i AHSV.

AHSV RT-PCR-metoden som beskrives, ble utformet ved bruk av sekvenser fra et bredt spekter av feltstammer av AHSV som er i omløp i dag (Quan et al., 2010⁽²⁾). I metoden inngår også en merkebeskyttet ekstern kontrollprøve for å kontrollere at alle delene av testen fungerer som de skal.

Sett for ettrinns sanntids-PCR er kommersielt tilgjengelige. Nedenfor følger noen grunnleggende trinn beskrevet av Guthrie et al. (2013) som kan endres i samsvar med lokale eller spesifikke krav, settene som brukes, og utstyret som er tilgjengelig.

Primer- og probesekvenser til påvisning av arter av AHS-viruset:

- foroverprimer 5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'
- reversprimer 5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'
- MGB-TaqMan-probe 5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

- 2.2.1. Stamløsningene for primer- og probeblandingen tillages i en konsentrasjon på 25× ved 5 µM for forover- og reversprimerne og 3 µM for proben. Det bør lages en testplatemal som lastes inn programvaren for sanntids-PCR-maskinen. Med denne malen som rettesnor tilsettes 5 µl RNA-prøver, herunder analyseprøver og positive og negative kontroller, i de relevante brønnene på platen i henhold til malen.

- 2.2.2. RNA denatureres ved oppvarming ved 95 °C i 5 minutter etterfulgt av rask avkjøling på is i minst 3 minutter.

(1) Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. 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. Tilbered en passende mengde masterblanding for ettrinns sanntids-RT-PCR for det antall prøver som skal analyseres, i henhold til produsentens anvisninger. 1 µl 25× stamløsning for primer/probe-blandingen (se nr. 2.2.1 ovenfor) tilsettes i masterblandingen for å gi en sluttkonsentrasjon i hver brønn på 200 nM for hver primer og 120 nM for proben. 20 µl masterblanding tilsettes i hver brønn på PCR-platen som inneholder det denaturerte RNA.
- 2.2.4. Platen plasseres i en sanntidstermosyklus programmert for revers transkripsjon og cDNA-amplifisering/fluorescens-påvisning i henhold til produsentens anvisninger. Amplifiseringsforholdene består for eksempel av et første trinn med revers transkripsjon ved 48 °C i 10 minutter etterfulgt av 10 minutter ved 95 °C og 40 sykluser à 15 sekunder ved 95 °C og 45 sekunder ved 60 °C.
- 2.2.5. Prøvene anses som positive dersom den normaliserte fluorescensen for AHSV RT-PCR-analysen overstiger en terskelverdi på 0,1 i 36 PCR-sykluser i alle replikater av en prøve.

Prøvene anses som usikre dersom den normaliserte fluorescensen for AHSV RT-PCR-analysen overstiger en terskelverdi på 0,1 mellom 36 og 40 PCR-sykluser i ett eller flere replikater av en prøve.

Prøvene anses som negative dersom den normaliserte fluorescensen for AHSV RT-PCR-analysen ikke overstiger en terskelverdi på 0,1 i 40 PCR-sykluser i alle replikater av en prøve, eller dersom den normaliserte fluorescensen for den merkebeskyttede syntetiske eksterne kontrollanalysen overstiger en terskelverdi på 0,1 i 33 PCR-sykluser.»
