

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА

от 21 февруари 2002 година

за изменение на приложение Г към Директива 90/426/ЕИО на Съвета по отношение на диагностичните тестове за африканска чума по конете

(нотифицирано под № C(2002) 556)

(текст от значение за ЕИП)

(2002/160/ЕО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаването на Европейската общност,

като взе предвид Директива 90/426/ЕИО на Съвета от 26 юни 1990 г. относно ветеринарно-санитарните условия, регулиращи движението и вноса от трети страни на еднокопитни животни¹, последно изменена с Решение 2001/298/ЕИО², и по-специално член 23 от нея,

като има предвид, че:

- 1) Приложение Г към Директива 90/426/ЕИО описва допълнителния тест за диагностициране на африканската чума по конете, който трябва да бъде проведен.
- 2) През м. ноември 2000 г. референтната лаборатория на Общността в Algete, Испания бе домакин на ежегодната среща на националните референтни лаборатории за африканска чума по конете на държавите-членки на ЕС. По време на тази среща бе представено научно доказателство, че допълнителният тест, описан понастоящем в приложение Г към Директива 90/426/ЕИО има сериозни ограничения, и по-специално защото е подходящ само за откриване на антитела след скорошна зараза или ваксинация. Нещо повече, тестът в практиката е заменен от модерните тестове Елайза в почти всички лаборатории в Общността и също в по-големите страни износители.
- 3) Международно признатите лабораторни тестове за разкриване на антитела срещу вируса на африканската чума по конете са описани в *Ръководство за стандартите за диагностични тестове и ваксини*³ на Международното бюро по епизоотиите (МБЕ), обаче настоящото издание споменава само един от тестовете Елайза, които са на разположение.
- 4) Затова е подходящо да се измени приложение Г на Директива 90/426/ЕИО, така че да се отчетат техническият напредък и международно одобрените стандарти.
- 5) Мерките, предвидени в настоящото решение, са в съответствие със становището на Постоянния ветеринарен комитет,

¹ ОВ L 224, 18.8.1990 г., стр. 42.

² ОВ L 102, 12.4.2001 г., стр. 63.

³ Глава 2.1.11, четвърто издание 2000 г.

РЕШИ:

Член 1

Приложение Г към Директива 90/426/ЕИО се заменя с приложението към настоящото решение.

Член 2

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 21 февруари 2002 година.

За Комисията
David BYRNE
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

„ПРИЛОЖЕНИЕ Г

АФРИКАНСКА ЧУМА ПО КОНЕТЕ

ДИАГНОЗА

Реагенти за ензимосвързани имунопоглъщани анализи (ЕЛАЙЗА), описани по-долу, могат да бъдат получени от референтната лаборатория на Общността или от референтните лаборатории на МБЕ за африканска чума по конете.

1. КОНКУРЕНТЕН ЕЛАЙЗА ЗА РАЗКРИВАНЕ НА АНТИТЕЛА НА ВИРУСА НА АФРИКАНСКАТА ЧУМА ПО КОНЕТЕ (AHSV)(ЗАДЪЛЖИТЕЛЕН ТЕСТ)

Конкурентният ЕЛАЙЗА се използва за разкриване на определени антитела на AHSV в серума на всякакви клетки от коне. Широкоспектърният, ширококлонов, имунен антивирусен серум от морско свинче (наричан по-долу „антисерум от морско свинче“) е серогрупово определен и може да разкрива всякакви познати серотипове на вируса на африканската чума по конете.

Принципът на теста е прекъсването на реакцията между антигена на вируса на африканската чума по конете и антисерума на морското свинче чрез тестова серумна проба. Антителата на вируса на африканската чума по конете от тестовата серумна проба ще се съревновават с тези от антисерума на морското свинче, което ще има за резултат намаляване на очакваното оцветяване (след добавяне на ензим означен антиморско свинче, антицяло и разтвор). Серумите могат да се тестват и в един разтвор 1 към 5 (метод за серуми в единствен разтвор) или могат да бъдат титрувани (метод на серумно титруване), за да дадат крайните точки на разтвора. Стойности на приемане над 50 % могат да бъдат тълкувани като положителни.

Описаният по-долу тестов протокол се използва в Регионалната референтна лаборатория за африканска чума по конете в Pirbright, Великобритания.

1.1. Описание на теста

1.1.1. Подготовка на плочки

1.1.1.1. Покрийте плочките с ЕЛАЙЗА с антигени от вируса на африканската чума по конете, извлечени от инфектирани клетъчни култури и разтворени в карбонатен/бикарбонатен буфер, рН 9,6. Сложете в инкубатор плочките с ЕЛАЙЗА през нощта при температура 4 °C.

1.1.1.2. Измийте плочките 3 пъти чрез мокрене и изпразване на резервоарчетата с фосфатен физиологичен разтвор, рН 7,2—7,4 и изсушете с попивателна хартия.

1.1.2. Контролни резервоари

1.1.2.1. Титрувайте положителният контролен серум в два пъти разтворени серии, от 1 към 5 до 1 към 640, през колона 1 в блокиращия буфер

(фосфатния физиологичен разтвор, съдържащ 0,05 % (v/v) Туин-20, 5,0 % (w/v) обезмаслено мляко на прах (Cadbury's MarvelTM) и накрая 1 % (v/v) серум от възрастно говедо), за да се получи краен обем от 50 микролитра/резервоарче.

1.1.2.2. Добавете 50 микролитра от контролен отрицателен серум в разтвор 1 към 5 (10 микролитра серум плюс 40 микролитра блокиращ буфер) към резервоари А и Б от колона 2.

1.1.2.3. Добавете 100 микролитра/резервоарче блокиращ буфер към резервоарчета В и Г от колона 2 (празна).

1.1.2.4. Добавете 50 микролитра блокиращ буфер към резервоари Д, Е, Ж и З от колона 2 (контрол от морско свинче).

1.1.3. *Метод за серуми в единствен разтвор*

1.1.3.1. Прибавете разтвор 1 към 5 на всеки тестов серум в блокиращия буфер, за да се удвоят резервоарчетата от колони 3—12 (10 микролитра серум плюс 40 микролитра блокиращ буфер).

или

1.1.4. *Метод на титруване на серума*

1.1.4.1. Подгответе двойно разтворени серии от всеки тестов модел (от 1 към 5 до 1 към 640) в блокиращ буфер в осем резервоарчета от единични колони (3—12).

след това

1.1.5. Добавете 50 микролитра от антисерум на морско свинче, предварително разтворен в блокиращ буфер, към всички резервоарчета, освен в празните резервоарчета от плочката с ЕЛАЙЗА (всички резервоарчета сега съдържат краен обем от 100 микролитра).

1.1.5.1. Инкубирайте за 1 час при 37 °C в ротативен уред за бъркане на течности.

1.1.5.2. Измийте плочките три пъти и ги изсушете както преди.

1.1.5.3. Добавете към всяко резервоарче 50 микролитра серум антиморско свинче, получен от заек, конюгиран с пероксид от хрян (HRP) и предварително разтворен в блокиращ буфер.

1.1.5.4. Инкубирайте за 1 час при 37 °C в ротативен уред за бъркане на течности.

1.1.5.5. Измийте плочките три пъти и ги изсушете както преди.

1.1.6. *Хромоген*

Подгответе разтвор хромоген орто-фенилдиамин (OPD) според инструкциите на производителя (0,5 милиграма/милилитър в стерилна дестилирана вода)

преди употреба. Добавете субстрат (водороден пероксид = H_2O_2), за да даде крайна концентрация 0,5 % (v/v) (1 към 2000 на 30 % H_2O_2). Добавете 50 микролитра от разтвора OPD към всеки резервоар и оставете чинийките за 10 минути в стайна температура. Спрете реакцията чрез добавяне на 50 микролитра/резервоар 1M сярна киселина на резервоарче (H_2SO_4).

1.1.7. Отчитане

Отчетете спектрофотометрично на 492 нанометра.

1.2. Изразяване на резултатите

1.2.1. Чрез използването на софтуерен пакет отпечатайте стойностите на оптичната плътност (OD) и процентното поемане (PI) за тестовите и контролни серуми, базирано на средната стойност, отчетена от четирите контролни резервоарчета от морски свинчета. Данните, отчетени като стойности на OD и процентното поемане се използват, за да се определи дали тестът е извършен в рамките на допустимите граници. Горните контролни граници (UCL) и долните контролни граници (LCL) за контрола от морско свинче са респективно между 1,4 и 0,4 стойности на OD. Крайното титруване на положителния контрол, базирано на 50 % процентно поемане, трябва да е 1 към 240 (в рамките на 1 към 120 до 1 към 480). Всяка чинийка, която не отговаря на горните критерии, трябва да бъде отхвърлена. Обаче ако титърът на положителния контролен серум е по-голям от 1 към 480 и тестовите проби са все още отрицателни, тогава отрицателните тестови проби могат да бъдат приети.

Резервоарите с удвоен обем с отрицателен контролен серум и празните резервоарчета с удвоен обем трябва да отчитат стойности на процентното поемане между + 25 % и -25 % и между + 95 % и + 105 % респективно. Невлизането в тези граници не елиминира резултатите от чинийката, но подсказва развиването на оцветяване на заден план.

1.2.2. Диагностичният праг (стойност на отрязване) за тестовия серум е 50 % (PI 50 %). Проби, отчитащи стойности на процентно поемане по-голямо от 50 %, се считат за положителни. Проби, отчитащи стойности на процентно поемане, по-малко от 50 %, се считат за отрицателни.

Проби, които отчитат стойности на процентно поемане над и под прага за резервоарчетата с удвоен обем, се считат за съмнителни. Такива проби могат да се тестват отново чрез метода за серуми в единствен разтвор или чрез титруване. Положителните проби могат също да се титруват, за да дадат сведение за степента на положителност.

Изглед на метода за серуми в единствен разтвор

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C +		Тестов серум									
A	1:5	C –	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Б	1:10	C –	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
В	1:20	празно										
Г	1:40	празно										
Д	1:80	СС										

Е	1:160	СС										
Ж	1:320	СС	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
З	1:640	СС	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

С – = отрицателна проверка

С + = положителна проверка

СС = проверка морско свинче

Титруване на серума

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	С +		Тестов серум									
А	1:5	С –										1:5
Б	1:10	С –	1:10									1:10
В	1:20	празн о	1:20									1:20
Г	1:40	празн о	1:40									1:40
Д	1:80	СС	1:80									1:80
Е	1:160	СС	1:160									1:160
Ж	1:320	СС	1:320									1:320
З	1:640	СС	1:640									1:640

С – = отрицателна проверка

С + = положителна проверка

СС = проверка морско свинче

2. НЕПРЯК ЕЛАЙЗА ТЕСТ ЗА РАЗКРИВАНЕ НА АНТИТЕЛА НА ВИРУСА НА АФРИКАНСКАТА ЧУМА ПО КОНЕТЕ (ЗАДЪЛЖИТЕЛЕН ТЕСТ)

Описаният по-долу тест е в съответствие с описанието на теста в глава 2.1.11 на *Ръководство за стандарти за диагностични тестове и ваксини на МБЕ*, четвърто издание, 2000 г.

Рекомбинатният VP7 протеин е използван като антиген за определяне на антителата на вируса на африканската чума по конете с висок индекс на чувствителност и определяне. Други предимства са, че той е стабилен и не се инфектира.

2.1. Тестова процедура

2.1.1. Твърда фаза

2.1.1.1. Чинийките с ЕЛАЙЗА се покриват с рекомбиниращ протеин ANSV-4 VP7, разтворен в карбонатен/бикарбонатен буфер, рН 9,6. Инкубирайте чинийките за една нощ при 4 °С.

2.1.1.2. Измийте чинийките пет пъти с дестилирана вода, съдържаща 0,01 % (v/v) Туин-20 (измиващ разтвор). Внимателно оставете чинийките върху абсорбиращ материал, за да премахнете остатъчен измиващ разтвор.

2.1.1.3. Блокирайте чинийките с фосфатен физиологичен разтвор + 5 % (w/v) обезмаслено мляко (Nestlé обезмаслено мляко на прах TM), 200 микролитра/резервоарче за 1 час при 37 °C.

2.1.1.4. Махнете блокиращия разтвор и изтръскайте внимателно чинийките в абсорбиращ материал.

2.1.2. *Тестови проби*

2.1.2.1. Серумните проби за тестване, положителните и отрицателните контролни серуми се разтварят 1 към 25 във фосфатен физиологичен разтвор + 5 % (w/v) обезмаслено мляко + 0,05 % (v/v) Туин-20, 100 микролитра на резервоарче. Инкубирайте 1 час при температура 37 °C.

За титруване направете серия от двойни разтвори от 1 към 25 (100 микролитра/резервоарче), един серум на колона от чинийки, и направете същата операция с положителните и с отрицателните проверки. Инкубирайте за 1 час при 37 °C.

2.1.2.2. Измийте чинийките, както е показано в стъпка 2.1.1.2.

2.1.3. *Смесване*

2.1.3.1. Смесете 100 микролитра на резервоарче от пероксидаза от цвекло – смесена с анти-конски гама-глобулин, разтворен във фосфатен физиологичен разтвор + 5 % обезмаслено мляко + 0,05 % Туин-20 с рН 7,2. Инкубирайте 1 час при температура 37 °C.

2.1.3.2. Измийте чинийките, както е показано в стъпка 2.1.1.2.

2.1.4. *Хромоген/Субстрат*

2.1.4.1. Добавете 200 микролитра/резервоарче от разтвор хромоген/субстрат (10 ml от 80,6 mM DMB (диметил amino-бензалдехид) + 10 ml от 1,56 mM MBTH (3-метил-2-бензо-тиазолин хидразон хидрахлорид) + 5 микролитра H₂O₂).

Развиването на цвят се спира с добавянето на 50 микролитра от 3N H₂SO₄ след около 5—10 минути (преди започване на оцветяването на отрицателната проверка).

Други хромогени като ABTS (2,2'-Азино-бис-[3-етилбензоатхиазолин-6-сериста киселина]), ТМВ (тетраметил бензидин) или OPD (орто-фетилдиамин) могат също да се използват.

2.1.4.2. Отчетете чинийките на 600 нанометра (или 620 нанометра).

2.2. *Интерпретиране на резултатите*

2.2.1. Изчислете праговата стойност чрез добавяне на 0,6 към стойността на негативната проверка (0,6 е стандартното отклонение, получено от група от 30 отрицателни серума).

2.2.2. Тестови проби, даващи стойности на поглъщане под стойността на изрязване, се считат като отрицателни.

2.2.3. Тестови проби, даващи стойности на поглъщане над стойността на изрязване + 0,15 се считат като положителни.

2.2.4. Тестови проби, даващи усреднени стойности на поглъщане, са съмнителни и трябва да се приложи втора техника за потвърждаване на резултата.

3. БЛОКИРАЩ ТЕСТ ЕЛАЙЗА ЗА РАЗКРИВАНЕ НА АНТИТЕЛА НА ВИРУСА НА АФРИКАНСКАТА ЧУМА ПО КОНЕТЕ (ЗАДЪЛЖИТЕЛЕН ТЕСТ)

Блокиращият тест ЕЛАЙЗА е предназначен за откриване на специфични антитела на вируса на африканската чума по конете в серум от всякакви възприемчиви видове. VP7 е най-големият антигенен вирусен протеин на африканската чума по конете и присъства в деветте серотипа. Поради това, че моноклоналното антитяло (Mab) също е насочено срещу VP7, анализът ще даде висока степен на чувствителност и определеност. Нещо повече, рекомбинантният VP7 антиген е напълно безвреден и дава висока степен на сигурност.

Принципът на теста е прекъсване на реакцията между рекомбинантният VP7, като антигенът се свързва с чинийката с ЕЛАЙЗА и конюгираното моноклонално антитяло, специфично за протеина VP7. Антителата в тестовия серум ще блокират реакцията между антигена и моноклоналното антитяло, което ще има за резултат намаляване на оцветяването.

Описаният по-долу тест е проведен в Референтната лаборатория на Европейската общност за африканска чума по конете в Algete, Испания.

3.1. Тестова процедура

3.1.1. Чинийки с ЕЛАЙЗА

3.1.1.1. Чинийките с ЕЛАЙЗА се покриват с рекомбинант ANSV-4 VP7, разтворен в карбонатен/бикарбонатен буфер, рН 9,6. Инкубирайте чинийките за една нощ при 4 °C.

3.1.1.2. Измийте чинийките пет пъти с фосфатен физиологичен разтвор, съдържащ 0,05 % (v/v) Туин-20.

3.1.1.3. Стабилизирайте чинийката чрез третиране със стабилизиращ разтвор (за да позволите по-дълго съхранение при температура от 4 °C, без загуба на дейност) и ги изсушете в абсорбиращ материал.

3.1.2. Тестови проби и контроли

3.1.2.1. За отсяване: разтворете тестови серуми и контроли 1 към 10 пряко на чинийките във фосфатен физиологичен разтвор, за да дадат краен обем 100 милилитра/резервоарче. Инкубирайте 1 час при температура 37 °C.

3.1.2.2. За титруване: Подгответе двойно разтворени серии от тестови серуми и положителни контроли (100 микролитра/резервоарче) от 1 към 10 до 1 към 1280 в осем резервоарчета. Негативните контроли се тестват в разтвор 1 към 10.

3.1.3. *Смесване*

Добавете 50 микролитра предварително разтворена пероксидаза от хрян — смесена с моноклонално анти тяло (моноклонални анти тела, специфични за антигена VP7) към всеки резервоар и я смесете внимателно, за да гарантирате хомогенност. Инкубирайте 30 мин при температура 37 °C.

3.1.4. Измийте чинийките пет пъти с фосфатен физиологичен разтвор и ги изсушете.

3.1.5. *Хромоген/Субстрат*

Добавете 100 микролитра/резервоарче разтвор хромоген/субстрат (1 ml ABTS (2,2'-Азино-бис-[3-етилбензотиазолин-6-сериста киселина]) 5 милиграма/милилитър + 9 милиграма/милилитър субстратен буфер (0,1 М фосфатно-цитратен буфер рН 4, съдържащ 0,03 % H₂O₂) и инкубирайте 10 минути при стайна температура. Образуването на цвят се спира с добавяне на 100 микролитра/резервоарче 2 % (w/v) натриев додецил сулфат.

3.1.6. *Отчитане*

Отчетете на 405 нанометра в рийдър за ЕЛАЙЗА.

3.2. Интерпретиране на резултатите

3.2.1. *Валидиране на анализа*

Тестът е валиден, когато оптичната плътност на негативните контроли е по-висока от 1,0 и оптичната плътност на положителните контроли е по-ниска от 0,2

3.2.2. *Изчисляване на изключването*

Положително изключване = $OK - ((OK - PK) \times 0,3)$

Отрицателно изключване = $OK - ((OK - PK) \times 0,2)$

Където ОК е оптичната плътност на отрицателните контроли, а ПК е оптичната плътност на положителните контроли.

3.2.3. *Интерпретиране на резултатите*

Проби с оптичната плътност, по-ниска от точката на изключване на положителните контроли, следва да се считат за положителни за анти тела на вируса на африканската чума по конете.

Проби с оптическа плътност, по-висока от точката на изключване на отрицателните контроли, следва да се считат за отрицателни за антитела на вируса на африканската чума по конете.

Проби със стойности на оптическа плътност между тези две стойности следва да се считат за съмнителни и животните да бъдат тествани отново след две до три седмици.