

DECYZJA WYKONAWCZA KOMISJI (UE) 2016/1840**z dnia 14 października 2016 r.****zmieniająca załącznik IV do dyrektywy Rady 2009/156/WE w odniesieniu do metod diagnostowania afrykańskiego pomoru koni***(notyfikowana jako dokument nr C(2016) 6509)***(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając dyrektywę Rady 2009/156/WE z dnia 30 listopada 2009 r. w sprawie warunków zdrowotnych zwierząt, regulujących przemieszczanie i przywóz zwierząt z rodziny koniowatych z państw trzecich ⁽¹⁾, w szczególności jej art. 20,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Załącznik IV do dyrektywy 2009/156/WE określa metody diagnostowania afrykańskiego pomoru koni, które w razie potrzeby należy stosować do celów badania zwierząt przed ich przemieszczaniem w Unii lub przywozem z państw trzecich.
- (2) Od czasu przyjęcia dyrektywy 2009/156/WE zdolności laboratoriów do prowadzenia zaawansowanych, bardzo dokładnych i skutecznych testów do diagnostyki afrykańskiego pomoru koni rozwinęły się. Równocześnie zmieniono rozdział dotyczący diagnostyki afrykańskiego pomoru koni w podręczniku badań diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) ⁽²⁾, aby odzwierciedlić tę ewolucję.
- (3) Laboratorium referencyjne Unii Europejskiej dla afrykańskiego pomoru koni ⁽³⁾ przedstawiło w ramach swojego programu prac na 2014 r. sprawozdanie dotyczące oceny technicznej metody diagnostycznej określonej w załączniku IV do dyrektywy 2009/156/WE. W ocenie przedstawionej Komisji w maju 2015 r., stwierdzono, że kompetycyjny test ELISA nie jest już dostępny, pośrednie testy ELISA nie są w powszechnym użyciu, ale mogą być dostarczone w ciągu 4–6 miesięcy od złożenia wniosku, oraz że ten blokujący test ELISA jest dostępny i powszechnie stosowany do analizy próbek podczas badań biegłości organizowanych przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej na potrzeby diagnostowania afrykańskiego pomoru koni.
- (4) W sprawozdaniu wskazano ponadto na przewagę rozpoznawania kwasu nukleinowego metodami łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) nad serologicznymi metodami diagnostycznymi, ponieważ te pierwsze umożliwiają wykrycie choroby we wczesnym stadium infekcji. Co więcej, większość krajowych laboratoriów referencyjnych państw członkowskich Unii Europejskiej stosuje, w tym do diagnozy afrykańskiego pomoru koni, metody RT-PCR w czasie rzeczywistym, które w rocznych badaniach biegłości przeprowadzonych w latach 2009–2014 uznano za odpowiednie. Sprawozdanie wskazuje również, że poza terytorium Unii wiele laboratoriów referencyjnych OIE i innych laboratoriów posiadających szczególne doświadczenie w zakresie afrykańskiego pomoru koni wprowadziło co najmniej jedną z metod RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania genomu wirusa afrykańskiego pomoru koni.
- (5) W dniach 24–25 listopada 2015 r. na wspólnych warsztatach laboratoriów referencyjnych Unii Europejskiej oraz krajowych laboratoriów referencyjnych w Ascot (Zjednoczone Królestwo) poświęconych afrykańskiemu pomorowi koni i chorobie niebieskiego języka zalecono włączenie metod wykrywania wirusa afrykańskiego pomoru koni z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (RT-PCR w czasie rzeczywistym) do załącznika IV do dyrektywy 2009/156/WE.

⁽¹⁾ Dz.U. L 192 z 23.7.2010, s. 1.

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

⁽³⁾ Dyrektywa Rady 92/35/EWG z dnia 29 kwietnia 1992 r. ustanawiająca zasady kontroli i środki zwalczania afrykańskiego pomoru koni (Dz.U. L 157 z 10.6.1992, s. 19).

- (6) Chociaż wszystkie dostępne metody wykrywania wirusa afrykańskiego pomoru koni z wykorzystaniem RT-PCR w czasie rzeczywistym są wystarczająco precyzyjne, laboratoria najczęściej stosują procedurę opisaną przez Agüero i in. (2008) ⁽⁴⁾. Metoda opisana przez Guthrie i in. (2013) ⁽⁵⁾ została opracowana specjalnie na potrzeby zagwarantowania bezpiecznego przewozu koni z obszarów zagrożonych zakażeniem afrykańskim pomorem koni po minimalnym okresie kwarantanny wymaganym zgodnie z Kodeksem zdrowia zwierząt lądowych ⁽⁶⁾ OIE.
- (7) Należy zatem włączyć do załącznika IV do dyrektywy 2009/156/WE metody identyfikacji czynnika chorobotwórczego i wykrywania przeciwciał jako uzupełniające metody szybkiego diagnozowania afrykańskiego pomoru koni.
- (8) Załącznik IV do dyrektywy 2009/156/WE należy zatem zmienić, wykreślając kompetycyjny test ELISA, jak również aktualizując procedury stosowania pośredniego i blokującego testu ELISA zgodnie z rozdziałem 2.5.1 Podręcznika testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), wydanie z 2016 r., opartego na wersji przyjętej przez Światowe Zgromadzenie Delegatów OIE w maju 2012 r. ⁽⁷⁾. Jednocześnie należy włączyć do tego załącznika procedury RT-PCR w czasie rzeczywistym opisane przez Agüero i in. (2008) oraz przez Guthrie i in. (2013) w celu udostępnienia tych testów na obecność czynnika chorobotwórczego na potrzeby testów realizowanych przed przemieszczaniem.
- (9) Należy zatem odpowiednio zmienić dyrektywę 2009/156/WE.
- (10) Środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Roślin, Zwierząt, Żywności i Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

Artykuł 1

Załącznik IV do dyrektywy 2009/156/WE zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku do niniejszej decyzji.

Artykuł 2

Niniejsza decyzja skierowana jest do państw członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 14 października 2016 r.

W imieniu Komisji
Vytenis ANDRIUKAITIS
Członek Komisji

⁽⁴⁾ M. Agüero, C. Gomez-Tejedor, M. Angeles Cubillo, C. Rubio, E. Romero i A. Jimenez-Clavero (2008), Test łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym na potrzeby wykrywania wirusa afrykańskiego pomoru koni, J. Vet. Diagn. Invest., 20, 325–328.

⁽⁵⁾ A.J. Guthrie, N.J. MacLachlan, C. Joone, C.W. Lourens, C.T. Weyer, M. Quan, M.S. Monyai, I.A. Gardner, Diagnostyczna precyzja dupleksowej łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym przy wykrywaniu wirusa afrykańskiego pomoru koni (ang. 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⁾ Zob. przypis 2.

ZAŁĄCZNIK

„ZAŁĄCZNIK IV

AFRYKAŃSKI POMÓR KONI

DIAGNOZOWANIE

CZĘŚĆ A

Badania serologiczne

Opisana poniżej metoda serologiczna to test immunoenzymatyczny (ELISA) na podstawie pkt 2 sekcji B rozdziału 2.5.1 Podręcznika testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych, przyjętego przez Światowe Zgromadzenie Delegatów OIE w maju 2012 r. (wydanie z 2016 r.).

Białko wirusowe VP7 jest głównym antygenem immunogennym wirusa afrykańskiego pomoru koni (AHSV) i występuje w dziewięciu serotypach wirusa AHSV. Rekombinowane białka AHSV-VP7 okazały się stabilne, nieszkodliwe i zdadne do wykorzystania jako antygeny w badaniach ELISA służących wykrywaniu przeciwciał AHSV, dzięki wysokiemu poziomowi czułości i swoistości (Laviada i in., 1992b⁽¹⁾; Maree i Pawęska, 2005). Pośredni test ELISA oraz blokujący test ELISA to dwa testy ELISA z wykorzystaniem AHS-VP7 odpowiednie do serologicznego diagnozowania afrykańskiego pomoru koni.

1. Pośredni test ELISA na obecność przeciwciał wirusa afrykańskiego pomoru koni (AHSV)

Koniugat wykorzystywany w tej metodzie to znakowana peroksydazą chrzanową antykońska IgG gamma-globulina reagująca z surowicą koni, mułów i osłów. W metodzie opisanej przez Maree i Pawęskę (2005)⁽²⁾ jako koniugat wykorzystuje się białko G, które reaguje też z surowicą zebry.

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), Hiszpania, może dostarczyć antygeny w ciągu 4–6 miesięcy od złożenia wniosku.

1.1. Procedura badania

1.1.1. Faza stała

1.1.1.1. Pokryć płytki do testu ELISA rekombinowanym AHSV-4 VP7 rozpuszczonym w węglanowo-dwuwęglanowym buforze, pH 9,6. Płytki inkubować przez całą noc w temperaturze 4 °C.

1.1.1.2. Umyć płytki pięć razy wodą destylowaną zawierającą 0,01 % (v/v) Tween 20 (roztwór do mycia). Delikatnie postukać o materiał absorpcyjny w celu usunięcia pozostałości po myciu.

1.1.1.3. Zblokować płytki roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) pH 7,2 + 5 % (w/v) odtłuszczonego mleka (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl/basenik przez 1 godzinę, w temperaturze 37 °C.

1.1.1.4. Usunąć roztwór blokujący i delikatnie postukać płytkami o materiał absorpcyjny.

1.1.2. Próbkki testowe

1.1.2.1. Próbkki surowicy przeznaczone do testowania oraz dodatnią i ujemną surowicę kontrolną rozpuścić w stosunku 1 do 25 w PBS + 5 % (w/v) odtłuszczonego mleka + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl/basenik. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.

Do miareczkowania przygotować podwójne serie roztworów, począwszy od stosunku 1 do 25 (100 µl/basenik), jedna płytka z surowicą na kolumnę, te same czynności należy wykonać w przypadku kontroli dodatnich i ujemnych. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.

⁽¹⁾ M.D. Laviada, P. Roy i J.M. Sanchez-Vizcaino (1992), Dostosowanie i ocena pośredniego testu ELISA i testu immunoblot do wykrywania przeciwciał afrykańskiego pomoru koni. Choroba niebieskiego języka, afrykański pomór koni i powiązanych orbivirusów – Materiały z drugiego międzynarodowego sympozjum, T.E. Walton i B.I. Osburn, Wyd. CRC Press, Boca Raton, Floryda, USA, s. 646–650.

⁽²⁾ S. Maree i J.T. Pawęska (2005), Przygotowanie antygenów rekombinowanego VP7 wirusa afrykańskiego pomoru koni przy użyciu prostej metody i zatwierdzenie pośredniego testu ELISA opartego o VP7 do wykrywania konkretnych grup przeciwciał IgG w surowicach koni, J. Virol. Methods, 125 (1), s. 55–65.

- 1.1.2.2. Umyć płytki pięć razy destylowaną wodą zawierającą 0,01 % (v/v) Tween 20 (roztwór do mycia). Delikatnie postukać o materiał absorpcyjny w celu usunięcia pozostałości po myciu.
- 1.1.3. Koniugat
 - 1.1.3.1. Sporządzić 100 µl/basenik peroksydazę chrzanową (HRP) znakowaną antykońską IgG gamma-globuliną rozpuszczoną w PBS + 5 % mleka + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.
 - 1.1.3.2. Umyć płytki pięć razy destylowaną wodą zawierającą 0,01 % (v/v) Tween 20 (roztwór do mycia). Delikatnie postukać o materiał absorpcyjny w celu usunięcia pozostałości po myciu.
- 1.1.4. Chromogen/substrat
 - 1.1.4.1. Dodać 200 µl/basenik roztworu chromogenu/substratu (10 ml z 80,6 mM DMAB (dimetyloaminobenzaldehyd) + 10 ml w 1,56 mM MBTH (chlorowodorek hydrazonu 3-metylo-2-benzo-tiazoliny) + 5 µl H₂O₂).

Rozwój koloru zostanie powstrzymany poprzez dodanie po około 5–10 minutach (zanim kontrola ujemna zacznie nabierać koloru) 50 µl 3N H₂SO₄.

Można stosować również inne chromogeny, takie jak: ABTS (kwas 2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolin-6-sulfonowy), TMB (tetrametylobenzydyna) lub OPD (ortofenylo-diamina).
 - 1.1.4.2. Odczytu płytek dokonywać na 600 nm (lub 620 nm).
- 1.2. *Interpretacja wyników*
 - 1.2.1. Ustalić wartość graniczną, dodając do wartości kontroli ujemnej 0,06 (0,06 to odchylenie standardowe obliczone na 30-elementowej grupie próbek surowicy ujemnej).
 - 1.2.2. Próbkę, których wartości absorpcji są niższe od wartości granicznej, uznaje się za ujemne.
 - 1.2.3. Próbkę, których wartości absorpcji są wyższe od wartości granicznej powiększonej o + 0,15, uznaje się za dodatnie.
 - 1.2.4. Próbkę, których wartości absorpcji są umiarkowane, uznaje się za niejednoznaczne i w celu potwierdzenia wyników należy zastosować drugą technikę.
2. **Blokujący test ELISA na obecność przeciwciał wirusa afrykańskiego pomoru koni (AHSV)**

Kompetycyjny blokujący test ELISA zaprojektowano do wykrywania określonych przeciwciał AHSV w surowicy zwierząt dowolnego gatunku koniowatych, tj. koni, osłów, zebr i ich krzyżówek oraz zapobieżenia problemowi swoistości doświadczanemu sporadycznie przy stosowaniu pośrednich testów ELISA.

Test opiera się na zablokowaniu reakcji między rekombinowanym białkiem VP7 wchłoniętym w płytkę do testu ELISA a zespolonym przeciwciałem monoklonalnym właściwym dla AHS-VP7. Przeciwciała w surowicy testowej zablokują reakcję między antygenem a przeciwciałem monoklonalnym, powodując redukcję intensywności koloru. Przeciwciało monoklonalne skierowane jest także przeciwko VP7, dlatego badanie charakteryzuje się wysokim poziomem czułości i swoistości.

Kompetycyjny blokujący test ELISA jest dostępny na rynku.

- 2.1. *Procedura badania*
 - 2.1.1. Faza stała
 - 2.1.1.1. Pokryć płytki do testu ELISA 50–100 ng rekombinowanego AHSV-4 VP7 rozpuszczonego w węglanowo-wodowęglanowym buforze, pH 9,6. Inkubować przez całą noc w temperaturze 4 °C.
 - 2.1.1.2. Umyć płytki trzykrotnie roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) 0,1× zawierającym 0,135 M NaCl i 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Delikatnie postukać o materiał absorpcyjny w celu usunięcia pozostałości po myciu.

2.1.2. Próbki testowe i kontrole

- 2.1.2.1. Próbki surowicy przeznaczone do testowania oraz dodatnią i ujemną surowicę kontrolną rozpuszcza się w stosunku 1:5 w rozcieńczalniku zawierającym 0,35 M NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 i 0,1 % Kathon, 100 µl/basenik. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.

Do miareczkowania przygotować podwójne serie roztworów surowicy testowej, poczynawszy od stosunku 1:10 do 1:280 w ośmiu basenikach (100 µl/basenik), jedna płytką z surowicą na kolumnę, przy czym te same czynności należy wykonać w przypadku kontroli dodatnich i ujemnych. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.

- 2.1.2.2. Umyć płytki pięciokrotnie roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) 0,1× zawierającym 0,135 M NaCl i 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Delikatnie postukać o materiał absorpcyjny w celu usunięcia pozostałości po myciu.

2.1.3. Koniugat

- 2.1.3.1. Sporządzić 100 µl/basenik przeciwciała monoklonalnego anti-VP7 sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Wcześniej to przeciwciała monoklonalne rozcieńczono w proporcji 1/5 000–1/15 000 w roztworze 1:1 StabiliZyme Select® Stabilizer (SurModics. Ref. SZ03) i wody destylowanej. Inkubować przez 30 minut w temperaturze 37 °C.

- 2.1.3.2. Umyć płytki pięciokrotnie roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) 0,1× zawierającym 0,135 M NaCl i 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Delikatnie postukać o materiał absorpcyjny w celu usunięcia pozostałości po myciu.

2.1.4. Chromogen/substrat

Dodać 100 µl/basenik roztworu chromogenu/substratu, tj. 1 ml ABTS (kwasu 2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolin-6-sulfonowego) 5 mg/ml + 9 ml buforu substratowego (0,1 M buforu cytrynianu fosforanu o pH 4, zawierającego 0,03 % H₂O₂), i inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Rozwój koloru zatrzymuje się przez dodanie 100 µl/basenik 2 % (w/v) SDS (dodecylosiarczanu sodu).

2.1.5. Odczyt

Odczytywać przy pomocy czytnika ELISA na 405 nm.

2.2. Interpretacja wyników

- 2.2.1. Określić współczynnik blokowania każdej próbki za pomocą następującego wzoru, gdzie „Abs“ oznacza przeciwciała:

$$\text{współczynnik blokowania} = \frac{\text{Abs}(\text{wzorcowe}^-) - \text{Abs}(\text{próbki})}{\text{Abs}(\text{wzorcowe}^-) - \text{Abs}(\text{wzorcowe}^+)} \times 100$$

- 2.2.2. Dla próbek wykazujących wartość współczynnika blokowania wyższą niż 50 % wynik wykrywania przeciwciał AHSV uznaje się za dodatni.

- 2.2.3. Dla próbek wykazujących wartość współczynnika blokowania niższą niż 45 % wynik wykrywania przeciwciał AHSV uznaje się za ujemny.

- 2.2.4. Dla próbek wykazujących wartość współczynnika blokowania między 45 % a 50 % wynik uznaje się za niejednoznaczny i należy zbadać je ponownie. Jeżeli wynik ponownie jest niejednoznaczny, zwierzęta należy ponownie poddać testom na podstawie próbek pobranych nie wcześniej niż dwa tygodnie po pobraniu próbek, które okazały się niejednoznaczne.

CZĘŚĆ B

Identyfikacja czynnika chorobotwórczego

Łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (RT-PCR w czasie rzeczywistym)

Test na obecność czynnika chorobotwórczego w oparciu o metody wykrywania kwasów nukleinowych musi wykazać szczepy referencyjne z dziewięciu serotypów wirusa AHSV.

Metoda opisana w pkt 2.1 opiera się na pkt 1.2 sekcji B rozdziału 2.5.1 Podręcznika testów diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych, przyjętego przez Światowe Zgromadzenie Delegatów OIE w maju 2012 r. (wydanie z 2016 r.).

Wszelkie metody wykrywania RT-PCR stosowane do badania próbek krwi lub śledziona w kontekście dyrektywy 2009/156/WE należy wykonywać z dokładnością odpowiadającą co najmniej dokładności metody opisanej w pkt 2 lub większą.

Inaktywowane referencyjne szczepy serotypów 1–9 wirusa można otrzymać z laboratorium referencyjnego Unii Europejskiej lub z laboratorium referencyjnego OIE w Algete, Hiszpania, zajmującego się afrykańskim pomorem koni.

1. Izolacja RNA wirusa

W celu zapewnienia odpowiedniej reakcji ekstrakt należy pobrać z próby RNA AHSV wysokiej jakości. Izolację kwasów nukleinowych z próbek klinicznych można przeprowadzać za pomocą różnych metod własnych i metod dostępnych na rynku.

Zestawy dostępne w sprzedaży wykorzystują inne podejście do izolacji RNA. Większość z nich oparta jest na jednej z następujących procedur:

- izolacja kwasów nukleinowych fenolem i chloroformem,
- adsorpcja kwasów nukleinowych na system filtrów,
- adsorpcja kwasów nukleinowych na kulki magnetyczne.

Niżej podano przykład metody własnej izolacji RNA:

- 1.1. 1 g próbki tkanki homogenizuje się w 1 ml roztworu czynnika denaturującego (4 M tiocyjanianu guanidyny, 25 mM cytrynianu sodu, 0,1 M 2-merkaptoetanolu, 0,5 % sarkozynianu laurylosiarczanu sodowego).
- 1.2. Po odwirowaniu do supernatantu dodaje się 1 µg RNA drożdży; 0,1 ml 2 M octanu sodu, pH 4,1; 1 ml fenolu i 0,2 ml mieszaniny alkoholowej chloroformu/alkoholu izoamylowego (49/1).
- 1.3. Zawiesinę wstrząsa się energicznie, a następnie schładza na lodzie przez 15 minut.
- 1.4. Po odwirowaniu RNA obecny w fazie wodnej jest ponownie zawieszony w sterylnej wodzie, wolny od fenolu, a etanol jest wytrącony.

2. Procedura RT-PCR w czasie rzeczywistym

- 2.1. *Swoisty grupowo RT-PCR w czasie rzeczywistym, Agüero i in., 2008* ⁽¹⁾

Ten swoisty grupowo RT-PCR w czasie rzeczywistym ukierunkowany jest na VP7 AHSV i umożliwia wykrywanie wszystkich znanych krążących obecnie serotypów i szczepów AHSV. Był on stosowany z bardzo dobrymi wynikami przez krajowe laboratoria referencyjne państw członkowskich Unii Europejskiej uczestniczących corocznie w badaniach biegłości organizowanych przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej w latach 2009–2015. Protokół ten znalazł się ponadto pośród najlepiej ocenionych w międzynarodowym porównaniu międzylaboratoryjnym zorganizowanym w 2015 r. w ramach sieci laboratoriów referencyjnych OIE.

Sekwencje startera i sondy na potrzeby wykrywania wirusów gatunku AHSV:

- starter sensowny 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- starter antysensowny 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'
- sonda TaqMan® MGB 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3'

- 2.1.1. Wyjściowe stężenie startera rozcieńcza się do stężenia roboczego 8 µM („zapas roboczy startera 8 µM”), natomiast sondę rozcieńcza się do stężenia roboczego 50 µM („zapas roboczy sondy 50 µM”). Forma płytki do badań winna być odpowiednio zaprojektowana i wprowadzona do oprogramowania urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym. Stosując formę jako wskaźnik, 2,5 µl każdego startera z zapasu roboczego 8 µM dodaje się do każdego basenika zawierającego próbki RNA, kontrole dodatnie lub ujemne (końcowe stężenie startera w 20 µl RT-PCR mix wynosić będzie 1 µM). Płytkę trzyma się na lodzie.

⁽¹⁾ M. Agüero, C. Gomez-Tejedor, M. Angeles Cubillo, C. Rubio, E. Romero i A. Jimenez-Clavero (2008), Łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym na potrzeby wykrywania wirusa afrykańskiego pomoru koni, J. Vet. Diagn. Invest., 20, s. 325–328.

- 2.1.2. 2 µl wyizolowanego RNA (próbki do testów i kontrola dodatnia) lub 2 µl wody wolnej od RNaz, której wynik badań był ujemny, miesza się ze starterem sensownym i antysensownym. Mieszanina ta poddawana jest denaturacji przez ogrzewanie w temperaturze 95 °C przez 5 minut, a następnie szybkie schłodzenie na lodzie przez co najmniej 5 minut.
- 2.1.3. Właściwą objętość Master Mix do jednoetapowego RT-PCR w czasie rzeczywistym na liczbę próbek do badania przygotowuje się według instrukcji producenta. 0,1 µl z 50 µM zapasu roboczego sondy dodaje się do każdego basenika zawierającego próbki RNA (w każdym baseniku zawierającym próbki RNA końcowe stężenie sondy wynosić będzie 0,25 µM). 13 µl Master Mix do jednoetapowego RT-PCR w czasie rzeczywistym rozdziela się do każdego basenika płytki PCR, zawierającego zdenaturowane startery i RNA.
- 2.1.4. Płytkę umieszcza się termocyklerze do analizy PCR w czasie rzeczywistym zaprogramowanym na odwrotną transkrypcję i amplifikację cDNA/detekcję fluorescencyjną. Warunki amplifikacji polegają na tym, że pierwszy etap odwrotnej transkrypcji odbywa się w temperaturze 48 °C przez 25 minut, następnie 10 minut przy 95 °C („hot start”) i 40 cykli po 15 sekund w temperaturze 95 °C, 35 sekund w temperaturze 55 °C i 30 sekund w temperaturze 72 °C (lub 40 cykli w temperaturze 97 °C przez 2 sekundy i 55 °C przez 30 sekund, jeżeli odczynniki i termocykler umożliwiają stosowanie szybkich reakcji). Fluorescencja cząsteczek pojawia się na koniec etapu 55 °C.
- 2.1.5. Jeżeli uzyskane krzywe amplifikacji są nietypowe, badanie uznaje się za nieważne i należy je powtórzyć.

Próbki uznaje się za dodatnie, jeżeli wartości Ct (numer cyklu, pod którym fluorescencja wytworzona w reakcji przekracza próg fluorescencji) nie przekraczają określonego progu Ct (35) w ciągu 40 cykli PCR (Ct ≤ 35).

Próbki uznaje się za niejednoznaczne, jeżeli w 40 cyklach PCR wartość Ct jest wyższa od określonego progu Ct (35) (Ct ≥ 35).

Próbki uznaje się za ujemne, jeżeli uzyskana krzywa amplifikacji jest horyzontalna i nie przekracza progu w ciągu 40 cykli PCR.

2.2. *Swoisty grupowo RT-PCR w czasie rzeczywistym, Guthrie i in., 2013* ⁽¹⁾

RT-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond FRET (ang.: Förster Resonance Energy Transfer) do wykrywania kwasu nukleinowego AHSV.

Test RT-PCR na obecność AHSV zaprojektowano z zastosowaniem sekwencji wielu krążących obecnie szczepów AHSV (Quan i in., 2010 ⁽²⁾). Obejmuje on także syntetyczny test kontroli zewnętrznej przeprowadzony przez producenta, aby sprawdzić prawidłowy przebieg oznaczania składników.

Zestawy do jednoetapowego RT-PCR w czasie rzeczywistym są dostępne w handlu. Poniżej kilka podstawowych kroków wg opisu Guthrie i in. (2013), które można modyfikować w zależności od wymogów lokalnych lub wymogów dla konkretnego przypadku, dostępnych zestawów i urządzeń.

Sekwencje startera i sondy na potrzeby wykrywania wirusów gatunku AHSV:

— starter sensowny 5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'

— starter antysensowny 5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'

— sonda TaqMan® MGB 5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

- 2.2.1. Roztwory podstawowe mieszaniny startera i sondy przygotowuje się w stężeniu o 25-krotnej wartości stężenia dla 5 µM starterów sensownych i antysensownych oraz 3 µM dla sondy. Forma płytki do badań winna być odpowiednio zaprojektowana i wprowadzona do oprogramowania urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym. Stosując formę jako wskazówkę, 5 µl próbek RNA, w tym próbki do testów oraz kontrole dodatnie i ujemne, dodaje się do odpowiednich baseników płytki, w zależności od formy.

- 2.2.2. RNA poddaje się denaturacji przez ogrzewanie w temperaturze 95 °C przez 5 minut, a następnie szybkie schłodzenie na lodzie przez co najmniej 3 minuty.

⁽¹⁾ A.J. Guthrie, N.J. MacLachlan, C. Joone, C.W. Lourens, C.T. Weyer, M. Quan, M.S. Monyai, I.A. Gardner, Diagnostyczna precyzja dupleksowej łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym przy wykrywaniu wirusa afrykańskiego pomoru koni (ang. *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⁾ M. Quan, C.W. Lourens, N.J. MacLachlan, I.A. Gardner, A.J. Guthrie, 2010, Rozwój i optymalizacja dupleksowej ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym ukierunkowanej na VP7 i geny NS2 wirusa afrykańskiego pomoru koni, *J. Virol. Methods* 167, s. 45–52.

- 2.2.3. Właściwą objętość Master Mix do jednoetapowego RT-PCR w czasie rzeczywistym na liczbę próbek do badania przygotowuje się według instrukcji producenta. 1 μ l 25-krotnej wartości roztworu podstawowego startera i sondy (z pkt 2.2.1 powyżej) dodaje się do Master Mix w celu uzyskania w każdym baseniku końcowego stężenia 200 nM dla każdego startera i 120 nM dla sondy. 20 μ l Master Mix rozdziela się do każdego basenika płytki PCR, zawierającego zdenaturowany RNA.
- 2.2.4. Płytkę umieszcza się w termocyklerze do analizy PCR w czasie rzeczywistym zaprogramowanym na odwrotną transkrypcję i amplifikację cDNA/detekcję fluorescencyjną, zgodnie z zaleceniami producentów. Warunki amplifikacji polegają np. na tym, że pierwszy etap odwrotnej transkrypcji odbywa się w temperaturze 48 °C przez 10 minut, a następnie przez 10 minut w temperaturze 95 °C i 40 cykli po 15 sekund w temperaturze 95 °C i 45 sekund w temperaturze 60 °C.
- 2.2.5. Próbki uznaje się za dodatnie, jeśli znormalizowana fluorescencja w teście RT-PCR na obecność AHSV przekracza próg 0,1 w ciągu 36 cykli PCR we wszystkich kontrpróbach.

Próbki uznaje się za niejednoznaczne, jeśli znormalizowana fluorescencja w teście RT-PCR na obecność AHSV przekracza próg 0,1 w ciągu 36–40 cykli PCR w jakiegokolwiek kontrpróbie.

Próbki uznaje się za ujemne, jeżeli znormalizowana fluorescencja w teście RT-PCR na obecność AHSV nie przekracza progu 0,1 w ciągu 40 cykli PCR we wszystkich kontrpróbach oraz jeżeli znormalizowana fluorescencja w syntetycznym teście kontroli zewnętrznej przeprowadzonym przez producenta przekroczyła próg 0,1 w ciągu 33 cykli PCR.”
