Приложение № 2

к Ветеринарно-санитарной норме, устанавливающей условия относительно здоровья при передвижении и импорте лошадиных

**Диагностика африканской чумы лошадей**

**Часть A**

**Серологические тесты**

Серологический метод, описанный далее, представляет собой иммуносорбентный анализ с мечеными ферментами антителами (ИФА), основанный на пункте 2 раздела B главы 2.5.1 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, выпуск 2016 года, принятый Всемирной ассамблеей делегатов Всемирной организации по охране здоровья животных в мае 2012 года.

Вирусный белок VP7 является основным иммунодоминантным антигеном вируса африканской чумы лошадей (ВАЧЛ) и есть во всех девяти серотипах ВАЧЛ. Было показано, что рекомбинантные белки VP7 ВАЧЛ являются стабильными, безопасными и пригодными для использования в качестве антигенов в процедурах ИФА для определения антител анти-ВАЧЛ с высокой степенью чувствительности и специфичности. Непрямой ИФА и ИФА блокировки представляют два метода ИФА АЧЛ-VP7, подходящих для серологического диагноза африканской чумы лошадей (АЧЛ).

**1. Непрямой ИФА для обнаружения антител против вируса африканской чумы лошадей (ВАЧЛ)**

Конъюгат, используемый в этом методе, представляет собой антилошадиный гамма глобулин, конъюгированный с пероксидазой хрена, который реагирует с сывороткой крови лошади, мула и осла. Описанный способ использует в качестве конъюгата белок G, который реагирует с сывороткой крови зебры.

Антиген может быть предоставлен Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) (Центр исследований здоровья животных) из Испании, в течение 4-6 месяцев с момента получения запроса.

1.1. Процедура тестирования

1.1.1. Твердая фаза

1.1.1.1. Налить в планшеты ИФА рекомбинантный белок VP7 ВАЧЛ серотипа 4, разведенный в карбонатно/бикарбонатном буфере с pH 9,6. Инкубировать планшеты в течение ночи при температуре 4 °C.

1.1.1.2. Промыть планшеты пять раз дистиллированной водой, содержащей 0,01 % (О/О) ТВИН-20 (раствор для промывки). Аккуратно обтереть пластины абсорбирующим материалом, чтобы удалить следы воды.

1.1.1.3. Блокировать планшеты фосфатным буферным солевым раствором (ФБР) с pH 7,2 + 5 % (В/О) сухого обезжиренного молока (Nestlé Dry Skim Milk TM), по 200 мкл в каждую лунку в течение одного часа при 37 ° С.

1.1.1.4. Удалить блокирующий раствор и аккуратно встряхнуть планшет над абсорбирующим материалом.

1.1.2. Образцы для испытаний

1.1.2.1. Образцы тестируемой сыворотки и контрольных положительной и отрицательной сывороток развести 1/25 в ФБР + 5 % (В/О) сухого обезжиренного молока + 0,05 % (О/О) ТВИН-20, 100 мкл в каждую лунку. Инкубировать в течение одного часа при температуре 37 °C.

Для титрования выполнить серии двукратного разведения от 1 к 25 (100 мкл/лунку), используя по одной сыворотке для одной колонки планшета; то же самое произвести с положительными и отрицательными образцами. Инкубировать в течение одного часа при температуре 37 °C.

1.1.2.2. Промыть планшеты пять раз дистиллированной водой, содержащей 0,01 % (О/О) ТВИН-20 (раствор для промывки). Аккуратно обтереть пластины абсорбирующим материалом, чтобы удалить следы воды.

1.1.3. Конъюгат

1.1.3.1. Разлить в каждую лунку по 100 мкл антилошадиного гамма глобулина, конъюгированного с пероксидазой хрена, разведенного в ФБР + 5 % молока + 0,05 % ТВИН-20 с pH 7,2. Инкубировать в течение одного часа при температуре 37 °C.

1.1.3.2. Промыть планшеты пять раз дистиллированной водой, содержащей 0,01 % (О/О) ТВИН-20 (раствор для промывки). Аккуратно обтереть пластины абсорбирующим материалом, чтобы удалить следы воды.

1.1.4. Хромоген / субстрат

1.1.4.1. Добавить 200 мкл/лунку раствора хромоген / субстрат [10 мл ДМАБ (диметиламинобензальдегид) 80,6 мМ + 10 мл МБТГ (гидрохлорид гидразона 3-метил-2-бензотиазолина) 1,56 мМ + 5 мкл H2O2].

Блокировать колориметрическую реакцию примерно через 5-10 минут (прежде чем отрицательный контроль начнет окрашиваться), добавив 50 мкл H2SO4 3N.

Могут быть использованы другие хромогены, такие как AБТС [2,2'-Азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)], ТМБ (тетраметилбензидин ) или ОФД (ортофенилдиамин).

1.1.4.2. Снять показатели с планшетов при 600 нм (или 620 нм).

1.2. Интерпретация результатов

1.2.1. Рассчитать пороговое значение путем добавления 0,06 к показателю отрицательного контроля (0,06 стандартное отклонение, полученное с группой 30 отрицательных сывороток).

1.2.2. Образцы для тестирования, дающие показатели абсорбции ниже, чем пороговое значение, считают отрицательными.

1.2.3. Образцы для тестирования, дающие показатели абсорбции больше, чем пороговое значение +0,15, считают положительными.

1.2.4. Образцы для тестирования, дающие средние показатели абсорбции, являются сомнительными, и следует использовать второй метод, чтобы подтвердить результат.

**2. Блокирующий метод ИФА для выявления антител к вирусу африканской чумы лошадей (ВАЧЛ)**

Блокирующий метод ИФА разработан, чтобы выявить специфические антитела к вирусу африканской чумы лошадей в сыворотках от восприимчивых видов лошадиных, а именно лошадей, ослов, зебр и их гибридов, что предотвращает проблему специфичности, которая иногда встречается при использовании косвенных ИФА.

 Принцип теста заключается в прерывании реакции между рекомбинантным VP7, поглощенным на планшете ИФА, и конъюгированным моноклональным антителом, специфичным для VP7 АЧЛ (Mab). Антитела в тестовых сыворотках заблокируют реакцию между антигеном и Mab, что приводит в результате к редукции цвета. Поскольку Mab направлено против белка VP7, тест будет очень чувствительным и очень специфичным.

Блокирующий метод ИФА является коммерчески доступным.

2.1. Процедура тестирования

2.1.1. Твердая фаза

2.1.1.1. Налить в планшеты ИФА 50-100 нг рекомбинантного белка VP7 ВАЧЛ серотипа 4, разведенного в карбонатно-бикарбонатном буфере с pH 9,6. Инкубировать в течение ночи при температуре 4 °C.

2.1.1.2. Промыть планшеты три раза фосфатным буферным солевым раствором (ФБР) 0,1x, содержащим 0,135 М NaCl и 0,05 % (О/О) ТВИН-20 (ФБРТ). Аккуратно обтереть пластины абсорбирующим материалом, чтобы удалить следы воды.

2.1.2. Образцы для испытаний и контроля

2.1.2.1. Образцы тестируемой сыворотки и контрольных положительной и отрицательной сывороток развести 1 к 5 в разбавителе, содержащем 0,35 М NaCl, 0,05 % (О/О) ТВИН-20 и 0,1 % катона, 100 мкл в каждую лунку. Инкубировать в течение одного часа при температуре 37 °C.

Для титрования выполнить серии двукратного разведения испытываемых сывороток с 1 к 10 до 1 к 280 через 8 лунок (100 мкл / лунка), используя по одной сыворотке для одной колонки планшета; то же самое произвести с положительными и отрицательными образцами. Инкубировать в течение одного часа при температуре 37 °C.

2.1.2.2. Промыть планшеты пять раз фосфатным буферным солевым раствором (ФБР) 0,1x, содержащим 0,135 М NaCl и 0,05 % (О/О) ТВИН-20 (ФБРТ). Аккуратно обтереть пластины абсорбирующим материалом, чтобы удалить следы воды.

1.1.3. Конъюгат

2.1.3.1. Добавить в каждую лунку по 100 мкл Mab анти-VP7, конъюгированное с пероксидазой хрена. Перед этой операцией Mab соответственно следует развести 1/5 000 -1/15 000 в растворе 1/1 стабилизатора StabiliZyme Select® (ссылка SurModics.: SZ03) в дистиллированной воде. Инкубировать на 30 минут при 37 °C.

2.1.3.2. Промыть планшеты пять раз фосфатным буферным солевым раствором (ФБР) 0,1x, содержащим 0,135 М NaCl и 0,05 % (О/О) ТВИН-20 (ФБРТ). Аккуратно обтереть пластины абсорбирующим материалом, чтобы удалить следы воды.

2.1.4. Хромоген / субстрат

Добавить в каждую лунку по 100 мкл раствора хромоген / субстрат, то есть 1 мл AБТС [2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)] 5 мг / мл + 9 мл буферного раствора субстрата (0,1 М фосфат-цитратного буфера с pH 4, содержащего 0,03 % H2O2), затем выдержать в течение 10 минут при температуре окружающей среды. Блокировать колориметрическую реакцию, добавляя в каждую лунку по 100 мкл ДСН (додецилсульфат натрия) 2 % (В/О).

2.1.5. Чтение

Считать при 405 нм с помощью ИФА ридера.

2.2. Интерпретация результатов

2.2.1. Определение процента блокировки (ПБ) каждого образца по следующей формуле, где «Abs» означает антитела:

$$ПБ=\frac{Abs(контроль-)-Abs(образец )}{Abs\left(контроль-\right)-Abs(контроль +)}x100$$

2.2.2. Образцы с ПБ выше 50% должны считаться положительными для антител ВАЧЛ.

2.2.3. Образцы с ПБ ниже 50% должны считаться отрицательными для антител ВАЧЛ.

2.2.4. Образцы с BP от 45% до 50% следует считать неубедительными и следует подвергнуть повторному тестированию. Если результат все еще неубедителен, животных следует повторно протестировать на основе образцов, взятых не ранее, чем через две недели после проведения выборки, считающейся неубедительной.

**Часть B**

**Идентификация агента**

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ)

Тесты идентификации агента на основе методов, в которых используются нуклеиновые кислоты, должны определять референтные штаммы девяти серотипов ВАЧЛ.

Метод, описанный в пункте 2.1, основан на пункте 1.2 раздела B главы 2.5.1 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, выпуск 2016 года, принятом Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 года.

Любой метод обнаружения на основе ОТ-ПЦР, который используется для тестирования образцов, либо крови, либо селезенки, в контексте Директивы 2009/156/CE, должен быть, по меньшей мере, столь же чувствительным, как и методологии, описанные в пункте 2.

Референтные штаммы инактивированного вируса из серотипов 1-9 могут быть получены из Справочной лаборатории Европейского Союза или из справочной лаборатории МЭБ по африканской чуме лошадей из Альхете, Испания.

**1. Экстракция вирусной РНК**

Для того чтобы обеспечить хорошую реакцию, необходимо извлечь из образца РНК ВАЧЛ высокого качества. Экстракция нуклеиновых кислот из клинических образцов может быть осуществлена с помощью множества внутренних методов и доступных коммерческих методов.

Коммерческие наборы используют различные методы для выделения РНК. Большинство из них основаны на одной из следующих процедур:

- фенол-хлороформная экстракция нуклеиновых кислот;

- адсорбции нуклеиновых кислот в системе фильтрации;

- адсорбции нуклеиновых кислот в системе с магнитными шариками;

Пример внутренней экстракции РНК приведен ниже:

1.1. 1 г образца ткани гомогенизируют в 1 мл денатурирующего раствора (гуанидина тиоцианата 4 М, цитрата натрия 25 мМ, 2 -меркаптоэтанола 0,1 M, саркозила 0,5 %).

1.2. После центрифугирования в супернатант добавляют 1 мкг дрожжевой РНК, 0,1 мл 2 М ацетата натрия 2 M с pH 4, 1 мл фенола и 0,2 мл смеси хлороформ / изоамиловый спирт (49/1).

1.3. Суспензию энергично встряхивают и охлаждают на льду в течение 15 минут.

1.4. После центрифугирования РНК, присутствующая в водной фазе, экстрагируется фенолом, осаждается этанолом и ресуспендируется в стерильной воде.

**2. Процедура ОТ-ПЦР в режиме реального времени**

2.1. ОТ-ПЦР для конкретной группы

Эта ОТ-ПЦР в режиме реального времени определяет группу, нацеленную на белок VP7 ВАЧЛ, и может обнаруживать все известные серотипы и штаммы ВАЧЛ, циркулирующие в настоящее время. Она была успешно использована национальными справочными лабораториями в государствах-членах Европейского Союза, которые участвовали в ежегодных тестах на компетентность, организованных Справочной лабораторией Европейского Союза за период 2009-2015 годов. Кроме того, во время межлабораторных испытаний, проведенных в 2015 году в сети справочных лабораторий Всемирной организации по охране здоровья животных, этот протокол был классифицирован на очень высоком уровне по сравнению с другими.

Праймер и последовательности образцов для обнаружения вирусов вида ВАЧЛ:

|  |  |
| --- | --- |
| Прямой праймер | 5′-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3′ |

|  |  |
| --- | --- |
| Обратный праймер | 5′-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3′ |

|  |  |
| --- | --- |
| Зонд MGB-TaqMan | 5′-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3′ |

2.1.1. Концентрацию праймерного раствора разбавляют до рабочей концентрации 8 мкМ («рабочий раствор 8 мкМ праймера»), в то время, как образец разбавляют до рабочей концентрации 50 мкМ («рабочий раствор 50 мкМ образца»). План тестового планшета должен быть спроектирован и загружен в программное обеспечение машины ПЦР в реальном времени. Используя макет в качестве руководства, добавляют 2,5 мкл каждого рабочего раствора 8 мкМ праймера в каждую лунку, содержащую образцы РНК, положительные и/или отрицательные образцы (конечная концентрация праймера будет составлять 1 мкМ в 20 мкл смеси ОТ-ПЦР). Планшет выдерживается на льду.

2.1.2. 2 мкл изолированной РНК (тестовые образцы и положительный контрольный образец) или 2 мкл свободной от РНК воды в контрольных образцах с отрицательной реакцией смешивают с прямым и обратным праймерами. Эту смесь денатурируют нагреванием при 95 ° С в течение 5 минут с последующим быстрым охлаждением на льду в течение, по меньшей мере, 5 минут.

2.1.3. Подготавливают в соответствии с инструкциями производителя соответствующий объем основной смеси для ОТ-ПЦР в режиме реального времени в один этап для количества образцов, подлежащих тестированию. В каждую лунку, содержащую образцы РНК, добавляют 0,1 мкл рабочего раствора 50 мкМ образца (конечная концентрация образца должна составлять 0,25 мкМ в каждой лунке, содержащей образцы РНК). Распределяют в каждую лунку планшета ПЦР, содержащую РНК и денатурированные праймеры, 13 мкл основной смеси для ОТ-ПЦР в режиме реального времени в один этап.

2.1.4. Помещают планшет в термоциклер в режиме реального времени, запрограммированный для обратной транскрипции, и для обнаружения ДНК путем флуоресценции / амплификации. Условия амплификации состоят из первой стадии обратной транскрипции при 48 ° С в течение 25 минут, затем 10 минут при 95 ° C («горячий старт») и 40 циклов по 15 секунд при 95 ° C, 35 секунд при 55 ° C и 30 секунд при 72 ° C (или 40 циклов при 97 ° C в течение 2 секунд и 55 ° C в течение 30 секунд, если используются реагенты и термоциклер, позволяющий быстрые реакции). Данные относительно флуоресценции получают в конце этапа 55°C.

2.1.5. Если получены атипичные кривые амплификации, тест не считается действительным и его следует повторить.

Образцы считаются положительными, если значение Ct (номер цикла, при котором флуоресценция, генерируемая в реакции, превышает порог флуоресценции) меньше или равно заданному порогу Ct (35) в течение максимум 40 циклов ПЦР (Ct ≤ 35).

Образцы считаются неубедительными, если значение Ct превышает заданный порог Ct (35) в течение максимум 40 циклов ПЦР (Ct> 35).

Образцы считаются отрицательными, если получена горизонтальная кривая амплификации, которая не пересекает пороговую линию в течение максимум 40 циклов ПЦР.

2.2. RT-PCR в реальном времени для конкретной группы.

ОТ-ПЦР в режиме реального времени, использующая флуоресцентный резонансный перенос энергии (ФРПЭ) для определения нуклеиновой кислоты ВАЧЛ.

Описанный анализ ОТ-ПЦР для ВАЧЛ был разработан на основе последовательностей из широкого спектра циркулирующих в настоящее время полевых штаммов ВАЧЛ. Он также включает запатентованный синтетический анализ внешнего контроля для проверки правильности функционирования компонентов анализа.

Наборы для одностадийной ПЦР в режиме реального времени доступны в продаже. Ниже приведено несколько основных этапов, которые могут быть изменены в зависимости от от местных / конкретных требований, используемых наборов и доступного оборудования.

Праймер и последовательности образцов для обнаружения вирусов вида ВАЧЛ:

|  |  |
| --- | --- |
| Прямой праймер | 5′-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3′ |

|  |  |
| --- | --- |
| Обратный праймер | 5′-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3′ |

|  |  |
| --- | --- |
| Зонд MGB-TaqMan | 5′-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3′ |

2.2.1. Растворы смеси праймера и образца готовятся в концентрации 25 × при 5 мкМ для прямого и обратного праймеров и 3 мкМ для образца. План тестового планшета должен быть спроектирован и загружен в программное обеспечение машины ПЦР в реальном времени. Используя макет в качестве руководства, в соответствующие лунки планшета, согласно плану, добавляют 5 мкл образцов РНК, включая образцы, подлежащие испытанию, положительные и отрицательные образцы.

2.2.2. РНК денатурируют нагреванием при 95 ° С в течение 5 минут с последующим быстрым охлаждением на льду в течение, по меньшей мере, 3 минут.

2.2.3. Подготавливают в соответствии с инструкциями производителя соответствующий объем основной смеси для ОТ-ПЦР в режиме реального времени в один этап, для количества образцов, подлежащих тестированию. В основную смесь включают 1 мкл 25× раствора смеси праймера и образца (из пункта 2.2.1), чтобы получить в каждой лунке конечную концентрацию 200 нМ для каждого праймера и 120 нМ для образца. Распределяют 20 мкл основной смеси в каждую лунку планшета ПЦР, содержащую денатурированную РНК.

2.2.4. Помещают планшет в термоциклер в режиме реального времени, запрограммированный для обратной транскрипции, и для обнаружения ДНК путем флуоресценции / амплификации, в соответствии с рекомендациями производителей. Условия амплификации состоят, например, из первой стадии обратной транскрипции при 48 °C в течение 10 минут, затем 10 минут при 95 ° C и 40 циклов по 15 секунд при 95 ° C и 45 секунд при 60°C.

2.2.5. Образцы считаются положительными, если нормализованная флуоресценция для теста ОТ-ПЦР относительно ВАЧЛ превышает пороговое значение 0,1 в течение 36 циклов ПЦР во всех репликациях образца.

Образцы считаются неубедительными, если нормализованная флуоресценция для теста ОТ-ПЦР относительно ВАЧЛ превышает пороговое значение 0,1 между 36 и 40 циклами ПЦР в любой репликации образца.

Образцы считаются отрицательными, если нормализованная флуоресценция для теста ОТ-ПЦР относительно ВАЧЛ не превышает пороговое значение 0,1 в течение 40 циклов ПЦР во всех репликациях образца, и если нормализованная флуоресценция для запатентованного синтетического теста внешнего контроля превышает пороговое значение 0,1 в течение 33 циклов ПЦР.