

SERVICE PUBLIC FEDERAL
SECURITE SOCIALE

F. 2009 — 3346 (2009 — 2681) [C — 2009/22444]

18 MARS 2009. — Arrêté royal modifiant l'annexe à l'arrêté royal du 14 septembre 1984 établissant la nomenclature des prestations de santé en matière d'assurance obligatoire soins de santé et indemnités. — Erratum

Au *Moniteur belge* n° 256 du 30 juillet 2009, les corrections suivantes doivent être apportées :

1. A la page 51412, il y a lieu de lire dans le texte en français de la prestation 634211-634222 « U 9500 » au lieu de « 9500 ».

2. A la page 51415, neuvième alinéa, il y a lieu de lire dans le texte en néerlandais « 634196-634200 » au lieu de « 634196-34200 ».

FEDERALE OVERHEIDSDIENST
SOCIALE ZEKERHEID

N. 2009 — 3346 (2009 — 2681) [C — 2009/22444]

18 MAART 2009. — Koninklijk besluit tot wijziging van de bijlage bij het koninklijk besluit van 14 september 1984 tot vaststelling van de nomenclatuur van de geneeskundige verstrekkingen inzake verplichte verzekering voor geneeskundige verzorging en uitkeringen. — Erratum

In het *Belgisch Staatsblad* nr. 256 van 30 juli 2009 moeten de volgende correcties worden aangebracht :

1. Op pagina 51412 dient men in de Franse tekst van de verstrekking 634211-634222 « U 9500 » te lezen in plaats van « 9500 ».

2. Op pagina 51415, negende lid, dient men in de Nederlandse tekst « 634196-634200 » te lezen in plaats van « 634196-34200 ».

SERVICE PUBLIC FEDERAL SANTE PUBLIQUE,
SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE
ET ENVIRONNEMENT

F. 2009 — 3347 [C — 2009/24229]

28 JUIN 2009. — Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 26 janvier 1993 relatif à la lutte contre la peste équine

ALBERT II, Roi des Belges,
A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 24 mars 1987 relative à la santé des animaux, l'article 9, 5°, modifié par la loi du 28 mars 2003;

Vu l'arrêté royal du 26 janvier 1993 relatif à la lutte contre la peste équine;

Considérant la Directive 90/426/CEE du Conseil du 26 juin 1990 relative aux conditions de police sanitaire régissant les mouvements d'équidés en provenance des pays tiers, annexe D;

Considérant la Décision 2002/160/CE de la Commission du 21 février 2002 modifiant l'annexe D de la Directive 90/426/CEE du Conseil concernant les tests de diagnostic de la peste équine;

Vu l'avis de l'Inspecteur des Finances, donné le 20 août 2008;

Vu l'avis 45.598/3 du Conseil d'Etat, donné le 3 mars 2009, en application de l'article 84, § 1^{er}, 1°, des lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973;

Sur la proposition de la Ministre de la Santé publique et de la Ministre de l'Agriculture,

Nous avons arrêté et arrêtons :

Article 1^{er}. Dans l'arrêté royal du 26 janvier 1993 relatif à la lutte contre la peste équine, l'annexe 1 est remplacée par l'annexe jointe au présent arrêté.

Art. 2. La Ministre qui a la Santé publique dans ses attributions et la Ministre qui a l'Agriculture dans ses attributions sont chargées, chacune en ce qui la concerne, de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 28 juin 2009.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Santé publique,
Mme L. ONKELINX

La Ministre de l'Agriculture,
Mme S. LARUELLE

FEDERALE OVERHEIDSDIENST VOLKSGEZONDHEID,
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN
EN LEEFMILIEU

N. 2009 — 3347 [C — 2009/24229]

28 JUNI 2009. — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 26 januari 1993 betreffende de bestrijding van paardenpest

ALBERT II, Koning der Belgen,
Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de diergezondheidswet van 24 maart 1987, artikel 9, 5°, gewijzigd bij de wet van 28 maart 2003;

Gelet op het koninklijk besluit van 26 januari 1993 betreffende de bestrijding van paardenpest;

Overwegende de Richtlijn 90/426/EEG van de Raad van 26 juni 1990 met betrekking tot vaststelling van veterinairerechtelijke voorschriften voor het verkeer van paardachtigen en de invoer van paardachtigen uit derde landen, bijlage D;

Overwegende de Beschikking 2002/160/EG van de Commissie van 21 februari 2002 tot wijziging van bijlage D bij Richtlijn 90/426/EEG van de Raad met betrekking tot de diagnostische tests voor paardenpest;

Gelet op het advies van de Inspecteur van Financiën, gegeven op 20 augustus 2008;

Gelet op advies 45.598/3 van de Raad van State, gegeven op 3 maart 2009, met toepassing van artikel 84, § 1, eerste lid, van de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973;

Op de voordracht van de Minister van Volksgezondheid en de Minister van Landbouw,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

Artikel 1. In het koninklijk besluit van 26 januari 1993 betreffende de bestrijding van paardenpest wordt de bijlage 1 vervangen door de bijlage gevoegd bij dit besluit.

Art. 2. De Minister bevoegd voor Volksgezondheid en de Minister bevoegd voor Landbouw zijn, ieder wat hem betreft, belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 28 juni 2009.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
Mevr. L. ONKELINX

De Minister van Landbouw,
Mevr. S. LARUELLE

Annexe à l'arrêté royal du 28 juin 2009 modifiant l'arrêté royal du 26 janvier 1993 relatif à la lutte contre la peste équine

DIAGNOSTIC DE LA PESTE EQUINE

Les réactifs pour les techniques immuno-enzymatiques (ELISA) décrites ci-dessous peuvent être obtenus auprès du laboratoire communautaire de référence ou des laboratoires de référence de l'OIE pour la peste équine.

1. TEST ELISA DE COMPETITION POUR DETECTER LA PRESENCE D'ANTICORPS VIRUS DE LA PESTE EQUINE (VPE) (TEST OBLIGATOIRE)

Le test ELISA de compétition est utilisé pour détecter la présence d'anticorps spécifiques contre le virus de la peste équine dans les sérums de toute espèce d'équidés. L'antisérum de cobaye contre le VPE, ci-après dénommé "antisérum de cobaye", est un antisérum à large spectre, polyclonal et immunitaire; il est spécifique du sérotype PE et permet de détecter tous les sérotypes connus du virus de cette maladie.

Le principe du test est une diminution de la réaction entre l'antigène du VPE et un antisérum de cobaye par un échantillon de sérum à tester. Les anticorps du VPE dans l'échantillon de sérum à tester seront en compétition avec ceux de l'antisérum de cobaye, ce qui entraînera une réduction de la couleur attendue (après ajout d'un anticorps anticobaye marqué par un enzyme et du substrat). Les sérums peuvent être testés à une seule dilution de 1/5 (méthode du test ponctuel) ou être titrés (méthode de titrage du sérum), pour donner les points terminaux de dilution. Des valeurs d'inhibition supérieures à 50 % peuvent être considérées comme positives.

Le protocole du test décrit ci-dessous est utilisé par le laboratoire régional de référence pour la peste équine de Pirbright, Royaume-Uni.

1.1. Description du test

1.1.1. Préparation des plaques

1.1.1.1. Déposer sur des plaques ELISA de l'antigène du VPE extrait de cultures de cellules infectées, dilué dans un tampon carbonate-bicarbonate de pH 9,6. Incuber les plaques ELISA pendant une nuit à 4 °C.

1.1.1.2. Laver les plaques trois fois par rinçage et vider les puits avec une solution saline tamponnée au phosphate (SSTP) de pH 7,2-7,4, puis sécher au buvard.

1.1.2. Puits de contrôle

1.1.2.1. Titrer les sérums de contrôle positifs dans une série de dilutions de 2 en 2, de 1/5 à 1/640, dans la colonne 1, dans un tampon de blocage SSTP contenant 0,05 % (v/v) de Tween-20, 5,0 % (m/v) de lait écrémé en poudre (Cadbury's Marvel™) et 1 % (v/v) de sérum bovin adulte, afin d'obtenir un volume final de 50 µl par puits.

1.1.2.2. Ajouter 50 µl de sérum de contrôle négatif à une dilution de 1/5 (10 µl de sérum + 40 µl de tampon de blocage) aux puits A et B de la colonne 2.

1.1.2.3. Ajouter 100 µl par puits de tampon de blocage aux puits C et D de la colonne 2 (CONTROLE A BLANC).

1.1.2.4. Ajouter 50 µl de tampon de blocage aux puits E, F, G et H de la colonne 2 (contrôle sérum de cobaye).

1.1.3. Méthode du test ponctuel

1.1.3.1. Ajouter au tampon de blocage une dilution à 1/5 de chaque sérum à tester afin de doubler les puits des colonnes 3 à 12 (sérums de 10 µl + 40 µl de tampon de blocage).

ou

1.1.4. Méthode de titrage du sérum

1.1.4.1. Préparer une série de dilutions de 2 en 2 de chaque échantillon à tester (de 1/5 à 1/640) dans un tampon de blocage dans huit puits de chacune des colonnes 3 à 12.

ensuite

1.1.5. Ajouter 50 µl d'antisérum de cobaye, préalablement dilué dans le tampon de blocage, à l'ensemble des puits, excepté les puits DE CONTROLE A BLANC de la plaque ELISA (tous les puits contiennent à présent un volume final de 100 µl).

1.1.5.1. Incuber pendant 1 heure à 37 °C dans un agitateur rotatif.

1.1.5.2. Laver les plaques trois fois et sécher comme précédemment.

1.1.5.3. Ajouter à chaque puits 50 µl de sérum de lapin anticobaye conjugué à de la peroxydase de raifort, préalablement dilué dans un tampon de blocage.

1.1.5.4. Incuber pendant 1 heure à 37 °C dans un agitateur rotatif.

1.1.5.4. Laver les plaques trois fois et sécher comme précédemment.

1.1.6. Chromogène

Préparer la solution chromogène OPD (OPD = orthophényldiamine) selon les instructions du fabricant (0,4 mg/ml dans de l'eau distillée stérile) juste avant de l'utiliser. Ajouter un substrat (peroxyde d'hydrogène = H₂O₂), afin d'obtenir une concentration finale de 0,05 % (v/v) (1/2000 d'une solution à 30 % de H₂O₂). Ajouter 50 µl de la solution OPD à chaque puits et laisser les plaques sur la paillasse pendant 10 minutes à température ambiante. Stopper la réaction en ajoutant 50 µl par puits d'acide sulfurique 1M (H₂SO₄).

1.1.7. Lecture

Lecture par spectrophotométrie à 492 nm.

1.2. Expression des résultats

1.2.1. A l'aide éventuelle d'un logiciel, déterminer les valeurs de densité optique (DO) et le pourcentage d'inhibition (PI) des sérums à tester et des sérums de contrôle, sur la base de la valeur moyenne enregistrée dans les quatre puits contenant les sérums-contrôles de cobaye. Les valeurs DO et PI sont utilisées pour déterminer si le test a été exécuté dans les limites acceptables. Les limites supérieures et inférieures des sérums-contrôles de cobaye se situent respectivement entre les valeurs 1,4 et 0,4 de DO.

Le titre du point terminal du contrôle positif sur la base d'un PI de 50 % devrait être de 1/240 (entre 1/120 à 1/480). Toute plaque non conforme aux critères précités doit être rejetée. Toutefois, si le titre du sérum de contrôle positif est supérieur à 1/480 et que les échantillons testés sont toujours négatifs, les échantillons réputés négatifs peuvent être acceptés.

Les puits de sérum de contrôle négatif dédoublés et les puits de contrôle à blanc dédoublés devraient présenter des valeurs PI comprises respectivement entre + 25 % et - 25 % et entre + 95 % et + 105 %. Le non-respect de ces limites n'a pas pour effet d'invalider les résultats de la plaque, mais il laisse supposer la formation d'une couleur de bruit de fond.

1.2.2. Le seuil de diagnostic (valeur limite) pour les sérums testés est de 50 % (PI 50 %). Les échantillons donnant des valeurs PI supérieures à 50 % sont considérés comme positifs. Les échantillons donnant des valeurs PI inférieures à 50 % sont considérés comme négatifs.

Les échantillons qui présentent des valeurs PI supérieures ou inférieures au seuil pour les puits dédoublés sont considérés comme douteux. Ces échantillons peuvent être retestés par test ponctuel ou par titrage. Les échantillons positifs peuvent également être titrés afin de fournir une indication du degré de positivité.

Analyse ponctuelle

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
c +		Sérums testés									
1:5	c-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1:10	c-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1:20	à blanc										
1:40	à blanc										
1:80	cc										
1:160	cc										
1:320	cc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:640	cc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

C - = contrôle négatif.

C + = contrôle positif.

CC = contrôle de cobaye.

Titrage du sérum

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
c +		Sérums testés									
1:5	c-	1:5									1:5
1:10	c-	1:10									1:10
1:20	à blanc	1:20									1:20
1:40	à blanc	1:40									1:40
1:80	cc	1:80									1:80
1:160	cc	1:160									1:160
1:320	cc	1:320									1:320
1:640	cc	1:640									1:640

C - = contrôle négatif.

C + = contrôle positif.

CC = contrôle de cobaye.

2. TEST ELISA INDIRECT POUR DETECTER LA PRESENCE D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LE VIRUS DE LA PESTE EQUINE (VPE) (TEST OBLIGATOIRE)

Le test décrit ci-après est conforme à la description du chapitre 2.1.11 du manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins de l'OIE, quatrième édition, 2000.

La protéine recombinante VP7 a été utilisée comme antigène pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre le virus de la peste équine; la méthode est très sensible et très spécifique. Cette protéine présente également l'avantage d'être stable et non infectieuse.

2.1. Description du test

2.1.1. Phase solide

2.1.1.1. Des plaques ELISA sont sensibilisées avec la protéine recombinante VP7 du VPE de sérotype 4, diluée dans du tampon carbonate/bicarbonate de pH 9,6. Incuber les plaques pendant une nuit à 4 °C.

2.1.1.2. Rincer les plaques 5 fois avec de l'eau distillée contenant 0,01 % (v/v) de Tween-20 (solution de lavage). Secouer doucement les plaques sur un matériel absorbant pour enlever toute trace de rinçage.

2.1.1.3. Saturer les plaques avec une SSTP + 5 % (m/v) de lait écrémé en poudre (lait Nestlé™), à raison de 200 µl par puits pendant 1 heure à 37 °C.

2.1.1.4. Enlever la solution de saturation et secouer doucement les plaques sur un matériel absorbant.

2.1.2. Echantillons

2.1.2.1. Les sérums à tester et les sérums positif et négatif de contrôle sont dilués au 1/25 dans une SSTP + 5 % (m/v) de lait écrémé + 0,05 % (v/v) de Tween-20; ils sont ensuite déposés à raison de 100 µl par puits. Incuber pendant 1 heure à 37 °C.

Pour le titrage, réaliser des séries de dilution de 2 en 2 à partir du 1/25^e (100 µl/puits), en utilisant une colonne de la plaque par sérum; réaliser la même chose avec les contrôles positif et négatif. Incuber pendant 1 heure à 37 °C.

2.1.2.2. Rincer les plaques comme décrit à l'étape 2.1.1.2.

2.1.3. Conjugué

2.1.3.1. Déposer 100 µl/puits des anticorps anti-cheval conjugués à la peroxydase de raifort; ces anticorps sont dilués dans une SSTP + 5 % de lait écrémé + 0,05 % de Tween-20 de pH 7,2. Incuber pendant 1 heure à 37 °C.

2.1.3.2. Rincer les plaques comme décrit à l'étape 2.1.1.2.

2.1.4. Chromogène/substrat

2.1.4.1. Ajouter 200 µl /puits de la solution de chromogène/substrat [10 ml de 80,6 mM de DMAB (diméthylaminobenzaldéhyde) + 10 ml de 1,56 mM de MBTH (3-méthyl-2-benzothiazoline d'hydrochlorure d'hydrazone) + 5 µl de H₂O₂].

Bloquer après environ 5 à 10 minutes (avant que le contrôle négatif ne commence à se colorer) la réaction colorimétrique en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ 3N.

D'autres chromogènes tels que le ABTS (2,2'-azino-bis-[3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique), le TMB (tétraméthyle de benzidine) ou l'OPD (ortho-phényldiamine) peuvent aussi être utilisés.

2.1.4.2. Lire la plaque à 600 nm (ou 620 nm).

2.2. Interprétation des résultats

2.2.1. Calculer la valeur du seuil par addition de 0,6 à la valeur du contrôle négatif (0,6 est l'écart type calculé à partir d'un groupe de 30 sérums négatifs).

2.2.2. Les échantillons testés donnant une valeur d'absorbance inférieure au seuil sont considérés comme négatifs.

2.2.3. Les échantillons testés donnant une valeur d'absorbance plus grande que le seuil + 0,15 sont considérés comme positifs.

2.2.4. Les échantillons testés donnant une valeur d'absorbance intermédiaire sont douteux et une deuxième technique doit être employée pour confirmer le résultat.

3. TEST ELISA BLOQUANT VISANT A DETECTER LA PRESENCE D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LE VIRUS DE LA PESTE EQUINE (VPE) (TEST OBLIGATOIRE)

Le test ELISA bloquant est destiné à détecter la présence d'anticorps spécifiques contre le virus de la peste équine dans les sérums de toute espèce sensible. La VP7 constitue la protéine antigénique principale du VPE; elle est présente dans les 9 sérotypes. Du fait que l'anticorps monoclonal est également dirigé contre la protéine VP7, le test sera très sensible et très spécifique. En outre, l'antigène recombinant VP7 est totalement inoffensif et très sûr.

Le principe du test est la diminution de la réaction entre la protéine recombinante VP7, en tant qu'antigène lié à la plaque ELISA, et l'anticorps monoclonal conjugué, spécifique de la protéine VP7. Les anticorps dans les sérums à tester bloqueront la réaction entre l'antigène et l'anticorps monoclonal, ce qui entraînera une réduction de la couleur.

Le test décrit ci-dessous est utilisé par le laboratoire communautaire de référence pour la peste équine de Algete, Espagne.

3.1. Description du test

3.1.1. Plaques ELISA

3.1.1.1. Déposer sur des plaques ELISA de l'antigène du VPE de sérotype 4 avec la protéine recombinante VP7, diluée dans un tampon carbonate/bicarbonate de pH 9,6, et incuber pendant une nuit à 4 °C.

3.1.1.2. Laver les plaques 5 fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (SSTP) contenant 0,05 % (v/v) de Tween-20.

3.1.1.3. Stabiliser la plaque par traitement à l'aide d'une solution de stabilisation (pour permettre un stockage à long terme à 4 °C sans perte d'activité) et sécher au buvard.

3.1.2. Echantillons et contrôles

3.1.2.1. Criblage: Diluer les sérums à tester et les contrôles dans la proportion de 1 à 10 directement sur la plaque dans la SSTP afin d'obtenir un volume final de 100 µl par puits. Incuber pendant 1 heure à 37 °C.

3.1.2.2. Titration: Préparer une série de dilutions de 2 en 2 de sérums à tester et de contrôles positifs (100 µl par puits) de 1/10 à 1/1280 à déposer dans huit puits. Le contrôle négatif est testé à une dilution de 1/10.

3.1.3. Conjugué

Ajouter 50 µl d'anticorps monoclonal préalablement dilué (anticorps monoclonal conjugué avec la peroxydase du raifort) dans chaque puits et mélanger doucement afin de garantir l'homogénéité. Incuber pendant 30 minutes à 37 °C.

3.1.4. Laver les plaques 5 fois à l'aide de SSTP et sécher au buvard comme décrit ci-dessus.

3.1.5. Chromogène/substrat

Ajouter 100 µl par puits de la solution suivante de chromogène/substrat: 1 ml de ABTS (2,2'-azino-bis-[3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique]) à 5 mg/ml + 9 ml de tampon de substrat (0,1M de tampon de phosphate-citrate de pH 4 contenant 0,03 % de H₂O₂), puis incuber pendant 10 minutes à température ambiante. Le développement de la couleur est arrêté par l'addition de 100 µl par puits de SDS (sulfate de sodium dodécyl) à 2 % (m/v).

3.1.6. Lecture

Lire à 405 nm dans un lecteur ELISA.

3.2. Interprétation des résultats

3.2.1. Validité du test

Le test est valable lorsque la densité optique (DO) du contrôle négatif (CN) est supérieure à 1,0 et que la DO du contrôle positif (CP) est inférieure à 0,2.

3.2.2. Calcul des limites

Limite positive = CN - ((CN - CP) × 0,3)

Limite négative = CN - ((CN - CP) × 0,2)

CN est la DO du contrôle négatif et CP est la DO du contrôle positif.

3.2.3. Interprétation des résultats

Dans la recherche d'anticorps contre le VPE, les échantillons présentant des DO inférieures à la limite positive doivent être considérés comme positifs.

Dans la recherche d'anticorps contre le VPE, les échantillons présentant des DO supérieures à la limite positive doivent être considérés comme négatifs.

Les échantillons présentant des DO comprises entre ces deux valeurs doivent être considérés comme douteux et des échantillons doivent être prélevés de nouveau sur les animaux après 2 à 3 semaines. »

Vu pour être annexé à notre arrêté du 28 juin 2009 modifiant l'arrêté royal du 26 janvier 1993 relatif à la lutte contre la peste équine.

La Ministre de la Santé publique,
Mme L. ONKELINX

La Ministre de l'Agriculture,
Mme S. LARUELLE

Bijlage bij het koninklijk besluit van 28 juni 2009 tot wijziging
van het koninklijk besluit van 26 januari 1993 betreffende de bestrijding van paardepest

DIAGNOSE VAN PAARDENPEST

Reagentia voor de hieronder beschreven enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) kunnen worden bekomen bij het communautaire referentielaboratorium of de referentielaboratoria van het OIE voor paardepest.

1. COMPETITIE-ELISA VOOR HET AANTONEN VAN ANTILICHAMEN TEGEN HET PAARDENPESTVIRUS (AHSV) (VOORGESCHREVEN TEST)

De competitie-ELISA wordt gebruikt voor het aantonen van specifieke antilichamen tegen AHSV in sera van paardachtigen. Het breedspectrum, polykloonaal, anti-AHSV caviaserum is serogroepspecifiek en is geschikt voor het aantonen van antilichamen gericht tegen alle bekende serotypes van het paardepestvirus.

De test is gebaseerd op het onderbreken van de reactie tussen het AHSV-antigeen en een anti-AHSV caviaserum door AHSV-antilichamen in een testserummonster. AHSV-antilichamen in het testserummonster gaan competitie aan met de AHSV-antilichamen in het caviaserum, wat resulteert in vermindering van de kleurontwikkeling (na toevoeging van met een enzym gelabelled anticavia-antilichaam en substraat). De sera kunnen worden getest bij een enkele verdunning van 1 op 5 (spottestmethode) of kunnen worden getitreerd voor het verkrijgen van verdunningseindpunten. Inhibitiewaarden van meer dan 50 % kunnen als positief worden beschouwd.

Het hieronder beschreven testprotocol wordt gebruikt in het regionaal referentielaboratorium voor paardepest in Pirbright, Verenigd Koninkrijk.

1.1. Testprocedure

1.1.1. Voorbereiding van de plaatjes

1.1.1.1. Coat de ELISA-plaatjes met AHSV-antigeen dat is geëxtraheerd uit geïnfecteerde celculturen en verdund in carbonaat/bicarbonaatbuffer, pH 9,6. Incubeer de ELISA-plaatjes bij 4 °C gedurende één nacht.

1.1.1.2. Was de plaatjes driemaal door de putjes te vullen met PBS (pH 7,2-7,4) en vervolgens weer leeg te slaan, en sla de plaatjes droog op absorberend papier.

1.1.2. Controleputjes

1.1.2.1. Titreer de positieve controlesera in een tweevoudige verdunningsreeks, 1 op 5 tot 1 op 640, in kolom 1 in blockingbuffer (PBS met 0,05 % (v/v) Tween-20, 5 % (w/v) magere melkpoeder (Cadbury's Marvel™) en 1 % (v/v) serum van een volwassen rund) tot een eindvolume van 50 µl per putje.

1.1.2.2. Pipetteer 50 µl van het negatieve controleserum in een verdunning 1 op 5 (10 µl serum + 40 µl blockingbuffer) in de putjes A en B van kolom 2.

1.1.2.3. Pipetteer 100 µl blockingbuffer in de putjes C en D van kolom 2 (BLANCO).

1.1.2.4. Pipetteer 50 µl blockingbuffer in de putjes E, F, G en H van kolom 2 (caviaserum controle).

1.1.3. Spottestmethode

1.1.3.1. Pipetteer een verdunning van elk testserum in blockingbuffer (verhouding 1 op 5) in duplo (twee putjes/monster) van de kolommen 3 tot en met 12 (10 µl serum + 40 µl blockingbuffer).

of

1.1.4. Serumtitreringsmethode

1.1.4.1. Bereid een tweevoudige verdunningsreeks van elk testserum (1 op 5 tot 1 op 640) in blockingbuffer en pipetteer deze in 8 putjes van een kolom (een verdunningsreeks per kolom: kolommen 3 tot en met 12).

vervolgens

1.1.5. Pipetteer 50 µl anti-AHSV caviaserum, reeds voorverdund tot de eindverdunning in blockingbuffer, in alle putjes van de ELISA-plaat, behalve de blanco's (elk putje bevat nu 100 µl vloeistof).

1.1.5.1. Incubeer gedurende 1 uur bij 37 °C op een schudapparaat.

1.1.5.2. Was de plaatjes driemaal en sla droog als hierboven omschreven.

1.1.5.3. Pipetteer 50 µl konijn-anticavia-HRP-conjugaat, reeds voorverdund tot de eindverdunning in blockingbuffer, in elk putje.

1.1.5.5. Incubeer gedurende 1 uur bij 37 °C op een schudapparaat.

1.1.5.5. Was de plaatjes driemaal en sla droog als hierboven omschreven.

1.1.6. Chromogeen

Bereid de chromogeenoplossing OPD (OPD=ortho-phenyldiamine) volgens de instructies van de fabrikant (0,4 mg per ml in steriel gedistilleerd water) enkele minuten vóór het gebruik. Voeg substraat (H₂O₂, waterstofperoxide) toe tot een eindconcentratie van 0,05 % (v/v) (verdunning van 1 op 2 000 van een 30 %-ige oplossing van H₂O₂). Pipetteer 50 µl OPD-oplossing in elk putje en laat de plaatjes gedurende 10 minuten bij omgevingstemperatuur staan. Stop de reactie met 1M zwavelzuur (H₂SO₄) (50 µl per putje).

1.1.7. Aflezen

Lees af met behulp van een spectrofotometer bij een golflengte van 492 nm.

1.2. Berekening van de resultaten

1.2.1. Print de OD-waarden en het percentage inhibitie (PI) voor de testsera en controlesera, gebaseerd op de gemiddelde waarde van de vier caviaserum controleputjes, uit met gebruikmaking van een speciaal softwarepakket. De verkregen OD- en PI-waarden worden gebruikt om te bepalen of de testresultaten binnen aanvaardbare grenzen liggen. De OD-waarden voor de caviaserum controles liggen tussen OD = 1,4 (bovengrens) en OD = 0,4 (ondergrens). De eindpunttiter van de positieve controle, gebaseerd op 50 % PI, zou 1/240 moeten bedragen (tussen 1/120 en 1/480). Elk plaatje dat niet aan bovenstaande criteria voldoet, moet worden afgewezen. Indien het positieve controleserum evenwel een titer te zien geeft die groter is dan 1 op 480 en de testmonsters toch negatief zijn, mogen de negatieve testmonsters worden geaccepteerd.

De PI-waarden van het in duplo geteste negatieve controleserum en de in duplo blanco's moeten liggen tussen + 25 % en - 25 %, respectievelijk tussen + 95 % en + 105 %. Indien deze waarden buiten de boven- en ondergrenzen liggen, is de test niet als zodanig mislukt maar is er mogelijk sprake van een te hoge achtergrondkleuring.

1.2.2. De diagnostische drempel (afkapwaarde) voor testsera bedraagt 50 % (PI 50 %). Monsters met een PI-waarde die groter is dan 50 %, worden als positief beschouwd. Monsters met een PI-waarde die lager is dan 50 %, worden als negatief beschouwd.

Monsters met duplo's waarvan één PI-waarde boven en één beneden de diagnostische drempel ligt, worden als twijfelachtig beschouwd. Dergelijke monsters kunnen opnieuw worden getest met de spottest of door titrerings. Positieve monsters mogen ook worden getitreerd om een indicatie te geven van de graad van positiviteit.

Proefopstelling spottest

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
+ Cont.		Testsera									
1:5	- Cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1:10	- Cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1:20	Blank										
1:40	Blank										
1:80	GP Cont.										
1:160	GP Cont.										
1:320	GP Cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:640	GP cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- Cont. = negatieve controle.

+ Cont. = positieve controle. GP Cont.

= Guinea Pig Control (caviacontrole).

Proefopstelling serumtitrerings

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
+ Cont.		Testsera									
1:5	- Cont.	1:5									1:5
1:10	- Cont.	1:10									1:10
1:20	Blank	1:20									1:20
1:40	Blank	1:40									1:40
1:80	GP Cont.	1:80									1:80
1:160	GP Cont.	1:160									1:160
1:320	GP Cont.	1:320									1:320
1:640	GP Cont.	1:640									1:640

- Cont. = negatieve controle.

+ Cont. = positieve controle. GP Cont.

= Guinea Pig Control (caviacontrole).

2. INDIRECTE ELISA VOOR HET AANTONEN VAN ANTILICHAMEN TEGEN HET PAARDENPESTVIRUS (AHSV) (VOORGESCHREVEN TEST)

De hieronder beschreven test is in overeenstemming met de testprocedure die is beschreven in hoofdstuk 2.1.11 van het « Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines » van het OIE, vierde editie, 2000.

Recombinant VP7 proteïne is gebruikt als antigeen voor de bepaling van antilichamen tegen AHSV met een hoge gevoeligheid en specificiteit. Andere voordelen zijn dat het stabiel is en niet besmettelijk.

2.1. Testprocedure

2.1.1. Vaste fase

2.1.1.1. Coat de ELISA-plaatjes met recombinant AHSV-4 VP7, verdund in carbonaat/bicarbonaatbuffer. Incubeer de plaatjes gedurende één nacht bij 4 °C, pH 9,6.

2.1.1.2. Was de plaatjes vijfmaal met gedistilleerd water dat 0,01 % (v/v) Tween 20 (wasoplossing) bevat. Klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal om resten van het wassen te verwijderen.

2.1.1.3. Blokkeer de plaatjes met PBS + 5 % (w/v) magere melk (mageremelkpoeder van NestléTM), 200 µl per putje, gedurende 1 uur bij 37 °C.

2.1.1.4. Verwijder de blockingbuffer en klop de plaatjes zachtjes af op absorberend materiaal.

2.1.2. Testmonsters

2.1.2.1. De te testen serummonsters en de positieve en negatieve controlesera worden verdund in een verhouding 1 op 25 in PBS + 5 % (w/v) magere melk + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl per putje. Incubeer gedurende 1 uur bij 37 °C.

Voor titrerings wordt een tweevoudige verdunningsreeks aangelegd te beginnen bij 1 op 25 (100 µl/ putje), één serum per kolom, en wordt hetzelfde gedaan met de positieve en de negatieve controles. Incubeer gedurende 1 uur bij 37 °C.

2.1.2.2. Was de plaatjes als omschreven onder 2.1.1.2.

2.1.3. Conjugaat

2.1.3.1. Pipetteer in elk putje 100 µl met HRP geconjugerd anti-paard gamma-globuline, verdund in PBS + 5 % melk + 0,05 % Tween 20, pH 7,2. Incubeer gedurende 1 uur bij 37 °C.

2.1.3.2. Was de plaatjes als omschreven onder 2.1.1.2.

2.1.4. Chromogeen/Substraat

2.1.4.1. Pipetteer in elk putje 200 µl chromogeen/substraatoplossing [10 ml van 80,6 mM DMAB (dimethyl aminobenzaldehyde) + 10 ml van 1,56 mM MBTH (3-methyl-2-benzo-thiazolin hydrazone hydro-chloride) + 5 µl H₂O₂].

Kleurontwikkeling wordt gestopt door toevoeging van 50 µl 3N H₂SO₄ na 5 à 10 minuten (voordat de negatieve controle begint te kleuren).

Andere chromogenen, bijv. ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]), TMB (tetra-methyl benzidine), of OPD (ortho-phenyldiamine) mogen ook worden gebruikt.

2.1.4.2. Lees de plaatjes af bij een golflengte van 600 nm (of 620 nm).

2.2. Interpretatie van de resultaten

2.2.1. Bereken de afkapwaarde door 0,6 toe te voegen aan de waarde van de negatieve controle (0,6 is de afgeleide standaarddeviatie bij een groep van 30 negatieve sera).

2.2.2. Testmonsters met absorptiewaarden beneden de afkapwaarde worden als negatief beschouwd.

2.2.3. Testmonsters met absorptiewaarden boven de afkapwaarde +0,15 worden als positief beschouwd.

2.2.4. Testmonsters met een tussenliggende absorptiewaarde zijn twijfelachtig en in dat geval moet een tweede methode worden toegepast om het resultaat te bevestigen.

3. BLOKKERINGS-ELISA VOOR HET AANTONEN VAN ANTILICHAMEN TEGEN HET PAARDENPESTVIRUS (AHSV) (VOORGESCHREVEN TEST)

De blokkerings-ELISA is gericht op het aantonen van specifieke antilichamen tegen AHSV in sera van elke gevoelige diersoort. VP7 is het belangrijkste antigene virusproteïne van AHSV en komt voor binnen de negen serotypen. Aangezien het monoklonale antilichaam (Mab) ook gericht is tegen het VP7, heeft de test een zeer grote gevoeligheid en specificiteit. Voorts is recombinant VP7 antigeen totaal onschadelijk en is bijgevolg een zeer hoge veiligheidsgraad gegarandeerd.

De test is gebaseerd op het onderbreken van de reactie tussen het recombinant VP7, d.i. het aan het ELISA-plaatje gebonden antigeen, en het geconjugeerde Mab dat specifiek is voor VP7. Antilichamen in het testserum blokkeren de reactie tussen het antigeen en het Mab, wat resulteert in vermindering van de kleurontwikkeling.

De hieronder beschreven test wordt uitgevoerd in het communautair referentielaboratorium voor paardenpest in Algete, Spanje.

3.1. Testprocedure

3.1.1. ELISA-plaatjes

3.1.1.1. Coat de ELISA-plaatjes met recombinant AHSV-4 VP7, voorverdund in carbonaat/bicarbonaatbuffer, pH 9,6. Incubeer de plaatjes gedurende één nacht bij 4 °C.

3.1.1.2. Was de plaatjes vijfmaal met PBST (PBS waaraan 0,05 % (v/v) Tween 20 is toegevoegd).

3.1.1.3. Stabiliseer de plaatjes door behandeling met een stabilisatieoplossing (met het oog op langdurige opslag bij 4 °C zonder verlies van werkzaamheid) en sla de plaatjes droog op absorberend materiaal.

3.1.2. Testmonsters en controles

3.1.2.1. Voor screening : Verdun de testsera en de controles in een verhouding 1 op 10, rechtstreeks op het plaatje in PBST, tot een uiteindelijk volume van 100 µl per putje. Incubeer gedurende 1 uur bij 37 °C.

3.1.2.2. Voor titrerings : Leg een tweevoudige verdunningsreeks aan van de testsera en de positieve controles (100 µl per putje) verdeeld over 8 putjes, gaande van 1 op 10 tot 1 op 1 280. Een negatieve controle wordt getest in de verdunning 1 op 10.

3.1.3. Conjugaat

Pipetteer 50 µl voorverdund, aan HRP (horseradish-peroxidase) geconjugeerd Mab (voor VP7 specifieke monoklonale antilichamen) in elk putje en meng zachtjes om homogeniteit te garanderen. Incubeer gedurende 30 minuten bij 37 °C.

3.1.4. Was de plaatjes vijfmaal met PBST en sla droog als hierboven omschreven.

3.1.5. Chromogeen/Substraat

Pipetteer 100 µl chromogeen/substraatoplossing in elk putje [(1 ml ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]) 5 mg/ml + 9 ml substraatbuffer (0,1M fosfaat-citraatbuffer met pH 4 die 0,03 % H₂O₂ bevat)] en incubeer gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur. Stop de kleurontwikkeling door toevoeging van 2 % (w/v) SDS (natriumdodecylsulfaat) (100 µl per putje).

3.1.6. Aflezen

Lees af bij een golflengte van 405 nm in een ELISA-leesapparaat.

3.2. Interpretatie van de resultaten

3.2.1. Validering van de test

De test is geldig wanneer de optische densiteit (OD) van de negatieve controle (NC) hoger is dan 1,0 en de OD van de positieve controle (PC) lager is dan 0,2.

3.2.2. Berekening van de afkapwaarde

Positieve afkapwaarde = NC - ((NC - PC) × 0,3)

Negatieve afkapwaarde = NC - ((NC - PC) × 0,2)

NC is de OD van de negatieve controle en PC is de OD van de positieve controle.

3.2.3. Interpretatie van de resultaten

Monsters met een OD beneden de positieve afkapwaarde worden als positief voor antilichamen tegen AHSV aangemerkt.

Monsters met een OD boven de negatieve afkapwaarde worden als negatief voor antilichamen tegen AHSV aangemerkt.

Monsters met een OD tussen deze beide waarden worden als twijfelachtig aangemerkt en de betrokken dieren moeten 2 à 3 weken later opnieuw worden bemonsterd.

Gezien om gevoegd te worden bij ons besluit van 28 juni 2009 tot wijziging van het koninklijk besluit van 26 januari 1993 betreffende de bestrijding van paardenpest.

De Minister van Volksgezondheid,

Mevr. L. ONKELINX

De Minister van Landbouw,

Mevr. S. LARUELLE