2017. gada aprīlī Noteikumi Nr.

Rīgā (prot. Nr. .§)

Grozījumi Ministru kabineta 2002. gada 19. marta noteikumos Nr. 127 „Epizootiju uzliesmojuma un draudu novēršanas kārtība”

Izdoti saskaņā ar Veterinārmedicīnas likuma 26. panta pirmā daļa un

27. panta trešā daļa

Izdarīt Ministru kabineta 2002. gada 19. marta noteikumos Nr. 127 „Epizootiju uzliesmojuma un draudu novēršanas kārtība” (Latvijas Vēstnesis, 2002, 27. nr., 2004, 193. nr., 2005, 130. nr., 2007, 100., 201. nr., 2009, 57., 142. nr., 2010, 12. nr., 2012, 156. nr., 2013, 158. nr.) šādus grozījumus:

1. Aizstāt noteikumu tekstā vārdu “pielikums” (attiecīgā locījumā) ar skaitli un vārdu “1. pielikums” (attiecīgā locījumā).

2. Papildināt 2. punktu aiz vārdiem “vides zinātniskais institūts” ar abreviatūru pēdiņās “BIOR”.

3. Papildināt noteikumus ar 2.1 punktu šādā redakcijā:

“2.1 Valsts zinātniskais institūts “Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts “BIOR” paraugus uz Āfrikas zirgu mēri izmeklē ar šo noteikumu 2. pielikumā noteiktajām metodēm.”

4. Svītrot 11.2. apakšpunktu.

6. Papildināt noteikumus ar 2. pielikumu šādā redakcijā:

“2. pielikums

Ministru kabineta

2002. gada 19. marta

 noteikumiem Nr. 127

**Āfrikas zirgu mēra diagnostika**

**1. nodaļa**

**Seroloģiskie testi**

1. Laboratoriskajiem izmeklējumiem izmanto seroloģiskās imūnfermentatīvās analīzes metodes (*ELISA*), kuru pamatā ir 2016. gada izdevuma Sauszemes dzīvnieku diagnostisko testu un vakcīnu rokasgrāmatas 2.5.1. nodaļas B daļas 2. punkts (pieņemts Pasaules Dzīvnieku veselības organizācijas(*OIE*)pasaules delegātu sanāksmē 2012. gada maijā).

2. VP7 vīrusa proteīns ir imūndominants Āfrikas zirgu mēra vīrusa (*AHSV*) lielākais antigēnais proteīns, un tas ir sastopams visos deviņos *AHSV* serotipos. Rekombinētie *AHSV*-VP7 proteīni ir stabili un nekaitīgi, un piemēroti izmantošanai par antigēniem *ELISA* procedūrās Āfrikas zirgu mēra vīrusa (turpmāk – ĀZMV) antivielu noteikšanai ar augstu jutības un specifiskuma pakāpi (*Laviada et al*., 1992b; *Maree* un *Paweska*, 2005).

3. Āfrikas zirgu mēra (ĀZM)seroliģiskajai diagnosticēšanai ir piemēroti divi *AHS*-VP7 *ELISA* testi:

3.1. netiešā *ELISA*;

3.2. bloķējošā *ELISA*.

**1.1. Netiešā *ELISA* *AHSV* antivielu noteikšanai**

1. Šajā metodē izmantotais konjugāts ir enzīms (mārrutku peroksidāze) pretzirgu gammaglobulīns, kas reaģē ar zirgu, mūļu un ēzeļu serumu. *Maree* un *Paweska* (2005) aprakstītajā metodē par konjugātu izmanto G proteīnu, kas reaģē ar zebru serumu.

2. Eiropas Savienības references laboratorija Āfrikas zirgu mēra noteikšanai C*entro de Investigación en Sanidad Animal* (*CISA*), Spānijā pēc pieprasījuma četru līdz sešu mēnešu laikā nodrošina ar seroloģiskajiem testiem nepieciešamo antigēnu.

3. Testa procedūras cietā fāze:

3.1. *ELISA* plates pārklāj ar rekombinētu *AHSV*-4 VP7, kas izšķīdināts karbonāta/bikarbonāta bufervielā ar pH 9,6. Plates atstāj pa nakti inkubēties 4 °C temperatūrā;

3.2. plates piecas reizes mazgā ar destilētu ūdeni, kas satur 0,01 % (masas) *Tween* 20 (mazgāšanas šķīdumu). Viegli uzsit pa platēm virs absorbējoša materiāla, lai atbrīvotos no atlikušajām mazgāšanas sastāvdaļām;

3.3. plates bloķē ar fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (*PBS*), kura pH ir 7,2 un kuram pievieno 5 % (m/V) vājpiena (*Nestlé Dry Skim Milk* TM), 200 μl uz iedobi, vienu stundu 37 °C temperatūrā;

3.4. atbrīvojas no bloķējošā šķīduma un viegli uzsit pa platēm virs absorbējoša materiāla;

3.5. izmeklējamos serumu paraugus un pozitīvos un negatīvos kontrolserumus proporcijā 1 pret 25 izšķīdina *PBS*, kam pievieno 5 % (masas) vājpiena un 0,05 % (masas) *Tween* 20, 100 μl uz iedobi. Inkubē vienu stundu 37 °C temperatūrā;

3.6. lai veiktu titrēšanu, sagatavo divkārša atšķaidījuma virknes no 1 pret 25 (100 μl uz iedobi) – viens serums attiecībā uz vienu plates aili – un tāpat rīkojas ar pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm. Inkubē vienu stundu 37 °C temperatūrā;

3.7. plates piecas reizes mazgā ar destilētu ūdeni, kas satur 0,01 % (masas) *Tween* 20 (mazgāšanas šķīdumu). Viegli uzsit pa platēm virs absorbējoša materiāla, lai atbrīvotos no atlikušajām mazgāšanas sastāvdaļām.

4. Konjugāts: ielej 100 μl uz iedobi mārrutku peroksidāzes (*HRP*) pretzirgu gammaglobulīna konjugātu, kas izšķīdināts *PBS*, kuram pievieno 5 % vājpiena un 0,05 % *Tween* 20, pH 7,2. Inkubē vienu stundu 37 °C temperatūrā.

5. Plates piecas reizes mazgā ar destilētu ūdeni, kas satur 0,01 % (masas) *Tween* 20 (mazgāšanas šķīdumu). Viegli uzsit pa platēm virs absorbējoša materiāla, lai atbrīvotos no atlikušajām mazgāšanas sastāvdaļām.

6. Hromogēns/substrāts: pievieno 200 μl uz iedobi hromogēna/substrāta šķīdumu (10 ml 80,6 mM *DMAB* (dimetilaminobenzaldehīdu), kam pievieno 10 ml 1,56 mM *MBTH* (3-metil-2-benzotiazolīnhidrazona hidrohlorīdu) un 5 μl H2O2).

7. Krāsas veidošanos aptur, apmēram pēc 5 līdz 10 minūtēm (pirms sāk iekrāsoties negatīvā kontrole) pievienojot 50 μl 3N H2SO4. Var izmantot arī citus hromogēnus, kā, piemēram, *ABTS* (2,2′-azino-bis-[3-etilbenzotiazolīn-6-sulfoskābi]), *TMB* (tetrametilbenzidīnu) vai *OPD* (ortofenildiamīnu).

8. Veic plašu nolasījumus pie 600 nm (vai 620 nm).

9. Rezultātu interpretācija:

9.1. aprēķina izslēgšanas vērtību, pieskaitot negatīvās kontroles vērtībai 0,06 (0,06 ir standartnovirze, ko iegūst 30 negatīvu serumu grupā);

9.2. testa paraugi, kas uzrāda zemākas absorbcijas vērtības nekā izslēgšanas vērtība, uzskatāmi par negatīviem;

9.3. testa paraugi, kas uzrāda lielākas absorbcijas vērtības nekā izslēgšanas vērtība + 0,15, uzskatāmi par pozitīviem;

9.4. testa paraugi, kuru uzrādītās absorbcijas vērtības atrodas vidusposmā, uzskatāmi par nepārliecinošiem, un rezultāta apstiprināšanai jālieto otra metode.

**1.2.** **Bloķējošā *ELISA* *AHSV* antivielu noteikšanai**

10. Konkurējošā bloķējošā *ELISA* ir izstrādāta tā, lai noteiktu specifiskās *AHSV* antivielas jebkuras zirgu dzimtas sugas dzīvnieku, t. i., zirgu, ēzeļu, zebru un to krustojumu, serumos, novēršot šo specifiskuma problēmu, ar ko reizēm nācās saskarties, izmantojot netiešo *ELISA*.

11. Testa princips ir bloķēt reakciju starp rekombinēto VP7 proteīnu, kas absorbēts uz *ELISA* plates, un konjugēto *AHS*-VP7 specifisko monoklonālo antivielu (*Mab*). Tā kā antiviela testa serumos bloķē reakciju starp antigēnu un *Mab*, vājinās krāsas reakcija. Tā kā *Mab* ir vērsta pret VP7, pārbaudei raksturīga augsta jutības un specifiskuma pakāpe.

12. Testa procedūras cietā fāze:

12.1. *ELISA* plates pārklāj ar 50–100 ng rekombinētu *AHSV*-4 VP7, kas izšķīdināts karbonāta/bikarbonāta bufervielā ar pH 9,6. Plates atstāj pa nakti inkubēties 4 °C temperatūrā;

12.2. plates trīs reizes mazgā ar 0,1× fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (*PBS*), kas satur 0,135 M NaCl un 0,05 % (masas) *Tween* 20 (*PBST*). Viegli uzsit pa platēm virs absorbējoša materiāla, lai atbrīvotos no atlikušajām mazgāšanas sastāvdaļām;

12.3. testējamos seruma paraugus un pozitīvos un negatīvos kontrolserumus proporcijā 1 pret 5 izšķīdina 0,35 M NaCl, 0,05 % (masas) *Tween* 20 un 0,1 % katona, 100 μl uz iedobi. Inkubē vienu stundu 37 °C temperatūrā;

12.4. lai veiktu titrēšanu, sagatavo testa seruma divkārša atšķaidījuma virknes no 1 pret 10 līdz 1 pret 280 astoņās iedobēs (100 μl uz iedobi) – viens serums uz vienu plates aili – un tāpat rīkojas ar pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm. Inkubē vienu stundu 37 °C temperatūrā;

12.5. plates piecas reizes mazgā ar 0,1× fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (*PBS*), kas satur 0,135 M NaCl un 0,05 % (masas) *Tween* 20 (*PBST*). Viegli uzsit pa platēm virs absorbējoša materiāla, lai atbrīvotos no atlikušajām mazgāšanas sastāvdaļām.

13. Konjugāts: ielej 100 μl uz iedobi mārrutku peroksidāzes konjugātu *Mab* anti-VP7. Iepriekš šīs *Mab* atšķaida 1/5 000–1/15 000 *StabiliZyme Select® Stabilizer* (*SurModics*. Atsauce: SZ03) 1/1 šķīdumā destilētā ūdenī. Inkubē 30 minūtes 37 °C temperatūrā.

14. Plates piecas reizes mazgā ar 0,1× fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (*PBS*), kas satur 0,135 M NaCl un 0,05 % (masas) *Tween* 20 (*PBST*). Viegli uzsit pa platēm virs absorbējoša materiāla, lai atbrīvotos no atlikušajām mazgāšanas sastāvdaļām.

15. Hromogēns/substrāts**:** pievieno 100 μl uz iedobi hromogēna/substrāta šķīdumu, t. i., 1 ml *ABTS* (2,2′-azino-bis-[3-etilbenzotiazolīn-6-sulfoskābi]) 5 mg/ml, kam pievieno 9 ml substrāta bufervielas (0,1 M fosfāta-citrāta buferšķīdumu ar pH 4, kas satur 0,03 % H2O2), un inkubē 10 minūtes istabas temperatūrā. Krāsas veidošanos aptur, pievienojot 100 μl uz iedobi 2 % (masas) *SDS* (nātrija dodecilsulfātu).

16. Nolasījumu veic pie 405 nm *ELISA* nolasītājā.

17. Rezultātu interpretācija:

17.1. katra parauga bloķējošo procentuālo daļu (BP) nosaka, izmantojot šādu formulu, kur “Abs” ir antivielas:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | Formula17.2. paraugi ar BP vērtību, kas pārsniedz 50 %, būtu jāuzskata par pozitīviem attiecībā uz *AHSV* antivielām;17.3. paraugi ar BP vērtību, kas ir zemāka par 45 %, būtu jāuzskata par negatīviem attiecībā uz *AHSV* antivielām;17.4. paraugi ar BP vērtību robežās no 45 līdz 50 %, būtu jāuzskata par nepārliecinošiem un jātestē atkārtoti. Ja rezultāts atkal ir nepārliecinošs, dzīvniekiem veic atkārtotu testēšanu no paraugiem, kas noņemti ne agrāk kā divas nedēļas pēc tam, kad tika noņemti paraugi, kuri tika uzskatīti par nepārliecinošiem.**2. nodaļa****ĀZM vīrusa noteikšana****2.1. Reāllaika atgriezeniskās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcija (*rRT-PCR*)**18. ĀZM vīrusa noteikšanas testiem, kuru pamatā ir nukleīnskābju metodes, jāizmanto references celmi no deviņiem *AHSV* vīrusa serotipiem.19. 2.2. un 2.3. nodaļā aprakstītās metodes pamatā ir 2016. gada izdevuma Sauszemes dzīvnieku diagnostisko testu un vakcīnu rokasgrāmatas 2.5.1. nodaļas B daļas 1.2. apakšpunkts (pieņemts Pasaules dzīvnieku veselības organizācijas(*OIE*)pasaules delegātu sanāksmē 2012. gada maijā).20. Jebkurai asiņu vai liesas paraugu testēšanai izmantojamajai *RT-PCR* metodei jābūt līdzvērtīgai vai jutīgākai par 2.2. un 2.3. nodaļā aprakstīto metodi.21. Eiropas Savienības references laboratorija Āfrikas zirgu mēra noteikšanai C*entro de Investigación en Sanidad Animal* (*CISA*) Spānijā vai *OIE* Āfrikas zirgu mēra references laboratorija Algetē, Spānijā nodrošina inaktivētus ĀZM vīrusa 1. līdz 9. serotipa standarta celmus.22. Lai nodrošinātu labu reakciju, no parauga nepieciešams ekstrahēt ļoti kvalitatīvu *ĀZMV* RNS. Nukleīnskābes no klīniskajiem paraugiem var ekstrahēt ar dažādām iekšējām un komerciāli pieejamām metodēm.23. Komerciāli pieejamos testēšanas komplektos izmanto dažādas pieejas RNS izolācijai. Lielākā daļa balstās uz vienu no šādām procedūrām:23.1. nukleīnskābju ekstrahēšanu ar fenolu un hloroformu;23.2. nukleīnskābju adsorbciju filtrēšanas sistēmā;23.3. nukleīnskābju adsorbciju magnētisku lodīšu sistēmā.24. RNS ar iekšējo metodi var ekstrahēt šādi:24.1. 1 g audu parauga homogenizē 1 ml denaturēšanas šķīduma (4 M guanīdija tiocianāta, 25 mM nātrija citrāta, 0,1 M 2-merkaptoetanola, 0,5 % sarkozila);24.2. pēc centrifugēšanas supernatantam pievieno vienu μg rauga RNS, 0,1 ml 2 M nātrija acetāta pH 4 un 1 ml fenola, un 0,2 ml hloroforma/izoamilspirta maisījumu (49/1);24.3. suspensiju enerģiski sakrata un 15 minūšu atdzesē uz ledus;24.4. pēc centrifugēšanas ūdens fāzē esošo RNS ekstrahē ar fenolu, izgulsnē ar etanolu un atkārtoti suspendē sterilā ūdenī.**2.2. Grupai specifiskā reāllaika *RT-PCR***25. Grupai specifiskā reāllaika *RT-PCR* saskaņā ar *Agüero et al.*, 2008attiecas uz *AHSV* VP7, un ar to var noteikt visus zināmos *AHSV* serotipus un patlaban apritē esošos vīrusu celmus. 26. Praimeru un zondes sekvences *AHSV* sugas vīrusu noteikšanai:26.1. tiešais praimeris **–** 5′-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3′;26.2. atgriezeniskais praimeris **–** 5′-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3′;26.3. *MGB-TaqMan* zonde **–** 5′-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3′.27. Praimeru sākotnējā atšķaidījuma koncentrāciju atšķaida līdz 8 μM darba koncentrācijai (“praimera darba atšķaidījums 8 μM”), bet zondi atšķaida līdz 50 μM darba koncentrācijai (“zondes darba atšķaidījums 50 μM”). Jāsagatavo testa plates izkārtojums un jāieraksta reāllaika *PCR* mašīnas programmatūrā. Izmantojot izkārtojumu par norādi, 2,5 μl no katra praimera darba atšķaidījuma pievieno katrā iedobē, kur vēlāk pievienos paraugu RNS, pozitīvo un negatīvo kontroli (praimera galīgajai koncentrācijai jābūt 1 μM 20 μM *RT-PCR* maisījuma). Plati tur uz ledus.28. 2 μl izolētas RNS (testa paraugiem un pozitīvās kontroles) vai 2 μl no RNS brīva ūdens negatīvās reakcijas kontrolēs sajauc ar tiešo un atgriezenisko praimeru maisījumu. Šo maisījumu denaturē, karsējot 5 minūtes 95 °C temperatūrā, un pēc tam vismaz 5 minūtes ātri atdzesē uz ledus.29. Sagatavo attiecīgu daudzumu viensoļa reāllaika *RT-PCR* reaģentu maisījuma atbilstoši analizējamo paraugu skaitam pēc ražotāja norādījumiem. 0,1 μl zondes darba atšķaidījuma pievieno katrā iedobē, kas satur denaturētos RNS paraugus un praimerus. (Zondes galīgajai koncentrācijai jābūt 0,25 μM katrā iedobē, kas satur RNS paraugus.) 13 μl viensoļa reāllaika *RT-PCR* reaģentu maisījuma sadala katrā iedobē uz *PCR* plates, kas satur denaturētos praimerus un RNS.30. Plati ievieto reāllaikā amplifikatorā, kas ieprogrammēts atgriezeniskās transkripcijas un cDNS amplifikācijas/fluorescences noteikšanai. Amplifikācijas apstākļi ietver pirmo atgriezeniskās transkripcijas soli 25 minūtes 48 °C temperatūrā, tad 10 minūšu 95 °C temperatūrā (“karstā iedarbināšana”) un 40 ciklu pa 15 sekundēm 95 °C temperatūrā, 35 sekundes 55 °C temperatūrā un 30 sekunžu 72 °C temperatūrā (vai 40 ciklu pa 2 sekundēm 97 °C un 30 sekunžu 55 °C temperatūrā, ja izmanto reaģentus un amplifikatoru, kas pieļauj ātru reakcijas gaitu). Fluorescences datus iegūst 55 °C temperatūras soļa beigās.31. Ja iegūtas netipiskas amplifikācijas līknes, analīze uzskatāma par nederīgu un tā jāatkārto.32. Rezultātu interpretācija:32.1. paraugus uzskata par pozitīviem, ja Ct vērtība (ciklu skaits, kuros reakcijā ģenerētā fluorescences līkne šķērso fluorescences slieksni) ir mazāka par noteikto Ct slieksni (35) 40 *PCR* ciklos (Ct ≤ 35) vai vienāda ar to;32.2. paraugus uzskata par nepārliecinošiem, ja *Ct* vērtība ir augstāka nekā noteiktais *Ct* slieksnis (35) 40 *PCR* ciklos (*Ct* ≥ 35);32.3. paraugus uzskata par negatīviem, ja ir iegūta horizontālās amplifikācijas līkne, kas nešķērso sliekšņa līkni 40 *PCR* ciklos.**2.3. Grupai specifiskā reāllaika *RT-PCR* saskaņā ar *Guthrie* *et al*., 2013**33. Reāllaika RT-PCR, kurā izmanto fluorescences rezonanses enerģijas pārvades (*FRET*) zondes, lai noteiktu *AHSV* nukleīnskābi, tika izstrādāta, izmantojot sekvences no dažādiem patlaban sastopamiem *AHSV* pamatcelmiem (*Quan et al*., 2010). Tajā ietilpst arī patentēta sintētiska ārēja kontroles analīze, lai pārbaudītu analīzes komponentu pareizu darbību.34. Saskaņā ar *Guthrie et al*. (2013) daži pamatsoļi, ko var mainīt atkarībā no vietējām (gadījumam specifiskām) prasībām, izmantotajiem testēšanas komplektiem un pieejamā aprīkojuma:34.1. praimeru un zondes sekvences *AHSV* sugas vīrusu noteikšanai:34.1.1. tiešais praimeris **–** 5′-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3′;34.1.2. atgriezeniskais praimeris **–** 5′-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3′;34.1.3. *MGB-TaqMan* zonde **–** 5′-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3′;34.2. praimera un zondes maisījuma atšķaidījumus pagatavo 25× koncentrācijā 5 μΜ attiecībā uz tiešo un atgriezenisko praimeri un 3 μΜ attiecībā uz zondi. Jāsagatavo testa plates izkārtojums un jāieraksta reāllaika *PCR* mašīnas programmatūrā. Izmantojot izkārtojumu par norādi,   μl paraugu RNS, tostarp testa paraugus un pozitīvās un negatīvās kontroles, pievieno attiecīgajās plates iedobēs, kā paredzēts norādē;34.3. RNS denaturē, karsējot 5 minūtes 95 °C temperatūrā, un pēc tam vismaz 3 minūtes ātri atdzesē uz ledus;34.4. sagatavo attiecīgu daudzumu viensoļa reāllaika *RT-PCR* reaģentu maisījuma atbilstoši analizējamo paraugu skaitam pēc ražotāja norādījumiem. 1 μl no 25× praimera un zondes maisījuma atšķaidījuma (iepriekš 34.2. apakšpunktā) iekļauj reaģentu maisījumā, lai katrā iedobē iegūtu galīgo koncentrāciju 200 nM attiecībā uz katru praimeri un 120 nM zondes. 20 μl reaģentu maisījuma sadala katrā iedobē uz *PCR* plates, kas satur denaturēto RNS;34.5. plati ievieto reāllaikā amplifikatorā, kas ieprogrammēts atgriezeniskās transkripcijas un cDNS amplifikācijas/fluorescences noteikšanai atbilstoši ražotāja norādēm. Amplifikācijas apstākļi ietver, piemēram, pirmo atgriezeniskās transkripcijas soli 10 minūšu 48 °C temperatūrā un tad 10 minūšu 95 °C temperatūrā, un 40 ciklu pa 15 sekundēm 95 °C temperatūrā, un 45 sekundes 60 °C temperatūrā;34.6. paraugi ir uzskatāmi par pozitīviem, ja *ĀZMV RT-PCR* analīzes normalizēta fluorescence pārsniedz 0,1 slieksni 36 *PCR* ciklos visos parauga atkārtojumos.35. Rezultātu interpretācija:35.1. paraugi ir uzskatāmi par nepārliecinošiem, ja *AHSV RT-PCR* analīzes normalizēta fluorescence pārsniedz 0,1 slieksni starp 36 un 40 *PCR* cikliem kādā no parauga atkārtojumiem;35.2. paraugi ir uzskatāmi par negatīviem, ja *AHSV RT-PCR* analīzes normalizēta fluorescence nepārsniedz 0,1 slieksni 40 *PCR* ciklos visos parauga atkārtojumos un ja patentētās sintētiskas ārējas kontroles analīzes normalizēta fluorescence pārsniedz 0,1 slieksni 33 *PCR* ciklos.” |

Ministru prezidents Māris Kučinskis

Zemkopības ministrs Jānis Dūklavs