



Laidiens: **15.06.2017., Nr. 119**

Oficiālās publikācijas Nr.: **2017/119.17**

Ministru kabineta noteikumi Nr. 332

Rīgā 2017. gada 13. jūnijā (prot. Nr. 30 37. §)

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

*Izdoti saskaņā ar Veterinārmedicīnas likuma
26. panta pirmo daļu un 27. panta trešo daļu*

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. Aizstāt 2. punktā vārdu "institūts" ar tekstu "institūts "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 Āfrikas zirgu mēra noteikšanai izmeklē, izmantojot šo noteikumu 2. pielikumā norādītās metodes."

4. Svītrot 11.2. apakšpunktu.

5. Aizstāt 42.3. apakšpunktā vārdu "institūts" ar tekstu "institūts "BIOR"".

6. Papildināt informatīvo atsauci uz Eiropas Savienības direktīvām ar 8. punktu šādā redakcijā:

"8) Padomes 2009. gada 30. novembra Direktīvas 2009/156/EK par dzīvnieku veselības prasībām attiecībā uz zirgu dzimtas dzīvnieku pārvadāšanu un importu no trešajām valstīm."

7. 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), pamatojoties uz 2016. gada izdevuma "Sauszemes dzīvnieku diagnostisko testu un vakcīnu rokasgrāmata" 2.5.1. nodaļas B daļas 2. punktu (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 (AHSV) antivielu noteikšanai ar augstu jutības un specifiskuma pakāpi (*Laviada et al.*, 1992b; *Maree un Paweska*, 2005).

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

3.1. netiešā ELISA;

3.2. bloķējošā ELISA.

1.1. Netiešā ELISA AHSV antivielu noteikšanai

4. 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 zebra serumu.

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

6. Testa procedūras cietā fāze:

6.1. 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;

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

6.3. 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;

6.4. atbrīvojas no bloķējošā šķīduma un viegli uzsit pa platēm virs absorbējošā materiāla;

6.5. 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;

6.6. lai veiktu titrēšanu, sagatavo divkārsa 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;

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

7. 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.

8. 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.
9. 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).
10. Krāsas veidošanos aptur, apmēram pēc 5 līdz 10 minūtēm (pirms sāk iekrāsoties negatīvā kontrole) pievienojot 50 µl 3N H₂SO₄. Var izmantot arī citus hromogēnus, piemēram, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolīn-6-sulfoskābi]), TMB (tetrametilbenzidīnu) vai OPD (ortofenildiamīnu).
11. Veic plašu nolasījumus pie 600 nm (vai 620 nm).
12. Rezultātu interpretācija:
 - 12.1. aprēķina izslēgšanas vērtību, pieskaitot negatīvās kontroles vērtībai 0,06 (0,06 ir standartnovirze, ko iegūst 30 negatīvu serumu grupā);
 - 12.2. testa paraugi, kas uzrāda zemākas absorbcijas vērtības nekā izslēgšanas vērtība, uzskatāmi par negatīviem;
 - 12.3. testa paraugi, kas uzrāda lielākas absorbcijas vērtības nekā izslēgšanas vērtība + 0,15, uzskatāmi par pozitīviem;
 - 12.4. testa paraugi, kuru uzrādītās absorbcijas vērtības atrodas vidusposmā, uzskatāmi par nepārliciecināmiem, un rezultāta apstiprināšanai jālieto otra metode.

1.2. Bloķējošā ELISA AHSV antivielu noteikšanai

13. Konkurējošā bloķējošā ELISA ir izstrādāta tā, lai noteiktu specifiskās AHSV antivielas jebkuras zirgu dzimtas sugas dzīvnieku, t. i., zirgu, ēzeļu, zebļu un to krustojumu, serumos, novēršot šo specifiskuma problēmu, ar ko reizēm nācās saskarties, izmantojot netiešo ELISA.
14. 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.
15. Testa procedūras cietā fāze:
 - 15.1. ELISA plates pārklāj ar 50–100 ng rekombinētu AHSV-4 VP7, kas izšķīdināts karbonāta/bikarbonāta bufervielā ar pH 9,6. Plates atstāj pa nakti inkubētās 4 °C temperatūrā;
 - 15.2. 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 absorbējošā materiāla, lai atbrīvotos no atlikušajām mazgāšanas sastāvdaļām;
 - 15.3. testējamās 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;
 - 15.4. lai veiktu titrēšanu, sagatavo testa seruma divkārtša 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;