

DECISÃO DA COMISSÃO
de 21 de Fevereiro de 2002
que altera o anexo D da Directiva 90/426/CEE do Conselho no respeitante aos ensaios para
diagnóstico da peste equina

[notificada com o número C(2002) 556]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2002/160/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,
Tendo em conta a Directiva 90/426/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1990, relativa às condições de polícia sanitária que regem a circulação de equídeos e as importações de equídeos provenientes de países terceiros ⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Decisão 2001/298/CE ⁽²⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 23.º,

Considerando o seguinte:

- (1) O anexo D da Directiva 90/426/CEE descreve o ensaio de fixação do complemento a utilizar para o diagnóstico da peste equina.
- (2) Em Novembro de 2000, o laboratório comunitário de referência de Algete, em Espanha, acolheu a reunião anual dos laboratórios nacionais de referência dos Estados-Membros da UE para a peste equina. Na reunião em causa, foram apresentadas provas científicas de que o ensaio de fixação do complemento actualmente descrito no anexo D da Directiva 90/426/CEE apresenta grandes limitações, nomeadamente pelo facto de apenas ser adequado à detecção de anticorpos na sequência de uma infecção ou vacinação recentes. Além disso, na prática, a maioria dos laboratórios da Comunidade, bem como dos principais países exportadores, utilizam testes ELISA, mais modernos, em vez do referido ensaio.
- (3) Os ensaios laboratoriais internacionalmente aceites para a detecção de anticorpos do vírus da peste equina são descritos no Manual das normas para técnicas de diag-

nóstico e vacinas ⁽³⁾ do Gabinete Internacional de Epizootias (OIE). Todavia, a actual edição apenas refere um dos testes ELISA disponíveis.

- (4) Afigura-se, pois, adequado alterar o anexo D da Directiva 90/426/CEE de forma a atender aos progressos técnicos e às normas internacionais aprovadas.
- (5) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Veterinário Permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

O anexo D da Directiva 90/426/CEE é substituído pelo anexo da presente decisão.

Artigo 2.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 21 de Fevereiro de 2002.

Pela Comissão

David BYRNE

Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO L 224 de 18.8.1990, p. 42.

⁽²⁾ JO L 102 de 12.4.2001, p. 63.

⁽³⁾ Secção 2.1.11, 4.ª edição, 2000.

ANEXO

«ANEXO D

PESTE EQUINA

DIAGNÓSTICO

Os reagentes a utilizar no ensaio imunoenzimático (ELISA) seguidamente descrito podem ser solicitados ao laboratório de referência da Comunidade Europeia ou aos laboratórios de referência do OIE para a peste equina.

1. ENSAIO ELISA COMPETITIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE EQUINA (AHSV) (ENSAIO RECOMENDADO)

O ensaio ELISA competitivo é utilizado para a detecção de anticorpos específicos de AHSV no soro de quaisquer espécies de equídeos. O imunossoro de cobaia anti-AHSV (adiante referenciado por “antissoro de cobaia”), de espectro largo e policlonal, é específico do serogrupo, sendo adequado à detecção de todos os serótipos do vírus AHS.

O princípio do ensaio consiste na competição entre um antissoro de cobaia e a amostra do soro em análise para o antígeno AHSV. Os anticorpos anti-AHSV da amostra de soro em análise competem com os anticorpos do antissoro de cobaia, resultando numa redução da coloração esperada por adição de anticorpo anti-cobaia marcado com enzima e de substrato. Podem utilizar-se soros com uma diluição única de 1: 5 (método de ensaio pontual) ou, em alternativa, diluir-se sucessivamente a amostra para determinar o título final (método de titulação do soro). São considerados positivos os valores de inibição superiores a 50 %.

O protocolo a seguir descrito é utilizado pelo laboratório regional de referência para a peste equina, em Pirbright, no Reino Unido.

1.1. Procedimento

1.1.1. *Preparação das placas*

1.1.1.1. Revestir placas ELISA com antígeno AHSV extraído de culturas de células infectadas diluído em tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Incubar as placas ELISA de um dia para o outro a 4 °C.

1.1.1.2. Lavar as placas três vezes, enchendo e esvaziando os alvéolos com tampão fosfato (PBS) a pH 7,2-7,4 e secar invertendo a placa sobre papel absorvente.

1.1.2. *Alvéolos-testemunha*

1.1.2.1. Distribuir ao longo da coluna 1 diluições sucessivas de 1: 2 a partir da diluição inicial, de 1: 5 até 1: 640, dos soros-testemunha positivos em tampão de bloqueio [PBS com 0,05 % (v/v) de Tween-20, 50 % (m/v) de leite em pó desnatado (Cadbury's Marvel™) e 1 % (v/v) de soro de bovino adulto], de forma a obter um volume final de 50 µl/alvéolo.

1.1.2.2. Adicionar 50 µl de soro-testemunha negativo diluído a 1: 5 (10 µl de soro + 40 µl de tampão de bloqueio) aos alvéolos A e B da coluna 2.

1.1.2.3. Adicionar, por alvéolo, 100 µl de tampão de bloqueio nos alvéolos C e D da coluna 2 (branco).

1.1.2.4. Distribuir 50 µl de tampão de bloqueio nos alvéolos E, F, G e H da coluna 2 (testemunha de cobaia).

1.1.3. *Método de ensaio pontual (diluição única da amostra)*

1.1.3.1. Distribuir em duas séries de alvéolos das colunas 3 a 12 diluições a 1: 5 de cada soro em tampão de bloqueio (10 µl soro em análise + 40 µl tampão de bloqueio).

ou

1.1.4. *Método de titulação do soro (diluição seriada)*

1.1.4.1. Distribuir, em oito alvéolos de cada uma das colunas 3 a 12, diluições sucessivas para metade (de 1: 5 a 1: 640) de cada amostra em tampão de bloqueio.

seguidamente

1.1.5. Adicionar 50 µl de anti-soro de cobaia, previamente diluído com tampão de bloqueio, a todos os alvéolos da placa ELISA, com excepção dos alvéolos correspondentes ao ensaio em branco (desta forma, todos os alvéolos deverão conter um volume final de 100 µl).

1.1.5.1. Incubar a 37 °C durante uma hora, utilizando um agitador orbital.

1.1.5.2. Lavar as placas três vezes e secar do modo descrito anteriormente.

1.1.5.3. Adicionar a cada alvéolo 50 µl de anticorpo de coelho anti-cobaia conjugado com peroxidase de rábano (HRP), previamente diluído em tampão de bloqueio.

1.1.5.4. Incubar a 37 °C durante uma hora, utilizando um agitador orbital.

1.1.5.5. Lavar as placas três vezes e secar do modo descrito anteriormente.

1.1.6. Cromogénio

Preparar a solução de cromogénio (OPD = orto-fenildiamina) de acordo com as instruções dos fabricantes (0,4 mg/ml em água destilada estéril), imediatamente antes da utilização. Adicionar substrato (peróxido de hidrogénio = H₂O₂) de forma a obter uma concentração final de 0,05 % (v/v) (1: 2000 numa solução de H₂O₂ a 30 %), no caso de uma solução a 30 %. Adicionar 50 µl de solução de OPD a cada alvéolo e deixar as placas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Suspender a reacção por adição a cada alvéolo de 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M.

1.1.7. Determinações espectrofotométricas

Efectuar as determinações espectrofotométricas da densidade óptica (DO) a 492 nm.

1.2. Expressão dos resultados

1.2.1. Com recurso a um programa informático, obter os valores de DO e as percentagens de inibição (PI) correspondentes aos soros em análise e aos soros-testemunha, com base nos valores médios referentes aos quatro alvéolos com soro-testemunha de cobaia. Os valores de DO e PI são utilizados para determinar se os resultados dos ensaios se situam num intervalo aceitável. Os valores extremos (superior e inferior) de DO dos soros-testemunha de cobaia situam-se entre 1,4 e 0,4, respectivamente. Para uma PI de 50 %, o título final da testemunha positiva deverá ser de 1: 240 (variação de 1: 120 a 1: 480). As placas que não sejam conformes aos referidos critérios deverão ser rejeitadas. Todavia, se o título do soro-testemunha positivo exceder 1: 480 e as amostras em análise permanecerem negativas, são aceitáveis as amostras em análise negativas.

Ambos os alvéolos com soro-testemunha negativo e ambos os alvéolos correspondentes ao ensaio em branco deverão apresentar valores de PI compreendidos entre + 25 % e - 25 %, e entre + 95 e + 105 %, respectivamente. Se tal não suceder, não deverá rejeitar-se a placa, havendo contudo que ter em conta a possibilidade de estar a desenvolver-se uma coloração de fundo.

1.2.2. O limite positivo (*cut-off*) para os soros em análise é de 50 % (PI = 50 %). As amostras que apresentem valores de PI superiores a 50 % são consideradas positivas; as amostras que apresentem valores de PI inferiores a 50 % são consideradas negativas.

As amostras que apresentem, nos alvéolos repetidos, valores de PI superiores e inferiores ao limiar são consideradas duvidosas, podendo ser objecto de nova análise pelo método de ensaio pontual e por titulação. Poderão também titular-se as amostras positivas, de forma a obter indicações quanto ao grau de positividade.

Representação esquemática do ensaio pontual

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve. Cont.		Soros em análise									
A	1:5	- ve. Cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	- ve. Cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	Branco										
D	1:40	Branco										
E	1:80	GP Cont.										
F	1:160	GP Cont.										
G	1:320	GP Cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	GP Cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- ve. Cont. = testemunha negativa

+ ve. Cont. = testemunha positiva

GP Cont. = testemunha de cobaia

Representação esquemática do método de titulação sérica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve. Cont.		Soros em análise									
A	1:5	– ve. Cont.	1:5									1:5
B	1:10	– ve. Cont.	1:10									1:10
C	1:20	Branco	1:20									1:20
D	1:40	Branco	1:40									1:40
E	1:80	GP Cont.	1:80									1:80
F	1:160	GP Cont.	1:160									1:160
G	1:320	GP Cont.	1:320									1:320
H	1:640	GP Cont.	1:640									1:640

– ve. Cont. = testemunha negativa

+ ve. Cont. = testemunha positiva

GP Cont. = testemunha de covaia

2. ENSAIO ELISA INDIRECTO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE EQUINA (AHSV) (MÉTODO RECOMENDADO)

O ensaio seguidamente descrito é conforme à descrição apresentada no ponto 2.1.11 do Manual de normas para ensaios de diagnóstico e vacinas do OIE (quarta edição, 2000).

A proteína recombinante VP7 tem sido utilizada como antígeno para a determinação de anticorpos contra o vírus AHS com um elevado grau de sensibilidade e especificidade. O facto de a proteína em causa ser estável e não ser infecciosa constitui outra vantagem.

2.1. Procedimento

2.1.1. Fase sólida

2.1.1.1. Revestir as placas ELISA com proteína recombinante VP7 de AHSV-4 diluída em tampão de carbonato/bicarbonato a pH 9,6. Incubar as placas de um dia para o outro a 4 °C.

2.1.1.2. Lavar as placas cinco vezes com água destilada contendo 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solução de lavagem). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.

2.1.1.3. Bloquear as placas mediante a adição a cada alvéolo de 200 µl de PBS com 5 % (m/v) de leite desnatado (leite em pó desnatado Nestlé™, incubando a 37 °C durante uma hora.

2.1.1.4. Remover a solução de bloqueio; inverter e bater levemente com as placas num material absorvente.

2.1.2. Amostras em análise

2.1.2.1. Diluir as amostras de soro em análise, bem como os soros das testemunhas positiva e negativa, na proporção 1: 25, em PBS + 5 % (m/v) leite desnatado + 0,05 % (v/v) Tween 20, adicionando 100 µl a cada alvéolo. Incubar a 37 °C durante uma hora.

Preparar nos alvéolos de cada coluna (100 µl/alvéolo) diluições sucessivas para metade de cada soro (diluição inicial 1: 25), procedendo da mesma forma com as testemunhas positiva e negativa. Incubar a 37 °C durante uma hora.

2.1.2.2. Lavar as placas do modo descrito em 2.1.1.2.

2.1.3. Conjugado

2.1.3.1. Distribuir por cada alvéolo 100 µl de anti-gama globulina de cavalo conjugada com peroxidase de rábano (HRP) diluída em PBS + 5 % de leite + 0,05 % Tween 20 a pH 7,2. Incubar a 37 °C durante uma hora.

2.1.3.2. Lavar as placas do modo descrito em 2.1.1.2.

2.1.4. Cromogénio/Substrato

- 2.1.4.1. Distribuir por cada alvéolo 200 µl de solução cromogénio/substrato [10 ml DMAB (dimetilaminobenzaldeído) + 10 ml MBTH (cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolino-hidrazona) + 5 µl H₂O₂].

O desenvolvimento da coloração é suspenso pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 3N decorridos 5-10 minutos (antes do início da coloração da testemunha negativa).

Podem utilizar-se outros cromogénios, tais como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico]), TMB (tetrametil-benzidina) ou OPD (orto-fenildiamina).

- 2.1.4.2. Efectuar as leituras espectrofotométricas da densidade óptica (DO) a 600 nm (ou 620 nm).

2.2. Interpretação dos resultados

- 2.2.1. Calcular o valor-limite (cut-off) adicionando 0,6 ao valor obtido para a testemunha negativa (0,6 é o desvio-padrão obtido com um grupo de 30 soros negativos).
- 2.2.2. As amostras que apresentarem valores de absorvância inferiores ao valor-limite são consideradas negativas.
- 2.2.3. As amostras que apresentarem valores de absorvância superiores ao valor-limite acrescido de 0,15 são consideradas positivas.
- 2.2.4. As amostras que apresentem valores de absorvância intermédios são duvidosas, devendo utilizar-se outra técnica para confirmar o resultado.

3. ENSAIO ELISA DE BLOQUEIO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE EQUINA (AHSV) (ENSAIO RECOMENDADO)

O ensaio ELISA de bloqueio é concebido para a detecção de anticorpos específicos anti-AHSV em soros de quaisquer espécies sensíveis. A VP7 constitui a principal proteína antigénica vírica do AHSV, sendo conservada nos nove serótipos. Uma vez que o anticorpo monoclonal (Mab) também é dirigido contra o VP7, o ensaio apresenta um elevado nível de sensibilidade e especificidade. Além disso, o antígeno recombinante VP7 é totalmente inócuo, proporcionando, assim, um elevado grau de segurança.

O princípio do ensaio consiste no bloqueio por anticorpos da amostra da reacção entre o antígeno recombinante VP7, ligado à placa ELISA, e o Mab conjugado específico da proteína recombinante VP7. Os anticorpos do soro da amostra em análise bloqueiam a reacção entre o antígeno e o Mab, resultando numa redução da coloração.

O ensaio seguidamente descrito é utilizado no laboratório de referência da Comunidade Europeia para a peste equina, em Algete (Espanha).

3.1. Procedimento

3.1.1. Placas ELISA

- 3.1.1.1. Revestir as placas ELISA com proteína recombinante AHSV-4 VP7 diluída em tampão de carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Incubar a 4 °C de um dia para o outro.
- 3.1.1.2. Lavar as placas cinco vezes com PBS contendo 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST).
- 3.1.1.3. Estabilizar as placas revestidas com o antígeno por tratamento com uma solução adequada (de forma a permitir a armazenagem a seco, a 4 °C, por períodos longos, sem perda de actividade) e secar invertendo a placa sobre um material absorvente.

3.1.2. Amostras em análise e testemunhas

- 3.1.2.1. Para rastreio: Diluir em PBST, directamente na placa, os soros em análise e soros-testemunha na proporção 1: 10, de modo a obter um volume final de 100 µl/alvéolo. Incubar a 37 °C durante uma hora.
- 3.1.2.2. Para titulação: Distribuir por oito alvéolos (100 µl/alvéolo) diluições sucessivas para metade (de 1: 10 a 1: 1 280) dos soros em análise e soros-testemunha positivos. As testemunhas negativas são analisadas numa diluição de 1: 10.

3.1.3. *Conjugado*

Adicionar a cada alvéolo 50 µl de Mab (anticorpo monoclonal específico de VP7) anti-VP7) conjugado com HRP, previamente diluído, e misturar suavemente de forma a garantir a homogeneidade. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

3.1.4. Lavar as placas cinco vezes com PBST e secar do modo atrás descrito.

3.1.5. *Cromogénio/Substrato*

Adicionar a cada alvéolo 100 µl de solução cromogénio/substrato constituída por 1 ml de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico]) na concentração de 5 mg/ml e 9 ml de tampão-substrato (0,1M tampão de fosfato-citrato de pH 4 com 0,03 % H₂O₂) e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. O desenvolvimento da coloração é suspenso mediante a adição, a cada alvéolo, de 100 µl de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 2 % (m/v).

3.1.6. *Determinações*

Efectuar a leitura da DO a 405 nm com recurso a um leitor para placas ELISA.

3.2. Interpretação dos resultados

3.2.1. *Validação do ensaio*

O ensaio é válido se a densidade óptica (DO) da testemunha negativa (TN) for superior a 1,0 e a DO da testemunha positiva (TP) for inferior a 0,2.

3.2.2. *Cálculo dos valores-limite*

Valor-limite positivo $TN - [(TN-TP) \times 0.3]$

Valor-limite negativo $TN - [(TN-TP) \times 0.2]$

Em que TN representa a DO da testemunha negativa e TP a DO da testemunha positiva.

3.2.3. *Interpretação dos resultados*

As amostras com DO inferior ao valor-limite positivo devem ser consideradas positivas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

As amostras com DO superior ao valor-limite negativo devem ser consideradas negativas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

As amostras com DO compreendida entre os dois valores referidos deverão ser consideradas duvidosas, devendo recolher-se novas amostras decorridas duas a três semanas.»
