

32002D0160

L 53/37

JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE

23.2.2002

DECIZIA COMISIEI
din 21 februarie 2002
de modificare a anexei D la Directiva 90/426/CEE a Consiliului privind testele de diagnosticare a pestei
cabaline africane
[notificată cu numărul C(2002) 556]
(Text cu relevanță pentru SEE)

(2002/160/CE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 90/426/CEE a Consiliului din 26 iunie 1990 privind condițiile de inspecție veterinară care reglementează circulația și importul de ecvidee din țări terțe ⁽¹⁾, astfel cum a fost modificată ultima dată prin Decizia 2001/298/CE ⁽²⁾, în special articolul 23,

întrucât:

- (1) Anexa D la Directiva 90/426/CEE descrie testul de fixare a complementului care trebuie efectuat pentru diagnosticarea pestei cabaline africane.
- (2) În noiembrie 2002, laboratorul comunitar de referință din Algete, Spania, a găzduit reuniunea anuală a laboratoarelor naționale de referință pentru pesta cabalină africană. În cursul acestei reuniuni, a fost prezentată dovada științifică conform căreia testul de fixare a complementului descris în prezent în anexa D la Directiva 90/426/CEE prezenta limitări serioase, în special pentru că nu permite detectarea prezenței anticorpilor decât în urma unei infectări sau a unei vaccinări recente. În plus, testul este înlocuit, în practică, de teste ELISA moderne în aproape toate laboratoarele Comunității, precum și în principalele țări exportatoare.
- (3) Testele de laborator acceptate la nivel internațional pentru detectarea anticorpilor virusului pestei cabaline africane

sunt descrise în Manualul de standarde pentru testele de diagnosticare și pentru vaccinuri ⁽³⁾ al Oficiului internațional pentru epizootii (OIE); cu toate acestea, ediția curentă menționează doar unul dintre testele ELISA disponibile.

- (4) În consecință, este necesară modificarea anexei D la Directiva 90/426/CEE pentru a ține seama de evoluția tehnică și de standardele agreate la nivel internațional.
- (5) Măsurile prevăzute de prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent veterinar,

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

Articolul 1

Anexa D la Directiva 90/426/CEE se înlocuiește cu anexa la prezenta decizie.

Articolul 2

Prezenta decizie se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 21 februarie 2002.

Pentru Comisie

David BYRNE

Membru al Comisiei

⁽¹⁾ JO L 224, 18.8.1990, p. 42.

⁽²⁾ JO L 102, 12.4.2001, p. 63.

⁽³⁾ Capitolul 2.1.11, ediția a patra 2000.

ANEXĂ

„ANEXA D

PESTA CABALINĂ AFRICANĂ

DIAGNOSTICARE

Reactivii pentru metodele de imunoabsorbție enzimatică (ELISA) descrise în cele ce urmează pot fi obținuți de la laboratorul comunitar de referință sau de la laboratoarele de referință ale OIE pentru pesta cabalină africană.

1. TEST ELISA COMPETITIV PENTRU DETECTAREA PREZENȚEI ANTICORPILOR VIRUSULUI PESTEI CABALINE AFRICANE (VPCA) (TEST OBLIGATORIU)

Testul ELISA competitiv este utilizat pentru detectarea prezenței anticorpilor specifici ai virusului pestei cabaline africane în serurile provenite de la toate speciile de ecvidee. Antiserul de cobai împotriva VPCA, denumit în continuare «antiser de cobai», este un antiser cu spectru larg, policlonal și imun; este specific serogrupului PCA și permite detectarea tuturor serotipurilor cunoscute ale virusului acestei boli.

Principiul de testare este întreruperea reacției dintre antigenul VPCA și un antiser de cobai pe un eșantion de ser de testat. Anticorpul VPCA din eșantionul de ser de testat sunt în competiție cu cei ai antiserului de cobai, ceea ce antrenează o atenuare a culorii preconizate (după adăugarea unui anticorp anticobai marcat cu o enzimă și a substratului). Serurile pot fi testate la o singură diluție de 1/5 (metoda testului punctual) sau pot fi titrate (metoda de titrare a serului) pentru obținerea unei serii de diluții. Valorile de inhibiție mai mari de 50 % pot fi considerate pozitive.

Protocolul de testare descris anterior este utilizat de laboratorul regional de referință pentru pesta cabalină africană din Pirbright, Regatul Unit.

1.1. Descrierea testului

1.1.1. Pregătirea plăcilor

1.1.1.1. Se depune pe plăci ELISA antigenul VPCA extras din culturi de celule infectate, diluat într-un tampon carbonat-bicarbonat cu pH 9,6. Se incubează plăcile ELISA peste noapte la 4 °C.

1.1.1.2. Se spală plăcile de trei ori prin clătire și golirea godeurilor cu o soluție salină tamponată cu fosfat (SSTF) cu pH 7,2-7,4, apoi se usucă pe sugativă.

1.1.2. Godeuri de control

1.1.2.1. Se titrează serurile de control pozitive într-o serie de diluții în baza doi, de la 1/5 la 1/640, în coloana 1, într-un tampon de blocare SSTF cu conținut de 0,05 % (v/v) de Tween-20, 5,0 % (m/v) de lapte praf degresat (Cadbury's Marvel™) și 1 % (v/v) de ser de bovine adulte, pentru a obține un volum final de 50 μl pentru fiecare godeu.

1.1.2.2. Se adaugă 50 μl de ser de control negativ într-o diluție de 1/5 (10 μl ser + 40 μl tampon de blocare) în godeurile A și B din coloana 2.

1.1.2.3. Se adaugă 100 μl de tampon de blocare în godeurile C și D din coloana 2 (CONTROL ORB).

1.1.2.4. Se adaugă 50 μl tampon de blocare în godeurile E, F, G și H din coloana 2 (control cu ser de cobai).

1.1.3. Metoda testului punctual

1.1.3.1. Se adaugă la tamponul de blocare o diluție de 1/5 din fiecare ser de testat pentru dublarea godeurilor din coloanele de la 3 la 12 (seruri de 10 μl + 40 μl tampon de blocare).

sau

1.1.4. Metoda de titrare a serului

1.1.4.1. Se prepară o serie de diluții în baza doi din fiecare eșantion de testat (de la 1/5 la 1/640) într-un tampon de blocare în opt godeuri în fiecare dintre coloanele de la 3 la 12.

apoi

1.1.5. Se adaugă 50 μl antiser de cobai, diluat în prealabil într-un tampon de blocare, în toate godeurile, cu excepția godeurilor de CONTROL ORB din placa ELISA (toate godeurile conțin

in acum un volum final de 100 μl).

1.1.5.1. Se incubează timp de 1 oră la 37 °C într-un agitator rotativ.

1.1.5.2. Se spală plăcile de trei ori și se usucă în modul menționat anterior.

- 1.1.5.3. Se adaugă în fiecare godeu 50 µl ser de iepure anticobai conjugat cu peroxidază de hrean, diluat în prealabil într-un tampon de blocare.
- 1.1.5.4. Se incubează timp de 1 oră la 37 °C într-un agitator rotativ.
- 1.1.5.5. Se spală plăcile de trei ori și se usucă în modul menționat anterior.
- 1.1.6. *Cromogen*
- Se prepară soluția cromogen (OFD = ortofenildiamină) conform instrucțiunilor fabricantului (0,4 mg/ml în apă distilată sterilă) cu puțin timp înainte de utilizare. Se adaugă un substrat (peroxid de hidrogen = H₂O₂), pentru a obține o concentrație finală de 0,05 % (v/v) (1/2000 dintr-o soluție la 30 % de H₂O₂). Se adaugă 50 µl din soluția OFD în fiecare godeu și se lasă plăcile pe suport timp de 10 minute la temperatura ambiantă. Se oprește reacția prin adăugarea a 50 µl de acid sulfuric 1M (H₂SO₄) în fiecare godeu.
- 1.1.7. *Citire*
- Citire prin spectrofotometrie la 492 nm.

1.2. Exprimarea rezultatelor

- 1.2.1. Cu ajutorul unui program de calculator, se stabilesc valorile de densitate optică (DO) și valoarea procentuală de inhibiție (PI) pentru serurile de testare și serurile de control, pe baza valorii medii înregistrate în cele patru godeuri care conțin serurile de cobai de control. Valorile DO și PI se utilizează pentru a stabili dacă testul a fost efectuat în limite acceptabile. Limitele superioare și inferioare ale serurilor de cobai de control se situează respectiv între valorile 1,4 și 0,4 de DO. Titrul punctului terminal de control pozitiv pe baza unui PI de 50 % ar trebui să fie 1/240 (între 1/120 și 1/480). Plăcile care nu sunt în conformitate cu criteriile menționate anterior trebuie respinse. Cu toate acestea, în cazul în care titrul serului de control pozitiv este mai mare de 1/480 și eşantioanele testate sunt, totuși, negative, eşantioanele negative cunoscute pot fi acceptate.

Godeurile duplicat cu ser de control negativ și godeurile duplicat de control orb ar trebui să prezinte valori PI cuprinse între + 25 % și - 25 %, respectiv între + 95 % și + 105 %. Nerespectarea acestor limite nu conduce la invalidarea rezultatelor plăcii, însă sugerează că este în curs formarea unei culori de fond.

- 1.2.2. Pragul de diagnostic (valoarea-limită) pentru serurile testate este de 50 % (PI 50 %). Eşantioanele care prezintă valori PI mai mari de 50 % sunt considerate pozitive. Eşantioanele care prezintă valori PI mai mici de 50 % sunt considerate negative.

Eşantioanele care prezintă valori PI superioare sau inferioare pragului pentru godeurile duplicat sunt considerate neconcludente. Aceste eşantioane pot fi testate din nou printr-un test punctual sau prin titrare. Eşantioanele pozitive pot fi și ele titrate pentru a furniza o indicație cu privire la gradul de pozitivitate.

Analiză punctuală

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C+		Seruri testate									
A	1:5	C-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	C-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	orb										
D	1:40	orb										
E	1:80	CC										
F	1:160	CC										
G	1:320	CC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	CC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

C- = control negativ
 C+ = control pozitiv
 CC = control cu cobai.

Titrare serului

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C+		Seruri testate									
A	1:5	C-	1:5									1:5
B	1:10	C-	1:10									1:10
C	1:20	orb	1:20									1:20
D	1:40	orb	1:40									1:40
E	1:80	CC	1:80									1:80
F	1:160	CC	1:160									1:160
G	1:320	CC	1:320									1:320
H	1:640	CC	1:640									1:640

C- = control negativ
 C+ = control pozitiv
 CC = control cu cobai.

2. TEST ELISA INDIRECT PENTRU DETECTAREA PREZENȚEI ANTICORPILOR PESTEI CABALINE AFRICANE (VPCA) (TEST OBLIGATORIU)

Testul descris în continuare este în conformitate cu descrierea din capitolul 2.1.11 din Manualul de standarde pentru teste de diagnosticare și vaccinuri al OIE, ediția a patra, 2000.

Proteina recombinantă VP7 a fost utilizată ca antigen pentru detectarea prezenței anticorpilor virusului pestei cabaline africane; metoda este foarte sensibilă și foarte specifică. Această proteină prezintă, de asemenea, avantajul de a fi stabilă și neinfecțioasă.

2.1. Descrierea testului

2.1.1. Faza solidă

- 2.1.1.1. Plăcile ELISA se sensibilizează cu proteina recombinantă VP7 a VPCA de serotip 4, diluată într-un tampon carbonat/bicarbonat cu pH 9,6. Se incubează plăcile peste noapte la 4 °C.
- 2.1.1.2. Se clătesc plăcile de cinci ori cu apă distilată cu conținut de 0,01 % (v/v) Tween-20 (soluție de spălare). Se scutură ușor plăcile pe un material absorbant pentru a îndepărta orice urmă de apă.
- 2.1.1.3. Se saturează plăcile cu o soluție SSTF + 5 % (m/v) de lapte praf degresat (lapte Nestlé™), câte 200 μl în fiecare godeu timp de o oră la 37 °C.
- 2.1.1.4. Se înlătură soluția de saturare și se scutură ușor plăcile pe un material absorbant.

2.1.2. Eșantioane

- 2.1.2.1. Serurile de testat și serurile pozitiv și negativ de control se diluează la 1/25 într-o soluție SSTF + 5 % (m/v) de lapte degresat + 0,05 % (v/v) Tween – 20; se aplică apoi 100 μl în fiecare godeu. Se incubează timp de 1 oră la 37 °C.

Pentru titrare, se efectuează serii de diluție în baza doi începând de la 1/25 (100 μl/godeu), utilizându-se câte o coloană a plăcii pentru fiecare ser; se procedează la fel pentru controalele pozitiv și negativ. Se incubează timp de 1 oră la 37 °C.

- 2.1.2.2. Se clătesc plăcile în conformitate cu descrierea din etapa 2.1.1.2.

2.1.3. Conjugat

- 2.1.3.1. Se depun în fiecare godeu câte 100 μl de anticorpi anti-cal conjugați cu peroxidază de hrean; anticorpii se diluează într-o SSTF + 5 % lapte degresat + 0,05 % Tween-20 cu pH 7,2. Se incubează timp de 1 oră la 37 °C.
- 2.1.3.2. Se clătesc plăcile în conformitate cu descrierea din etapa 2.1.1.2.

2.1.4. Cromogen/substrat

2.1.4.1. Se adaugă 200 µl/godeu de soluție de cromogen/substrat [10 ml de 80,6 mM de DMAB (dimetilaminobenzaldehidă) + 10 ml de 1,56 mM de MBTH (3-metil-2-benzotiazolină de hidrociorură de hidrazonă) + 5 µl de H₂O₂].

Se blochează reacția colorimetrică după aproximativ 5-10 minute (înainte să înceapă să se coloreze controlul negativ) prin adăugarea a 50 µl de H₂SO₄ 3N.

Se pot utiliza și alți cromogeni, cum ar fi ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic)], TMB (tetrametil de benzidină) sau OFD (ortofenil diamină).

2.1.4.2. Se citește placa la 600 nm (sau 620 nm).

2.2. Interpretarea rezultatelor

2.2.1. Se calculează valoarea pragului adăugând 0,6 la valoarea controlului negativ (0,6 este abaterea standard calculată pe baza unui grup de 30 de seruri negative).

2.2.2. Eșantioanele testate care prezintă o valoare de absorbție inferioară pragului sunt considerate negative.

2.2.3. Eșantioanele testate care prezintă o valoare de absorbție superioară pragului + 0,15 sunt considerate pozitive.

2.2.4. Eșantioanele testate care prezintă o valoare de absorbție intermediară sunt neconcludente și trebuie utilizată o a doua tehnică pentru confirmarea rezultatului.

3. TESTUL ELISA DE BLOCARE PENTRU DETECTAREA PREZENȚEI ANTICORPILOR VIRUSULUI PESTEI CABALINE AFRICANE (VPCA) (TEST OBLIGATORIU)

Testul ELISA de blocare are ca scop detectarea prezenței anticorpilor specifici virusului pestei cabaline africane în serurile provenite de la orice specie susceptibilă la acest virus. VP7 constituie proteina antigenică principală a VPCA, fiind prezentă în toate cele 9 serotipuri. Deoarece anticorpii monoclonali sunt îndreptați tot împotriva proteinei VP7, testul va fi foarte sensibil și foarte specific. De asemenea, antigenul recombinant VP7 este total inofensiv și, prin urmare, foarte sigur.

Principiul testului este întreruperea reacției dintre proteina recombinantă VP7, în calitate de antigen legat de placa ELISA, și anticorpii monoclonali conjugat, specifici proteinei VP7. Anticorpii din serurile de testat vor bloca reacția dintre antigen și anticorpii monoclonali, ceea ce va duce la atenuarea culorii.

Testul descris în continuare este utilizat de laboratorul comunitar de referință pentru pesta cabalină africană din Algețe, Spania.

3.1. Descrierea testului

3.1.1. Plăcile ELISA

3.1.1.1. Se depune pe plăci ELISA antigenul VPCA de serotip 4 cu proteina recombinantă VP7, diluată într-un tampon carbonat/bicarbonat cu pH 9,6 și se incubează peste noapte la 4 °C.

3.1.1.2. Se spală plăcile de 5 ori cu o soluție salină tamponată cu fosfat (SSTF) cu conținut de 0,05 % (v/v) de Tween-20.

3.1.1.3. Se stabilizează placa prin tratare cu ajutorul unei soluții de stabilizare (pentru a permite păstrarea pe termen lung la 4 °C fără pierdere de activitate) și se usucă pe sugativă.

3.1.2. Eșantioane și controale

3.1.2.1. Depistare: Se diluează serurile de testat și serurile de control în proporție de 1 la 10 direct pe placă în SSTF pentru a obține un volum final de 100 µl în fiecare godeu. Se incubează timp de o oră la 37 °C.

3.1.2.2. Titrare: Se pregătește o serie de diluții în baza doi de seruri de testat și de control pozitive (100 µl în fiecare godeu) de la 1/10 la 1/1 280, care se depun în opt godeuri. Controlul negativ este testat la o diluție de 1/10.

3.1.3. *Conjugat*

Se adaugă 50 µl de anticorp monoclonal diluat în prealabil (anticorp monoclonal conjugat cu peroxidază de hrean) în fiecare godeu și se amestecă ușor pentru a omogeniza. Se incubează timp de 30 de minute la 37 °C.

3.1.4. Se spală plăcile de 5 ori cu SSTF și se usucă pe sugativă cum s-a descris anterior.

3.1.5. *Cromogen/substrat*

Se adaugă în fiecare godeu 100 µl din soluția următoare de cromogen/substrat: 1 ml de ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic)] cu 5 mg/ml + 9 ml de tampon de substrat (0,1 M de tampon de fosfat-citrat cu pH 4 cu conținut de 0,03 % de H₂O₂), apoi se incubează timp de 10 minute la temperatura ambiantă. Se stopează formarea culorii prin adăugarea în fiecare godeu a 100 µl de DSS (dodecil sulfat de sodiu) la 2 % (m/v).

3.1.6. *Citire*

Se citește la 405 nm într-un cititor de plăci ELISA.

3.2. **Interpretarea rezultatelor**3.2.1. *Valabilitatea testului*

Testul este valabil atunci când densitatea optică (DO) a controlului negativ (CN) este mai mare de 0,1 și DO a controlului pozitiv (CP) este mai mică de 0,2.

3.2.2. *Calcularea limitelor*

Limită pozitivă = $CN - [(CN - CP) \times 0,3]$

Limită negativă = $CN - [(CN - CP) \times 0,2]$

CN este DO a controlului negativ și CP este DO a controlului pozitiv.

3.2.3. *Interpretarea rezultatelor*

La depistarea anticorpilor VPCA, eşantioanele care prezintă valori ale DO mai mici decât limita pozitivă trebuie considerate pozitive.

La depistarea anticorpilor VPCA, eşantioanele care prezintă valori ale DO mai mari decât limita pozitivă trebuie considerate negative.

Eşantioanele care prezintă valori ale DO care se încadrează între aceste două valori trebuie considerate neconcludente, fiind necesară prelevarea altor eşantioane de la animale după 2-3 săptămâni.”