

DECISÃO DE EXECUÇÃO (UE) 2016/1840 DA COMISSÃO**de 14 de outubro de 2016****que altera o anexo IV da Diretiva 2009/156/CE do Conselho no que diz respeito aos métodos de diagnóstico da peste equina***[notificada com o número C(2016) 6509]***(Texto relevante para efeitos do EEE)**

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta a Diretiva 2009/156/CE do Conselho, de 30 de novembro de 2009, relativa às condições de polícia sanitária que regem a circulação de equídeos e as importações de equídeos provenientes de países terceiros ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 20.º,

Considerando o seguinte:

- (1) O anexo IV da Diretiva 2009/156/CE estabelece os métodos de diagnóstico da peste equina a utilizar, quando necessário, para testar os equídeos antes da sua circulação no interior da União ou da sua importação a partir de países terceiros.
- (2) Desde a adoção da Diretiva 2009/156/CE, observou-se uma evolução das capacidades laboratoriais de realização de testes de diagnóstico da peste equina avançados, altamente sensíveis e eficientes. Paralelamente, o capítulo relativo ao diagnóstico da peste equina do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) ⁽²⁾ foi alterado de modo a refletir essa evolução.
- (3) No âmbito do seu programa de trabalho de 2014, o Laboratório de Referência da União Europeia para a Peste Equina ⁽³⁾ elaborou um relatório sobre a avaliação técnica dos métodos de diagnóstico descritos no anexo IV da Diretiva 2009/156/CE. A avaliação, que foi apresentada à Comissão em maio de 2015, concluiu que o ensaio de imunoabsorção enzimática competitiva (ELISA) já não está disponível, o ensaio ELISA indireto não é prática corrente, mas pode ser fornecido num prazo de quatro a seis meses a contar da apresentação do pedido, e o ensaio ELISA de bloqueio está disponível comercialmente e é utilizado correntemente para a análise das amostras durante os testes de proficiência organizados pelo Laboratório de Referência da União Europeia para a Peste Equina.
- (4) O relatório salienta, por outro lado, que os métodos de identificação dos ácidos nucleicos por transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) têm vantagens em relação aos métodos de diagnóstico serológicos, dado que permitem detetar a doença numa fase precoce da infeção. Além disso, a maioria dos laboratórios nacionais de referência dos Estados-Membros da União Europeia utiliza métodos RT-PCR em tempo real, incluindo para o diagnóstico da peste equina, métodos esses que provaram ser adequados à sua finalidade nos testes anuais de proficiência realizados de 2009 a 2014. O relatório indica igualmente que, fora do território da União, vários laboratórios de referência da OIE e outros laboratórios especializados na peste equina implementaram pelo menos um dos métodos RT-PCR em tempo real para a deteção do genoma da peste equina.
- (5) Em 24 e 25 de novembro de 2015, o seminário conjunto dos laboratórios de referência da União Europeia para a peste equina/febre catarral ovina e dos laboratórios nacionais de referência, realizado em Ascot, Reino Unido, recomendou a inclusão no anexo IV da Diretiva 2009/156/CE de métodos em tempo real de transcriptase reversa (RRT) associada à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a deteção do vírus da peste equina.

⁽¹⁾ JO L 192 de 23.7.2010, p. 1.

⁽²⁾ http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.01_AHS.pdf

⁽³⁾ Diretiva 92/35/CEE do Conselho, de 29 de abril de 1992, que define as regras de controlo e as medidas de luta contra a peste equina (JO L 157 de 10.6.1992, p. 19).

- (6) Embora todos os métodos de RT-PCR em tempo real disponíveis para a deteção do genoma da peste equina sejam suficientemente sensíveis, o procedimento descrito por Agüero *et al.* (2008) ⁽⁴⁾ é o mais comumente utilizado pelos laboratórios. O método descrito por Guthrie *et al.* (2013) ⁽⁵⁾ foi concebido especificamente para garantir que os cavalos provenientes de zonas onde exista um risco de infeção por peste equina possam ser transportados em segurança após o período de quarentena mínimo exigido em conformidade com o Código Sanitário para os Animais Terrestres ⁽⁶⁾ da OIE.
- (7) É, por conseguinte, adequado incluir no anexo IV da Diretiva 2009/156/CE métodos de identificação do agente e métodos de deteção de anticorpos como métodos complementares para um diagnóstico rápido da peste equina.
- (8) O anexo IV da Diretiva 2009/156/CE deve, pois, ser alterado mediante a supressão do ensaio ELISA competitivo e a atualização dos procedimentos para os ensaios ELISA de bloqueio e indiretos, em conformidade com o capítulo 2.5.1 do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, edição de 2016, baseado na versão adotada pela Assembleia Mundial dos Delegados da OIE em maio de 2012 ⁽⁷⁾. Ao mesmo tempo, devem ser incluídos nesse anexo procedimentos de RT-PCR em tempo real, como descritos por Agüero *et al.* (2008) e por Guthrie *et al.* (2013), para que esses testes de identificação do agente possam estar disponíveis para efeitos de ensaio pré-circulação.
- (9) A Diretiva 2009/156/CE deve, por conseguinte, ser alterada em conformidade.
- (10) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Vegetais, Animais e Alimentos para Consumo Humano e Animal,

ADOTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

O anexo IV da Diretiva 2009/156/CE é substituído pelo texto constante do anexo da presente decisão.

Artigo 2.º

Os destinatários da presente decisão são os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 14 de outubro de 2016.

Pela Comissão

Vytenis ANDRIUKAITIS

Membro da Comissão

⁽⁴⁾ Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. e Jimenez-Clavero A. (2008). «Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus». *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 325-328.

⁽⁵⁾ Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. «Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus». *Journal of Virological Methods*. 2013;189(1):30-35.

⁽⁶⁾ http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_ahs.pdf

⁽⁷⁾ Ver nota de rodapé 2.

ANEXO

«ANEXO IV

**PESTE EQUINA
DIAGNÓSTICO**

PARTE A

Testes serológicos

Os métodos serológicos seguidamente descritos consistem em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) baseados no capítulo 2.5.1, secção B, ponto 2, do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, edição de 2016, adotado pela Assembleia Mundial dos Delegados da OIE em maio de 2012.

A proteína vírica VP7 é uma importante proteína antigénica imunodominante do vírus da peste equina (AHSV), sendo conservada nos nove serótipos do AHSV. Está demonstrado que as proteínas recombinantes AHSV-VP7 são estáveis, inócuas e adequadas para utilização como antigénios em procedimentos ELISA para a determinação de anticorpos anti-AHSV com um elevado grau de sensibilidade e especificidade (Laviada *et al.*, 1992b ⁽¹⁾; Maree e Paweska, 2005). O ensaio ELISA indireto e o ensaio ELISA de bloqueio são os dois ensaios ELISA AHS-VP7 adequados para o diagnóstico serológico da peste equina (AHS).

1. Ensaio ELISA indireto para a deteção de anticorpos contra o vírus da peste equina (AHSV)

O conjugado utilizado no presente método é uma antigama globulina de cavalo conjugada com peroxidase de rábano que reage com o soro de cavalos, mulas e burros. O método descrito por Maree & Paweska (2005) ⁽²⁾ utiliza a proteína G como conjugado que também reage com soro de zebra.

O antigénio pode ser fornecido pelo *Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)*, Espanha, no prazo de quatro a seis meses a contar da data do pedido.

1.1. Procedimento de ensaio**1.1.1. Fase sólida**

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

1.1.1.2. 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.

1.1.1.3. Bloquear as placas mediante a adição a cada alvéolo de 200 µl de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 com 5 % (m/v) de leite desnatado (leite em pó desnatado Nestlé™, incubando a 37 °C durante uma hora.

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

1.1.2. Amostras em análise

1.1.2.1. Diluir as amostras de soro para analisar, 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.

Para a titulação, 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.

⁽¹⁾ Laviada M.D., Roy P. e Sanchez-Vizcaino J.M (1992b). «Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection». Em: «Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium». Walton T.E. & Osburn B.L., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646-650.

⁽²⁾ Maree S. and Paweska J.T. (2005). «Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera». *J. Virol. Methods*, 125 (1), 55-65.

- 1.1.2.2. 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.
- 1.1.3. Conjugado
 - 1.1.3.1. Distribuir por cada alvéolo 100 µl de antigama globulina de cavalo conjugada com peroxidase de rábano (HRP) diluída em PBS + 5 % leite + 0,05 % Tween 20 a pH 7,2. Incubar a 37 °C durante uma hora.
 - 1.1.3.2. 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.
- 1.1.4. Cromogénio/Substrato
 - 1.1.4.1. Distribuir por cada alvéolo 200 µl de solução cromogénio/substrato [10 ml DMAB (dimetilaminobenzaldeído) 80,6 mM + 10 ml MBTH (cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolino-hidrazona) 1,56 mM + 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).
 - 1.1.4.2. Efetuar as leituras espectrofotométricas da densidade ótica (DO) a 600 nm (ou 620 nm).

1.2. *Interpretação dos resultados*

- 1.2.1. Calcular o valor-limite (*cut-off*) adicionando 0,06 ao valor obtido para a testemunha negativa (0,06 é o desvio-padrão obtido com um grupo de 30 soros negativos).
- 1.2.2. As amostras em análise que apresentarem valores de absorvância inferiores ao valor-limite são consideradas negativas.
- 1.2.3. As amostras em análise que apresentarem valores de absorvância superiores ao valor-limite acrescido de 0,15 são consideradas positivas.
- 1.2.4. As amostras em análise que apresentarem valores de absorvância intermédios são consideradas inconclusivas, devendo utilizar-se outra técnica para confirmar o resultado.

2. **Ensaio ELISA de bloqueio para a deteção de anticorpos contra o vírus da peste equina (AHSV)**

O ensaio ELISA competitivo de bloqueio foi concebido para a deteção de anticorpos específicos anti-AHSV em soros de quaisquer espécies de equídeos, ou seja, cavalos, burros, zebras e respetivos cruzamentos, evitando o problema da especificidade encontrado ocasionalmente quando se utilizam ensaios ELISA indiretos.

O princípio do ensaio consiste no bloqueio da reação entre a proteína recombinante VP7 absorvida na placa ELISA e um anticorpo monoclonal (Mab) conjugado específico da AHS-VP7. Os anticorpos do soro da amostra em análise bloqueiam a reação entre o antigénio e o Mab, resultando numa redução da coloração. Uma vez que o Mab é dirigido contra a VP7, o ensaio apresenta um elevado nível de sensibilidade e especificidade.

O ensaio ELISA competitivo de bloqueio está disponível comercialmente.

2.1. *Procedimento de ensaio*

2.1.1. Fase sólida

- 2.1.1.1. Revestir as placas ELISA com 50-100 ng de proteína recombinante AHSV-4 VP7 diluída em tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Incubar a 4 °C de um dia para o outro.
- 2.1.1.2. Lavar as placas três vezes com PBS 0,1× contendo 0,135 M de NaCl e 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.

2.1.2. Amostras em análise e testemunhas

- 2.1.2.1. Diluir as amostras de soro para analisar, bem como os soros das testemunhas positiva e negativa, na proporção 1:5, em solvente com 0,35 M de NaCl, 0,05 % (v/v) de Tween 20 e 0,1 % de Kathon, adicionando 100 µl a cada alvéolo. Incubar a 37 °C durante uma hora.

Para a titulação, distribuir por 8 alvéolos (100 µl/alvéolo) diluições sucessivas para metade, de 1:10 para 1:280, dos soros em análise, um soro por coluna, procedendo da mesma forma com as testemunhas positiva e negativa. Incubar a 37 °C durante uma hora.

- 2.1.2.2. Lavar as placas cinco vezes com PBS 0,1× contendo 0,135 M de NaCl e 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.

2.1.3. Conjugado

- 2.1.3.1. Distribuir por cada alvéolo 100 µl de Mab anti-VP7 conjugado com peroxidase de rábano. Previamente, o Mab deve ser diluído a 1/5 000-1/15 000 numa solução 1/1 de estabilizador StabiliZyme Select® (SurModics. Referência: SZ03) em água destilada. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

- 2.1.3.2. Lavar as placas cinco vezes com PBS 0,1× contendo 0,135 M de NaCl e 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.

2.1.4. 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 (0,1 M 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).

2.1.5. Leitura

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

2.2. Interpretação dos resultados

- 2.2.1. Determinar a percentagem de bloqueio (PB) de cada amostra aplicando a seguinte fórmula, em que "AC", corresponde a "anticorpos":

$$PB = \frac{AC(\text{testemunha}^-) - AC(\text{amostra})}{AC(\text{testemunha}^-) - AC(\text{testemunha}^+)} \times 100$$

- 2.2.2. As amostras com um valor PB superior a 50 % devem ser consideradas positivas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

- 2.2.3. As amostras com um valor PB inferior a 45 % devem ser consideradas negativas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

- 2.2.4. As amostras com um valor PB entre 45 % e 50 % devem ser consideradas inconclusivas e sujeitas a um novo ensaio. Se o resultado for novamente inconclusivo, os animais devem ser submetidos a um novo ensaio em amostras colhidas não antes de duas semanas depois de a amostra considerada inconclusiva ter sido colhida.

PARTE B

Identificação do agente

Transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase em tempo real (rRT-PCR)

Os testes de identificação do agente baseados em métodos de ácidos nucleicos devem detetar estirpes de referência dos nove serótipos do AHSV.

O método descrito no ponto 2.1 baseia-se no capítulo 2.5.1, secção B, ponto 1.2, do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, edição de 2016, adotado pela Assembleia Mundial dos Delegados da OIE em maio de 2012.

Qualquer método de deteção RT-PCR utilizado na análise de amostras de sangue ou de baço no contexto da Diretiva 2009/156/CE deve ter sensibilidade igual ou superior à dos métodos descritos no ponto 2.

Os vírus inativados das estirpes de referência dos serótipos 1 a 9 a utilizar no ensaio podem ser solicitados ao Laboratório de Referência da União Europeia ou ao Laboratório de Referência da OIE para a Peste Equina, em Algete, Espanha.

1. Extração do ARN viral

A fim de assegurar uma boa reação, o ARN do AHSV extraído da amostra deve ser de elevada qualidade. A extração de ácidos nucleicos de amostras clínicas pode ser realizada utilizando diversos métodos internos ou disponíveis comercialmente.

Os kits comerciais utilizam várias abordagens para o isolamento do ARN. Na maior parte dos casos baseiam-se num dos seguintes procedimentos:

- Extração de ácidos nucleicos por fenol-clorofórmio;
- Adsorção de ácidos nucleicos em sistemas de filtração;
- Adsorção de ácidos nucleicos em sistemas de esferas magnéticas.

Segue-se um exemplo de extração de ARN por método interno:

- 1.1. Homogeneizar 1 g de amostra de tecido em 1 ml de uma solução de desnaturação (tiocianato de guanidínio 4 M, citrato de sódio 25 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 M, sarcosil 0,5 %).
- 1.2. Após centrifugação, adicionar ao sobrenadante 1 µg de ARN de levedura, 0,1 ml de acetato de sódio 2 M pH 4, 1 ml de fenol e 0,2 ml de mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (49/1).
- 1.3. Agitar vigorosamente a suspensão e arrefecer sobre gelo durante 15 minutos.
- 1.4. Após centrifugação, o ARN presente na fase aquosa é extraído com fenol, precipitado com etanol e ressuspensão em água esterilizada.

2. Procedimento RT-PCR em tempo real

- 2.1. RT-PCR em tempo real específico de grupo, por Agüero et al., 2008 ⁽¹⁾

Este método RT-PCR em tempo real específico de grupo tem por alvo a proteína VP7 do vírus AHSV e permite detetar todos os serótipos e estirpes conhecidos do AHSV atualmente em circulação. Foi utilizado com muito bons resultados pelos laboratórios nacionais de referência dos Estados-Membros da União Europeia que participaram nos testes de proficiência organizados anualmente pelo Laboratório de Referência da União Europeia durante o período de 2009-2015. Além disso, num ensaio colaborativo internacional organizado em 2015 no âmbito da rede de laboratórios de referência do OIE, este protocolo foi dos que obtiveram as classificações mais elevadas.

Sequências de iniciadores e sondas para deteção de vírus da espécie AHSV:

- iniciador direto 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- iniciador inverso 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'
- sonda MGB-TaqMan 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3'

- 2.1.1. Diluir a solução-mãe do iniciador para uma concentração de trabalho de 8 µM ("concentração de trabalho a 8 µM do iniciador") e diluir a sonda para uma concentração de trabalho de 50 µM ("concentração de trabalho a 50 µM da sonda"). Configurar a placa de ensaio e introduzir a configuração no software do aparelho de PCR em tempo real. Utilizando a configuração como guia, adicionar 2,5 µl da concentração de trabalho a 8 µM de cada iniciador a cada alvéolo destinado às amostras de ARN e às testemunhas positiva e/ou negativa (a concentração final do iniciador será de 1 µM em 20 µl da mistura para RT-PCR). Manter a placa em gelo.

⁽¹⁾ Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. and Jimenez-Clavero A. (2008). «Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus». *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 325-328.

- 2.1.2. Misturar 2 µl do ARN isolado (amostras em análise e testemunha positiva), ou 2 µl de água isenta de RNase nas testemunhas de reação negativa, com os iniciadores direto e inverso. Desnaturar esta mistura por aquecimento a 95 °C durante cinco minutos, seguido de arrefecimento rápido em gelo durante pelo menos cinco minutos.
- 2.1.3. Seguindo as instruções do fabricante, preparar um volume de *master mix* para RT-PCR em tempo real de uma só etapa, adequado ao número de amostras a testar. Adicionar 0,1 µl da concentração de trabalho a 50 µM da sonda a cada alvéolo contendo amostras de ARN (a concentração final da sonda será de 0,25 µM em cada alvéolo contendo amostras de ARN). Distribuir 13 µl da *master mix* para RT-PCR em tempo real de uma só etapa em cada alvéolo da placa de PCR contendo os iniciadores e o ARN desnaturados.
- 2.1.4. Colocar a placa num termociclador em tempo real programado para transcrição reversa e amplificação/deteção por fluorescência do ADNc. As condições de amplificação consistem numa primeira etapa de transcrição reversa a 48 °C durante 25 minutos, seguida de 10 minutos a 95 °C ("arranque a quente") e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 35 segundos a 55 °C e 30 segundos a 72 °C (ou 40 ciclos a 97 °C durante dois segundos e a 55 °C durante 30 segundos se forem utilizados reagentes e um termociclador que permitam reações rápidas). Os dados de fluorescência são obtidos no final da etapa a 55 °C.
- 2.1.5. Se se obtiverem curvas de amplificação atípicas, o ensaio não é considerado válido e tem de ser repetido.

As amostras são consideradas positivas se o valor Ct (número de ciclos necessários para que a fluorescência gerada numa reação ultrapasse o limiar de fluorescência) for inferior ou igual ao limiar Ct definido (35) em 40 ciclos de PCR (Ct ≤ 35).

As amostras são consideradas inconclusivas se o valor Ct for superior ao limiar Ct definido (35) em 40 ciclos de PCR (Ct ≥ 35).

As amostras são consideradas negativas se for obtida uma curva de amplificação horizontal que não cruza o limiar em 40 ciclos de PCR.

2.2. RT-PCR em tempo real específico de grupo, por Guthrie *et al.*, 2013 ⁽¹⁾

RT-PCR em tempo real utilizando sondas FRET (transferência de energia por ressonância de fluorescência) para detetar ácido nucleico de AHSV.

O ensaio RT-PCR do AHSV descrito foi concebido utilizando sequências de uma grande variedade de estirpes de campo do AHSV atualmente em circulação (Quan *et al.*, 2010 ⁽²⁾). Inclui também um ensaio de controlo sintético externo patenteado, a fim de verificar o correto funcionamento dos componentes do ensaio.

Estão disponíveis comercialmente *kits* para PCR em tempo real de uma etapa. Apresentam-se em seguida algumas etapas básicas, como descritas por Guthrie *et al.* (2013), que podem ser modificadas em função dos requisitos locais ou do caso específico, dos *kits* utilizados e do equipamento disponível.

Sequências de iniciadores e sondas para deteção de vírus da espécie AHSV:

— iniciador direto 5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'

— iniciador inverso 5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'

— sonda MGB-TaqMan 5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

- 2.2.1. Preparar soluções-mãe de mistura dos iniciadores e da sonda numa concentração 25×, a 5 µM para os iniciadores direto e reverso e 3 µM para a sonda. Configurar a placa de ensaio e introduzir a configuração no *software* do aparelho de PCR em tempo real. Utilizando a configuração como guia, adicionar aos alvéolos da placa 5 µl das amostras de ARN, incluindo as amostras em análise e as testemunhas positiva e negativa, seguindo a configuração.
- 2.2.2. Densaturar o ARN por aquecimento a 95 °C durante 5 minutos, seguido de arrefecimento rápido em gelo durante pelo menos 3 minutos.

⁽¹⁾ Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. «Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus». *Journal of Virological Methods*. 2013;189 (1):30-5.

⁽²⁾ Quan, M., Lourens, C.W., MacLachlan, N.J., Gardner, I.A., Guthrie, A.J., 2010. «Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus». *J. Virol. Methods* 167, 45-52.

- 2.2.3. Seguindo as instruções do fabricante, preparar um volume de *master mix* para RT-PCR em tempo real de uma só etapa adequado ao número de amostras a testar. Adicionar à *master mix* 1 µl da solução-mãe dos iniciadores e da sonda a 25× (ver ponto 2.2.1) de forma a obter uma concentração final em cada alvéolo de 200 nM para cada iniciador e 120 nM para a sonda. Distribuir 20 µl da *master mix* em cada alvéolo da placa de PCR contendo o ARN desnaturado.
- 2.2.4. Colocar a placa num termociclador em tempo real programado para transcrição reversa e amplificação/deteção por fluorescência do ADNc como sugerido pelo fabricante. As condições de amplificação consistem, por exemplo, numa primeira etapa de transcrição reversa a 48 °C durante 10 minutos, seguida de 10 minutos a 95 °C e de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 45 segundos a 60 °C.
- 2.2.5. As amostras são consideradas positivas se a fluorescência normalizada para o ensaio RT-PCR do AHSV ultrapassar um limiar de 0,1 em menos de 36 ciclos de PCR em todos os replicados de uma amostra.

As amostras são consideradas inconclusivas se a fluorescência normalizada para o ensaio RT-PCR do AHSV ultrapassar um limiar de 0,1 entre 36 e 40 ciclos em qualquer replicado de uma amostra.

As amostras são consideradas negativas se a fluorescência normalizada para o ensaio RT-PCR do AHSV não ultrapassar um limiar de 0,1 em 40 ciclos de PCR em todos os replicados de uma amostra e se a fluorescência normalizada do ensaio de controlo sintético externo patentado ultrapassar um limiar de 0,1 em 33 ciclos de PCR.»
