

DECISÃO DA COMISSÃO

de 15 de Dezembro de 2009

que altera o anexo D da Directiva 64/432/CEE do Conselho no que se refere aos testes para diagnóstico da leucose bovina enzoótica

[notificada com o número C(2009) 9951]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2009/976/UE)

A COMISSÃO EUROPEIA,

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

Tendo em conta a Directiva 64/432/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1964, relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais das espécies bovina e suína ⁽¹⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 16.º, segundo parágrafo,

Considerando o seguinte:

- (1) A Directiva 64/432/CEE é aplicável ao comércio de bovinos intra-União e o capítulo II do seu anexo D estabelece os testes para diagnóstico da leucose bovina enzoótica (LBE) a utilizar para o controlo e a erradicação daquela doença, para a vigilância e o acompanhamento, para a criação e a manutenção de um estatuto de efectivos oficialmente indenes de leucose bovina enzoótica e ainda para a certificação exigida para o comércio de bovinos intra-União.
- (2) O capítulo II do anexo D da Directiva 64/432/CEE determina que as provas para pesquisa da LBE devem efectuar-se quer por imunodifusão sobre placas de ágar com um antigénio padronizado em relação a um soro-padrão oficial CE (soro EI), quer por imunoabsorção enzimática (Elisa) padronizada em relação ao soro E4. Ambos os soros-padrão são fornecidos pelo National Veterinary Institute, da Universidade Técnica da Dinamarca.
- (3) Foi recentemente desenvolvido um novo soro-padrão para a LBE (soro E05) pelo laboratório de referência para a leucose bovina enzoótica da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) na Alemanha (Friedrich-Loeffler-Institute), em cooperação com os laboratórios de referência da OIE no Reino Unido (Veterinary Laboratories Agency) e na Polónia (National Veterinary Research Institute), após ter sido submetido a um teste interlaboratorial entre os referidos laboratórios. O soro E05 foi validado em relação aos soros EI e E4 através de diferentes provas de imunodifusão sobre placas de ágar e ensaios Elisa, tendo sido por isso incluído como soro-padrão

acreditado pela OIE no capítulo 2.4.11, secção B.2, do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, sexta edição, 2008. Este soro está disponível através do laboratório de referência para a leucose bovina enzoótica da OIE na Alemanha.

- (4) Além disso, o National Veterinary Institute, da Universidade Técnica da Dinamarca, informou a Comissão de que já não se encontra em condições de cumprir as suas obrigações em matéria de fornecimento de soros-padrão, tal como previsto no capítulo II do anexo D da Directiva 64/432/CEE.
- (5) As autoridades competentes alemãs e o Friedrich-Loeffler-Institute aceitaram tornar-se no fornecedor do soro E05 que, conseqüentemente, será o novo soro-padrão oficial da União Europeia (UE) para a LBE.
- (6) A Directiva 64/432/CEE deve, conseqüentemente, ser alterada em conformidade.
- (7) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

O capítulo II do anexo D da Directiva 64/432/CEE é substituído pelo texto que consta do anexo da presente decisão.

Artigo 2.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 15 de Dezembro de 2009.

Pela Comissão

Androulla VASSILIOU

Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO 121 de 29.7.1964, p. 1977/64.

ANEXO

O capítulo II do anexo D da Directiva 64/432/CEE passa a ter a seguinte redacção:

«CAPÍTULO II

PROVAS PARA PESQUISA DE LEUCOSE BOVINA ENZOÓTICA

A pesquisa de leucose bovina enzoótica efectua-se mediante a prova de imunodifusão em ágar nas condições descritas nas partes A e B, ou mediante a prova de imunoabsorção enzimática (Elisa) nas condições descritas na parte C. O método de imunodifusão só se aplica às provas individuais. No caso de os resultados das provas serem objecto de uma contestação devidamente fundamentada, efectuar-se-á uma prova de imunodifusão como controlo complementar.

As provas de imunodifusão e Elisa devem ser padronizados em relação ao soro E05, que é o soro-padrão oficial da UE, fornecido por:

Friedrich-Loeffler-Institut
Federal Research Institute for Animal Health
OIE Reference Laboratory for Enzootic Bovine Leukosis (EBL)
Südufer 10
17493 Greifswald — Insel Riems
Alemanha.

A. Provas de imunodifusão sobre placas de ágar para pesquisa de leucose bovina enzoótica

1. O antígeno a utilizar nesta prova deve conter a glicoproteína do vírus da leucose bovina. O antígeno deve ser padronizado em relação ao soro E05.
2. Os organismos oficiais e laboratórios nacionais de referência designados em conformidade com o disposto no artigo 6.ºA para a coordenação dos padrões e dos métodos de diagnóstico da leucose bovina enzoótica devem ser encarregados da calibração do antígeno-padrão de trabalho em relação ao soro E05.
3. Os antígenos-padrão utilizados no laboratório devem ser apresentados pelo menos uma vez por ano aos organismos oficiais ou laboratórios nacionais de referência designados em conformidade com o artigo 6.ºA, para aí serem testados por comparação com o soro E05. Independentemente desta padronização, o antígeno utilizado pode ser calibrado de acordo com o método descrito na parte B.
4. Na prova serão utilizados os reagentes seguintes:
 - a) Antígeno: o antígeno deve conter a glicoproteína específica do vírus da leucose bovina enzoótica padronizado por comparação com o soro E05;
 - b) O soro a testar;
 - c) Um soro de controlo positivo conhecido;
 - d) Ágar:
 - 0,8 % ágar,
 - 8,5 % NaCl,
 - tampão Tris 0,05 M, pH 7,2,
 - devem colocar-se 15 ml deste ágar numa placa de Petri de 85 mm de diâmetro, o que dá uma altura de 2,6 mm de ágar.
5. Preparar um dispositivo experimental de sete cavidades isentas de humidade por perfuração do ágar até ao fundo da placa; a rede assim obtida deverá ser constituída por uma cavidade central em torno da qual se ordenam seis cavidades periféricas dispostas em círculo.

Diâmetro da cavidade central: 4 mm;

Diâmetro das cavidades periféricas: 6 mm;

Distância entre a cavidade central e as cavidades periféricas: 3 mm.

6. Encher a cavidade central com o antígeno-padrão. As cavidades periféricas 1 e 4 – ver esquema no ponto 3 da parte B – são enchidas com o soro positivo conhecido e as cavidades 2, 3, 5 e 6 com os soros a testar. As cavidades devem ser enchidas até ao desaparecimento do menisco.
7. As quantidades obtidas são as seguintes:
 - antígeno: 32 microlitros,
 - soro de controlo: 73 microlitros,
 - soro a testar: 73 microlitros.
8. A incubação deve durar 72 horas à temperatura ambiente (20-27 °C) em atmosfera húmida e fechada.
9. A prova pode ser lida passadas 24 horas e passadas 48 horas, mas não se pode obter qualquer resultado final antes de passarem 72 horas:
 - a) Um soro a testar é positivo se formar uma curva de precipitação específica com o antígeno do vírus da leucose bovina e se essa curva coincidir com a do soro de controlo;
 - b) Um soro a testar é negativo se não formar uma curva de precipitação específica com o antígeno do vírus da leucose bovina e se não inflectir a curva do soro de controlo;
 - c) A reacção não pode ser considerada concludente se:
 - i) inflectir a curva do soro de controlo para a cavidade do antígeno do vírus da leucose bovina sem formar uma curva de precipitação visível com o antígeno, ou
 - ii) não for possível interpretá-la como negativa ou como positiva.

No caso de as reacções não serem concludentes, pode repetir-se a prova e utilizar soro concentrado.
10. Pode ser utilizada qualquer outra configuração ou distribuição das cavidades, desde que permita detectar como positiva uma diluição do soro E05 em soro negativo a 1/10.

B. Método de padronização do antígeno

1. Soluções e materiais necessários

- a) 40 ml de ágar a 1,6 % num tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 7,2, com 8,5 % de NaCl;
- b) 15 ml de um soro de leucose bovina que só tenha anticorpos em relação às glicoproteínas do vírus da leucose bovina, diluído a 1/10 num tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 7,2, com 8,5 % de NaCl;
- c) 15 ml de um soro de leucose bovina que só tenha anticorpos em relação às glicoproteínas do vírus da leucose bovina, diluído a 1/5 num tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 7,2, com 8,5 % de NaCl;
- d) Quatro placas de Petri de plástico, com 85 mm de diâmetro;
- e) Punção com 4 a 6 mm de diâmetro;
- f) Antígeno de referência;
- g) Antígeno a padronizar;
- h) Banho-maria (56 °C).

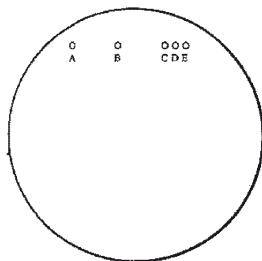
2. Modo de execução

Dissolver o ágar (1,6 %) no tampão Tris/HCl aquecendo com cuidado até 100 °C. Pôr no banho-maria a 56 °C durante cerca de 1 hora. Colocar também as diluições do soro de leucose bovina no banho-maria a 56 °C.

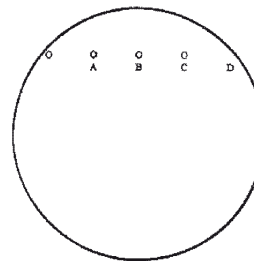
Misturar em seguida 15 ml de solução de agarose a 56 °C com os 15 ml de soro de leucose bovina (1:10), agitar rapidamente e deitar em duas placas de Petri, à razão de 15 ml por placa. Repetir as operações atrás descritas com o soro de leucose bovina diluído a 1/5.

Quando a agarose tiver endurecido, fazer as cavidades do seguinte modo:

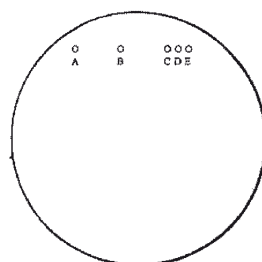
Placa de Petri n.º
Soro diluído a 1/10



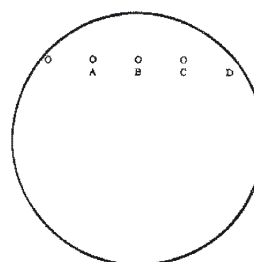
Placa de Petri n.º
Soro diluído a 1/10



Placa de Petri n.º
Soro diluído a 1/5



Placa de Petri n.º 4
Soro diluído a 1/5



3. Adição de antígeno

a) Placas de Petri n.ºs 1 e 3:

- i) cavidade A — antígeno de referência não diluído,
- ii) cavidade B — antígeno de referência diluído a 1/2,
- iii) cavidades C e E — antígeno de referência,
- iv) cavidade D — antígeno a testar, não diluído.

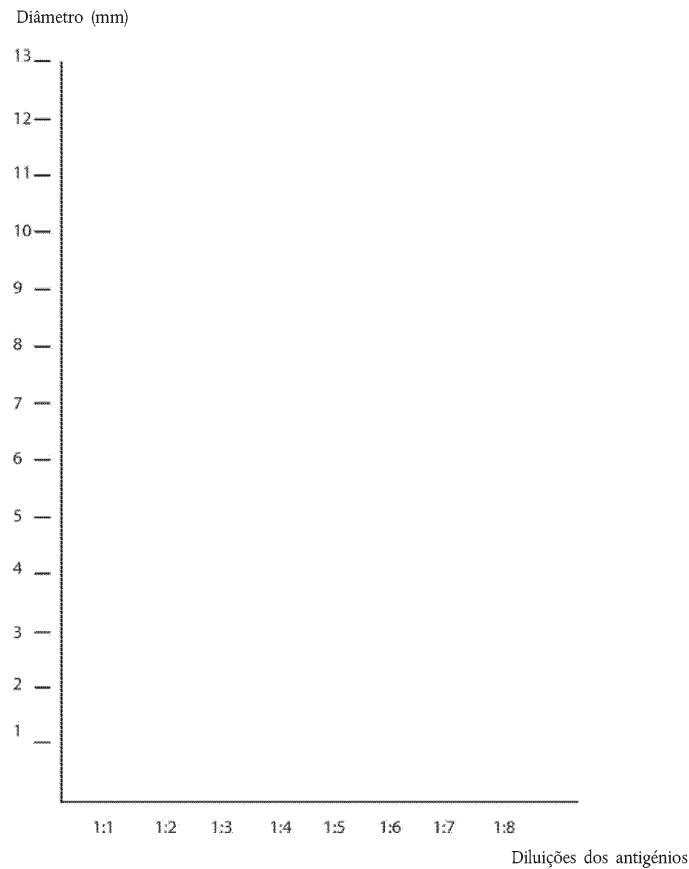
b) Placas de Petri n.ºs 2 e 4:

- i) cavidade A — antígeno a testar, não diluído,
- ii) cavidade B — antígeno a testar, diluído a 1/2,
- iii) cavidade C — antígeno a testar, diluído a 1/4,
- iv) cavidade D — antígeno a testar, diluído a 1/8.

4. Instruções complementares

- a) A prova deve ser efectuada com dois graus de diluição do soro (1/5 e 1/10) a fim de obter a precipitação óptima;
- b) Se o diâmetro de precipitação for muito pequeno para cada um dos dois graus de diluição, deve fazer-se uma diluição suplementar do soro;
- c) Se o diâmetro de precipitação for excessivo para ambos os graus de diluição e se o precipitado for ténue, deve-se escolher um grau de diluição mais fraco para o soro;
- d) A concentração final de ágar deve ser de 0,8 % e a dos soros de 5 % e de 10 %, respectivamente;

- e) Anotar os diâmetros medidos no gráfico seguinte. A diluição de trabalho é aquela em que se registar o mesmo diâmetro para o antígeno a testar e para o antígeno de referência.



C. Prova de imunoabsorção enzimática (Elisa) para a pesquisa de leucose bovina enzoótica

1. São os seguintes os materiais e reagentes a utilizar:

- a) Microplacas para fase sólida, tinas ou qualquer outra fase sólida;
- b) Antígeno fixado à fase sólida com ou sem a ajuda de anticorpos de captação policlonais ou monoclonais. Se o antígeno for directamente aplicado à fase sólida, todas as amostras que apresentem reacções positivas devem ser testadas de novo em relação ao antígeno de controlo. Este deve ser idêntico ao antígeno testado, mas sem os antígenos do vírus da leucose bovina. Se os anticorpos de captação forem aplicados à fase sólida, os anticorpos devem reagir apenas aos antígenos do vírus da leucose bovina;
- c) Fluido biológico a examinar;
- d) Controlos positivos e negativos correspondentes;
- e) Conjugado;
- f) Substrato adaptado à enzima utilizada;
- g) Solução de paragem, se necessário;
- h) Soluções para a diluição das amostras de ensaio, para a preparação dos reagentes e para a lavagem;
- i) Sistema de leitura adequado ao substrato utilizado.

2. Normalização e sensibilidade do teste

A sensibilidade da prova Elisa utilizada deve ser de um nível tal que o soro E05 seja positivo quando diluído 10 vezes (amostras de soro) ou 250 vezes (amostras de leite) mais do que uma diluição obtida a partir de amostras agregadas. Em provas em que as amostras (soro e leite) sejam examinadas individualmente, o soro E05, diluído à razão de 1 para 10 (para o soro negativo) ou à razão de 1 para 250 (para o leite negativo), deve dar uma reacção positiva quando for examinado na mesma diluição que é utilizada para os ensaios individuais. Os organismos públicos indicados no ponto 2 da parte A são responsáveis pelo controlo da qualidade do método Elisa, nomeadamente para determinar, para cada lote de produção, o número de amostras a agregar, com base na contagem obtida com o soro E05.

3. Condições de utilização do teste Elisa para a pesquisa de leucose bovina enzoótica

- a) O método Elisa pode ser utilizado em amostras de leite ou de soro.
 - b) Se os testes Elisa forem utilizados para efeitos de certificação, em conformidade com o disposto no n.º 2, alínea c), do artigo 6.º, ou para a determinação e manutenção do estatuto dos efectivos, em conformidade com o disposto no capítulo I do anexo D, a agregação de amostras de soro ou de leite deve efectuar-se de molde a que as amostras colhidas para exame possam ser indubitavelmente relacionadas com os animais incluídos no agregado. Os testes de confirmação devem ser efectuados em amostras colhidas de animais específicos.
 - c) Sempre que o teste Elisa for utilizado numa amostra de leite a granel, esta amostra deve ter sido retirada de uma colheita de leite proveniente de um efectivo com pelo menos 30 % das vacas leiteiras em lactação. Os testes de confirmação devem ser efectuados em amostras de soro ou leite colhidas de animais específicos.»
-