

DECISIÓN DE LA COMISIÓN**de 21 de febrero de 2002****por la que se modifica el anexo D de la Directiva 90/426/CEE del Consejo con respecto a las pruebas de diagnóstico de la peste equina***[notificada con el número C(2002) 556]***(Texto pertinente a efectos del EEE)**

(2002/160/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 90/426/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, relativa a las condiciones de policía sanitaria que regulan los movimientos de équidos y las importaciones de équidos procedentes de países terceros ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye la Decisión 2001/298/CE ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 23,

Considerando lo siguiente:

- (1) En el anexo D de la Directiva 90/426/CEE se describe la prueba de fijación del complemento que debe llevarse a cabo para diagnosticar la peste equina.
- (2) En noviembre de 2000 el Laboratorio de referencia de la Comunidad Europea de Algete (España), organizó la reunión anual de los laboratorios nacionales de referencia para la peste equina de los Estados miembros de la Unión Europea. Durante dicha reunión se demostró científicamente que la prueba de fijación del complemento recogida actualmente en el anexo D de la Directiva 90/426/CEE tiene serias limitaciones, especialmente porque solamente es adecuada para detectar anticuerpos después de una infección o una vacunación recientes. Además, en la práctica, en casi todos los laboratorios de la Comunidad y también de los principales países exportadores estas pruebas se han sustituido por modernas pruebas ELISA.
- (3) En el Manual de normas para pruebas de diagnóstico y vacunas (Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines) ⁽³⁾ de la Oficina Internacional de Epizootias

(Office International des Epizooties, OIE) se detallan las pruebas de laboratorio internacionalmente aceptadas para detectar anticuerpos contra el virus de la peste equina; sin embargo, la edición actual solamente menciona una de las pruebas ELISA disponibles.

- (4) Por tanto, procede modificar el anexo D de la Directiva 90/426/CEE para reflejar la evolución técnica y hacerse eco de las normas internacionalmente aceptadas.
- (5) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

El anexo D de la Directiva 90/426/CEE del Consejo quedará sustituido por el anexo de la presente Decisión.

Artículo 2

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 21 de febrero de 2002.

Por la Comisión

David BYRNE

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 224 de 18.8.1990, p. 42.

⁽²⁾ DO L 102 de 12.4.2001, p. 63.

⁽³⁾ Capítulo 2.1.11, 4ª edición (2000).

ANEXO

«ANEXO D

PESTE EQUINA

DIAGNÓSTICO

Los reactivos para las pruebas de inmunoabsorción enzimática (ELISA) descritos a continuación pueden obtenerse del Laboratorio de referencia de la Comunidad Europea o de los laboratorios de referencia de la OIE para la peste equina.

1. TÉCNICA ELISA DE COMPETICIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE EQUINA (VPE) (PRUEBA RECOMENDADA)

La técnica ELISA de competición se utiliza para detectar anticuerpos específicos contra el virus de la peste equina presentes en sueros de cualquier especie de équidos. El antisuero de cobaya contra el virus de la peste equina, policlonal y de amplio espectro (en lo sucesivo, denominado "antisuero de cobaya"), tiene especificidad de serogrupo y puede detectar todos los serotipos conocidos del virus de la peste equina.

El principio de la prueba es la interrupción, mediante una muestra de suero problema, de la reacción entre el antígeno del virus de la peste equina y un antisuero de cobaya. Los anticuerpos contra el virus de la peste equina contenidos en la muestra de suero problema competirán con los del antisuero de cobaya, de lo que resultará una reducción del color esperado (tras la adición de anticuerpos anti-cobaya marcados con la enzima y de sustrato). Los sueros pueden analizarse a una sola dilución al 1/5 (método para sueros a una sola dilución) o a una serie de diluciones para determinar el título (método de titulación del suero). Los valores de inhibición superiores al 50 % se consideran positivos.

El protocolo de la prueba descrito a continuación se utiliza en el Laboratorio regional de referencia para la peste equina de Pirbright (Reino Unido).

1.1. Procedimiento de la prueba**1.1.1. Preparación de las placas**

1.1.1.1. Recubrir las placas ELISA con antígeno del virus de la peste equina extraído de cultivos celulares infectados y diluido en una solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar las placas ELISA durante toda la noche a 4 °C.

1.1.1.2. Lavar las placas 3 veces llenando y vaciando los pocillos con solución salina fosfatada (PBS), pH 7,2-7,4 y secar en papel absorbente.

1.1.2. Pocillos control

1.1.2.1. Poner en la primera columna el suero control positivo haciendo diluciones dobles, desde la 1/5 hasta la 1/640, en solución salina de bloqueo (PBS que contenga un 0,05 % (v/v) de Tween 20, un 5 % (p/v) de leche desnatada en polvo (Cadbury's Marvel™) y un 1 % (v/v) de suero de bovino adulto, hasta llegar a un volumen final de 50 µl por pocillo.

1.1.2.2. Añadir 50 µl de suero control negativo diluido al 1/5 (10 µl de suero + 40 µl de solución de bloqueo) en los pocillos A y B de la columna 2.

1.1.2.3. Poner 100 µl/pocillo de solución salina de bloqueo en los pocillos C y D de la columna 2 (blanco).

1.1.2.4. Añadir 50 µl de solución salina de bloqueo en los pocillos E, F, G y H de la columna 2 (control cobaya).

1.1.3. Método para sueros a una sola dilución (1/5)

1.1.3.1. Hacer una dilución al 1/5 de cada suero problema en solución salina de bloqueo; dispensar por duplicado en los pocillos de la columna 3 a la 12 (10 µl del suero + 40 µl de solución salina de bloqueo).

o bien

1.1.4. Método de titulación del suero

1.1.4.1. Preparar una serie de diluciones dobles de cada muestra problema (desde 1/5 hasta 1/640) en solución salina de bloqueo, poner en ocho pocillos de la columna 3 a la 12.

después

1.1.5. Añadir 50 µl de antisuero de cobaya, previamente diluido en solución salina de bloqueo, a todos los pocillos de la placa, excepto a los del blanco (tras esta operación, todos los pocillos contienen un volumen final de 100 µl).

1.1.5.1. Incubar durante una hora a 37 °C en un agitador orbital.

1.1.5.2. Lavar las placas tres veces y secar en papel como antes.

- 1.1.5.3. Añadir a cada pocillo 50 µl de suero anticobaya obtenido en conejo, conjugado con peroxidara de rábano y previamente diluido en solución salina de bloqueo.
- 1.1.5.4. Incubar durante una hora a 37 °C en un agitador orbital.
- 1.1.5.5. Lavar las placas tres veces y secar en papel como antes.

1.1.6. *Cromógeno*

Preparar la solución de cromógeno OD (OD = orto-fenildiamina) según las instrucciones del fabricante (0,4 mg/ml en agua destilada estéril) inmediatamente antes de su utilización. Añadir sustrato (peróxido de hidrógeno = H₂O₂) para llegar a una concentración final de 0,05 % (v/v) (1/2000 de una solución al 30 % de H₂O₂). Añadir 50 µl de la solución de OFD a cada pocillo y dejar las placas durante 10 minutos en la mesa y a temperatura ambiente. Detener la reacción añadiendo a cada pocillo 50 µl de ácido sulfúrico 1 M (H₂ SO₄).

1.1.7. *Lectura*

Leer con espectrofotómetro a 492 nm de longitud de onda.

1.2. **Expresión de los resultados**

- 1.2.1. Haciendo uso de un programa informático, imprimir los valores de densidad óptica (DO) y del porcentaje de inhibición (PI) de los sueros problema y de los sueros control basándose en el valor medio registrado en los cuatro pocillos de control de cobaya. Los datos expresados como valores de DO y de PI se emplean para determinar si la prueba funciona dentro de límites aceptables. El límite del valor superior y el límite del valor inferior del control de cobaya tiene que estar entre valores de DO de 1,4 y 0,4 respectivamente. El título del control positivo, basado en el 50 % del porcentaje de inhibición debería ser de 1/240 (dentro de una gama que varía desde 1/120 a 1/480). Deberá rechazarse toda placa que no cumpla los criterios citados. No obstante, si el título del suero del control positivo es superior a 1/480 y las muestras problema resultan negativas, se aceptarán como negativas.

Los pocillos duplicados del suero control negativo y los pocillos duplicados del blanco deberán registrar unos valores de PI comprendidos entre + 25 % y - 25 %, y entre + 95 % y + 105 %, respectivamente. Si los valores no están situados entre estos límites, la placa no queda invalidada, pero ello indica que existe un color de fondo.

- 1.2.2. El umbral de diagnóstico (punto de corte o "cut off") de los sueros problema es el 50 % (PI 50 %). Las muestras que registren valores de PI superiores al 50 % son positivas. Las muestras que registren valores de PI inferiores al 50 % son negativas.

Se considera que son dudosas las muestras que registren un valor de PI por encima y otro por debajo del punto de corte en cada uno de los pocillos duplicados. Dichas muestras pueden volver a analizarse otra vez en la prueba a una sola dilución y por titulación. Las muestras positivas pueden también titularse para conocer el grado de positividad.

Presentación de los resultados de la prueba a una sola dilución (1/5)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C +		Sueros problema									
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	Blanco										
D	1:40	Blanco										
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 negativo
 C + = control positivo
 CC = control de cobaya

Presentación de los resultados de la titulación del suero

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C +		Sueros problema									
A	1:5	C -	1:5									1:5
B	1:10	C -	1:10									1:10
C	1:20	Blanco	1:20									1:20
D	1:40	Blanco	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 negativo

C + = control positivo

CC = control de cobaya

2. TÉCNICA ELISA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE EQUINA (VPE) (PRUEBA RECOMENDADA)

La prueba que se describe a continuación se ajusta a la descripción recogida en el capítulo 2.1.11 de la cuarta edición (2000) del Manual de normas para pruebas de diagnóstico y vacunas de la OIE.

Se utiliza la proteína VP7 recombinante como antígeno para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la peste equina con un alto índice de sensibilidad y especificidad. Tiene además las ventajas de ser estable y no infecciosa.

2.1. Procedimiento de la prueba

2.1.1. Fase sólida

2.1.1.1. Recubrir las placas ELISA con proteína VP7 recombinante de la cepa 4 del virus (VPE-4), diluida en solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar las placas toda la noche a 4 °C.

2.1.1.2. Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solución de lavado). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

2.1.1.3. Bloquear las placas poniendo en cada pocillo 200 µl de solución salina fosfatada (PBS) + 5 % (p/v) de leche desnatada (leche desnatada en polvo de Nestlé™), y dejar una hora a 37 °C.

2.1.1.4. Eliminar la solución de bloqueo y golpear suavemente las placas contra un material absorbente.

2.1.2. Muestras problema

2.1.2.1. Diluir los sueros problema y los sueros control positivo y negativo al 1/25 en PBS + 5 % (p/v) de leche desnatada + 0,05 % (v/v) de Tween 20, hasta alcanzar un volumen de 100 µl por pocillo. Incubar una hora a 37 °C.

Para la titulación, hacer una serie de diluciones dobles desde 1/25 (100 µl por pocillo), un suero por columna de la placa, y hacer la misma operación con los controles positivos y negativos. Incubar durante una hora a 37 °C.

2.1.2.2. Lavar las placas siguiendo las indicaciones del punto 2.1.1.2.

2.1.3. Conjugado

2.1.3.1. Poner en cada pocillo 100 µl de gammaglobulina anti-caballo conjugada con peroxidasa de rábano diluida en PBS + 5 % de leche + 0,05 % de Tween 20, pH 7,2. Incubar durante una hora a 37 °C.

2.1.3.2. Lavar las placas siguiendo las indicaciones del punto 2.1.1.2.

2.1.4. Cromógeno/sustrato

- 2.1.4.1. Añadir a cada pocillo 200 µl de solución de cromógeno/sustrato [10 ml de solución 80,6 mM de DMAB (dimetil-aminobenzaldehído) + 10 ml de solución 1,56 mM de MBTH (clorhidrato 3-metil-2-benzotiazolina-hidrazona) + 5 µl H₂O₂].

La formación de color se detiene añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 3N tras unos cinco o diez minutos aproximadamente (antes de que el control negativo comience a tomar color).

Pueden utilizarse también otros cromógenos como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]), TMB (tetrametil-bencidina) u OPD (orto-fenildiamina).

- 2.1.4.2. Leer las placas a 600 nm (o 620 nm).

2.2. Interpretación de los resultados

- 2.2.1. Calcular el valor del punto de corte añadiendo 0,6 al valor del control negativo (0,6 es la desviación típica derivada de un grupo de 30 sueros negativos).
- 2.2.2. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia inferiores al punto de corte se consideran negativas.
- 2.2.3. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia superiores al punto de corte + 0,15 se consideran positivas.
- 2.2.4. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia intermedios son dudosas, por lo que debe emplearse otra técnica para confirmar el resultado.

3. TÉCNICA ELISA DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE EQUINA (VPE) (PRUEBA RECOMENDADA)

La técnica ELISA de bloqueo tiene como finalidad detectar anticuerpos específicos contra el virus de la peste equina en sueros procedentes de cualquier especie susceptible. La VP7 es la principal proteína antigénica del virus de la peste equina y es constante en los nueve serotipos. Teniendo en cuenta que el anticuerpo monoclonal también va dirigido contra la VP7, el ensayo presenta un alto nivel de sensibilidad y especificidad. Además, el antígeno VP7 recombinante es completamente inocuo, por lo que garantiza un alto nivel de seguridad.

El principio de la prueba es la interrupción de la reacción entre la proteína VP7 recombinante, como antígeno adsorbido a la placa ELISA, y el anticuerpo monoclonal conjugado específico de la VP7. Los anticuerpos del suero problema bloquean la reacción entre el antígeno y el anticuerpo monoclonal, lo que se materializa en una reducción del color.

La prueba que se describe a continuación es la que utiliza el Laboratorio de referencia de la Comunidad Europea para la peste equina de Algete (España).

3.1. Procedimiento de la prueba

3.1.1. Placas ELISA

- 3.1.1.1. Recubrir las placas con proteína VP7 recombinante de VPE-4 diluida en solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar toda la noche a 4 °C.
- 3.1.1.2. Lavar las placas cinco veces con solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) que contenga 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST).
- 3.1.1.3. Estabilizar la placa mediante tratamiento con una solución estabilizadora (para prolongar el tiempo de almacenamiento a 4 °C sin pérdida de actividad). Secar sobre material absorbente.

3.1.2. Muestras problema y controles

- 3.1.2.1. Para la detección: Diluir los sueros problema y los controles al 1/10 directamente en la placa con PBST hasta alcanzar un volumen final de 100 µl por pocillo. Incubar una hora a 37 °C.
- 3.1.2.2. Para la titulación: Preparar una serie de diluciones dobles de los sueros problema y de los controles positivos (100 µl por pocillo) desde 1/10 hasta 1/1 280, en ocho pocillos. El control negativo se analiza a la dilución 1/10.

3.1.3. *Conjugado*

Añadir previamente diluido 50 µl por pocillo de anticuerpo monoclonal específico de VP7 conjugado con peroxidasa de rábano a cada uno de los pocillos y agitar suavemente para asegurar la homogeneidad. Incubar treinta minutos a 37 °C.

3.1.4. Lavar las placas cinco veces con PBST y secar como se indica arriba.

3.1.5. *Cromógeno/sustrato*

Añadir a cada pocillo 100 µl de solución de cromógeno/sustrato [1 ml de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) 5 mg/ml + 9 ml de solución amortiguadora de sustrato (0,1 M de solución amortiguadora fosfato/citrato de pH 4 que contenga 0,03 % H₂O₂) e incubar durante diez minutos a temperatura ambiente. Detener la formación de color añadiendo 100 µl/pocillo de SDS (dodecil-sulfato sódico) al 2 % (p/v).

3.1.6. *Lectura*

Leer los resultados a 405 nm en un lector ELISA.

3.2. Interpretación de los resultados

3.2.1. *Validación del ensayo*

La prueba es válida cuando la densidad óptica (DO) del control negativo (CN) es superior a 1,0 y la densidad óptica del control positivo (CP) es inferior a 0,2.

3.2.2. *Cálculo del punto de corte*

Valor del punto de corte positivo = $CN - ((CN - CP) \times 0,3)$

Valor del punto de corte negativo = $CN - ((CN - CP) \times 0,2)$

CN es la densidad óptica del control negativo y CP es la densidad óptica del control positivo.

3.2.3. *Interpretación de los resultados*

Las muestras con una densidad óptica inferior al valor del punto de corte positivo deben considerarse positivas para anticuerpos de VPE.

Las muestras con una densidad óptica superior al valor del punto de corte negativo deben considerarse negativas para anticuerpos de VPE.

Las muestras con una densidad óptica situada entre estos dos valores deben considerarse dudosas, por lo que se deben volver a tomar muestras de los animales de dos a tres semanas después.»
