II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 25 de febrero de 1991

por la que se establecen los protocolos de normalización de materiales y de procedimientos para las pruebas veterinarias, así como las condiciones de aprobación de los mercados para la importación desde terceros países de animales domésticos de las especies bovina y porcina

(91/189/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 72/462/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1972, relativa a problemas sanitarios y de policía sanitaria en las importaciones de animales de las especies bovina y porcina y de carnes frescas procedentes de terceros países [1], cuya última modificación la constituye la Directiva 91/69/CEE [2], y, en particular, el apartado 1 de su artículo 8,

Considerando que la Directiva 72/462/CEE autoriza la importación de animales domésticos de las especies bovina y porcina de los terceros países que figuran en la lista aneja a la Decisión 79/542/CEE del Consejo [3], cuya última modificación la constituye la Decisión 90/485/CEE [4];

Considerando que es preciso establecer normas veterinarias aplicables a las importaciones de animales vivos desde un tercer país, teniendo en cuenta las normas veterinarias de dicho país;

Considerando que, a pesar de que las normas veterinarias pueden variar de un país a otro, los protocolos para las pruebas veterinarias y las condiciones para la aprobación en terceros países de mercados de ganado destinado a ser exportado a la Comunidad son aplicables en todos los terceros países;

Considerando que, con el fin de simplificar las decisiones referentes a las normas veterinarias aplicables a la importación de animales domésticos de las especies bovina y porcina de terceros países, resulta útil remitirse a una única decisión que contenga todos los protocolos para las pruebas veterinarias y las condiciones para la aprobación de mercados;

Considerando que una decisión por la que se establezcan los protocolos para las pruebas veterinarias y las condiciones para la aprobación de mercados en terceros países sólo se aplicará a aquellos terceros países respecto a cuya situación de sanidad animal se haya adoptado un decisión de forma específica;

Considerando que las medidas previstas en la presente decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

1. La presente Decisión esablece los protocolos para las pruebas veterinarias y las condiciones para la aprobación

(1) DO nº L 302 de 31. 12. 1972, p. 28.
(2) DO nº L 46 de 19. 2. 1991, p. 37.
(3) DO nº L 146 de 14. 6. 1979, p. 15.
(4) DO nº L 276 de 27. 9. 1990, p. 46.

en terceros países de mercados de ganado destinado a ser exportado a la Comunidad en relación con la importación de animales domésticos vivos de las especies bovina y porcina de los terceros países enumerados en la lista aneja a la Decisión 79/542/CEE.

2. Los requisitos establecidos en los Anexos I y II de la presente Decisión sólo se aplicarán a los terceros países con respecto a los cuales se hayan adoptado decisiones que establezcan las normas veterinarias en cada caso, según lo establecido en el artículo 8 de la Directiva 72/462/CEE.

Artículo 2

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 25 de febrero de 1991.

Por la Comisión

Ray MAC SHARRY

Miembro de la Comisión

ANEXO I

PROTOCOLOS DE NORMALIZACIÓN DE LOS MATERIALES Y DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PRUEBA

CAPÍTULO I

Ganado bovino

1. *Tuberculosis*

La tuberculinización intradérmica simple con tuberculina bovina deberá efectuarse de conformidad con el Anexo B de la Directiva 64/432/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina [1].

2. *Brucelosis*

La seroaglutinación y la prueba de fijación del complemento deberán efectuarse de conformidad con las partes A y B del Anexo C de la Directiva 64/432/CEE del Consejo.

3. *Leucosis enzoótica bovina*

La prueba de inmunodifusión en gel de agar deberá efectuarse de conformidad con el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE.

4. *Fiebre catarral*

A. La prueba ELISA competitiva o de bloqueo deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

La prueba ELISA competitiva utilizando anticuerpo monoclonal 3-17-A3 permite detectar los anticuerpos de todos los serotipos conocidos del virus de la fiebre catarral (VFC).

La prueba se basa en la interrupción de la reacción entre el antígeno del VFC y un anticuerpo monoclonal específico de grupo (3-17-A3) mediante la adición de diluciones de sueros problema. Los anticuerpos del VFC que se encuentran en el suero problema bloquean la reactividad del anticuerpo monoclonal (AM) y producen una reducción de la formación de color esperada al añadir el sustrato enzimático.

Material y reactivos

1. Placas de microtitulación de fondo plano.
2. Antígeno: prepárese como se indica a continuación.
3. Tampón de bloqueo: 5 % (p/v) de leche en polvo desecada «Marvel», 0,1 % (v/v) de Tween-20 (en forma de jarabe de monolaurato de polioxietilensorbitol) en STF (solución tampón de fosfatos).
4. Anticuerpo monoclonal: 3-17-A3 (en forma de sobrenadante de cultivo tisular de hibridomas conservado a – 20 °C o liofilizado, diluido antes del uso al 1/50 con tampón de bloqueo y dirigido contra el polipéptido p_7 específico de grupo.
5. Conjugado: anticuerpo de conejo antiglobulina de ratón (previamente sometido a adsorción y elución) conjugado con peroxidasa de rábano picante y conservado al abrigo de la luz a 4 °C.
6. Sustrato y cromógeno: 0,2 g de orto-fenilendiamina (OFD) disuelta en un tampón de 2,553 g de ácido cítrico y 4,574 g de ortofosfato ácido disódico enrasado hasta 500 ml con agua destilada, que se dividirá en alícuotas de 25 ml y se conservará a – 20° C y al abrigo de la luz; inmediatamente antes del uso se añadirán 12 µl/25 ml de peróxido de hidrógeno (30 % p/v).

   Manejar la OFD con cuidado — usar guantes de goma — posible mutágeno.
7. Acido sulfúrico 1 molar: añadir 26,6 ml de ácido a 473,4 ml de agua destilada.

   Atención: Añadir siempre el ácido al agua, nunca el agua al ácido.

---

[1] DO nº 121 de 29. 7. 1964, p. 1977/64.

8. Agitador orbital.

9. Lector de placas ELISA (el ensayo puede leerse visualmente).

Formato de la prueba

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Ensayo en blanco			Antígeno + conjugado						1
Control del AM			Antígeno + AM + conjugado						2
Control positivo	1/2	1/4	Antígeno + suero positivo + AM + conjugado 1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3
	1/2	1/4	Sueros problema 1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Sueros problema									7
									8
									9
									10
									11
									12

Protocolo de la prueba

Ensayo en blanco

La hilera 1 de A a H corresponde al ensayo en blanco, formado por antígeno del VFC y conjugado. Puede utilizarse para ajustar a cero el lector ELISA.

Control del AM

La hilera 2 de A a H corresponde al control del anticuerpo monoclonal, formado por antígeno del VFC, anticuerpo monoclonal y conjugado. Es un control negativo. La media de las lecturas de densidad óptica de esta hilera de control representa el porcentaje nulo de inhibición.

Control positivo

La hilera 3 de A a H corresponde al control positivo, formado por antígeno del VFC, diluciones de antisuero positivo del VFC, AM y conjugado. Se emplea como indicador del buen funcionamiento del ensayo, de modo que los niveles de inhibición obtenidos deben ser similares a los de los otros ensayos.

Sueros problema

El formato de prueba que figura con anterioridad permite analizar 18 sueros con unos índices de dilución de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. De este modo puede conocerse de forma aproximada el título del anticuerpo en los sueros problema. La escala de dilución puede ampliarse aún más para obtener los títulos del punto final de la dilución del suero. En investigaciones serológicas a gran escala pueden analizarse los sueros empleando una sola dilución (1/4) o dos diluciones (1/2 y 1/4), lo que permite realizar una detección rápida.

Procedimiento

1. Diluir el antígeno del VFC en STF hasta una concentración titulada previamente, tratar brevemente con ultrasonidos para dispersar el virus agregado (si no se dispone de baño de ultrasonidos, pipetear enérgicamente) y añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa ELISA. Golpear los lados de la placa para dispersar el antígeno.

2. Incubar a 37 °C durante 60 minutos en un agitador orbital. Enjuagar las placas tres veces, llenando los pocillos de STF no estéril, y secándolos a continuación con papel secante.

3. Añadir a cada pocillo 50 µl de tampón de bloqueo. Agregar sueros problema y suero positivo a los pocillos adecuados y diluir a lo largo de la placa con una pipeta de varias vías. No deberán añadirse sueros al ensayo en blanco ni al control del AM.

4. Inmediatamente después de la incorporación de los sueros problema, diluir el AM en tampón de bloqueo (hasta una dilución titulada previamente) y añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa, excepto los del ensayo en blanco.

5. Incubar a 37 °C durante 60 minutos en un agitador orbital. Enjuagar tres veces con STF y secar con papel secante.

6. Diluir al 1/5000 conjugado de anticuerpo de conejo antiglobulina de ratón en tampón de bloqueo y añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa.

7. Incubar a 37 °C durante 60 minutos en un agitador orbital. Enjuagar tres veces con STF y secar con papel secante.

8. Descongelar la OFD e, inmediatamente antes del uso, añadir 12 µl de peróxido de hidrógeno al 30 % a cada alícuota de 25 ml. Añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa. Tras 10 minutos aproximadamente de formación de color, interrumpir la reacción con ácido sulfúrico 1 M (50 µl por pocillo). La formación de color deberá producirse en los pocillos de control del AM y en los que contentan sueros *sin* anticuerpos del VFC.

9. Examinar y registrar las placas visualmente o mediante un lector espectrofotométrico.

Análisis de los resultados:

Calcular media de las lecturas de la densidad óptica (DO) de los controles del AM. Este resultado representará una inhibición del 0 %. Les lecturas de la densidad óptica de los sueros problema se expresarán como porcentajes de inhibición, utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 \frac{\text{DO en presencia del suero problema}}{\text{DO en ausencia del suero problema}} \times 100$$

Se considerarán positivos los porcentajes de inhibición superiores al 40 % en sueros diluidos al 1/4. Es posible efectuar una lectura visual, ya que la inhibición del 40 % es el valor mínimo que se puede apreciar fácilmente sin instrumental.

Preparación del antígeno del virus de la fiebre catarral (VFC) para la prueba ELISA

1. Lavar 10 frascos de Roux de células confluentes BHK-21 tres veces con medio de Eagle exento de suero e inocular virus de la fiebre catarral del serotipo 1 en medio de Eagle exento de suero.

2. Incubar a 37 °C y comprobar diariamente si se produce el efecto citopático (ECP).

3. Cuando dicho ECP se ponga de manifiesto en el 80-90 % de la capa celular de cada frasco de Roux, recoger el virus desprendiendo por agitación las células que hayan quedado adheridas al cristal.

4. Centrifugar a 2 000-3 000 rpm para que sedimenten las células.

5. Desechar el sobrenadante y efectuar una nueva suspensión celular en 30 ml aproximadamente de STF que contenga un 1 % de «Sarkosyl» y 2 ml de floruro de fenolmetilsulfonilo (tampón de lisis). Es posible que se produzca la gelificación de las células, en cuyo caso prodrá añadirse más tampón de lisis para reducir el efecto.

   Atención: el floruro de fenilmetilsulfonilo es nocivo — manejar con mucho cuidado.

6. Disgregar las células aplicando una sonda ultrasónica de 30 micrones de amplitud durante 60 segundos.

7. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos.

8. Almacenar el sobrenadante a +4 °C y efectuar una nueva suspensión del sedimento celular restante en 10-20 ml de tampón de lisis.

9. Someter a ultrasonidos y clarificar tres veces, almacenando el sobrenadante en cada fase.

10. Reunir los sobrenadantes y centrifugar durante 120 minutos a 24 000 rpm y a una temperatura de +4 °C sobre una almohadilla de 5 ml de sacarosa al 40 % (p/v en STF), utilizando tubos de centrifugado Beckmann de 30 ml y un rotor SW 28.

11. Desechar el sobrenadante, escurrir bien los tubos y efectuar una nueva suspensión del sedimento en STF mediante un baño de ultrasonidos. Almacenar el antígeno en partes alícuotas a −70 °C.

Titulación del antígeno ELISA del VFC.

El antígeno de la fiebre catarral para la prueba ELISA se titula mediante el método ELISA indirecto. Se titulan las diluciones a 1/2 del antígeno ante una dilución constante (1/50) del anticuerpo monoclonal 3-17-A3. El procedimiento es el siguiente:

1. Diluir el antígeno del VFC en STF a lo largo de la placa de microtitulación en una serie de diluciones a 1/2 (50 µl por pocillo) empleando una pipeta de varias vías.

2. Incubar durante 1 hora a 37 °C en un agitador orbital.

3. Enjuagar las placas tres veces con STF.

4. Añadir a cada pocillo de la placa de microtitulación 50 µl de anticuerpo monoclonal 3-17-A3 (dilución a 1/50).

5. Incubar durante 1 hora a 37 °C en un agitador orbital.

6. Enjuagar las placas tres veces con STF.

7. Añadir a cada pocillo de la placa de microtitulación 50 µl de anticuerpo de conejo antiglobulina de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante, diluido a una concentración óptima previamente titulada.

8. Incubar durante 1 hora a 37 °C en un agitador orbital.

9. Añadir el sustrato y el cromógeno como se ha descrito anteriormente. Transcurridos 10 minutos, interrumpir la reacción añadiendo ácido sulfúrico 1 M (50 µl/pocillo).

En el método competitivo el anticuerpo monoclonal debe hallarse en exceso, por lo tanto se utilizará una dilución de antígeno comprendida dentro de la curva de titulación (no en la región plana) que dé aproximadamente 0,8 DO después de 10 minutos.

B. La prueba de inmunodifusión en gel de agar deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Antígeno

El antígeno precipitante deberá prepararse en un cultivo celular que favorezca la multiplicación rápida de una cepa de referencia del virus de la fiebre catarral. Se recomienda la utilización de células BHK o Vero. Al finalizar el crecimiento del virus, el antígeno se encontrará en el líquido sobrenadante, pero para ser activo deberá tener una concentración de 50 a 100 veces, lo que se podrá obtener aplicando un procedimiento normalizado de concentración de las proteínas. El virus existente en el antígeno podrá inactivarse con la adición de 0,3 % (v/v) de betapropiolactona.

Suero de control positivo conocido

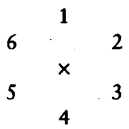
Con el suero y el antígeno de referencia internacionales, preparar un suero patrón nacional, normalizado con relación al suero de referencia internacional para obtener una proporción óptima, liofilizarlo y emplearlo como suero de control positivo conocido en cada prueba.

Suero problema

Procedimiento

Preparar una solución de agarosa al 1 % en un tampón de borato o de barbitol sódico, con un pH de 8,5 a 9,0, y verter en una placa Petri hasta una altura mínima de 3 mm.

Perforar en el agar siete pocillos libres de humedad de 5 mm de diámetro cada uno, dispuestos del siguiente modo: un pocillo central, rodeado de los otros seis pocillos, formando un círculo de 3 mm de radio.



Llenar el pocillo central con el antígeno estándar, los pocillos periféricos 2, 4 y 6 con el suero positivo conocido y los pocillos 1, 3 y 5 con el suero problema.

Incubar durante 72 horas como máximo a temperatura ambiente en una cámara cerrada y húmeda.

Interpretación

El suero problema es positivo si forma una línea de precipitina específica con el antígeno y una línea completa de identidad con el suero de control. El suero problema es negativo si no forma una línea específica con el antígeno y no desvía la línea del suero de control. Las placas Petri deberán examinarse sobre fondo oscuro con iluminación indirecta.

5. *Enfermedad hemorrágica epizoótica*

La prueba de inmunodifusión en gel de agar deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Antígeno

El antígeno precipitante deberá prepararse en un cultivo celular que favorezca la multiplicación rápida del serotipo (o serotipos) adecuado(s) de la enfermedad hemorrágica epizoótica. Se recomienda la utilización de células BHK o Vero. Al finalizar el crecimiento del virus, el antígeno se encontrará en el líquido sobrenadante, pero para ser activo deberá tener una concentración de 50 a 100 veces, lo que se podrá obtener aplicando un procedimiento normalizado de concentración de las proteínas. El virus existente en el antígeno podrá inactivarse con la adición de 0,3 % (v/v) de betapropiolactona.

Suero de control positivo conocido

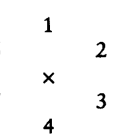
Con el suero y el antígeno de referencia internacionales, preparar un suero patrón nacional normalizado con relación al suero de referencia internacional para obtener una proporción óptima, liofilizarlo y emplearlo como suero de control positivo conocido en cada prueba.

Suero problema

Procedimiento

Preparar una solución de agarosa al 1 % en un tampón de borato o de barbitol sódico, con un pH de 8,5 a 9,0, y verter en una placa Petri hasta una altura mínima de 3 mm.

Perforar en el agar siete pocillos libre de humedad de 5 mm de diámetro cada uno, dispuestos del siguiente modo: un pocillo central, rodeado de los otros seis pocillos, formando un círculo de 3 mm de radio.



Llenar el pocillo central con el antígeno estándar, los pocillos periféricos 2, 4 y 6 con el suero positivo conocido, y los pocillos 1, 3 y 5 con el suero problema.

Incubar durante 72 horas como máximo a temperatura ambiente en una cámara cerrada y húmeda.

Interpretación

El suero problema es positivo si forma una línea de precipitina específica con el antígeno y una línea completa de identidad con el suero de control. El suero problema es negativo si no forma una línea específica con el antígeno y no desvía la línea del suero de control. Las placas Petri deberán examinarse sobre fondo oscuro con iluminación indirecta.

6. *Leptospirosis*

La prueba de microaglutinación deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Cultivos

Deberán mantenerse en un medio de Korthof o de EMJH a una temperatura de 30 °C.

Antígeno

Deberá contener 2 x 10^8 organismos por mililitro de medio de cultivo.

Procedimiento

Utilizar cantidades iguales de antígeno y de suero en las placas de microtitulación de fondo plano, mezclar e incubar a 30 °C durante 2 horas o a 37 °C durante una hora a hora y media, leer los resultados con iluminación débil sobre fondo oscuro, con un aumento comprendido entre 60 y 100.

Interpretación

El resultado será negativo cuando la aglutinación, a la dilución de 1/50, sea inferior al 50 %.

7. *Rinotraqueítis infecciosa bovina/Vulvovaginitis pustulosa infecciosa*

La prueba de seroneutralización deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Suero

Antes de su utilización, deberán inactivarse todos los sueros mediante calor a 56 °C durante 30 minutos.

Procedimiento

La prueba de seroneutralización constante con diferentes tipos de virus se realizará por microtitulación mediante células MDBK u otras células susceptibles. Deberán utilizarse las cepas Colorado, Oxford o cualquier otra cepa de referencia del virus, en una dosis de 100 $DICT_{50}$ por 0,025 milímetros; se mezclarán muestras de suero inactivado no diluido con un volumen igual (0,025 mililitros) de suspensión de virus. Incubar las mezclas virus/suero durante 2 horas a 37 °C en placas de microtitulación antes de añadir las células MDBK. Utilizar las células a una concentración que forme una monocapa completa pasadas 24 horas.

Controles

Control del carácter infeccioso del virus.
Control de la toxicidad del suero.
Control de cultivos de células no inoculados.
Antisueros de referencia.

Interpretación

Los resultados de la prueba de neutralización y el título del virus utilizado quedarán registrados previa incubación de 3 a 6 días a 37 °C. El suero se considerará negativo cuando no haya neutralización a la dilución 1/2 (suero no diluido).

8. *Diarrea vírica bovina (DVB)*

A. La prueba de aislamiento del virus deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Material de ensayo y métodos de detección

Se utilizarán suero, suspensión de capa amarillenta o de coágulos sanguíneos procedentes de muestras recién extraídas de sangre de ganado bovino de más de seis meses, que no hayan sido inactivados mediante calor. Para la detección de virus de la DVB en los cultivos inoculados se empleará un procedimiento de tinción inmunológica, como la técnica con anticuerpo fluorescente (AF), o una prueba con anticuerpo unido a enzimas, como la prueba de la inmunoperoxidasa (IPX).

Reactivos

Para la prueba del AF se necesita un antisuero específico de la DVB conjugado con ITCF. Para la prueba de la IPX se necesitan un suero específico anti-DVB no conjugado de origen bovino, un antisuero antibovino conjugado con peroxidasa y un sustrato enzimático adecuado (por ejemplo, 3-amino-9-etilcarbazol). Podrán utilizarse sueros anti-DVB procedentes de especies animales que no sean la bovina a condición de que el conjugado de peroxidasa esté dirigido contra las globulinas séricas de dicha especie. La especificidad de todos los sueros antivirales empleados debe estar comprobada y su reactividad debe ser amplia.

Procedimiento

En la prueba se utilizarán células susceptibles, como turbinado bovino, riñón de ternero o testículo de ternero, libres de virus de DVB endógenos.

Muestras de suero: el suero problema y las células de los cultivos tisulares se colocan en cultivos sobre portaobjetos, en pocillos de placas de microtitulación o en otros recipientes, de modo que la dilución final del suero sea del 10 %.

Capa amarillenta y coágulos sanguíneos: agregar las muestras a cultivos en monocapas de células confluentes y mantener a 37 °C durante 1 hora; a continuación, lavar los cultivos y cubrir con medio de cultivo que contenga un 10 % de suero fetal de ternero libre de DVB.

Incubar los cultivos a 37 °C, fijar y teñir mediante los métodos de AF o de IPX.

Controles

Control positivo del virus de la DVB.
Control negativo sin adición de virus.

Interpretación

Depués de 4 a 6 días de incubación, efectuar la tinción de la prueba del AF y leer con luz ultravioleta. La fluorescencia en células incubadas con la muestra problema se considerará resultado positivo.

Después de cuatro días de incubación, efectuar la tinción de la prueba de la IPX y leer con microscopio óptico. La coloración marrón oscuro del citoplasma de algunas células se considerará resultado positivo.

B. La prueba de seroneutralización deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Suero

Antes de su utilización, deberán inactivarse todos los sueros mediante calor a 56° C durante 30 minutos.

Procedimiento

Efectuar en placas de microtitulación la prueba de seroneutralización constante con diferentes tipos de virus, utilizando células susceptibles de bovino adecuadas que se hayan propagado en serie (por ejemplo, células turbinades de bovino, con arreglo a la descripción de McClurkin y otros, 1974, *Arch. ges. Virusfosch.*, 45, 285-289).

Es esencial que todos los reactivos y células estén exentos del virus de la DVB/EM no citopático y contaminante casual.

El virus de ensayo, que podrá ser cualquier cepa de referencia citopática adecuada (por ejemplo, la cepa NADL) se utilizará a una concentración de 100 dosis infecciosas medias de cultivo celular por 0,025 ml. Mezclar diluciones de suero inactivado con volúmenes iguales de suspensión vírica (0,025 mililitros) e incubar las mezclas virus-suero durante 1 hora a 37 °C antes de añadir volúmenes semejantes de suspensión celular. Utilizar las células a una concentración que forme una monocapa completa en el espacio de dos días.

Controles

Control del carácter infeccioso del virus.
Control de la toxicidad del suero.
Controles de cultivos de células no inoculados.
Antisueros de referencia.

Interpretación

Para el virus de la cepa NADL, la mejor lectura será la realizada tras cinco días de incubación a 37 °C. Un título de neutralización medio de 1/10 se considerará señal de una reacción inmunizadora a una infección aguda anterior.

9. *Análisis de la leche para determinar la presencia de mamitis*

El análisis de la leche deberá realizarse con arreglo al Anexo D de la Directiva 64/432/CEE.

10. *Fiebre aftosa (FA)*

A. La toma de muestras de esófago y faringe y el análisis deberán efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Reactivos

Antes de efectuar la toma de muestras, preparar el medio de transporte del siguiente modo: verter volúmenes de 2 ml en cada uno de los recipientes, cuyo número deberá ser igual al de animales examinados. Los recipientes utilizados deberán ser adecuados para soportar la congelación en CO_2 sólido o nitrógeno líquido.

Las muestras se tomarán empleando un instrumento de recogida de esputos especialmente diseñado a tal efecto («probang» o sonda esofágica).

Para extraer la muestra, introducir dicha sonda esofágica por la boca, pasando por encima de la lengua y descendiendo por la faringe, hasta alcanzar la parte superior del esófago. Raspar la superficie epitelial de la parte superior del esófago y la faringe mediante movimientos laterales y dirigidos hacia el velo del paladar. A continuación, extraer la sonda, preferentemente depués de que el animal haya efectuado un movimiento de deglución: deberá estar llena y contener una mezcla de mucosidades, saliva, fluido esofágico y restos de células. Deberá garantizarse que cada muestra contenga material celular visible. Se evitará realizar la operación con brusquedad, a fin de no ocasionar heridas que sangren.

Es posible que las muestras de algunos animales contengan rumiaduras en abundancia. En tal caso, se desecharán tales muestras y se enjuagará la boca del animal con agua, o, con preferencia, suero fisiológico, antes de repetir la toma de muestras.

Tratamiento de las muestras

Se examinará la calidad de cada muestra recogida con la sonda esofágica y se agregarán 2 ml de ella a un volumen igual de medio de transporte dentro de un recipiente adecuado para la congelación. Los recipientes serán cerrados herméticamente, precintados, desinfectados y etiquetados. Las muestras se mantendrán refrigeradas (+4 °C) y se examinarán en un plazo de 3 o 4 horas, o se conservarán en hielo seco – 69 °C) o nitrógeno líquido y permanecerán congeladas hasta que se examinen.

La sonda esofágica se desinfectará y se lavará con tres enjuages de agua limpia antes de emplearlo con un nuevo animal.

Ensayo del virus de la FA

Las muestras se inocularán en cultivos celulares primarios de tiroides de bovino, utilizando 3 tubos por muestra, como mínimo. Pueden emplearse también otras células susceptibles (por ejemplo, células primarias de riñón de bovino o porcino), aunque no debe olvidarse que su sensibilidad frente a algunas cepas del virus de la FA es menor. Los tubos se incubarán a 37 °C en un aparato giratorio y se examinarán una vez al día durante 48 horas para comprobar si se ponen de manifiesto los efectos citopáticos (ECP). En caso negativo, se procederá al paso ciego de los cultivos a nuevos cultivos y volverán a examinarse durante 48 horas. Deberá confirmarse la especificidad del ECP.

Medio de transporte recomendado

1. Tampón de fosfato 0,08 M con pH de 7,2, que contenga 0,01 % de seroalbúmina bovina, 0,002 % de rojo de fenol y antibióticos.
2. Medio de cultivo tisular (por ejemplo, MEM de Eagle) que contenga 0,04 M de tampón HEPES, 0,01 % de seroalbúmina bovina y antibióticos, con pH de 7,2.

Al medio de transporte deberán añadirse antibióticos, por ejemplo, los siguientes (por ml de volumen final):

— penicilina	1000 UI
— sulfato de neomicina	100 UI
— sulfato de polimixina B	50 UI
— nistatina	100 UI

B. La prueba de neutralización del virus deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Reactivos

Preparar la solución madre de antígeno del virus de la FA en cultivos celulares o en lenguas de bovino y almacenar a temperatura igual o inferior a – 70 °C, o bien a – 20 °C después de la adición de 50 % de glicerol. Esto constituye la solución madre de antígeno. El virus de la FA se mantiene estable en estas condiciones y los títulos apenas varían a lo largo de varios meses.

Procedimiento

El análisis se efectúa empleando placas de microtitulación de fondo plano adecuadas para cultivos celulares y se utilizan células susceptibles, como las IB-RS-2, las BHK-21 o células de riñón de ternero.

Se efectúa una dilución a 1/4 de los sueros problema en un medio de cultivo celular exento de suero y se añaden 100 UI/ml de neomicina o de otro antibiótico adecuado. Se inactivan los sueros a 56 °C durante 30 minutos y se emplean dosis de 0,05 ml para preparar una serie de diluciones a 1/2 en placas de microtitulación utilizando asas de 0,05 ml. A continuación, verter en cada pocillo virus previamente titulado diluido en un medio de cultivo exento de suero y que contenga 100 $DICT_{50}$/0,05 ml. Tras incubar a 37 °C durante una hora para que se produzca la neutralización, añadir a cada pocillo 0,05 ml de suspensión celular que contenga 0,5-1,0 x 10^6 células/ml en medio de cultivo celular que contenga suero exento de anticuerpos de la FA; a continuación, cerrar las placas de manera hermética.

Incubar las placas a 37 °C. Normalmente, las monocapas se hacen confluentes en un plazo de 24 horas. Por lo general, a las 48 horas el ECP se ha desarrollado lo suficiente para permitir la lectura de la prueba con *microscopio*. En ese momento puede efectuarse la lectura *microscópica* definitiva o pueden prepararse y teñirse las placas para realizar una lectura *macroscópica*, utilizando, por ejemplo, solución salina con 10 % de formol y 0,05 % de azul de metileno.

Controles

En cada prueba se efectuarán los siguientes controles: antisuero homólogo de título conocido, control celular, control de la toxicidad del suero, control del medio y una titulación del virus a partir de la cual se calcula la cantidad real de virus en la prueba.

Interpretación

Se considerarán infectados los pocillos con evidencia de ECP, y lo títulos de neutralización se expresarán como el inverso de la dilución final de suero presente en las mezclas de suero y virus en el punto final 50 % calculado con arreglo al método Spearman-Karber (Karber, G., 1931, *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162, 480).

Las pruebas se considerarán válidas cuando la candidad real de virus utilizada en cada pocillo esté comprendida entre $10^{1,5}$ y $10^{2,5}$ de la $DICT_{50}$ y cuando el título del suero de referencia no rebase el doble del título previsto, calculado en función del resultado de titulaciones anteriores. Cuando los controles no se ajusten a estos límites, se repetirán las pruebas.

Se considerará negativo un título de punto final igual o inferior a 1/11.

C. La detección y cuantificación de anticuerpos con el método ELISA deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

Reactivos

Antisueros de conejo frente al antígeno 146S de siete tipos de virus de la fiebre aftosa (VFA), utilizados a una concentración óptima determinada previamente en un tampón de carbonato/bicarbonato, siendo el pH de 9,6.

Los antígenos se preparan a partir de cepas seleccionadas de virus cultivados en monocapas de células BHK-21. Los sobrenadantes no purificados se utilizan y titulan previamente de conformidad con el procedimiento (aunque sin suero), de modo que se obtenga una dilución que, tras la adición de un volumen igual de STF (solución tampón de fosfatos que contenga 0,05 % de Tween-20 e indicador de rojo de fenol), dé una lectura de la densidad óptica comprendida entre 1,2 y 1,5. Los virus pueden emplearse inactivados. La STF se utiliza como diluyente. Los antisueros de cobayas se preparan mediante la inoculación de éstas con antígeno 146S de cada serotipo. Se prepara una concentración óptima determinada previamente con STF que contenga un 10 % de suero bovino normal y un 5 % de suero de conejo normal.

Utilizar anticuerpo de conejo antiinmunoglobulina de cobaya conjugado con peroxidasa de rábano picante a una concentración óptima determinada previamente en STF que contenga un 10 % de suero bovino normal y un 5 % de suero de conejo normal.

Los sueros problema se diluyen en STF.

Procedimiento

1. Las placas ELISA se recubren con 50 µl de sueros antivirales de conejo y se mantienen así hasta el día siguiente en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

2. Preparar en placas de fondo en forma de U con pocillos múltiples (placas portadoras) 50 µl de una serie doble de cada suero problema con diluciones a 1/2, empezando en 1/4. Añadir a cada pocillo 50 microlitros de una dosis constante de antígeno y dejar reposar las mezclas hasta el día siguiente a 4 °C. La adición del antígeno reduce a 1/8 la dilución inicial de suero.

3. Enjuagar cinco veces las placas ELISA con STF.

4. Transvasar 50 microlitros de las mezclas de suero y antígeno desde las placas portadoras a las placas ELISA recubiertas de suero de conejo, e incubar a 37 °C durante 1 hora en un agitador rotatorio.

5. Después del enjuage, añadir a cada pocillo 50 µl del antisuero de cobaya frente al antígeno utilizado en el punto 4. Incubar las placas a 37 °C durante 1 hora en un agitador rotatorio.

6. Enjuagar las placas y añadir a cada pocillo 50 µl de anticuerpo de conejo antiinmunoglobulina de cobaya conjugado con peroxidasa de rábano picante. Incubar las placas a 37 °C durante 1 hora en un agitador rotatorio.

7. Enjuagar las placas y añadir, a cada pocillo 50 µl de ortofenilendiamina que contenga 0,05 % H_2O_2 (30 %) p/v.

8. Transcurridos 15 minutos, interrumpir la reacción con 1,25 M H_2SO_4.

Efectuar la lectura de las placas con un espectrofotómetro a 492 mm en un lector ELISA conectado a un microordenador.

Controles

Por cada antígeno utilizado, 40 pocillos no contendrán suero sino antígeno diluido en STF.

Una serie duplicada de diluciones a 1/2 de antisuero bovino de referencia homólogo.

Una serie duplicada de diluciones a 1/2 de suero bovino negativo.

Interpretación

El título de los anticuerpos se expresa como la dilución final del suero problema que dé el 50 % del valor medio de DO registrado en los pocillos de control del virus donde no haya suero problema. Los títulos superiores a 1/40 se considerarán positivos.

Referencias

Hamblin C. Barnett ITR y Hedger RS (1986) — Un nuevo ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos del virus de la fiebre aftosa. I. ELISA: desarrollo y método. *Journal of immunological Methods*, 93, 115 — 121.11.

CAPÍTULO II

GANADO PORCINO

1. *Tuberculosis*

La tuberculinización intradérmica simple con tuberculina aviar deberá efectuarse con arreglo al Anexo B de la Directiva 64/432/CEE, con excepción del hecho de que el punto de inyección se situará sobre la piel fláccida de la base de la oreja.

2. *Brucelosis*

La seroaglutinación y la prueba de fijación del complemento deberán efectuarse con arreglo a los puntos A y B del Anexo C de la Directiva 64/432/CEE.

3. *Enfermedad de Aujeszky*

La prueba de seroneutralización deberá efectuarse con arreglo al procedimiento siguiente:

Suero

Antes de su utilización, se inactivarán todos los sueros con calor a 56 °C durante 30 minutos.

Procedimiento

La prueba de seroneutralización constante con diferentes tipos de virus se efectuará en placas de microtitulación con células Vero u otros sistemas celulares sensibles. El virus de la enfermedad de Aujeszky deberá utilizarse en una dosis de 100 $DICT_{50}$ por 0,025 mililitros; se mezclarán muestras de suero inactivado no diluido con un volumen igual (0,025 mililitros) de suspensión de virus. Incubar las mezclas virus/suero durante 2 horas a 37 °C en placas de microtitulación antes de añadir las células adecuadas. Utilizar las células a una concentración que forme una monocapa completa tras 24 horas.

Controles

Control del carácter infeccioso del virus.
Control de la toxicidad del suero.
Controles de cultivos de células no inoculados.
Antisueros de referencia.

Interpretación

Los resultados de la prueba de neutralización y el título del virus utilizado se registrarán tras 3 a 7 días de incubacion a 37 °C. Se considerarán negativos los sueros cuyos títulos sean inferiores a 1/2 (esperma no diluido).

4. *Gastroenteritis transmisible*

La prueba de seroneutralización deberá efectuarse con arreglo al procedimiento siguiente:

Suero

Antes de su utilización, se inactivarán todos los sueros con calor a 56 °C durante 30 minutos.

Procedimiento

La prueba de seroneutralización constante con diferentes tipos de virus se efectuará en placas de microtitulación con células A72 (tumor de perro) u otros sistemas celulares sensibles. El virus de la gastroenteritis transmisible deberá utilizarse en una dosis de 100 $DICT_{50}$ por 0,025 ml; se mezclarán muestras de suero inactivado no diluido con un volumen igual (0,025 ml) de suspensión de virus. Incubar las mezclas de virus/suero durante 30 a 60 minutos a 37 °C en las placas de microtitulación antes de añadir las células adecuadas. Utilizar las células a una concentración que forme una monocapa completa tras 24 horas. A cada pocillo se añadirá 0,1 ml de suspensión celular.

Controles

Control del carácter infeccioso del virus.
Control de la toxicidad del suero.
Controles de cultivos de células no inoculados.
Antisueros de referencia.

Interpretación

Los resultados de la prueba de neutralización y el título del virus utilizado se registrarán después de 3-5 días de incubación a 37 °C. Se considerarán negativos los sueros cuyos títulos sean inferiores a 1/2 (dilución final). Si las muestras de suero no diluido son tóxicas para los cultivos de tejidos, los sueros podrán diluirse a 1/2 antes de ser utilizados. Esto equivaldría a una dilución final del suero de 1/4. En este caso, se considerarán negativos los sueros cuyos títulos sean inferiores a 1/4 (dilución final).

5. *Gripe de los lechones*

La prueba de inhibición de la hemaglutinación deberá efectuarse con arreglo al procedimiento siguiente:

Procedimiento

Las pruebas se efectuarán con métodos normalizados (US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series nº 6).

Para destruir los inhibidores no específicos, los sueros de cerdo deberán someterse bien a la acción de una enzima que destruya los receptores (líquido filtrado de *Vibrio cholerae*) durante una noche a 37 °C, tratamiento que irá seguido de un calentamiento a 56 °C durante 30 minutos para destruir toda actividad enzimática residual, o bien a un tratamiento con caolín al 25 % durante una noche a 4 °C (Clark y Casals, 1958, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 7, 561).

Tras absorción mediante una suspensión al 10 % de eritrocitos de pollo durante 1 hora a 37 °C, controlar los sueros frente a cuatro unidades hemaglutinantes del virus adecuado utilizando un 1 % de eritrocitos de pollo. Dejar el virus y el suero en contacto durante 60 minutos a temperatura ambiente antes de añadir los eritrocitos.

Interpretación

Se considerarán positivos los títulos iguales o superiores a 1/10.

6. *Fiebre aftosa*

Las pruebas para el diagnóstico de la fiebre aftosa en el ganado porcino deberán efectuarse de conformidad con los procedimientos que figuran en el punto 10 del capítulo I.

7. *Enfermedad vesicular del cerdo*

La prueba de seroneutralización deberá efectuarse con arreglo al procedimiento siguiente:

Suero

Antes de su utilización, se inactivarán todos los sueros con calor a 56° C durante 30 minutos.

Procedimiento

La prueba de seroneutralización constante con diferentes tipos de virus se efectuará en placas de microtitulación con células IB-RS-2 u otros sistemas celulares sensibles. Se utilizará la cepa UKG 27/72 o cualquier otra cepa de referencia del virus en una dosis de 100 $DICT_{50}$ por 0,025 ml. Los sueros problema se diluirán a 1/4 y se inactivarán; a continuación se preparará una serie de diluciones a 1/2. Las muestras de suero se mezclarán con un volumen igual de suspensión de virus y se incubarán en las placas de microtitulación durante 1 hora a 37 °C, y después se añadirán 0,025 ml de suspensión celular que contenga 3 x 10^6 células/ml.

Controles

Control del carácter infeccioso del virus.
Control de la toxicidad del suero.
Controles de cultivos de células no inoculados.
Antisueros de referencia.

Interpretación

Los resultados de la prueba de neutralización y el título del virus utilizado se registrarán después de tres días de incubación a 37 °C. Los títulos se considerarán negativos si no se produce neutralización a una dilución de 1/11.

8. *Peste porcina clásica*

Las pruebas para el diagnóstico de la peste porcina clásica se efectuarán de conformidad con lo dispuesto en el Anexo I de la Directiva 80/217/CEE del Consejo (1).

9. *Leptospirosis*

Las pruebas para el diagnóstico de la leptospirosis en el ganado porcino se efectuarán de conformidad con lo dispuesto en el punto 6 del capítulo I del presente Anexo.

---

(1) DO nº L 47 de 21. 2. 1980, p. 11.

ANEXO II

CONDICIONES MÍNIMAS PARA LA AUTORIZACIÓN DE MERCADOS DE ANIMALES DE LAS ESPECIES BOVINA O PORCINA DESTINADOS A SER EXPORTADOS A LA COMUNIDAD EUROPEA

1. Los mercados serán supervisados por un veterinario oficial.

2. Los mercados se ubicarán en el centro de una zona de 20 km de diámetro en la que, de acuerdo con pruebas oficiales, no se haya registrado en los treinta días anteriores a su apertura como mercado autorizado ningún caso de fiebre aftosa o, cuando se trate de mercados autorizados de animales de la especie porcina, ningún caso de peste porcina, enfermedad vesicular del cerdo o encefalomielitis enteroviral del cerdo (enfermedad de Teschen).

3. Antes de su apertura como mercados autorizados, deberán ser limpiados y desinfectados con un desinfectante, autorizado en el país exportador, cuya eficacia para el control de las enfermedades mencionadas en el punto 2 haya sido oficialmente demostrada.

4. Los puntos de agrupación y las zonas de cargo u otros lugares por los que deban pasar los animales de las especies bovina o porcina destinados a ser exportados a la Comunidad Europea deberán cumplir las condiciones señaladas en los tres primeros puntos de este Anexo.

5. Todos los animales de la especie bovina o porcina que pasen por los mercados autorizados deberán cumplir las normas veterinarias vigentes para la importación de estas categorías de ganado a la Comunidad Europea.

6. Los animales para la exportación a la Comunidad Europea que pasen por los mercados autorizados deberán ser cargados y enviados directamente a la frontera del país exportador en los seis días siguientes a su paso por el mercado. Deberán cumplir las siguientes condiciones:

   a) no tener contacto alguno con animales biungulados que no pertenezcan a las especies bovina o porcina y que cumplan las normas veterinarias necesarias para la importación de la correspondiente categoría de animales en la Comunidad Europea;

   b) estar agrupados de tal forma que en un mismo envío no haya animales destinados a la cría o a la producción y animales para sacrificio inmediato;

   c) ser transportados en vehículos o contenedores previamente limpiados y desinfectados con un desinfectante, autorizado en el país exportador, cuya eficacia para el control de las enfermedades mencionadas en el punto 2 haya sido oficialmente demostrada; los vehículos y contenedores estarán diseñados de tal forma que durante el transporte no puedan derramarse ni caer fuera excrementos, orina, desechos o pienso.

7. Cuando una de las condiciones para la exportación de animales a la Comunidad sea la realización de pruebas en un plazo limitado antes de la carga de los animales, en ese plazo se incluirá un período de agrupación de hasta seis días subsiguiente al paso de los animales por los mercados autorizados.

8. El país exportador determinará qué mercados han sido autorizados para animales de cría y producción y cuáles para animales destinados a su sacrificio inmediato, y comunicará a la Comisión y a las autoridades centrales competentes de los Estados miembros los nombres y direcciones de dichos mercados.

9. El país exportador determinará el procedimiento para la supervisión oficial de mercados, puntos de agrupación y zonas de carga, y se ocupará de que aquélla se lleve a cabo.

10. El país exportador se encargará de incluir los datos sobre los mercados y las zonas de reunión en la sección correspondiente del certificado de sanidad que acompaña a los animales exportados a la Comunidad Europea.