II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 25 de Fevereiro de 1991

que estabelece os protocolos para a normalização de materiais e técnicas para a realização de testes veterinários e as condições para a aprovação de mercados em relação com a importação de animais domésticos das espécies bovina e suína provenientes de países terceiros

(91/189/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 72/462/CEE do Conselho, de 12 de Dezembro de 1972, relativa a problemas sanitários e de polícia sanitária, na importação de animais das espécies bovina e suína e de carnes frescas provenientes de países terceiros [1], com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 91/69/CEE [2], e, nomeadamente, o nº 1 do seu artigo 8º;

Considerando que a Directiva 72/462/CEE autoriza a importação de animais domésticos das espécies bovina e suína dos países terceiros que constam do anexo da Decisão 79/542/CEE do Conselho [3], com a última redacção que lhe foi dada pela Decisão 90/485/CEE [4];

Considerando que as condições sanitárias a impor aquando da importação de animais vivos de um país terceiro devem ser estabelecidas em função da situação sanitária nesse país;

Considerando que, apesar destas condições sanitárias poderem variar de país para país, os protocolos dos testes veterinários e as condições de aprovação dos mercados em países terceiros para o comércio de animais destinados à exportação para a Comunidade se aplicam a todos os países terceiros;

Considerando que, a fim de tornar mais simples as decisões relativas às condições sanitárias a aplicar aquando da importação de animais domésticos das espécies bovina e suína provenientes de países terceiros, é conveniente recorrer a uma única decisão comum, que estabeleça os protocolos dos testes veterinários e as condições de aprovação dos mercados;

Considerando que qualquer decisão que estabeleça os protocolos dos testes veterinários e as condições de aprovação dos mercados em países terceiros se aplica somente aos países terceiros relativamente aos quais tenha sido adoptada uma decisão quanto às condições sanitárias nesse mesmo país;

Considerando que as medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Veterinário Permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1º

1. A presente decisão prevê o estabelecimento dos protocolos dos testes veterinários e as condições de aprovação

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

dos mercados em países terceiros para o comércio de animais destinados à exportação para a Comunidade, no que diz respeito à importação de animais vivos das espécies bovina e suína provenientes dos países terceiros constantes do anexo da Decisão 79/542/CEE.

2. As condições estabelecidas nos anexos I e II da presente decisão aplicam-se exclusivamente a países terceiros para os quais tenham sido adoptadas decisões que estabelecem as condições sanitárias a impor em cada caso, em conformidade com o disposto no artigo 8º da Directiva 72/462/CEE.

Artigo 2º

Os Estados-membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 25 de Fevereiro de 1991.

Pela Comissão

Ray Mac SHARRY

Membro da Comissão

ANEXO I

PROTOCOLOS PARA A NORMALIZAÇÃO DE MATERIAIS E TÉCNICAS PARA A REALIZAÇÃO DE TESTES

CAPÍTULO I

Animais da espécie bovina

1. *Tuberculose*

A prova intradérmica da tuberculina com tuberculina bovina deve ser realizada conforme previsto no anexo B da 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].

2. *Brucelose*

As provas de seroaglutinação e de fixação do complemento devem ser realizadas conforme previsto nos pontos A e B do anexo C da Directiva 64/432/CEE do Conselho.

3. *Leucose bovina enzoótica*

A prova de imunodifusão em ágar-gel deve ser realizada conforme previsto no anexo G da Directiva 64/432/CEE do Conselho.

4. *Febre catarral*

A. A prova Elisa de bloqueio ou competitiva deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

A prova Elisa competitiva realizada com o anticorpo monoclonal 3-17-A3 permite detectar anticorpos de todos os serotipos conhecidos do vírus da febre catarral (VFC).

O fundamento da prova é a interrupção da reacção entre o antigénio do VFC e um anticorpo monoclonal específico de grupo (3-17-A3) por adição de soro de ensaio a diferentes diluições. Os anticorpos de VFC presentes no soro de ensaio bloqueiam a reactividade do anticorpo monoclonal (AMC), o que origina uma redução do desenvolvimento esperado da cor resultante da adição de substrato enzimático.

Material e reagentes:

1. Placas de microtítulo de fundo plano.
2. Antigénio: preparado como anteriormente descrito.
3. Tampão de bloqueio: 5 % (p/v) pó de leite seco «Marvel», 0,1 % (v/v) Tween-20 (fornecido em xarope monolaurato de polioxietileno sorbitol) em sistema tampão fosfatado (STF).
4. Anticorpo monoclonal (AMC): 3-17-A3 (fornecido na forma de sobrenadante da cultura de tecidos de hibridoma), armazenado a – 20 °C ou liofilizado, diluído a 1/50 com um tampão de bloqueio antes da utilização, dirigido contra o polipeptido p_7 específico do grupo.
5. Conjugado: globulina de coelho anti-rato (adsorvida e eluída), conjugada com peroxidase de rábano silvestre e mantida ao abrigo da luz a 4 °C.
6. Substrato e cromogénio: 0,2 g de ortofenileno diamina (OFD) dissolvidos num tampão que consiste em 2,553 g de ácido cítrico e 4,574 g de hidrogenortofosfato dissódico perfazendo até 500 ml com água destilada, dividido em alíquotas de 25 ml e mantido ao abrigo da luz a – 20 °C ; imediatamento antes da utilização, são adicionados 12 µl/25 ml de peróxido de hidrogénio (30 % p/v).

Manipular cuidadosamente o OFD — utilizar luvas de borracha — suspeita de efeito mutagénico

7. Ácido sulfúrico 1 molar: 26,6 ml de ácido, adicionados a 473,4 ml de água destilada.

Não esquecer — adicionar sempre o ácido à água, nunca a água ao ácido.

---

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

8. Agitator orbital.

9. Leitor de placa Elisa (a prova pode ser lida visualmente).

Formato de ensaio

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Controlo em branco			Antigénio + Conjugado						1
Controlo do AMC		Antigénio + AMC + Conjugado							2
Controlo positivo	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
Soros de ensaio									5
									6
									7
									8
									9
									10
									11
									12

Protocolo de ensaio

Controlo em branco

A faixa 1, de A a H, representa um controlo em branco que compreende o antigénio do VFC e um conjugado. Pode ser utilizado para aferir o leitor Elisa.

Controlo do AMC

A faixa 2, de A a H, representa o controlo do AMC e compreende o antigénio do VFC, o AMC e o conjugado. Trata-se de um controlo negativo. A média dos valores da densidade óptica desta faixa de controlo corresponde ao valor de inibição de 0 %.

Controlo positivo

A faixa 3, de A a H, representa o controlo positivo. Compreende o antigénio do VFC, as diluições de anti-soro positivo do VFC, o AMC e o conjugado. Trata-se de um indicador de que o ensaio está a decorrer com normalidade, devendo ser obtidos, de ensaio para ensaio, níveis de inibição equivalentes.

Soros de ensaio

No formato de ensaio atrás indicado podem ser ensaiados 18 soros às diluições de 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16. Obter-se-ão, desta forma, informações relativas ao título do anticorpo nos soros a ensaiar. A gama de diluições poderia ser alargada para obter títulos finais de diluição do soro. Por outro lado, para estudos serológicos em grande escala, o soro pode ser ensaiado a uma único diluição (1/4) ou a duas diluições (1/2 e 1/4) como prova rápida de controlo.

Técnica

1. Diluir o antigénio do VFC à concentração pré-titulada em STF. Proceder à dissociação ultrasónica para dispersar os agregados do vírus (não dispondo do aparelho necessário, pipetar vigorosamente) e adicionar 50 µl a todas as cavidades de placa Elisa. Bater ligeiramente nos bordos da placa para dispersar o antigénio.

2. Incubar a 37 °C durante 60 minutos num agitador orbital. Lavar as placas passando-as três vezes por água e esvaziando as cavidades com STF não estéril e secar com um papel absorvente.

3. Adicionar 50 µl de tampão de bloqueio por cavidade. Adicionar os soros de ensaio e um soro positivo às cavidades adequadas e diluir o conteúdo da placa com a ajuda de uma pipeta de canais múltiplos. Não adicionar soro nem ao controlo em branco nem ao controlo do AMC.

4. Imediatamente após a adição dos soros de ensaio, diluír o AMC em tampão de bloqueio (a uma diluição pré-titulada) e adicionar 50 µl a todas as cavidades da placa, excepto ao controlo em branco.

5. Incubar 37 °C durante 60 minutos num agitator orbital. Lavar três vezes com STF e secar com um papel absorvente.

6. Diluir o concentrado de coelho anti-rato a 1/5000 num tampão de bloqueio e adicionar 50 µl a todas as cavidades da placa.

7. Incubar 37 °C durante 60 minutos num agitador orbital. Lavar três vezes com STF e secar com um papel absorvente.

8. Descongelar o OFD e imediatamente antes da utilização adicionar 12 µl de peróxido de hidrogénio a 30 % por cada 25 ml de OFD. Adicionar 50 µl a todas as cavidades da placa. Aguardar que a cor se desenvolva durante aproximadamente 10 minutos e parar a reacção com ácido sulfúrico 1 molar (50 µl por cavidade). A cor deve-se desenvolver nas cavidades de controlo AMC e nas cavidades que contêm soros sem anticorpos do VFC.

9. Examinar e registar as placas, ou visualmente ou com recurso a um leitor espectrofotométrico.

Análise dos resultados

Calcular o valor médio da densidade óptica (DO) a partir dos controlos AMC. Esse valor representa o valor de inibição de 0 %. Os valores da densidade óptica dos soros a testar são expressos em valores de inibição percentuais e calculados por meio da fórmula seguinte:

$$\text{Valores de inibição percentuais} = 100 - \frac{\text{DO na presença do soro de ensaio}}{\text{DO na ausência do soro de ensaio}} \times 100.$$

Os valores de inibição superiores a 40 % para uma diluição do soro a 1/4 são considerados positivos. A leitura visual é possível visto uma inibição de 40 % ser o mais baixo valor facilmente visível a olho nu.

Preparação do antigénio do VFC para o método Elisa

1. Lavar três vezes dez roux de células BHK-21 confluentes com um meio «Eagle» isento de soro e infectar com o serótipo 1 do vírus da febre catarral num meio «Eagle» isento de soro.

2. Incubar a 37 °C e examinar diariamente o efeito citopatogénico (ECP).

3. Quando o ECP se tornar manifesto em 80 a 90 % da camada de células de cada roux, recolher o vírus por agitação destacando as células aderentes ao vidro.

4. Centrifugar a 2 000 a 3 000 rpm (rotações por minuto) para agregar as células.

5. Deitar fora a fracção sobrenadante e colocar novamente as células em suspensão em aproximadamente 30 ml de STF que contenha 1 % de «sarkosyl» e 2 ml de fluoreto de fenolmetilsulfonil (lise). Isto pode provocar uma gelificação das células, podendo ser adicionado mais lise para reduzir esse efeito.

   NB: o fluoreto de fenolmetilsulfonil é uma substância perigosa — manipular com muito cuidado.

6. Proceder à dissociação das células durante 60 segundos utilizando uma sonda ultrasónica a uma amplitude de 30 microns.

7. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos.

8. Reservar a fracção sobrenadante a +4 °C e colocar o agregado de células remanescente em 10 a 20 ml de lise.

9. Proceder à dissociação ultrasónica e clarificar, reservando a fracção sobrenadante em cada fase, num total de três vezes.

10. Reunir as fracções sobrenadantes e centrifugar a 24 000 rpm durante 120 minutos a uma temperatura de +4 °C sobre uma almofada de 5 ml de sucrose a 40 % (p/v em STF) utilizando tubos de centrifugação Beckmann de 30 ml e um rotor SW 28.

11. Eliminar a fracção sobrenadante, escorrer cuidadosamente os tubos e suspender novamente o agregado em STF por dissociação ultrasónica. Reservar o antigénio em alíquotas a −70 °C.

Titulação do antigénio do VFC para o método Elisa

A titulação do antigénio da febre catarral para o método Elisa é feita pelo método indirecto Elisa. Titulação de diluições a 1/2 do antigénio relativamente a uma diluição constante (1/50) de anticorpo monoclonal 3-17-A3. O protocolo é o seguinte:

Técnica

1. Diluir o antigénio do VFC em STF ao longo de uma placa de microtítulo numa série de diluições a 1/2 (50 µl/cavidade) utilizando uma pipeta de canais múltiplos.

2. Incubar durante uma hora a 37 °C num agitator orbital.

3. Lavar três vezes as placas com STF.

4. Adicionar 50 µl de anticorpo monoclonal 3-17-A3 (diluído a 1/50) a cada uma das cavidades da placa de microtítulo.

5. Incubar duranta uma hora a 37 °C num agitator orbital.

6. Lavar três vezes as placas com STF.

7. Adicionar 50 µl de globulina de coelho anti-rato conjugada com peroxidase de rábano silvestre, diluída numa concentração pré-titulada óptima, a cada cavidade da placa de microtítulo.

8. Incubar durante uma hora a 37 °C com um agitador orbital.

9. Adicionar um substrato e um cromogénio como indicado atrás. Parar a reacção após 10 minutos por meio da adição de ácido sulfúrico 1 molar (50 µl por cavidade).

No ensaio competitivo o anticorpo monoclonal deve encontrar-se em excesso, devendo por essa razão ser escolhida uma diluição de antigénio que se encontre na curva de titulação (e não na zona de planalto) que resulte numa densidade óptica de aproximadamente 0,8 após 10 minutos.

B. A prova de imunodifusão em ágar-gel é realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Antigénio

Preparar o antigénio, precipitando num sistema de cultura de células compatível com a multiplicação rápida uma estirpe de referência do vírus da febre catarral. São recomendadas as células BHK ou Vero. O antigénio está presente no fluído sobrenadante no termo do crescimento do vírus, mas, para ser eficaz, a sua concentração deve ser 50 a 100 vezes superior. Esta concentração obtém-se através de qualquer método padrão de concentração de proteínas; o vírus do antigénio pode ser inactivado por meio da adição de 0,3 % (v/v) de beta-propiolactono.

Soro de controlo positivo conhecido

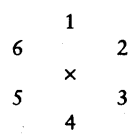
Utilizando o soro internacional de referência e antigénio, é produzido um soro-tipo nacional, padronizado para obtenção de uma proporção óptima relativamente ao soro internacional de referência, liofilizado e utilizado como o soro de controlo conhecido em cada ensaio.

Soro de ensaio.

Técnica:

Deitar agarose a 1 % preparada num tampão de borato ou de barbitol de sódio, com um pH entre 8,5 e 9,0 numa placa de Petri a uma profundidade mínima de 3,0 mm.

Cria-se no ágar uma estrutura de sete cavidades isentas de humidade, cada uma com 5,0 mm de diâmetro. A estrutura consiste numa cavidade central e seis cavidades dispostas num círculo com um raio de 3 mm:



Preencher a cavidade central com o antigénio padrão. As cavidades circundantes 2, 4 e 6 são preenchidas com soro positivo e as 1, 3 e 5 com o soro de ensaio.

O sistema é colocado em incubação durante um período que pode ir até 72 horas à temperatura ambiente numa câmara húmida fechada.

Interpretação

Um soro de ensaio é positivo caso resulte na formação de uma linha de precipitina específica com o antigénio e numa linha de identidade total com o soro de controlo. O soro de ensaio é negativo caso se não forme uma linha específica e caso não deforme a linha correspondente ao soro de controlo. As placas de Petri devem ser examinadas contra um fundo escuro e com uma iluminação indirecta.

5. *Doença hemorrágica epizoótica*

A prova de imunodifusão em ágar-gel é realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Antigénio

Preparar o antigénio, precipitando num sistema de cultura de células compatível com a multiplicação rápida serótipo(s) adequado(s) do vírus da doença hemorrágica epizoótica. São recomendadas as células BHK ou Vero. O antigénio está presente no fluído sobrenadante no termo do crescimento do vírus, mas, para ser eficaz, a sua concentração deve ser 50 a 100 vezes superior. Esta concentração obtém-se através de qualquer método padrão de concentração de proteínas; o vírus do antigénio pode ser inactivado por meio da adição de 0,3 % (v/v) de beta-propiolactono.

Soro de controlo positivo conhecido

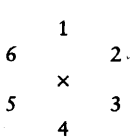
Utilizando o soro internacional de referência e antigénio, é produzido um soro-tipo nacional, padronizado para obtenção de uma proporção óptima relativamente ao soro internacional de referência, liofilizado e utilizado como o soro de controlo conhecido em cada ensaio.

Soro de ensaio.

Técnica

Deitar agarose a 1 % preparada num tampão de borato ou de barbitol de sódio, com um pH entre 8,5 e 9,0 numa placa de Petri a uma profundidade mínima de 3,0 mm.

Cria-se no ágar uma estrutura de sete cavidades isentas de humidade, cada uma com 5,0 mm de diâmetro. A estrutura consiste numa cavidade central e seis cavidades dipostas num círculo com um raio de 3 mm:



Preencher a cavidade central com o antigénio padrão. As cavidades circundantes 2, 4 e 6 são preenchidas com soro positivo e as 1, 3 e 5 com o soro de ensaio.

O sistema é colocado em incubação durante um período que pode ir até 72 horas à temperatura ambiente numa câmara húmida fechada.

Interpretação

Um soro de ensaio é positivo caso resulte na formação de uma linha de precipitina específica com o antigénio e numa linha de identidade total com o soro de controlo. O soro de ensaio é negativo caso se não forme uma linha específica e caso não deforme a linha correspondente ao soro de controlo. As placas de Petri devem ser examinadas contra um fundo escuro e com uma iluminação indirecta.

6. *Leptospirose*

A prova de aglutinação microscópica deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Culturas

São mantida em meio Korthof ou EMJH a 30 °C.

Antigénio

Contém 2 × 10^8 organismos por mililitro de meio de cultura.

Técnica

Misturar quantidades iguais de antigénio e soro em placas de microtítulo de fundo plano e incubar a 30 °C durante 2 horas ou a 37 °C durante 1,5 hora. A leitura da prova é feita com uma iluminação de baixa potência em campo escuro e com um amplificação entre 60x e 100x.

Interpretação

Para valores de aglutinação inferiores a 50 % a uma diluição de 1/50, o resultado considera-se negativo.

7. *Rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa*

A prova de seroneutralização deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Soro

Todos os seros são inactivados pelo calor, a 56 °C, durante os 30 minutos anteriores à utilização.

Técnica

A prova de variação da seroneutralização com vírus constante em placas de microtítulo utiliza células MDBK ou outras células susceptíveis. As estirpes Colorado, Oxford ou qualquer outra estirpe de referência do vírus devem ser utilizados a 100 $TCID_{50}$ por 0,025 ml; misturar as amostras de soro inactivado e não diluído com igual volume (0,025 ml) de suspensão do vírus. Incubar as misturas vírus/soro durante 2 horas a 37 °C nas placas de microtítulo, antes de adicionar as células MDBK. Utilizar as células a uma concentração tal que leve à formação de uma camada simples completa após 24 horas.

Controlos

— ensaio de infecciosidade do vírus,
— controlos de toxicidade do soro,
— controlos de cultura de células não inoculadas,
— anti-soros de referência.

Interpretação

Registar os resultados da prova de neutralização e o título do vírus utilizado na prova após 3 a 6 dias de incubação a 37 °C. Os títulos do soro consideram-se negativos se não houver neutralização a uma diluição de 1/2 (soro não diluído).

8. *Diarreia vírica bovina (DVB)*

A. A prova de isolamento do vírus deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Material e métodos de detecção

Utilizam-se soro ou suspensões de «buffy coat» ou de coágulos de sangue de amostras de sangue recém-colhidas, que não tenham sido inactivadas pelo calor, em animais com mais de seis meses de idade. Uma técnica imunológica de coloração, como a técnica do anticorpo fluorescente (AF) ou uma prova do anticorpo enzimático, como, por exemplo, a imunoperoxidase (IPX), é utilizada para detectar o vírus da DVB em culturas inoculadas.

Reagentes

Para a prova do AF é necessário um conjugado de anti-soro específico da DVB com isotiocianeto fluorescente (ITCF). Para a prova da imunoperoxidase (IPX) são necessários um soro não-conjugado específico anti-DVB de origem bovina, um conjugado de peroxidase com anti-soro antibovino e um substrato enzimático adequado (como o 3-amino-9-etilcarbazol). Pode ser utilizado um soro anti-DVB obtido de uma espécie diferente da bovina, desde que o conjugado de peroxidase seja dirigido contra globulinas do soro dessa espécie. Todos os soros antivíricos utilizados devem ter uma especificidade comprovada e uma ampla reactividade.

Técnica

A prova utiliza células susceptíveis como células dos cornetos de bovino, de rim ou de testículos de vitelos isentos de vírus da DVB endógena.

Amostras de soro — Colocar o soro de ensaio e as células de cultura de tecidos em culturas em placas cobertas ou em cavidades de placas de microtítulo ou outros recipientes, de modo a que a diluição final de soro seja de 10 %.

«Buffy coat» e coágulo de sangue — Adicionar as amostras a culturas de células confluentes em camada simples durante 1 hora a 37 °C, lavar depois as culturas e cobri-las com meio de cultura que contenha 10 % de soro fetal de vitelo isento de DVB.

Incubar então as culturas a 37 °C, fixá-las e proceder à coloração por técnicas AF ou IPX.

Controlos

— controlo positivo do vírus da DVB,
— controlo negativo sem adição de vírus.

Interpretação

Para o teste de AF, a coloração surge após 4—6 dias de incubação e a sua leitura é feita com luz ultravioleta. A fluorescência em células incubadas com a amostra de ensaio é interpretada como um resultado positivo.

Para a IPX, a coloração surge após quatro dias de incubação e a sua leitura é feita por microscopia ligeira. A existência de manchas castanhas escuras no citoplasma de algumas das células é interpretada como um resultado positivo.

B. A prova da seroneutralização deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Soro

Todos os soros são inactivados pelo calor, a 56 °C, durante os 30 minutos anteriores à utilização.

Técnica

A prova de variação da seroaglutinação com vírus constante em placas de microtítulo utiliza células susceptíveis de bovino adequadas propagadas em série (por exemplo, células dos cornetos conforme descritas por McClurkin and other, 1974, *Arch. ges. Virusforsch.*, 45, 285 a 289).

É essencial que todos os reagentes e células estejam isentos de vírus contaminantes adventícios não citopatogénicos da DVB.

Utilizar o vírus de ensaio, que pode pertencer a qualquer estirpe citopatogénica de referência adequada (como a estirpe NADL), numa concentração de 100 doses infecciosas de cultura de células intermédias por 0,025 ml.

Misturar diluições dos soros inactivados com iguais volumes de suspensão de vírus (0,025 ml) e incubar as misturas vírus-soro durante 1 hora, a 37 °C, antes de adicionar volumes equivalentes de suspensão de células. Utilizar as células a uma concentração tal que leve à formação de uma camada simples completa num prazo máximo de 2 dias.

Controlos

— ensaios de infecciosidade do vírus
— controlos de toxicidade do soro,
— controlos de culturas de células não inoculadas,
— anti-soros de referência.

Interpretação

Com o vírus da estirpe NADL, a leitura é realizada no momento óptimo se for feita após cinco dias de incubação a 37 °C.

Considera-se um título de neutralização mediano de 1/10 como indicativo de uma resposta imunitária a uma infecção aguda ocorrida anteriormente.

9. *Análise do leite para detecção da mastite*

A análise do leite deve ser efectuada em conformidade com o previsto no anexo D da Directiva 64/432/CEE.

10. *Febre aftosa (FA)*

A. A colheita de amostras do esófago/faringe e seu ensaio devem ser realizados de acordo com o protocolo seguinte:

Reagentes

Antes de colher as amostras, preparar o meio para transporte. Distribuir volumes de 2 ml por tantos recipientes quantos os animais que constituem a amostra. Os recipientes devem ser resistentes à congelação em CO_2 sólido ou azoto líquido.

As amostras são colhidas com uma sonda esofágica, especialmente concebida para a colheita do escarro.

Para colher uma amostra, passar o copo da sonda esofágica através da boca, sobre a língua, até à parte superior do esófago. Por meio de movimentos orientados lateral e superiormente, tentar raspar o epitélio superficial da parte superior do esófago e da faringe. Retirar então a sonda, de preferência após o animal ter engolido. O copo deve estar cheio e conter uma mistura de muco, saliva, fluído esofágico e detritos celulares. Deve-se assegurar que cada espécimen contenha algum material celular visível. O manuseamento muito brusco, que provoque sangramento, deve ser evitado.

As amostras provenientes de alguns animais podem estar fortemente contaminadas com o conteúdo do rúmen. Essas amostras devem ser rejeitadas e a boca do animal lavada com água ou, de preferência, soro fisiológico antes de a colheita ser repetida.

Tratamento das amostras

Examinar cada uma das amostras colhidas no copo da sonda esofágica relativamente à qualidade e adicionar 2 ml a igual volume de meio para transporte num recipiente que possa resistir à congelação. Fechar firmemente esses recipientes, selá-los, desinfectar e rotular. Manter as amostras a baixa temperatura (+ 4 °C) e examin-álas após 3 a 4 horas ou colocá-las sobre gelo seco (– 69 °C) ou azoto líquido, mantendo-as congeladas até serem examinadas.

Após utilização em cada animal, desinfectar e lavar a sonda por três vezes, sempre em água limpa.

Pesquisa do vírus da febre aftosa

Inocular as amostras em culturas de células primárias de tiróide de bovino, utilizando pelo menos três tubos por amostra. Embora possam ser utilizadas outras células susceptíveis, como por exemplo células primárias de rim de bovino ou suíno, é necessário não esquecer que, para algumas estirpes do vírus da FA, essas células são menos sensíveis. Colocar os tubos em incubação num agitador do tipo rotativo, a 37 °C, e examinar diariamente, durante 48 horas, para detecção do efeito citopatogénico (ECP). Caso o efeito não seja detectado, inocular casualmente as culturas em novas culturas e reexaminar durante 48 horas. A especificidade de qualquer ECO tem que ser confirmada.

Meios para transporte recomendados

1. Solução fosfatada tampão 0,08 M com pH 7,2 que contha albumina de soro de bovino a 0,01 %, vermelho de fenol a 0,002 % e antibióticos.

2. Meio de cultura de tecidos (por exemplo, MEM Eagle) que contenha solução tampão HEPES 0,04 M, albumina de soro de bovino a 0,01 % e antibióticos, e que tenha pH 7,2.

Adicionar antibióticos (por ml de solução final) ao meio para transporte, por exemplo:

— penicilina:	1 000 UI,
— sulfato de neomicina:	100 UI,
— sulfato de polimixina B:	50 UI,
— micostatina:	100 UI.

B. A prova de neutralização do vírus deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Reagentes

Preparar o antigénio de base do vírus da febre aftosa em culturas de células ou em línguas dos animais e armazená-lo a − 70 °C ou menos ou a − 20 °C após adição de glicerol a 50 %. Este antigénio constitui o antigénio de base. O vírus da febre aftosa é estável nestas condições e os títulos sofrem pouca variação durante meses.

Técnica

A prova é realizada em placas de microtítulo de fundo plano, com células susceptíveis como as IB-RS-2, BHK-21 ou células de rim de vitelo.

Diluir os soros de ensaio a 1/4 num meio de cultura de células isento de soro, adicionando 100 UI/ml de neomicina ou outros antibióticos adequados. Inactivar os soros a 56 °C durante 30 minutos e utilizar quantidades de 0,05 ml para preparar uma série de diluições a 1/2 em placas de microtítulo utilizando ansas de diluição de 0,05 ml.

Adicionar então a cada cavidade vírus pré-titulado diluído também em meio de cultura isento de soro e com 100 $TCID_{50}$/0,05 ml. Incubar a 37 °C durante 1 hora de forma a permitir que a neutralização se dê e, em seguida, adicionar a cada cavidade 0,05 ml de células em suspensão com 0,5—1,0 × 10^6 células por ml num meio de cultura de células com soro isento de anticorpos da febre aftosa. Selar em seguida as placas.

Incubar as placas a 37 °C. As camadas simples tornam-se normalmente confluentes em 24 horas. O efeito citopatogénico está habitualmente suficientemente avançado em 48 horas para permitir uma leitura microscópica da prova. Pode então ser feita uma leitura microscópica final ou uma fixação e coloração das placas para uma leitura macroscópica utilizando, por exemplo, uma solução de soro fisiológico e formol a 10 % e azul de metileno a 0,05 %.

Controlos

Em cada prova os controlos incluem anti-soro homólogo de título conhecido, um controlo de células, um controlo da toxicidade do soro, um controlo do meio e uma titulação do vírus a partir da qual é calculada a quantidade de vírus presente na prova.

Interpretação

Consideram-se infectadas as cavidades onde se verificou o ECP e os títulos de neutralização são expressos como o recíproco da diluição final de soro presente nas misturas soro/vírus na fase terminal de 50 % calculada pelo método Spearman-Karber. (Karber, G., 1931, *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162, 480.)

Os ensaios são considerados válidos quando a quantidade de vírus utilizada por cavidade no ensaio se situa entre $10^{1,5}$ e $10^{2,5}$ $TCID_{50}$ e quando o título do soro de referência não exceder o dobro do título esperado, estimado a partir do valor da moda de titulações prévias. Se os controlos estiverem fora destes limites, o ensaios têm que ser repetidos.

Um título, na fase terminal, de 1/11 ou menos é considerado negativo.

C. A detecção e a quantificação do anticorpo pelo método Elisa devem ser realizadas de acordo com o protocolo seguinte:

Reagentes

Anti-soros de rato para o antigénio 146S de 7 tipos de vírus da febre aftosa (VFA) a uma concentração pré-determinada óptima em solução tampão de carbonato/bicarbonato, com pH 9,6.

Os antigénios são preparados a partir de estirpes seleccionadas de vírus cultivadas em camadas simples de células BHK-21. Os sobrenadantes não purificados são utilizados e pré-titulados de acordo com o protocolo mas sem soro, de forma a obter uma diluição tal que, após a adição de igual volume de STFT (sistema tampão fosfatado com 0,05 % de Tween-20 e o indicador vermelho de fenol), tenha uma densidade óptica entre 1,2 e 1,5. Podem ser utilizados vírus inactivados. O STFT é utilizado como diluente. Os anti-soros de porco da Índia são preparados através da inoculação de porcos da Índia com antigénio 146S de cada serótipo. Prepara-se uma concentração pré-determinada óptima em STFT que contenha 10 % de soro normal de bovino e 5 % de soro normal de coelho.

Utiliza-se imunoglobulina de coelho antiporco da Índia conjugada com peroxidase de rábano silvestre com uma concentração óptima pré-determinada e STFT que contenha 10 % de soro normal de bovino e 5 % de soro normal de coelho.

Os soros de ensaio são diluídos em STFT.

Técnica

1. Revestir as placas Elisa com 50 µl de soros antivíricos de coelho e colocá-las durante uma noite numa câmara húmida e à temperatura ambiente.

2. Preparar 50 microlitros em duplicado, de uma série de diluições a 1/2 de cada soro de ensaio, começando com 1/4, em placas multi-cavidades com base em forma de U (placas portadoras). Adicionar 50 microlitros de uma dose constante de antigénio a cada cavidade e deixar as misturas em repouso durante uma noite a 4 °C. A adição do antigénio reduz a diluição inicial do soro para 1/8.

3. Lavar por cinco vezes as placas Elisa com STFT.

4. Transferir então 50 microlitros das misturas soro/antigénio das placas portadoras para as placas Elisa revestidas com soro de coelho e incubar a 37 °C durante uma hora num agitador do tipo rotativo.

5. Depois da lavagem, adicionar a cada cavidade 50 µl de anti-soro de porco da Índia ao antigénio utilizado em 4. Incubar as placas a 37 °C durante uma hora num agitador do tipo rotativo.

6. Lavar as placas e adicionar a cada cavidade 50 µl de imunoglobulina de coelho antiporco da Índia conjugada com peroxidase de rábano silvestre. Incubar as placas durante 1 hora a 37 °C num agitador do tipo rotativo.

7. Lavar as placas e adicionar a cada cavidade 50 µl de ortofenileno diamina com 0,05 % de H_2O_2 (30 %) p/v.

8. Parar a reacção após 15 minutos com H_2SO_2 1,25 M.

A leitura das placas é feita espectrofotometricamente a 492 nm num leitor Elisa ligado num microcomputador.

Controlos

— Por cada antigénio utilizado existem 40 cavidades que não contêm soro, mas que contêm antigénio diluído em STFT.

— Uma série, em duplicado, de diluições a 1/2 de anti-soro de bovino de referência homólogo.

— Uma série, em duplicado, de diluições a 1/2 de soro negativo de bovino.

Interpretação

Os títulos de anticorpos são expressos em termos da diluição final do soro dos ensaios que tenham 50 % do valor da DO (densidade óptica) média registada nas cavidades de controlo do vírus onde não existe soro. Consideram-se positivos os títulos superiores a 1/40.

Bibliografia

Hamblin C., Barnett ITR e Hedger RS (1986) — *A new enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA.* Journal of Immunological Methods, 93, 115-121.11.

CAPÍTULO II

Suínos

1. *Tuberculose*

A prova simples da tuberculina intradérmica com tuberculina de aves deve ser realizada em conformidade com o anexo B da Directiva 64/432/CEE, devendo porém a injecção ser dada numa prega de pele na base da orelha.

2. *Brucelose*

As provas de seroaglutinação e de fixção do complemento devem ser realizadas em conformidade com os pontos A e B do anexo C da Directiva 64/432/CEE.

3. Doença de Aujeszky

A prova da seroneutralização deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Soro

Todos os soros são inactivados pelo calor, a 56 °C, durante 30 minutos antes da utilização.

Técnica

A prova de variação da seroneutralização com vírus constante em placas de microtítulo utiliza células Vero ou outro sistema de células sensíveis. O vírus da doença de Aujeszky deve ser utilizado a 100 $TCID_{50}$ por 0,025 ml; misturar as amostras de soro inactivado e não diluído com igual volume (0,025 ml) de suspensão do vírus. Incubar as misturas vírus/soro durante 2 horas a 37 °C nas placas de microtítulo, antes de adicionar as células adequadas. Utilizar as células a uma concentração tal que leve à formação de uma camada simples completa após 24 horas.

Controlos

Ensaio de infecciosidade do vírus.
Controlos de toxicidade do soro.
Controlos de cultura de células não inoculadas.
Anti-soros de referência.

Interpretação

Registar os resultados da prova de neutralização e o título do vírus utilizado na prova após três a sete dias de incubação a 37 °C. Consideram-se negativos títulos do soro inferiores a 1/2 (sémen não diluído).

4. *Gastro-enterite transmissível*

A prova de seroneutralização deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Soro

Todos os soros são inactivados pelo calor, a 56 °C, durante 30 minutos antes da utilização.

Técnica

A prova da variação da seroneutralização com vírus constante em placas de microtítulo utiliza células A72 (tumor de cão) ou outro sistema de células sensíveis. O vírus da gastro-enterite transmissível deve ser utilizado a 100 $TCID_{50}$ por 0,025 ml; misturar as amostras de soro inactivado e não diluído com igual volume (0,025 ml) de suspensão do vírus. Incubar as misturas vírus/soro durante 30 a 60 horas a 37 °C nas placas de microtítulo, antes de adicionar as células adequadas. Utilizar as células a uma concentração tal que leve à formação de uma camada simples completa após 24 horas. Cada célula recebe 0,1 ml de suspensão de células.

Controlos

Ensaio de infecciosidade do vírus.
Controlos de toxicidade do soro.
Controlos de cultura de células não inoculadas.
Anti-soros de referência.

Interpretação

Registar o resultado da prova de neutralização e o título do vírus utilizado na prova após 3 a 5 dias de incubação a 37 °C. Consideram-se negativos títulos do soro inferiores a 1/2 (diluição final). Se as amostras de soro não diluídas forem tóxicas para as culturas de tecidos, estes soros podem ser diluídos a 1/2 antes de serem utilizados na prova. Isto será equivalente a 1/4 da diluição final do soro. Os títulos do soro inferiores a 1/4 (diluição final) são considerados negativos nestes casos.

5. *Gripe suína*

A prova de inibição da hemaglutinação deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Técnica

Utilizar, para estas provas, os métodos normalizados (US Department of Health, *Education and Welfare, Immunology series nº 6)*.

Para destruir inibidores não específicos, tratar os soros de porco com enzima anti-receptor (filtrado de *Vibrio cholera*) de um dia para o outro, a 37 °C, e aquecer em seguida a 56 °C durante 30 minutos para destruir a actividade enzimática residual, ou então proceder a um tratamento, de um dia para o outro, com silicato de alumínio a 25 %, a 4 °C (Clark an Casals, 1958, *American Journal of Tropical Medicina and Hygiene,* 7, 561).

Após absorção com uma suspensão a 10 % de eritrócitos de galinha, durante 1 hora e a 37 °C, testar os soros contra 4 unidades de hemaglutinação do vírus adequado, utilizando 1 % de eritrócitos de galinha. Deixar o vírus e o soro em contacto durante 60 minutos à temperatura ambiente antes de adicionar os eritrócitos.

Interpretação

Consideram-se positivos títulos iguais ou superiores a 1/10.

6. *Febre aftosa*

As provas para a febre aftosa em suínos devem ser realizadas de acordo com os protocolos estabelecidos no ponto 10 do capítulo I do presente anexo.

7. *Doença vesiculosa do suíno*

A prova de seroaglutinação deve ser realizada de acordo com o protocolo seguinte:

Soro

Todos os soros são inactivados pelo calor, a 56 % durante 30 minutos antes da utilização.

Técnica

A prova de variação da seroneutralização com vírus constante em placas de microtítulo utiliza células IB-RS-2 ou outro sistema de células sensíveis. A UKG 27/72 ou qualquer outra estirpe de referência do vírus é utilizada a 100 $TCID_{50}$ por 0,025 ml. Diluir os soros de ensaio a 1/4 e inactivá-los e preparar uma série de diluições a 1/2. Misturar as amostras de soro com igual volume de suspensão do vírus e incubar durante 1 hora a 37 °C nas placas de microtítulo antes de juntar 0,025 ml de suspensão de células com 3×10^6 células/ml.

Controlos

Ensaio de infecciosidade do vírus.
Controlos de toxicidade do soro.
Controlos de cultura de células não inoculadas.
Anti-soros de referência.

Interpretação

Registar os resultados da prova de neutralização e o título do vírus utilizado na prova após 3 dias de incubação a 37 °C. Os títulos do soro consideram-se negativos se a uma diluição de 1/11 não houver neutralização.

8. *Peste suína clássica*

As provas para a peste suína clássica devem ser realizadas de acordo com o disposto no anexo I da Directiva 80/217/CEE do Conselho [1].

9. *Leptospirose*

As provas para a leptospirose em suínos devem ser realizadas de acordo com o ponto 6 do capítulo I do presente anexo.

---

[1] JO nº L 47 de 21. 2. 1980, p. 11.

ANEXO II

CONDIÇÕES MÍNIMAS DE APROVAÇÃO DE MERCADOS PARA O COMÉRCIO DE ANIMAIS DAS ESPÉCIES BOVINA E SUÍNA DESTINADOS À EXPORTAÇÃO PARA A COMUNIDADE EUROPEIA

1. Os mercados devem ser supervisados por um veterinário oficial.

2. Os mercados devem estar localizados no centro de uma área de 20 km de diâmetro em que, de acordo com verificações oficiais, não se registou, pelo menos nos 30 dias anteriores à sua utilização como mercados aprovados, nenhum caso de febre aftosa e, no caso dos mercados aprovados para a espécie suína, nenhum caso de peste suína, doença vesiculosa do suíno ou encefalomielite enzoótica do porco (doença de «Teschen»).

3. Antes da sua utilização como mercados aprovados, os mercados devem ser limpos e desinfectados com um desinfectante oficialmente autorizado no país exportador como sendo apropriado para o controlo das doenças referidas no ponto anterior.

4. Os locais de concentração, de embarque ou quaisquer outros locais por onde os animais das espécies suína ou bovina destinados à exportação para a Comunidade Europeia possam passar devem obedecer às condições 1, 2 e 3 do presente anexo.

5. Qualquer animal das espécies bovina ou suína que passe por mercados aprovados deve satisfazer as condições sanitárias estabelecidas para a importação para a Comunidade Europeia de animais dessa categoria.

6. Os animais destinados à exportação para a Comunidade Europeia que passem por mercados aprovados devem, num período de 6 dias após essa passagem, ser embarcados e despachados directamente para a fronteira do país exportador:

   a) Sem contactarem com animais biungulados, com excepção de animais das espécies bovina ou suína que satisfaçam as condições sanitárias estabelecidas para a importação de animais dessa categoria pela Comunidade Europeia;

   b) Separados em compartimentos, de forma a que nenhum compartimento contenha simultaneamente animais reprodutores ou destinados à produção e animais para abate imediato;

   c) Em veículos de transporte ou contentores que tenham primeiramente sido limpos e desinfectados com um desinfectante oficialmente autorizado no país exportador como sendo apropriado para o controlo das doenças referidas no ponto 2 deste anexo e que tenham sido construídos de modo a impedir que durante o transporte deixem caír fezes, urina ou forragem.

7. Sempre que as condições para a exportação de animais para a Comunidade imponham a realização de um teste dentro de um determinado período antes do embarque, esse período incluirá qualquer período de concentração, até 6 dias, seguinte à passagem dos animais pelos mercados aprovados.

8. O país exportador designa os mercados aprovados para animais reprodutores ou destinados à produção e os aprovados para animais destinados ao abate e notifica a Comissão e as autoridades centrais competentes dos Estados-membros dos nomes e endereços desses mercados.

9. O país exportador determina o processo de supervisão oficial de mercados, locais de concentração e de embarque e garante a realização dessa supervisão.

10. O país exportador deve garantir que a caracterização dos mercados e locais de concentração conste da secção competente do certificado sanitário que acompanha os animais exportados para a Comunidade Europeia.