

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 15 de diciembre de 2009

por la que se modifica el anexo D de la Directiva 64/432/CEE del Consejo en lo relativo a las pruebas de diagnóstico de la leucosis enzoótica bovina

[notificada con el número C(2009) 9951]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2009/976/UE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Vista la Directiva 64/432/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios comunitarios de animales de las especies bovina y porcina ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 16, párrafo segundo,

Considerando lo siguiente:

- (1) La Directiva 64/432/CEE se aplica a los intercambios dentro de la Unión de animales de la especie bovina, y su anexo D, capítulo II, establece las pruebas de diagnóstico de la leucosis enzoótica bovina (LEB) que deben utilizarse para el control y la erradicación de esta enfermedad, para las tareas de vigilancia y seguimiento, para la determinación y el mantenimiento de la calificación de rebaño oficialmente indemne de leucosis enzoótica bovina, así como para la certificación necesaria en el comercio dentro de la Unión de animales de la especie bovina.
- (2) El anexo D, capítulo II, de la Directiva 64/432/CEE establece que la detección de la LEB se realizará mediante la prueba de inmunodifusión en placas de gel de agar (IGDA) con el uso del antígeno contrastado en relación con el suero patrón oficial CE (suero E1), o bien mediante la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) contrastada en relación con el suero E4. Ambos sueros patrón son suministrados por el Instituto Veterinario Nacional de la Universidad Técnica de Dinamarca.
- (3) Recientemente el Laboratorio de referencia para la Leucosis Enzoótica Bovina de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), el Friedrich-Loeffler-Institut, con sede en Alemania, ha producido un nuevo suero patrón para la LEB (el suero E05) en cooperación con los Laboratorios de referencia de la OIE del Reino Unido (Centro de Laboratorios Veterinarios) y de Polonia (Instituto Nacional de Investigación Veterinaria), tras haberlo sometido a pruebas en un ensayo interlaboratorios. El suero E05 ha sido validado en relación con los sueros E1 y E4 por diferentes IGDA y ELISA y, por consiguiente, se ha incluido como suero patrón acreditado de la OIE en el

capítulo 2.4.11, parte B(2), del *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres de la OIE*, sexta edición, de 2008. Se puede disponer de este suero por medio del Laboratorio de referencia de la OIE para la Leucosis Enzoótica Bovina de Alemania.

- (4) Por añadidura, el Instituto Veterinario Nacional de la Universidad Técnica de Dinamarca ha informado a la Comisión de que no puede continuar cumpliendo sus obligaciones para suministrar los sueros patrón actualmente previstos en el anexo D, capítulo II, de la Directiva 64/432/CEE.
- (5) Las autoridades alemanas competentes y el Friedrich-Loeffler-Institut han acordado suministrar el suero E05, que se convertirá, por consiguiente, en el nuevo suero patrón oficial de la Unión Europea (UE) para la LEB.
- (6) Procede, por tanto, modificar la Directiva 64/432/CEE en consecuencia.
- (7) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

El anexo D, capítulo II, de la Directiva 64/432/CEE se sustituye por el texto del anexo de la presente Decisión.

Artículo 2

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 15 de diciembre de 2009.

Por la Comisión
Androulla VASSILIOU
Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO 121 de 29.7.1964, p. 1977/64.

ANEXO

El anexo D, capítulo II, de la Directiva 64/432/CEE se sustituye por el texto siguiente:

«CAPÍTULO II

PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE LA LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA

La detección de la leucosis enzoótica bovina se realizará mediante la prueba de inmunodifusión en placas de gel de agar (IGDA), en las condiciones descritas en las partes A y B, o mediante la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA), en las condiciones descritas en la parte C. La prueba de inmunodifusión en placas de gel de agar solo se aplicará en las pruebas de muestras individuales. En el caso de que se cuestionen justificadamente los resultados de las pruebas, se llevará a cabo una prueba de inmunodifusión en placas de gel de agar como control complementario.

Las pruebas IGDA y ELISA estarán contrastadas en relación con el suero E05, que será el suero patrón oficial de la UE y que será suministrado por:

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

A. Pruebas de inmunodifusión en placas de gel de agar

1. El antígeno que habrá de utilizarse en esta prueba deberá contener glucoproteína del virus de la leucosis bovina. El antígeno deberá estar contrastado en relación con el suero E05.
2. Los institutos estatales, laboratorios nacionales de referencia o institutos oficiales designados de acuerdo con el artículo 6 bis para coordinar las normas y métodos de diagnóstico de las pruebas para la detección de la leucosis enzoótica bovina deberán encargarse de calibrar el antígeno patrón de trabajo del laboratorio en relación con el suero E05.
3. Los antígenos patrón empleados en el laboratorio deberán presentarse al menos una vez al año a los institutos estatales, laboratorios nacionales de referencia o institutos oficiales designados conforme al artículo 6 bis para que sean contrastados con el suero E05. Aparte de esa normalización, el antígeno utilizado podrá calibrarse de acuerdo con el método descrito en la parte B.
4. Las pruebas aplicarán los reactivos siguientes:
 - a) antígeno: el antígeno deberá contener glucoproteína específica del virus de la leucosis enzoótica bovina que haya sido contrastado en relación con el suero E05;
 - b) el suero para prueba;
 - c) un suero de control positivo conocido;
 - d) gel de agar:
 - 0,8 % de agar,
 - 8,5 % de NaCl,
 - tampón Tris 0,05 M, pH 7,2,
 - deberán introducirse 15 ml de este gel de agar en una placa de Petri de 85 mm de diámetro, lo que dará una profundidad de 2,6 mm de gel de agar.
5. Se deberá hacer una red experimental de siete oquedades exentas de humedad mediante perforación del gel de agar hasta el fondo de la placa; dicha red consistirá en una oquedad central alrededor de la cual se ordenarán seis oquedades periféricas dispuestas en círculo.

Diámetro de la oquedad central: 4 mm

Diámetro de las oquedades periféricas: 6 mm

Distancia entre la oquedad central y las periféricas: 3 mm

6. Se deberá llenar de antígeno patrón la oquedad central. Las oquedades periféricas 1 y 4 descritas en B.3 se llenarán con el suero positivo conocido; las oquedades 2, 3, 5 y 6, con los sueros de prueba. Las oquedades deberán llenarse hasta la desaparición del menisco.
7. Las cantidades obtenidas serán las siguientes:
 - antígeno: 32 μ l,
 - suero de control: 73 μ l,
 - suero de prueba: 73 μ l.
8. La incubación deberá durar 72 horas a temperatura ambiente (20-27 °C) en un recinto húmedo cerrado.
9. La prueba podrá leerse 24 y 48 horas después, pero no se debe obtener ningún resultado final antes de transcurridas 72 horas:
 - a) un suero de prueba será positivo si forma una curva de precipitación específica con el antígeno del virus de la leucosis bovina (VLB) y si dicha curva coincide con la del suero de control;
 - b) un suero de prueba será negativo si no da una curva de precipitación específica con el antígeno del VLB y si no desvía la curva del suero de control;
 - c) la reacción no podrá considerarse concluyente si:
 - i) el suero desvía la curva del suero de control hacia la oquedad del antígeno del VLB sin formar una curva de precipitación visible con el antígeno, o
 - ii) no es posible interpretarla como negativa ni como positiva.

En caso de reacciones dudosas, podrá repetirse la prueba y utilizarse suero concentrado.
10. Podrá utilizarse cualquier otra configuración o red de oquedades siempre que el suero E05, en una dilución a 1:10 en suero negativo, pueda ser detectado como positivo.

B. Método para contrastar el antígeno

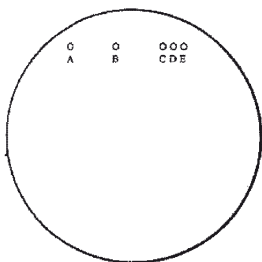
1. Soluciones y materiales necesarios:
 - a) 40 ml de gel de agar de 1,6 % en un tampón Tris 0,05 M/HCl de pH 7,2, con un 8,5 % de NaCl;
 - b) 15 ml de un suero de la leucosis bovina que solo contenga anticuerpos respecto a las glucoproteínas del virus de la leucosis bovina, diluido al 1:10 en un tampón Tris 0,05 M/HCl de pH 7,2, con un 8,5 % de NaCl;
 - c) 15 ml de un suero de la leucosis bovina que solo contenga anticuerpos respecto a las glucoproteínas del virus de la leucosis bovina, diluido a 1:5 en un tampón Tris 0,05 M/HCl de pH 7,2, con un 8,5 % de NaCl;
 - d) cuatro placas de Petri de plástico de un diámetro de 85 mm;
 - e) un punzón de un diámetro de 4 a 6 mm;
 - f) un antígeno de referencia;
 - g) el antígeno que haya de contrastarse;
 - h) un baño de agua caliente (56 °C).
2. Procedimiento:

Disolver el gel de agar (1,6 %) en el tampón Tris/HCl calentando con precaución hasta 100 °C. Colocar en el baño de agua a 56 °C durante una hora aproximadamente. Colocar además las soluciones de suero de la leucosis bovina en el baño de agua a 56 °C.

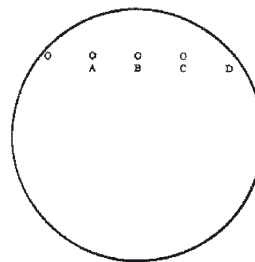
Mezclar a continuación 15 ml de la solución de gel de agar a 56 °C con los 15 ml de suero de la leucosis bovina (1:10), agitar rápidamente y verter en dos placas de Petri a razón de 15 ml por placa. Repetir el procedimiento con suero de la leucosis bovina diluido a 1:5.

Cuando el gel de agar se haya endurecido, se deberán practicar las oquedades de la forma siguiente:

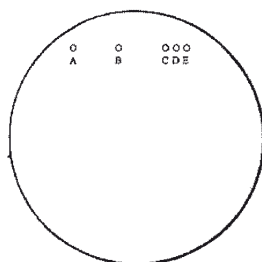
Placa de Petri nº 1
Sueros 1:10



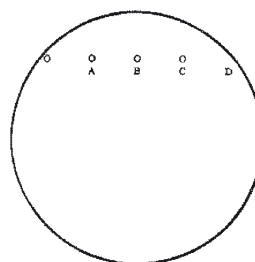
Placa de Petri nº 2
Sueros 1:10



Placa de Petri nº 3
Sueros 1:5



Placa de Petri nº 4
Sueros 1:5



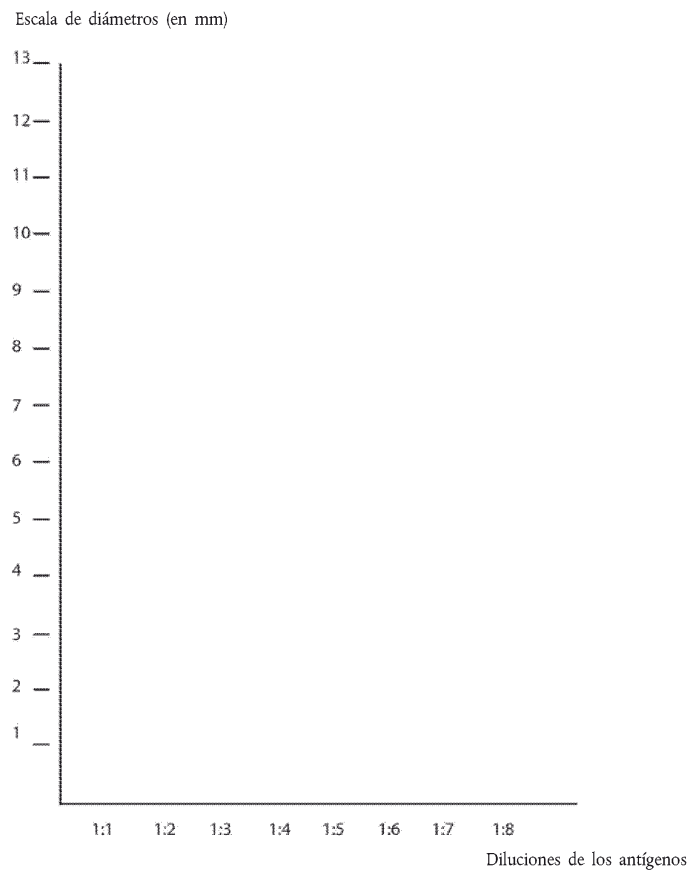
3. Adición de antígenos:

- a) placas de Petri números 1 y 3:
 - i) oquedad A — antígeno de referencia no diluido,
 - ii) oquedad B — antígeno de referencia diluido a 1:2,
 - iii) oquedades C y E — antígeno de referencia,
 - iv) oquedad D — antígeno de prueba no diluido;
- b) placas de Petri números 2 y 4:
 - i) oquedad A — antígeno de prueba no diluido,
 - ii) oquedad B — antígeno de prueba diluido a 1:2,
 - iii) oquedad C — antígeno de prueba diluido a 1:4,
 - iv) oquedad D — antígeno de prueba diluido a 1:8.

4. Instrucciones complementarias:

- a) el experimento deberá realizarse con dos grados de dilución del suero (1:5 y 1:10), a fin de obtener la precipitación óptima;
- b) si el diámetro de precipitación es excesivamente débil con los dos grados de dilución, el suero deberá ser objeto de una dilución suplementaria;
- c) si el diámetro de precipitación es excesivo para los dos grados de dilución y si el precipitado desapareciere, se deberá escoger un grado más débil de dilución para el suero;
- d) la concentración final del gel de agar deberá establecerse en un 0,8 %; y la de los sueros en 5 y 10 %, respectivamente.

- e) anotar los diámetros medidos en el sistema coordinado siguiente. La dilución de trabajo será aquella en la que se registre el mismo diámetro para el antígeno de prueba que para el antígeno de referencia.



C. Prueba de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para la detección de la leucosis enzoótica bovina

1. Los materiales y reactivos que habrán de utilizarse serán los siguientes:
 - a) microplacas de fase sólida, platillos o cualquier otra fase sólida;
 - b) el antígeno se fijará a la fase sólida con o sin ayuda de anticuerpos captadores policlonales o monoclonales; si el antígeno se asocia directamente a la fase sólida, todas las muestras de ensayo que den reacciones positivas deberán someterse a nuevas pruebas con el antígeno de control; el antígeno de control deberá ser idéntico al antígeno examinado, salvo que no habrá antígenos del VLB; si los anticuerpos captadores están asociados a la fase sólida, los anticuerpos solo deben reaccionar ante antígenos del VLB;
 - c) el líquido biológico que se vaya a examinar;
 - d) los controles positivos y negativos correspondientes;
 - e) el conjugado;
 - f) un sustrato adaptado a las enzimas utilizadas;
 - g) en caso necesario, una solución de interrupción;
 - h) soluciones para la dilución de las muestras de ensayo, para las preparaciones de reactivos y para el lavado;
 - i) un sistema de lectura que corresponda al sustrato utilizado.

2. Normalización y sensibilidad de la prueba

La sensibilidad de la prueba ELISA deberá ser de un nivel tal que el suero E05 dé positivo tras diluirse 10 veces (muestras de suero) o 250 veces (muestras de leche) más que la dilución obtenida a partir de muestras individuales puestas en común. En ensayos en los que las muestras (suero y leche) sean sometidas a pruebas por separado, el suero E05 diluido en una proporción de 1 a 10 (suero negativo) o de 1 a 250 (leche negativa) deberá dar positivo cuando se someta a la prueba en la misma dilución de ensayo utilizada para las pruebas individuales. Los institutos contemplados en el punto 2 de la parte A serán responsables del control de la calidad del método ELISA y, en particular, de determinar, en función del título obtenido con el suero E05, el número de muestras que deben ponerse en común de cada lote de productos.

3. Condiciones de utilización de la prueba ELISA para la detección de la leucosis enzoótica bovina

- a) las pruebas ELISA podrán utilizarse en muestras de suero y de leche;
 - b) si las pruebas ELISA se emplean para la certificación de conformidad con el artículo 6, apartado 2, letra c), o para el establecimiento y mantenimiento de la calificación de un rebaño de conformidad con el anexo D, capítulo I, la mezcla de muestras de suero o leche se realizará de forma que las muestras sometidas a examen puedan vincularse sin ningún género de dudas a los distintos animales incluidos en el conjunto. Toda prueba de confirmación deberá efectuarse con muestras tomadas de animales por separado;
 - c) cuando las pruebas ELISA se utilicen con una muestra de leche a granel, dicha muestra se tomará de la leche recogida en un rebaño con al menos un 30 % de vacas lecheras en fase de producción de leche. Toda prueba de confirmación deberá efectuarse con muestras de suero o leche tomadas de animales por separado.».
-