

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 1226/2002
af 8. juli 2002
om ændring af bilag B til Rådets direktiv 64/432/EØF

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 64/432/EØF af 26. juni 1964 om veterinærpolitimæssige problemer ved handel inden for Fællesskabet med kvæg og svin ⁽¹⁾, senest ændret ved Kommissionens forordning (EF) nr. 535/2002/EF ⁽²⁾, særlig artikel 16, stk. 1, andet afsnit, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Den 11. oktober 1999 vedtog Den Videnskabelige Komité for Dyrs Sundhed og Trivsel en rapport ⁽³⁾ om ændring af de tekniske bilag til direktiv 64/432/EØF for at tage hensyn til den videnskabelige udvikling med hensyn til tuberkulose, brucellose og enzootisk kvægleukose.
- (2) Ifølge ovennævnte rapport bør tuberkulosestest udføres i henhold til Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 3. udgave, 1996, fra Det Internationale Kontor for Epizootier (OIE).
- (3) I august 2001 offentliggjorde OIE 4. udgave, 2000, af denne manual, som indeholder ændringer af beskrivelsen af tuberkulosestest.

- (4) I januar 2002 offentliggjorde Det Europæiske Departement for Lægemiddelkvalitet den 4. udgave, 2002, af den europæiske farmakopé, der indeholder monografierne 0535 og 0536 om rensset aviær og bovin tuberkulin (Tuberculin Purified Protein Derivative).
- (5) Det er derfor nødvendigt at ændre bilag B til direktiv 64/432/EØF for at fastlægge testprocedurer, der skal gælde i forbindelse med overvågning og handel inden for EF, under hensyntagen til udtalelse fra Den Videnskabelige Veterinærkomité.
- (6) De i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

Bilag B til direktiv 64/432/EØF affattes som angivet i bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 8. juli 2002.

På Kommissionens vegne

David BYRNE

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT 121 af 29.7.1964, s. 1977/64.

⁽²⁾ EFT L 80 af 23.3.2002, s. 22.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

BILAG

»BILAG B

TUBERKULOSE

1. IDENTIFIKATION AF AGENSET

Forekomst af *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agens for bovin tuberkulose, i kliniske prøver og post mortem-prøver kan påvises ved undersøgelse ved hjælp af farvede udstrygninger eller immunoperoxydaseteknik og bekræftes ved dyrkning af organismen i primære isolationsmedier.

Patologisk materiale til bekræftelse af *M. bovis* tages fra anormale lymfeknuder og parenkyme organer såsom lunger, lever, milt osv. Hvis dyret ikke fremviser patologiske forandringer, tages der prøver fra lymfeknuder (Lnn. retropharyngeales, bronchales, mediastinales, supramammalis, mandibulares og bestemte Lnn. mesenterici) og lever til undersøgelse og dyrkning.

Normalt kan isolater identificeres ved at fastslå de dyrkningsmæssige og biokemiske egenskaber. Polymerasekædereaktionen (PCR) kan også anvendes til påvisning af *M. tuberculosis*komplekset. DNA-analyseteknikken kan vise sig at være hurtigere og mere pålidelig end biokemiske metoder til udskillelse af *M. bovis* fra andre medlemmer af *M. tuberculosis*komplekset. Genetiske fingeraftryk gør det muligt at skelne mellem forskellige *M. bovis*-stammer og beskrive oprindelses-, overførsels- og spredningsmønstrene.

De anvendte teknikker og medier, standardiseringen af dem og fortolkningen af resultaterne skal være i overensstemmelse med OIE's Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4. udgave, 2000, kapitel 2.3.3 (kvægtuberkulose).

2. KUTAN TUBERKULINPRØVE

Kun renset tuberkulin (PPD (Purified Protein Derivatives)), der opfylder standarderne i punkt. 2.1, må anvendes til den officielle kutane tuberkulinprøve efter procedurerne i punkt 2.2.

2.1. Standarder for (bovin og aviær) tuberkulin

2.1.1. Definition

Renset tuberkulin (renset bovin eller aviær tuberkulin) er et præparat, der er fremstillet af varmebehandlede produkter fra dyrkning og lysis af *Mycobacterium bovis* eller *Mycobacterium avium* (alt efter tilfældet), og som kan afsløre en forsinket overfølsomhed hos et dyr, der er sensibiliseret over for mikroorganismer af samme art.

2.1.2. Fremstilling

Tuberkulin fremstilles af de vandopløselige fraktioner, der tilberedes ved at opvarme kulturer af *Mycobacterium bovis* eller *Mycobacterium avium* (alt efter tilfældet), der er dyrket i et flydende syntetisk medium, i frit udstømmende damp og derefter filtrere dem. Den aktive fraktion af filtratet, der hovedsagelig består af protein, isoleres ved udfældning, vaskes og genopløses. Der kan tilsættes et antimikrobielt konserveringsmiddel såsom phenol, der ikke udløser falske positive reaktioner. Det endelige sterile præparat, der er frit for mycobakterier, distribueres aseptisk i sterile forseglede glasbeholdere, der derefter lukkes for at forhindre forurening. Præparatet kan frysetørres.

2.1.3. Identifikation af produktet

En række graduerede doser indsprøjtes intradermalt på forskellige steder på albinoforsøgsdyr, der er passende sensibiliseret, og som hvert vejer mindst 250 g. Efter 24 timer til 28 timer fremkommer der reaktioner i form af ødematøse hævelser med hudrødme med eller uden nekrose på injektionsstederne. Størrelsen og graden af reaktionerne varierer efter dosen. Ikke-sensibiliserede forsøgsdyr viser ingen reaktioner på sådanne indsprøjtninger.

2.1.4. Test

2.1.4.1. pH: pH-værdien er 6,5 til 7,5.

- 2.1.4.2. Phenol: Hvis det præparat, der skal undersøges, indeholder phenol, må dens koncentration højst være 5 g/l.
- 2.1.4.3. Sensibiliserende virkning: Der anvendes en gruppe af tre forsøgsdyr, der ikke er behandlet med noget stof, der kan påvirke testen. Ved tre lejligheder med intervaller på fem dage indsprøjtes der intradermalt hvert forsøgsdyr en dosis af det præparat, der skal undersøges, på 500 IE i 0,1 ml. 15 til 21 dage efter den tredje indsprøjtning indsprøjtes den samme dosis (500 IE) intradermalt i de samme dyr og i en kontrolgruppe af tre forsøgsdyr af samme vægt, der ikke tidligere har fået indsprøjet tuberkulin. 24 timer til 28 timer efter de sidste indsprøjtninger er de to gruppers reaktioner ikke særlig forskellige.
- 2.1.4.4. Toksicitet: Der anvendes to forsøgsdyr, der hvert mindst vejer 250 g, og som ikke tidligere er behandlet med et stof, der kan påvirke testen. Hvert forsøgsdyr indsprøjtes intradermalt 0,5 ml af det præparat, der skal undersøges. Dyrene observeres i syv dage. Ingen anormale virkninger indtræder i observationsperioden.
- 2.1.4.5. Sterilitet: Det opfylder testen for sterilitet som foreskrevet i monografien om Vacciner til veterinærbrug (Vaccines for veterinary use) i fjerde udgave, 2002, af den europæiske farmakopé.

2.1.5. Styrkebestemmelse

Styrken af rensset (bovin og aviær) tuberkulin bestemmes ved at sammenligne sensibiliserede forsøgsdyrs reaktioner på intradermale indsprøjtninger af en række fortyndinger af det præparat, der skal undersøges, med de reaktioner, der udløses af kendte koncentrationer af et referencepræparat af rensset (alt efter tilfældet bovin eller aviær) tuberkulin udtrykt i IE.

For at teste styrken sensibiliseres mindst ni albinoforsøgsdyr, der hvert vejer 400 g til 600 g, ved en dyb intramuskulær indsprøjtning af 0,0001 mg våd masse af levende *M. bovis* af stammen AN5 opslæmmet i 0,5 ml af en natriumklorid R-opløsning på 9 g/l for bovin tuberkulin eller en passende dosis af inaktiveret eller levende *M. avium* for aviær tuberkulin. Mindst fire uger efter sensibiliseringen af forsøgsdyrene barberes de på siderne for at skaffe plads til højst fire injektionssteder på hver side. Der tilberedes fortyndinger af det præparat, der skal undersøges, og af referencepræparatet ved anvendelse af en isotonisk fosfatbufferet kogsaltsopløsning (pH 6,5-7,5), der indeholder 0,005 g/l polysorbat 80 R. Der anvendes mindst tre doser af referencepræparatet og mindst tre doser af det præparat, der skal undersøges. Der vælges doser af en sådan størrelse, at de patologiske forandringer har en diameter på mindst 8 mm og højst 25 mm. Fortyndingerne fordeles efter et randomiseret latinsk kvadratmønster. Hver dosis indsprøjtes intradermalt med en konstant mængde på 0,1 ml eller 0,2 ml. De patologiske forandringers diameter måles efter 24 timer til 28 timer, og testens resultat beregnes ved anvendelse af de sædvanlige statistiske metoder og antagelse af, at forandringernes diameter er direkte proportionale med logaritmen af tuberkulinernes koncentration.

Testen er ikke gyldig, hvis konfidensintervalgrænserne (sandsynlighed = 0,95) ikke er mindst 50 % og ikke højst 200 % af den anslåede styrke. Den anslåede styrke er ikke mindre end 66 % og ikke mere end 150 % af den angivne styrke for bovin tuberkulin. Den anslåede styrke er ikke mindre end 75 % og ikke mere end 133 % af den angivne styrke for aviær tuberkulin. Den angivne styrke er mindst 20 000 IE/ml for begge tuberkuliner (bovin og aviær tuberkulin).

2.1.6. Opbevaring

Beskyttes mod lys ved en temperatur på 5 ± 3 °C.

2.1.7. Mærkning

På etiketten anføres:

- styrken i IE pr. ml
- eventuelle tilsatte stoffers navn og mængde
- for frysetørrede præparater:
 - rehydreringsvæskens navn og mængde
 - at produktet skal anvendes straks efter rehydrering.

2.2. Testprocedurer

2.2.1. Følgende intradermale tuberkulinprøver gælder som officielle:

- enkelt intradermal prøve: Prøven omfatter en enkelt indsprøjtning af bovin tuberkulin
- intradermal sammenlignende prøve: Prøven omfatter en enkelt indsprøjtning med bovin tuberkulin og en enkelt indsprøjtning med aviær tuberkulin, som gives samtidigt.

- 2.2.2. Den indsprøjtede tuberkulindosis skal indeholde:
- mindst 2 000 IE bovin tuberkulin
 - mindst 2 000 IE aviær tuberkulin.
- 2.2.3. Den indsprøjtede dosis må ikke være større end 0,2 ml.
- 2.2.4. Tuberkulinprøver foretages ved intradermal indsprøjtning af tuberkulin(er) i halsen. Indsprøjtningstederne skal være på grænsen mellem halsens forreste og midterste tredjedel. Såfremt samme dyr får indsprøjtet både aviær tuberkulin og bovin tuberkulin, skal indsprøjtningstedet for aviær tuberkulin ligge ca. 10 cm fra halskammen, og indsprøjtningstedet for bovin tuberkulin ca. 12,5 cm lavere på en linje, der stort set er parallel med skulderlinjen, eller på forskellige sider af halsen. Når det drejer sig om unge dyr, hvor der ikke er tilstrækkelig plads til adskillelse af indsprøjtningstederne på den ene side af halsen, gives der en indsprøjtning på hver side af halsen fra samme sted midt i halsens midterste tredjedel.
- 2.2.5. Tuberkulinprøveteknikken og bedømmelsen af reaktionerne er som følger:
- 2.2.5.1. Teknik
- Indsprøjtningstederne afhåres og renses. I hvert enkelt afhåret felt tages en hudfold mellem pege- og tommelfinger og måles med en krumpasser, og resultatet registreres. Derefter indsprøjtes tuberkulindosen efter en metode, der sikrer, at tuberkulinet indgives intradermalt. En kort steril kanyle med udvendig skråkant påsat en tuberkulinfyldt gradinddelt sprøjte, der indføres på skrå i hudens dybereliggende lag, kan anvendes. Indsprøjtningen er foretaget korrekt, hvis der på hvert indsprøjtningsted kan føles en lille ærteagtig hævelse. På hvert indsprøjtningsted måles hudfoldens tykkelse på ny 72 timer (+/- 4 timer) efter indsprøjtningen, og resultatet registreres.
- 2.2.5.2. Fortolkning af resultater
- Reaktionerne bedømmes ved besigtigelse samt på grundlag af den registrerede forøgelse af hudfoldens tykkelse på indsprøjtningstedet 72 timer efter tuberkulinindsprøjtningen.
- a) Negativ reaktion: hvis hævelsen kun er begrænset og ikke har forøget hudfoldens tykkelse mere end højst 2 mm, og der ikke er kliniske symptomer, som f.eks. diffust eller ekstensivt ødem, eksudation, nekroser, smerte eller betændelse i de omkringliggende lymfekar eller i lymfekirtlerne.
 - b) Usikker reaktion: hvis der ikke iagttages kliniske symptomer, jf. litra a), og hudfoldens tykkelse er forøget mere end 2 mm, men mindre end 4 mm.
 - c) Positiv reaktion: hvis der iagttages kliniske symptomer, jf. litra a), eller hvis hudfoldens tykkelse på indsprøjtningstedet er forøget med 4 mm eller mere.
- 2.2.5.3. Officielle intradermale tuberkulinprøver bedømmes således:
- 2.2.5.3.1. Enkelt intradermal prøve:
- a) positiv: reaktion som defineret i punkt 2.2.5.2, litra c)
 - b) usikker: reaktion som defineret i punkt 2.2.5.2, litra b)
 - c) negativ: en negativ bovin reaktion som defineret i punkt 2.2.5.2, litra a).
- Dyr, der reagerer usikkert på en enkelt intradermal prøve, prøves igen tidligst 42 dage senere.
- Dyr, der ikke reagerer på anden prøve, anses for at have reageret positivt.
- Dyr, der reagerer positivt på en enkelt intradermal prøve, kan underkastes en intradermal sammenlignende prøve, hvis der er mistanke om en falsk positiv reaktion eller en interferensreaktion.
- 2.2.5.3.2. Intradermal sammenlignende prøve med henblik på at give eller fortsat sikre kvægbedrifter status som officielt tuberkulosefri:
- a) Positiv: en positiv bovin reaktion, hvor hævelsen er mere end 4 mm større end ved aviærreaktionen, eller hvor der forekommer kliniske symptomer.
 - b) Usikker: en positiv eller usikker bovin reaktion, hvor hævelsen er mellem 1 og 4 mm større end ved aviærreaktionen, og hvor der ikke forekommer kliniske symptomer.
 - c) Negativ: en negativ bovin reaktion, eller en positiv eller usikker reaktion, hvor hævelsen svarer til eller er mindre end ved en positiv eller usikker aviærreaktion, og hvor der i intet tilfælde forekommer kliniske symptomer.
- Dyr, der reagerer usikkert på den intradermale sammenlignende prøve, prøves igen tidligst 42 dage senere. Dyr, der ikke reagerer på anden prøve, anses for at have reageret positivt.

- 2.2.5.3.3. En kvægbesætnings status som officielt tuberkulosefri kan suspenderes, og dyrene fra kvægbesætningen må ikke indgå i samhandelen inden for EF, før følgende dyrs status er afklaret:
- dyr, som har reageret usikkert på en enkelt intradermal tuberkulinprøve
 - dyr, som har reageret positivt på en enkelt intradermal tuberkulinprøve, men som senere skal underkastes en intradermal sammenlignende prøve
 - dyr, som har reageret usikkert på den intradermale sammenlignende prøve.
- 2.2.5.3.4. Hvis der ifølge EF-forskrifterne skal foretages en intradermal prøve, før dyrene flyttes, fortolkes prøven således, at dyr, der udviser en fortykkelse i hudfolden på mere end 2 mm eller kliniske symptomer, ikke må indgå i samhandelen i EF.
- 2.2.5.3.5. For at muliggøre påvisning af det størst mulige antal inficerede eller sygdomsramte dyr i en besætning eller i en region kan medlemsstaterne ændre kriterierne for fortolkning af prøven for at opnå forbedret prøvesensibilitet, så at alle usikre reaktioner som omhandlet i punkt 2.2.5.3.1, litra b), og punkt 2.2.5.3.2, litra b), anses for positive reaktioner.

3. SUPPLERENDE PRØVE

For at muliggøre påvisning af det størst mulige antal inficerede eller sygdomsramte dyr i en besætning eller i en region kan medlemsstaterne tillade brugen af gamma-interferon-prøven som omhandlet i OIE's Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4. udgave, 2000, kapitel 2.3.3 (kvægtuberkulose), ud over tuberkulinprøven.

4. STATSINSTITUTTER OG NATIONALE REFERENCELABORATORIER

4.1. Opgaver og ansvar

Statsinstitutterne og referencelaboratorierne i punkt 4.2 er ansvarlige for den officielle prøvning af tuberkuliner eller reagenser i punkt 2 og 3 i deres respektive stater for at sikre, at disse tuberkuliner eller reagenser opfylder ovennævnte standarder.

4.2. Liste over statsinstitutter og nationale referencelaboratorier

- Tyskland:
Paul-Ehrlich Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-23207 Langen; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin — Bereich Jena — D-07743 Jena
- Belgien:
Institut Scientifique de la Santé Publique — Louis Pasteur, 14 Rue Juliette Wytzman — B-1050 Bruxelles/Brussel
- Frankrig:
Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fougères
- Storhertugdømmet Luxembourg:
Leveringslandets institut
- Italien:
Istituto superiore di sanità, Roma
- Nederlandene:
Centraal Instituut voor Dierziekte Controle Lelystad (CIDC-Lelystad), Lelystad
- Danmark:
Danmarks Veterinærinstitut, Bülowsvej 27, DK-1790 København
- Irland:
Leverandørlandets institut
- Det Forenede Kongerige:
Veterinary Laboratory Agency, Addlestone, Weybridge
- Grækenland:
Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων, Νεαπόλεως 25, 153 10 Αθήνα

- 11) Spanien:
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Granada
 - 12) Portugal:
Laboratório Nacional de Investigaçao Veterinária, Lisboa
 - 13) Østrig:
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling
 - 14) Finland:
Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimus laitos — Forskningsanstalten för veterinärmedicin och livsmedel,
Helsinki
 - 15) Sverige:
Statens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala.«
-