

II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

CONSIGLIO

DIRETTIVA DEL CONSIGLIO

del 14 giugno 1988

che modifica la direttiva 64/432/CEE per quanto concerne la leucosi bovina e che abroga la direttiva 80/1102/CEE

(88/406/CEE)

IL CONSIGLIO DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea, in particolare l'articolo 43,

vista la proposta della Commissione ⁽¹⁾,

visto il parere del Parlamento europeo ⁽²⁾,

visto il parere del Comitato economico e sociale ⁽³⁾,

considerando che uno dei compiti della Comunità nel settore veterinario è il miglioramento dello stato di salute degli allevamenti, allo scopo di migliorarne il rendimento;

considerando che a tal fine è necessario proteggere la Comunità contro la leucosi bovina enzootica; che, del resto, la Comunità ha già avviato, con le direttive 77/391/CEE ⁽⁴⁾ e 78/52/CEE ⁽⁵⁾ e la decisione 87/58/CEE ⁽⁶⁾, un'azione intesa a sradicare questa malattia;

considerando che le azioni di questo tipo devono contribuire a sopprimere gli ostacoli che sussistono negli scambi intracomunitari di animali vivi, dovuti alle diverse condizioni sanitarie;

considerando che a tal fine sono state introdotte, fino al 31 dicembre 1987, misure di protezione contro la leucosi bovina enzootica nella direttiva 64/432/CEE del Consiglio,

del 26 giugno 1964, relativa a problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina ⁽⁷⁾, modificata da ultimo dal regolamento (CEE) n. 3805/87 ⁽⁸⁾;

considerando che conviene prorogare queste misure, pur riconoscendo nuovi metodi di ricerca della leucosi bovina enzootica;

considerando che, dopo un periodo transitorio, conviene porre fine alle norme particolari previste dall'attuale regime per i paesi che applicano programmi nazionali di lotta contro la malattia in questione;

considerando che è opportuno prevedere norme per la qualificazione degli allevamenti rispetto alla leucosi bovina enzootica;

considerando che per qualificare i loro allevamenti gli Stati membri devono attuare un programma per sottoporli ad uno degli esami per la ricerca della leucosi previsti nell'allegato G della direttiva 64/432/CEE;

considerando che, ad eccezione degli animali destinati alla macellazione di età inferiore a 30 mesi, gli animali destinati agli scambi intracomunitari dovranno provenire da un allevamento controllato ed essere stati sottoposti ad un esame individuale,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Con effetto dal 1° luglio 1988, la direttiva 64/432/CEE è modificata come segue:

⁽⁷⁾ GU n. 121 del 29. 7. 1964, pag. 1977/64.

⁽⁸⁾ GU n. L 357 del 19. 12. 1987, pag. 1.

⁽¹⁾ GU n. C 5 del 9. 1. 1988, pag. 5.

⁽²⁾ GU n. C 49 del 22. 2. 1988, pag. 164.

⁽³⁾ GU n. C 80 del 28. 3. 1988, pag. 34.

⁽⁴⁾ GU n. L 145 del 13. 6. 1977, pag. 44.

⁽⁵⁾ GU n. L 15 del 19. 1. 1978, pag. 34.

⁽⁶⁾ GU n. L 24 del 27. 1. 1987, pag. 51.

- 1) All'articolo 2 è aggiunta la lettera seguente:
- «s) Allevamento indenne da leucosi bovina enzootica: un allevamento nel quale:
- nessun caso di leucosi bovina enzootica sia stato constatato, clinicamente oppure come risultato degli esami effettuati conformemente all'allegato G, né confermato nel corso degli ultimi due anni;
 - tutti gli animali di età superiore ai 24 mesi, abbiano, nel corso degli ultimi 12 mesi, reagito negativamente a due esami praticati conformemente all'allegato G, ad un intervallo di almeno 4 mesi oppure, nel caso di un allevamento che abbia già soddisfatto questo requisito, ad un solo esame, praticato conformemente al suddetto allegato;
 - a decorrere dalla data del primo controllo si trovino solo animali che vi siano nati o che provengano da un allevamento indenne da leucosi bovina enzootica.»
- 2) All'articolo 3, paragrafo 2 è aggiunta la lettera seguente:
- «j) purché si tratti di bovini di allevamento riproduttori di razza pura, quali sono definiti all'articolo 1 della direttiva 77/504/CEE, esclusivamente riservati alla riproduzione e di grande valore, provenire da un allevamento:
- in cui non sia stato portato a conoscenza del veterinario ufficiale alcun fatto che consenta di desumere l'esistenza di casi di leucosi bovina enzootica nel corso degli ultimi due anni;
 - il cui proprietario abbia dichiarato di non essere stato a conoscenza di tali fatti e abbia inoltre dichiarato per iscritto che l'animale o gli animali destinati agli scambi intracomunitari sono nati e sono stati allevati in tale allevamento o hanno fatto parte integrante di detto allevamento nei precedenti 12 mesi.»
- 3) L'articolo 3, paragrafo 3 è completato dalla lettera seguente:
- «d) provenire da un allevamento in cui nulla abbia consentito di desumere l'esistenza di casi di leucosi bovina enzootica nel corso degli ultimi due anni e, se di età superiore a 12 mesi, essere stati sottoposti, con esito negativo nei 30 giorni precedenti il carico, ad un esame individuale praticato conformemente all'allegato G.
- Tuttavia, questo esame non sarà necessario per i bovini di sesso maschile e per i bovini castrati di età inferiore a 30 mesi e destinati alla produzione di carne, purché al momento del carico questi animali rechino un contrassegno particolare di identificazione e lo Stato membro prenda le disposizioni per evitare la contaminazione degli allevamenti locali.»
- 4) All'articolo 7, paragrafo 1 è aggiunta la lettera seguente:
- «G. Per quanto riguarda i bovini di sesso femminile di età inferiore a 30 mesi e destinati alla produzione di carne, che in deroga all'articolo 3, paragrafo 3, lettera d) non sono stati sottoposti ad alcun esame individuale. Tali animali devono recare un contrassegno particolare. Lo Stato membro destinatario adotta tutte le disposizioni per evitare la contaminazione degli allevamenti locali.»
- 5) L'articolo 8, paragrafo 2 è completato dal comma seguente:
- «Per quanto riguarda in particolare la leucosi bovina enzootica e gli animali di cui all'articolo 3, paragrafo 2, lettera j), gli Stati membri sono autorizzati, nell'osservanza delle disposizioni generali del trattato, ad esigere altresì che tutti gli animali dell'allevamento di provenienza, di età superiore a 24 mesi alla data dell'esame, abbiano, nel corso degli ultimi 12 mesi, reagito negativamente ad un esame effettuato conformemente all'allegato G. Tali garanzie non possono però essere richieste per l'introduzione di animali provenienti da uno Stato membro qualora, secondo la procedura prevista all'articolo 12, sia riconosciuto che esso offre garanzie sufficienti per quanto riguarda la leucosi bovina enzootica.»
- 6) È inserito l'articolo seguente:
- «Articolo 8 bis
- Gli Stati membri che, dal 1980, applicano un programma obbligatorio nazionale di profilassi della leucosi bovina enzootica, possono subordinare l'introduzione sul proprio territorio di bovini da allevamento o da produzione destinati ad essere integrati in allevamenti bovini non sospetti di leucosi, alla presentazione di un certificato compilato il giorno del carico da un veterinario ufficiale competente e redatto almeno nella o nelle lingue del paese destinatario, dal quale risulti che:
 - il predetto veterinario non è stato a conoscenza di fatti da cui si possa desumere l'esistenza di casi di leucosi bovina enzootica nell'allevamento di provenienza negli ultimi tre anni e che il proprietario dell'allevamento ha dichiarato di non essere a conoscenza di tali fatti e ha inoltre dichiarato per iscritto che l'animale o gli animali destinati agli scambi intracomunitari sono nati e cresciuti nell'allevamento stesso o ne hanno fatto parte integrante negli ultimi 12 mesi;
 - negli ultimi 12 mesi, tutti i bovini di oltre 24 mesi d'età alla data dell'esame, appartenenti all'allevamento di provenienza, hanno reagito negativamente a un esame eseguito conformemente all'allegato G.
- Secondo la procedura prevista all'articolo 12, gli Stati membri diversi da quelli di cui al paragrafo 1, possono essere autorizzati ad applicare gli stessi requisiti

al proprio territorio o, per quanto concerne il Regno Unito, all'Irlanda del Nord se un piano di eradicazione della leucosi bovina enzootica vi è attuato in applicazione della decisione 87/58/CEE o se è provato che, alla data in cui il comitato veterinario permanente è stato interpellato, essi vi applicano da almeno 2 anni un programma minimo di eradicazione comprendente i seguenti requisiti minimi:

- tutti i tumori riscontrati negli organi e nel sistema linfatico di bovini devono essere notificati ed esaminati dal punto di vista istologico da un laboratorio veterinario posto sotto il controllo diretto di uno dei laboratori menzionati nell'allegato G;
- tutti i bovini degli allevamenti che hanno avuto un contatto contagioso con un animale su cui è stato riscontrato un tumore leucotico sono sottoposti ad un esame di ricerca della leucosi bovina enzootica, effettuato in conformità dell'allegato G, in un laboratorio posto sotto il controllo diretto di uno dei laboratori menzionati nello stesso allegato;
- in un allevamento in cui su un animale è stato riscontrato un tumore leucotico e per cui è stata confermata la diagnosi di leucosi bovina enzootica, gli animali infetti potranno uscire dagli allevamenti soltanto per essere macellati, sotto il controllo delle autorità competenti. L'allevamento deve rimanere sotto controllo ufficiale fino al momento in cui non vi sia potuto avere esito negativo in almeno due esami effettuati, ad intervalli di almeno quattro mesi, su tutti i bovini di età superiore a 24 mesi, in conformità dell'allegato G, in un laboratorio posto sotto il controllo diretto di uno dei laboratori menzionati nello stesso allegato.

Le condizioni complementari cui può essere subordinata tale estensione per ciascuno Stato membro o parte di territorio interessato possono essere precisate nella decisione prevista al primo comma.»

7) Nell'allegato E, alla fine della lettera a) è aggiunto il trattino seguente:

«— leucosi bovina enzootica.»

8) Nell'allegato F, modello I:

a) Al punto V:

aa) dopo la lettera d), è inserita la lettera seguente:

«e) — sono stati mantenuti negli ultimi 12 mesi ⁽⁵⁾ o, se di età inferiore a 12 mesi, dalla nascita, in un allevamento in cui, nel corso degli ultimi tre anni ⁽⁵⁾, a conoscenza del sottoscritto e secondo le assicurazioni date dal proprietario, non è stato accertato alcun caso di leucosi bovina enzootica ⁽²⁾ ⁽¹²⁾,

- provengono da un allevamento in cui nulla ha permesso di desumere l'esistenza di leucosi bovina enzootica negli ultimi tre anni ⁽²⁾,
- alla data dell'esame, tutti i bovini di età superiore a 24 mesi sono stati sottoposti ⁽²⁾ ⁽¹²⁾ nel corso degli ultimi 12 mesi ⁽⁵⁾, con risultato negativo, ad un esame individuale ⁽¹³⁾,
- hanno reagito negativamente ⁽²⁾ ⁽⁵⁾ ⁽¹¹⁾ entro il termine prescritto di 30 giorni ⁽⁵⁾ ad un esame individuale ⁽¹³⁾ per la ricerca della leucosi bovina enzootica,
- sono destinati all'ingrasso ⁽²⁾ ⁽¹¹⁾»

bb) le lettere da e) a i) diventano le lettere da f) a j).

b) sono aggiunte le note seguenti:

«⁽¹¹⁾ Questa eccezione è consentita solo per gli animali di sesso maschile di età inferiore a 30 mesi destinati all'ingrasso, sempreché tali animali rechino un contrassegno distintivo e siano sottoposti ad un controllo particolare nel paese di destinazione.

⁽¹²⁾ Tale indicazione è necessaria solo per gli animali riproduttori di razza pura, esclusivamente riservati alla riproduzione e di grande valore.

⁽¹³⁾ L'esame individuale è stato effettuato conformemente all'allegato G della direttiva 64/432/CEE.»

9) È aggiunto l'allegato G che figura nell'allegato della presente direttiva.

Articolo 2

Con effetto dal 1° luglio 1990 la direttiva 64/432/CEE è modificata come segue:

1) L'articolo 3, paragrafo 2, lettera j) è soppresso.

2) All'articolo 3, paragrafo 3 il testo della lettera d) è sostituito dal testo seguente e sono aggiunte le lettere e) ed f) seguenti:

«d) provenire da un allevamento indenne da leucosi bovina enzootica ai sensi dell'articolo 2, lettera s);

e) oltre al requisito di cui alla lettera d), se sono di età superiore a 12 mesi, aver reagito negativamente ad un esame individuale effettuato, in conformità dell'allegato G, nei 30 giorni precedenti la data del carico;

- f) non essere soggetti ai requisiti delle lettere d) ed e), quando si tratta di bovini di età inferiore a 30 mesi destinati alla produzione di carne, i quali:
- i) provengano da un allevamento nel quale nessun caso di leucosi bovina enzootica è stato notificato e confermato negli ultimi due anni;
 - ii) siano contrassegnati con uno speciale marchio al momento del carico e restino sotto sorveglianza sino alla macellazione,
- sempreché lo Stato di destinazione prenda tutte le misure per evitare la contaminazione degli allevamenti locali.»

3) L'articolo 7, paragrafo 1, lettera G è soppresso.

4) L'articolo 8, paragrafo 2, ultimo comma è soppresso.

5) L'articolo 8 bis è soppresso.

6) Nel modello I dell'allegato F:

— Al punto V il testo della lettera e) è sostituito dal testo seguente:

- «e) — sono stati mantenuti negli ultimi 12 mesi ⁽⁵⁾ o, se di età inferiore a 12 mesi ⁽⁵⁾, dalla nascita, in un allevamento indenne dalla leucosi bovina enzootica ⁽²⁾ ⁽¹¹⁾,
- hanno reagito negativamente entro il termine prescritto di 30 giorni ⁽⁵⁾ ad un esame individuale ⁽¹²⁾ per la ricerca della leucosi bovina enzootica ⁽²⁾ ⁽¹¹⁾,
- sono destinati all'ingrasso ⁽¹¹⁾»,

— La nota a piè di pagina ⁽¹¹⁾ è sostituita dalla nota seguente:

«⁽¹¹⁾ questa eccezione è consentita solo per i bovini di età inferiore a 30 mesi destinati all'ingrasso, sempreché gli animali

- provengano da un allevamento in cui nessun caso di leucosi bovina enzootica sia stato notificato e confermato negli ultimi due anni,
- rechino un contrassegno distintivo e siano sottoposti ad un controllo particolare nel paese di destinazione.»

— La nota a piè di pagina ⁽¹²⁾ è soppressa.

— La nota a piè di pagina ⁽¹³⁾ diventa la nota ⁽¹²⁾.

Articolo 3

1. Per qualificare gli allevamenti come indenni da leucosi bovina enzootica, gli Stati membri attuano un programma in modo da sottoporre i propri allevamenti ad uno degli esami indicati nell'allegato G della direttiva 64/432/CEE.

2. Gli Stati membri informano la Commissione almeno una volta all'anno in merito allo svolgimento del proprio programma ed in merito ai risultati ottenuti dall'applicazione dello stesso.

Articolo 4

Anteriormente al 1° gennaio 1990 il Consiglio, deliberando su proposta della Commissione, fissa i criteri che consentono il riconoscimento di uno Stato membro o di parte del territorio di uno Stato membro come indenne da leucosi bovina enzootica e le condizioni da attuare per garantire il mantenimento di tale status, nonché le norme applicabili agli scambi a partire da regioni o Stati membri indenni da leucosi bovina enzootica.

Articolo 5

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni necessarie per conformarsi alle prescrizioni:

- degli articoli 1 e 3, al più tardi il 1° luglio 1988,
- dell'articolo 2, al più tardi il 1° luglio 1990.

Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 6

La direttiva 80/1102/CEE ⁽¹⁾ è abrogata.

Articolo 7

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Lussemburgo, addì 14 giugno 1988.

Per il Consiglio

Il Presidente

I. KIECHLE

⁽¹⁾ GU n. L 325 dell'1. 12. 1980, pag. 18.

ALLEGATO

„ALLEGATO G”

ESAMI PER LA RICERCA DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

La ricerca della leucosi bovina enzootica è effettuata mediante un esame di immunodiffusione come descritto nelle lettere A e B o mediante un saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) come descritto nella lettera C. L'esame di immunodiffusione è effettuato solo in esami individuali.

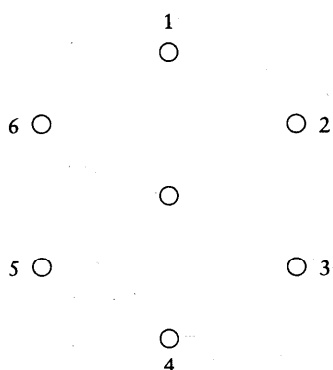
In caso di contestazione debitamente motivata dei risultati degli esami, si effettua un controllo complementare mediante un esame di immunodiffusione.

A. Reazione di immunodiffusione su gel di agar

1. L'antigene da impiegare nella prova deve contenere glicoproteine del virus della leucosi bovina. Esso va standardizzato rispetto a un siero di riferimento (siero E 1) fornito dal laboratorio sierologico veterinario statale danese di Copenaghen.
2. La responsabilità della standardizzazione degli antigeni di laboratorio rispetto al siero ufficiale CEE di riferimento (siero E 1) fornito dal laboratorio sierologico veterinario di Stato di Copenaghen è affidata ai seguenti istituti:

a) Germania	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere—Tübingen;
b) Belgio	Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelles
c) Francia	Laboratoire national de pathologie bovine, Lyon
d) Granducato del Lussemburgo	—
e) Italia	Istituto zooprofilattico sperimentale, Perugia
f) Paesi Bassi	Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam
g) Danimarca	Statens Veterinære Serumlaboratorium, København
h) Irlanda	Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin
i) Regno Unito	
1. Gran Bretagna	The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England,
2. Irlanda del Nord	The Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast
j) Spagna	Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Barcelona
k) Portogallo	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa.
3. Gli antigeni standard di laboratorio devono essere presentati almeno una volta all'anno ai laboratori di riferimento CEE elencati al paragrafo 2 per essere esaminati in rapporto al siero CEE. Indipendentemente da detta standardizzazione, l'antigene in uso può essere standardizzato secondo la tecnica descritta alla lettera B.
4. I reattivi da impiegare sono i seguenti:
 - a) antigene: esso dovrà contenere le glicoproteine specifiche del virus della leucosi bovina enzootica standardizzato rispetto al siero ufficiale CEE;
 - b) siero in esame;
 - c) siero di controllo riconosciuto positivo;
 - d) gel di agar
 - 0,8 % di agar
 - 8,5 % di NaCl
 - tampone Tris 0,05 M a pH 7,2;
 - versare 15 ml di questo terreno in una scatola Petri del diametro di 85 mm, in modo da ottenere uno strato dello spessore di 2,6 mm.
5. Nell'agar sul fondo della scatola ricavare sette pozzetti, esenti da umidità e distribuiti come segue: un pozzetto centrale e 6 pozzetti disposti in cerchio attorno ad esso;
 - diametro del pozzetto centrale : 4 mm,
 - diametro dei pozzetti periferici: 6 mm,
 - distanza fra il pozzetto centrale e i pozzetti periferici: 3 mm.

6. Riempire il pozzetto centrale con l'antigene standard, i pozzetti periferici 1 e 4 (vedi lo schema) con un siero riconosciuto come positivo e i pozzetti 2, 3, 5 e 6 con i sieri in esame. Il riempimento va effettuato fino a scomparsa del menisco.



7. Le quantità di reattivi da impiegare sono dunque le seguenti:

antigene: 32 microlitri,
 siero di controllo: 73 microlitri.
 sieri in esame: 73 microlitri.

8. Incubare per 72 ore a temperatura ambiente (20—27 °C), in atmosfera confinata ed umida.
9. La lettura può essere effettuata dopo 24 e 48 ore, ma non è possibile ottenere il risultato finale prima di 72 ore.
- a) Il siero in esame è positivo se forma una linea specifica di precipitine con l'antigene del virus della LBE e una linea completa di identità con il siero di riferimento;
- b) il siero in esame è negativo se non forma una linea specifica di precipitazione con l'antigene della LBE e se non provoca l'incurvamento della linea del siero di riferimento;
- c) la reazione è considerata non conclusiva:
- i) se la linea del siero di riferimento si incurva verso l'antigene della LBE senza formare con l'antigene una linea di precipitine visibile, ovvero
- ii) se non può essere interpretata come negativa o positiva.

Quando la reazione non è conclusiva, la prova può essere ripetuta e può essere impiegato siero concentrato.

B. Metodo per la standardizzazione dell'antigene

Soluzioni e materiali necessari:

- 40 ml di agarosio all'1,6% in tampone Tris/HCl 0,05 a pH 7,2, contenente l'8,5% di NaCl;
- 15 ml di siero della leucosi bovina, contenente anticorpi delle sole glicoproteine del virus della leucosi bovina, diluito 1:10 in tampone Tris/HCl 0,05 M a pH 7,2, contenente l'8,5% di NaCl;
- 15 ml di siero della leucosi bovina, contenente anticorpi delle sole glicoproteine del virus della leucosi bovina, diluito 1:5 in tampone Tris/HCl 0,05 a pH 7,2, contenente l'8,5% di NaCl;
- 4 scatole Petri in plastica, del diametro di 85 mm;
- un punzone del diametro di 4—6 mm;
- antigene di riferimento;
- antigene da standardizzare;
- bagnomaria (56 °C).

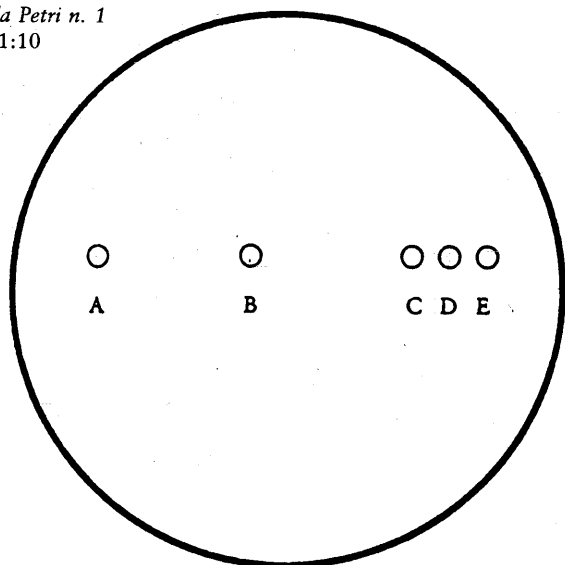
Modo di operare:

Sciogliere l'agarosio (1,6%) nel tampone Tris/HCl, riscaldando cautamente a 100 °C. Mettere in bagnomaria a 56 °C per circa 1 ora. Porre in bagnomaria a 56 °C anche le diluizioni di siero della leucosi bovina.

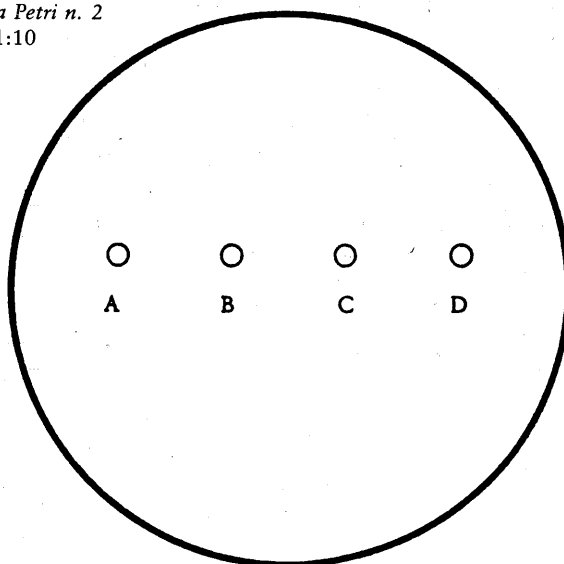
Mescolare 15 ml della soluzione di agarosio a 56 °C con 15 ml di siero della leucosi bovina (1:10), agitare rapidamente e versare due porzioni da 15 ml della miscela in due scatole Petri. Ripetere il procedimento con il siero della leucosi bovina diluito 1:5.

Quando l'agarosio si è solidificato, praticare i pozzetti secondo il seguente schema:

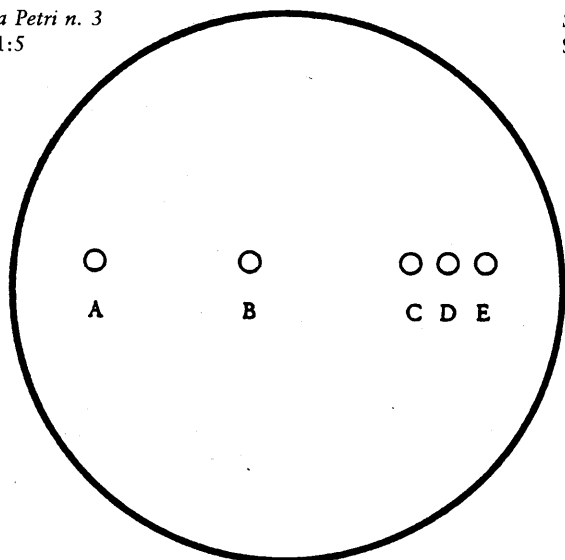
Scatola Petri n. 1
Siero 1:10



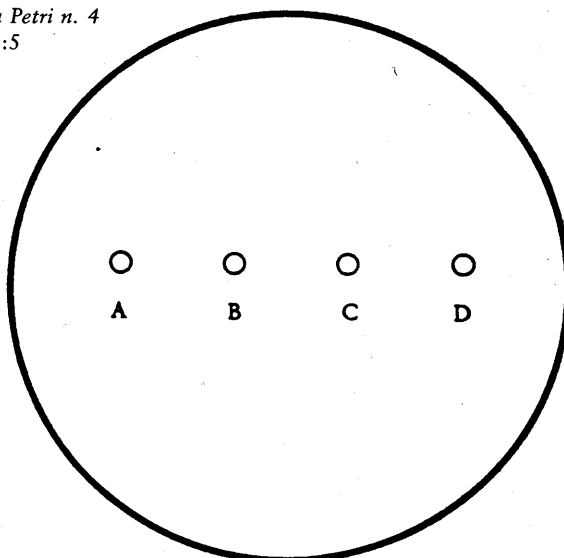
Scatola Petri n. 2
Siero 1:10



Scatola Petri n. 3
Siero 1:5



Scatola Petri n. 4
Siero 1:5



Aggiunta di antigene

I. Scatole Petri 1 e 3:

- | | |
|----------------|---|
| pozzetto A | — antigene di riferimento non diluito, |
| pozzetto B | — antigene di riferimento, diluito 1:2, |
| pozzetti C + E | — antigene di riferimento, |
| pozzetto D | — antigene da controllare, non diluito. |

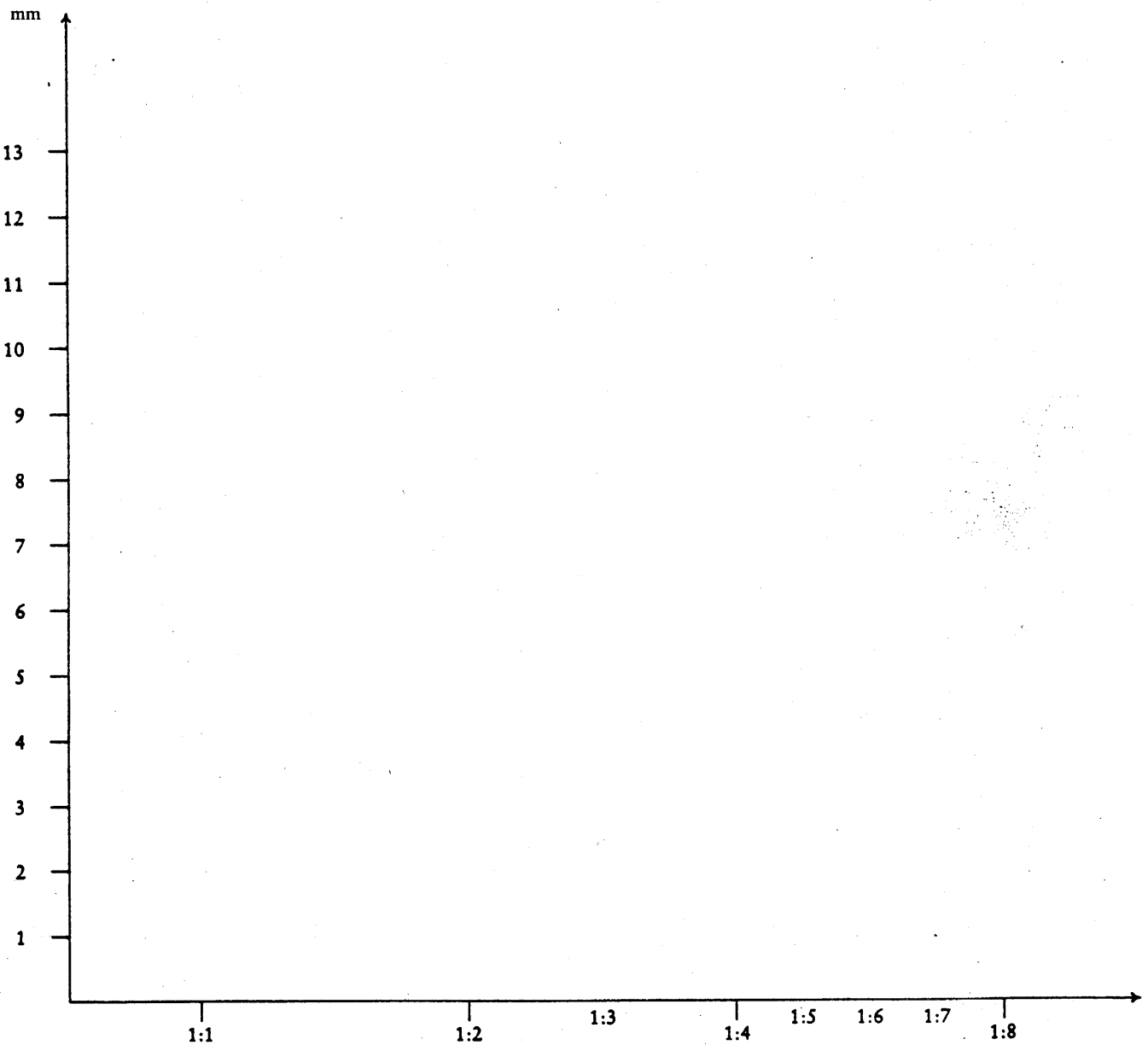
II. Scatole Petri 2 e 4:

- | | |
|------------|-----------------------------------|
| pozzetto A | — antigene in esame, non diluito, |
| pozzetto B | — antigene in esame, diluito 1:2, |
| pozzetto C | — antigene in esame, diluito 1:4, |
| pozzetto D | — antigene in esame, diluito 1:8. |

Istruzioni complementari

1. Per realizzare una precipitazione ottimale, l'esperimento va effettuato con due diluizioni di siero (1:5 e 1:10).
2. Se il diametro di precipitazione è troppo piccolo ad ambedue le diluizioni, il siero va ulteriormente diluito.
3. Se la precipitazione per ambedue le diluizioni è indistinta e il diametro è troppo grande, per il siero va scelta una diluizione inferiore.
4. La concentrazione finale dell'agarosio deve essere dello 0,8 %; quella dei sieri deve essere rispettivamente del 5% e del 10%.
5. Riportare i diametri misurati sull'accluso sistema di assi coordinati. La diluizione di lavoro deve corrispondere alla diluizione dell'antigene sotto prova che ha lo stesso diametro dell'antigene di riferimento.

Diametro



Diluizione dell'antigene

«C. Saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per la ricerca della leucosi bovina enzootica

1. Per procedere al saggio ELISA occorrono le attrezzature e i reattivi qui indicati:

- a) micropiastre, cuvette o qualsiasi altro recipiente per la fase solida;
- b) l'antigene è fissato sulla fase solida con o senza l'ausilio di anticorpi leganti policlonali o monoclonali. Se la fase solida è rivestita direttamente dall'antigene, tutti i campioni in esame che presentano reazione positiva devono essere riesaminati facendo riferimento all'antigene di controllo. Quest'ultimo deve essere identico all'antigene in questione, salvo nel caso di antigeni della leucosi bovina enzootica. Se gli anticorpi leganti sono distribuiti sulla fase solida, gli anticorpi non devono reagire ad antigeni diversi da quelli della leucosi bovina enzootica;
- c) il fluido biologico (siero o latte) da esaminare;
- d) un controllo positivo o negativo;
- e) il coniugato: una qualunque immunoglobulina antibovina biotinilata o coniugata con un enzima oppure una immunoglobulina anti-BLV biotinilata o coniugata con un enzima;
- f) l'avidina: enzima per le prove, qualora si utilizzino preparati di immunoglobulina biotinilata;
- g) un substrato adatto all'enzima impiegato;
- h) una soluzione di arresto;
- i) soluzioni tamponate per la diluizione dei campioni per la preparazione dei reattivi e per il lavaggio;
- j) un sistema di lettura con filtri appropriati corrispondenti al substrato impiegato.

2. *Standardizzazione e sensibilità della prova*

La sensibilità del saggio ELISA deve essere di livello tale che il siero E4 risulti positivo quando è diluito 10 volte (campioni di siero) o 250 volte (campioni di latte) più della diluizione ottenuta da singoli campioni presi congiuntamente.

Nelle prove in cui i campioni (siero e latte) sono esaminati individualmente, il siero E4 diluito nella proporzione di 1:10 (nel siero negativo) o di 1:250 (nel latte negativo) deve presentare una reazione positiva quando è esaminato in una diluizione di prova uguale a quella impiegata per le prove individuali.

Il siero E4 è fornito dal laboratorio veterinario nazionale di Copenaghen.

3. *Condizioni di utilizzazione del saggio ELISA*

Il metodo ELISA può essere utilizzato su un campione di latte prelevato dal latte proveniente da un'azienda in cui almeno il 30 % delle vacche da latte sono in lattazione a condizione che il campione si riferisca al latte prodotto da meno di 50 vacche ed ad una concentrazione di siero di latte ricavato dal latte proveniente da un numero di vacche compreso tra un minimo di 20 ed un massimo di 50, e che, qualora il latte raccolto provenga da più di 50 vacche, il numero di prelievi sia aumentato proporzionalmente.

Il metodo ELISA può essere altresì utilizzato su un campione di sangue prelevato da non più di 50 animali.

Se si ricorre ad una delle facoltà precitate, si devono prendere misure per garantire la corrispondenza tra i campioni prelevati e gli animali da cui provengono il latte esaminato o i sieri.

In caso di risultato positivo su uno dei campioni, il bestiame deve restare sotto controllo ufficiale fin quando non sia stato registrato un risultato negativo per almeno due esami individuali effettuati, ad un intervallo minimo di quattro mesi, su tutti i bovini di età superiore ai sei mesi, conformemente alle succitate disposizioni, e in un laboratorio direttamente ispezionato da un laboratorio menzionato al punto A.»