

REGOLAMENTO (CE) N. 1226/2002 DELLA COMMISSIONE
dell'8 luglio 2002
che modifica l'allegato B della direttiva 64/432/CEE del Consiglio

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la 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 ⁽¹⁾, modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 535/2002 della Commissione ⁽²⁾, in particolare l'articolo 16, paragrafo 1, secondo comma,

considerando quanto segue:

- (1) L'11 ottobre 1999 il comitato scientifico per la salute e il benessere degli animali ha adottato una relazione ⁽³⁾ concernente l'adeguamento degli allegati tecnici della direttiva 64/432/CEE per tener conto degli sviluppi scientifici in materia di tubercolosi, brucellosi e leucosi bovina enzootica.
- (2) Secondo tale relazione, le prove per la tubercolosi devono essere effettuate conformemente al Manuale di norme per le prove diagnostiche e i vaccini dell'Ufficio internazionale delle epizootie (OIE), terza edizione, 1996.
- (3) Nell'agosto 2001 l'OIE ha pubblicato la quarta edizione del suddetto manuale, che contiene alcune modifiche della descrizione delle prove per la tubercolosi.

- (4) Nel gennaio 2002 la direzione europea per la qualità dei medicinali ha pubblicato la quarta edizione della Farmacopea europea, che contiene le monografie 0535 e 0536 sul derivato proteico purificato della tubercolina bovina e aviaria.
- (5) È quindi necessario modificare l'allegato B della direttiva 64/432/CEE in modo da definire le procedure di prova da applicare ai fini della sorveglianza e degli scambi all'interno della Comunità, tenendo conto del parere del comitato scientifico veterinario.
- (6) Le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato B della direttiva 64/432/CEE è sostituito dall'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, l'8 luglio 2002.

Per la Commissione

David BYRNE

Membro della Commissione

⁽¹⁾ GU L 21 del 29.7.1964, pag. 1977/64.

⁽²⁾ GU L 80 del 23.3.2002, pag. 22.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

ALLEGATO

«ALLEGATO B

TUBERCOLOSI

1. IDENTIFICAZIONE DELL'AGENTE EZIOLOGICO

La presenza del *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agente della tubercolosi bovina, su campioni clinici e post mortem può essere dimostrata esaminando uno striscio colorato o con le tecniche di immunoperossidasi e confermata da una cultura dell'organismo in un substrato primario di isolamento.

Il tessuto patologico per la conferma di *M. bovis* deve essere prelevato su linfonodi anormali e organi parenchimatosi come i polmoni, il fegato, la milza ecc. Quando l'animale non presenta lesioni patologiche, occorre prelevare campioni dai linfonodi retrofaringei, bronchiali, mediastinici, sopramammari, mandibolari e da alcuni linfonodi mesenterici e dal fegato, per sottoporli ad analisi e cultura.

L'identificazione degli isolati di solito può essere attuata attraverso la determinazione delle proprietà biochimiche e delle caratteristiche della cultura. Per individuare il complesso della tubercolosi *M.* si può anche utilizzare la reazione a catena della polimerasi (PCR). Le tecniche di analisi del DNA possono rivelarsi più rapide e attendibili dei metodi biochimici per differenziare il *Mycobacterium bovis* da altri individui del complesso della tubercolosi *M.* Le impronte genetiche permettono di distinguere tra i vari ceppi di *M. bovis* nonché di descrivere i modelli dell'origine, della trasmissione e della diffusione di *M. bovis*.

Le tecniche e i materiali utilizzati, la loro normalizzazione e l'interpretazione dei risultati devono essere conformi a quanto prescritto nel Manuale di norme per le prove diagnostiche e i vaccini dell'OIE (IV edizione, 2000), capitolo 2.3.3 (tubercolosi dei bovini).

2. LA PROVA CUTANEA DI REAZIONE ALLA TUBERCOLINA

Per l'esecuzione delle prove cutanee ufficiali di reazione alla tubercolina, da eseguire secondo le procedure indicate al punto 2.2, deve essere utilizzata la tubercolina PPD (derivati proteici purificati) rispondente alle norme indicate nel punto 2.1.

2.1. Norme per la tubercolina (bovina e aviaria)

2.1.1. Definizione

Il derivato proteico purificato di tubercolina (tubercolina PPD, bovina o aviaria) è un preparato ottenuto da prodotti di crescita e di lisi di *Mycobacterium bovis* o, secondo i casi, di *Mycobacterium avium*, sottoposti a trattamento termico, in grado di rivelare un'ipersensibilità ritardata in un animale sensibilizzato a microorganismi della stessa specie.

2.1.2. Produzione

Si ottiene da frazioni solubili in acqua, preparate scaldando al vapore libero e successivamente filtrando le colture di *Mycobacterium bovis* o, secondo i casi, di *Mycobacterium avium*, sviluppatasi in un substrato liquido sintetico. La frazione attiva del filtrato, costituita in massima parte da proteine, viene isolata per precipitazione, lavata e nuovamente diluita. Si possono aggiungere conservanti antimicrobici come il fenolo, che non diano luogo a reazioni falsamente positive. Il preparato finale sterile, esente da *Mycobacterium*, viene ripartito in condizioni asettiche in recipienti di vetro a prova di manomissione che vengono chiusi in modo da evitare qualsiasi contaminazione. Il preparato può essere liofilizzato.

2.1.3. Identificazione del prodotto

Si inocula per via intradermica, in diversi punti, una serie di dosi titolate su cavie albine sensibilizzate di peso non inferiore a 250 g ciascuna. Dopo 24-28 ore, nei punti dell'inoculazione si osservano reazioni sotto forma di gonfiore edematoso accompagnato da eritema, con o senza necrosi. Le dimensioni e la gravità delle reazioni variano in funzione della dose. Le cavie non sensibilizzate non presentano reazioni a iniezioni di questo tipo.

2.1.4. Prove

2.1.4.1. pH: il pH è compreso tra 6,5 e 7,5.

- 2.1.4.2. Fenolo: se il preparato da esaminare contiene fenolo, la concentrazione non deve superare 5 g/l.
- 2.1.4.3. Sensibilizzazione: si utilizza un gruppo di tre cavie non trattate con materiali che possano interferire con la prova. A tre riprese e ad intervalli di cinque giorni si procede ad un'iniezione intradermica, su ciascuna cavia, di una dose del preparato da esaminare, equivalente a 500 UI in 0,1 ml. Da 15 a 21 giorni dopo la terza iniezione si inietta per via intradermica la stessa dose (500 UI) sugli stessi animali e su un gruppo di controllo di 3 cavie dello stesso peso, alle quali non sia stata fatta in precedenza alcuna iniezione di tubercolina. Da 24 a 28 ore dopo le ultime iniezioni le reazioni dei due gruppi non presentano differenze significative.
- 2.1.4.4. Tossicità: si utilizzano due cavie di peso non inferiore a 250 grammi ciascuna, non trattate in precedenza con materiali che possano interferire con la prova. Si opera un'iniezione sottocutanea in ciascuna cavia di 0,5 ml del preparato da esaminare. Gli animali sono tenuti sotto osservazione per 7 giorni. Nel periodo di osservazione non si producono effetti anormali.
- 2.1.4.5. Sterilità: attenersi alla prova di sterilità prescritta nella monografia sui vaccini ad uso veterinario riportata nella IV edizione 2002 della Farmacopea europea.
- 2.1.5. *Attività*

L'attività della tubercolina PPD (bovina e aviaria) è determinata comparando le reazioni prodotte in cavie sensibilizzate attraverso un'iniezione intradermica di una serie di diluizioni del preparato da analizzare con quelle prodotte da concentrazioni note di un preparato di riferimento di tubercolina PPD (bovina o aviaria, a seconda dei casi) calibrata in Unità internazionali (UI).

Per la prova dell'attività occorre sensibilizzare non meno di 9 cavie albine, di peso compreso tra 400 e 600 g ciascuna, con un'iniezione intramuscolare profonda di 0,0001 mg di massa umida di *M. bovis* vivo del ceppo AN5 in sospensione in 0,5 ml di una soluzione a 9 g/l di cloruro di sodio R per la tubercolina bovina o una dose appropriata di *M. avium*, vivo o inattivato, per la tubercolina aviaria. Dopo almeno quattro settimane dalla sensibilizzazione delle cavie, si tocano i due fianchi delle cavie per fare spazio a non più di quattro iniezioni su ogni lato. Si preparano diluizioni del preparato da esaminare e del preparato di riferimento utilizzando una soluzione salina (pH 6,5-7,5) isotonica tamponata contenente 0,005 g/l di polisorbato 80 R. Utilizzare non meno di 3 dosi del preparato di riferimento e non meno di 3 dosi del preparato da analizzare. Scegliere le dosi in modo che le lesioni prodotte abbiano un diametro da 8 a 25 mm. Ripartire le diluizioni secondo una distribuzione irregolare in quadrato latino. Eseguire per ogni dose un'iniezione intradermica in un volume costante di 0,1 o 0,2 ml. Misurare il diametro e delle lesioni dopo 24-48 ore e calcolare il risultato della prova secondo i normali metodi statistici e partendo dall'ipotesi che i diametri delle lesioni sono direttamente proporzionali al logaritmo della concentrazione delle tubercoline.

La prova sarà valida solo se i limiti di errore ($P = 0,95$) sono superiori al 50 % e inferiori al 200 % dell'attività stimata. L'attività stimata deve essere non inferiore a 66 % e non superiore a 150 % dell'attività dichiarata della tubercolina bovina. L'attività stimata deve essere non inferiore a 75 % e non superiore a 133 % dell'attività dichiarata della tubercolina aviaria. L'attività dichiarata deve essere non inferiore a 20 000 UI/ml per entrambe le tubercoline (bovina e aviaria).

2.1.6. *Conservazione*

Conservare al riparo dalla luce ad una temperatura di 5 ± 3 °C.

2.1.7. *Etichettatura*

L'etichetta indica:

- l'attività espressa in unità internazionali al millilitro (UI/ml),
- il nome e la quantità delle sostanze eventualmente aggiunte,
- per i preparati liofilizzati:
 - il nome e il volume del liquido di ricostituzione da aggiungere,
 - che il prodotto deve essere usato immediatamente dopo la ricostituzione.

2.2. **Procedure di prova**

- 2.2.1. Sono riconosciute ufficialmente le seguenti tecniche di intradermotubercolinizzazione:
- intradermotubercolinizzazione singola: inoculazione singola di tubercolina bovina,
 - intradermotubercolinizzazione comparativa: inoculazione simultanea delle due tubercoline (aviaria e bovina).

- 2.2.2. La dose di tubercolina iniettata non deve essere inferiore a:
- 2 000 UI di tubercolina bovina,
 - 2 000 UI di tubercolina aviaria.
- 2.2.3. Il volume di ciascuna dose non deve superare 0,2 ml.
- 2.2.4. La tubercolizzazione deve essere effettuata inoculando la tubercolina, o le tubercoline, nella pelle del collo. I punti di inoculazione devono trovarsi al limite tra il terzo anteriore ed il terzo mediano del collo. Quando nello stesso animale vengono inoculate ambedue le tubercoline il punto d'inoculazione della tubercolina aviaria deve trovarsi a circa 10 cm dalla cresta del collo e il punto di inoculazione della tubercolina bovina a 12,5 cm al di sotto di una linea approssimativamente parallela a quella della spalla, o su diversi punti del collo; negli animali giovani, sul cui collo non vi è abbastanza spazio per effettuare le due inoculazioni a distanza sufficiente sullo stesso lato, ciascuna inoculazione va praticata su uno dei due lati del collo, in punti identici, al centro del terzo mediano del collo.
- 2.2.5. Tecnica ed interpretazione delle reazioni di tubercolizzazione
- 2.2.5.1. Tecnica
- Tosare e pulire i punti di inoculazione. Prendere fra il pollice e l'indice una piega di pelle in ciascuna delle zone depilate, misurarne lo spessore con un calibro e annotarne il risultato. Iniettare quindi la dose di tubercolina con un metodo che garantisca che la tubercolina sia rilasciata per via intradermica. Introdurre obliquamente negli strati più profondi della pelle, tenendo il taglio trasversale della punta rivolto verso l'esterno, un ago corto sterile, collegato ad una siringa graduata caricata con la tubercolina in esame. L'inoculazione è avvenuta in modo corretto se la palpazione rivela un piccolo gonfiore, delle dimensioni di un pisello, in ciascun punto di inoculazione. A distanza di 72 ore (+/- 4 ore) dall'inoculazione, misurare nuovamente lo spessore della piega cutanea in ciascun punto di inoculazione e annotarne il risultato.
- 2.2.5.2. Interpretazione dei risultati
- L'interpretazione delle reazioni deve essere fondata su osservazioni cliniche e sulla registrazione dell'aumento, o degli aumenti, dello spessore della piega cutanea nei punti di inoculazione, 72 ore dopo l'inoculazione della tubercolina o delle tubercoline.
- a) Reazione negativa: si osserva solo un gonfiore circoscritto con aumento di spessore della piega cutanea non superiore a 2 mm, senza segni clinici, quali edema diffuso od esteso, essudazione, necrosi, dolore o infiammazione dei dotti linfatici della regione o dei linfonodi.
 - b) Reazione dubbia: non si osservano segni clinici del tipo di quelli menzionati alla lettera a), e l'aumento dello spessore della piega cutanea è superiore a 2 mm ed inferiore a 4 mm.
 - c) Reazione positiva: si osservano segni clinici del tipo di quelli menzionati alla lettera a), o si riscontra un aumento di 4 mm o più dello spessore della piega cutanea nel punto di iniezione.
- 2.2.5.3. Interpretazione delle intradermotubercolizzazioni ufficiali
- 2.2.5.3.1. Intradermotubercolizzazione singola:
- a) positiva: reazione bovina positiva secondo la definizione di cui al punto 2.2.5.2, lettera c);
 - b) dubbia: reazione secondo la definizione di cui al punto 2.2.5.2, lettera b);
 - c) negativa: reazione bovina negativa secondo la definizione di cui al punto 2.2.5.2, lettera a).
- Gli animali per i quali la intradermotubercolizzazione singola non dà esito conclusivo devono essere sottoposti ad un'altra prova a distanza di almeno 42 giorni.
- Gli animali che non risultano negativi a questa seconda prova devono essere ritenuti positivi.
- Gli animali che risultano positivi all'intradermotubercolizzazione singola possono essere sottoposti ad un'intradermotubercolizzazione comparativa qualora si sospetti una reazione falsamente positiva o una reazione di interferenza.
- 2.2.5.3.2. Intradermotubercolizzazione comparativa per il riconoscimento degli allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi e per il mantenimento di tale qualifica:
- a) positiva: reazione bovina positiva, superiore di oltre 4 mm alla reazione alla tubercolina aviaria, ovvero presenza di segni clinici;
 - b) dubbia: reazione bovina positiva o dubbia, superiore da 1 a 4 mm alla reazione alla tubercolina aviaria, ed assenza di segni clinici;
 - c) negativa: reazione bovina negativa, ovvero reazione bovina positiva o dubbia, ma di intensità pari o inferiore ad una reazione positiva o dubbia alla tubercolina aviaria ed assenza di segni clinici in ambedue i casi.
- Gli animali per i quali l'intradermotubercolizzazione comparativa non dà esito conclusivo devono essere sottoposti ad un'altra prova a distanza di almeno 42 giorni. Gli animali che non risultano negativi a questa seconda prova devono essere ritenuti positivi.

- 2.2.5.3.3. La qualifica di "allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi" può essere sospesa e gli animali dell'allevamento sono esclusi dagli scambi intracomunitari fino al momento in cui ne sia stato chiarito lo stato, per gli allevamenti dove siano presenti animali per i quali si ritenga che:
- abbiano avuto una reazione dubbia ad una intradermotubercolinizzazione singola;
 - siano risultati positivi all'intradermotubercolinizzazione singola, ma che sono in attesa di un nuovo controllo per intradermotubercolinizzazione;
 - abbiano avuto una reazione dubbia ad una intradermotubercolinizzazione comparativa.
- 2.2.5.3.4. Se gli animali devono essere sottoposti, in base alla legislazione comunitaria, a intradermotubercolinizzazione prima del trasporto, la prova deve essere interpretata in modo tale da escludere dagli scambi intracomunitari tutti gli animali che mostrano un aumento dello spessore della piega cutanea superiore a 2 mm o la presenza di segni clinici.
- 2.2.5.3.5. Per poter individuare il maggior numero possibile di animali contagiati o ammalati in un allevamento o in una regione, gli Stati membri possono modificare i criteri per l'interpretazione delle prove in modo da accrescere la sensibilità della prova, considerando positive tutte le reazioni dubbie di cui ai punti 2.2.5.3.1, lettera b) e 2.2.5.3.2, lettera b).

3. PROVE SUPPLEMENTARI

Per poter individuare il maggior numero possibile di animali contagiati o ammalati in un allevamento o in una regione, gli Stati membri possono autorizzare l'uso della prova del gamma-interferone descritta nel Manuale di norme per le prove diagnostiche e i vaccini dell'OIE (IV edizione, 2000), capitolo 2.3.3 (tubercolosi bovina), oltre alla prova della tubercolina.

4. ISTITUTI STATALI E LABORATORI NAZIONALI DI RIFERIMENTO

4.1. **Compiti e responsabilità**

Gli istituti statali e i laboratori di riferimento indicati nel punto 4.2 sono responsabili del controllo ufficiale delle tubercoline e dei reagenti descritti ai punti 2 e 3, nei rispettivi stati, per garantirne la rispondenza alle norme sopra indicate.

4.2. **Istituti statali e Laboratori Nazionali di Riferimento**

- Germania:
Paul-Ehrlich Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-23207 Langen; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin — Bereich Jena — D-07743 Jena
- Belgio:
Institut Scientifique de la Santé Publique Louis Pasteur, 14 Rue Juliette Wytsman, — B-1050 Bruxelles
- Francia:
Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fougères
- Granducato del Lussemburgo:
Istituto del paese fornitore
- Italia:
Istituto superiore di Sanità, Roma
- Paesi Bassi:
Centraal Instituut voor Dierziekte Controle Lelystad (CIDC-Lelystad), Lelystad
- Danimarca:
Danmarks Veterinærinstitut, Bülowsvej 27, DK-1790 København
- Irlanda:
Istituto del paese fornitore
- Regno Unito:
Veterinary Laboratory Agency, Applestone, Weybridge
- Grecia:
Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων, Νεαπόλεως 25, 153 10 Αθήνα

11. Spagna:
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Granada
 12. Portogallo:
Laboratório Nacional de Investigaçao Veterinária, Lisboa
 13. Austria:
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling
 14. Finlandia:
Eläinlääkintä- ja elintarvikelaitos — Anstalten för veterinärmedicin och livsmedel, Helsinki
 15. Svezia:
Statens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala.»
-