

## DECISIONE DELLA COMMISSIONE

del 10 dicembre 2008

**che modifica l'allegato C della direttiva 64/432/CEE del Consiglio e la decisione 2004/226/CE per quanto riguarda i test diagnostici per la brucellosi bovina**

[notificata con il numero C(2008) 7642]

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(2008/984/CE)

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<sup>(1)</sup>, in particolare l'articolo 6, paragrafo 2, lettera b), e l'articolo 16, secondo comma;

considerando quanto segue:

- (1) L'allegato C della direttiva 64/432/CEE stabilisce i metodi diagnostici per la brucellosi bovina da utilizzare per il controllo e l'eradicazione di tale malattia e per la sorveglianza e il monitoraggio, nonché per l'attribuzione e il mantenimento della qualifica di allevamento ufficialmente indenne da brucellosi e della certificazione necessaria per il commercio intracomunitario di bovini.
- (2) La decisione 2004/226/CE della Commissione, del 4 marzo 2004, che autorizza taluni test per la ricerca degli anticorpi della brucellosi bovina nel quadro della direttiva 64/432/CEE del Consiglio<sup>(2)</sup> approva i test per la brucellosi bovina che possono essere utilizzati in alternativa al test obbligatorio di sieroaagglutinazione (SAT) per la certificazione dei bovini a norma dell'articolo 6, paragrafo 2, lettera b), della direttiva 64/432/CEE.
- (3) La polarizzazione di fluorescenza (FPA) è un nuovo test diagnostico che è stato incluso come test prescritto per il commercio internazionale nel capitolo 2.4.3 (brucellosi bovina) del Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri) dell'Ufficio internazionale delle epizootie (OIE) (sesta edizione, 2008).
- (4) La Commissione ha chiesto all'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) di esprimere un parere scientifico sull'opportunità di inserire l'FPA nell'allegato C della direttiva 64/432/CEE.

(5) Inoltre la Commissione ha chiesto all'EFSA di valutare l'idoneità dell'FPA e dei test elencati all'articolo 1 della decisione 2004/226/CE ai fini della certificazione dei bovini per gli scambi intracomunitari.

(6) L'11 dicembre 2006 il gruppo di esperti sulla salute e il benessere degli animali ha adottato un parere scientifico sui metodi diagnostici della brucellosi per i bovini<sup>(3)</sup>, nel quale conclude che, ad eccezione del SAT, i test diagnostici della brucellosi bovina inclusi nell'allegato C della direttiva 64/432/CEE sono idonei a rimanere come test standard ai fini della certificazione dei bovini per gli scambi intracomunitari.

(7) Tuttavia, dato che il SAT è il test da praticare prima dell'uscita dall'allevamento di origine per gli scambi di bovini, prescritto direttamente dall'articolo 6, paragrafo 2, lettera b), della direttiva 64/432/CEE, una specifica tecnica deve figurare nell'allegato C di tale direttiva.

(8) Inoltre, secondo il parere scientifico dell'11 dicembre 2006 la sensibilità e la specificità dell'FPA sono comparabili a quelle dei test inclusi nell'allegato C della direttiva 64/432/CEE e il test è quindi idoneo ad essere incluso in detto allegato come test standard per la diagnosi della brucellosi per i bovini destinati agli scambi intracomunitari.

(9) I metodi della reazione a catena della polimerasi recentemente sviluppati e descritti nella sezione 1, lettera d), del capitolo 2.4.3 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri dell'OIE (sesta edizione, 2008) forniscono ulteriori metodi di ricerca e identificazione della *Brucella* spp. e vanno quindi inclusi nell'allegato C della direttiva 64/432/CEE.

(10) Occorre pertanto modificare in tal senso l'allegato C della direttiva 64/432/CEE e la decisione 2004/226/CE.

(11) Le misure di cui alla presente decisione sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

<sup>(1)</sup> GU L 121 del 29.7.1964, pag. 1977/64.

<sup>(2)</sup> GU L 68 del 6.3.2004, pag. 36.

<sup>(3)</sup> [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178620727231.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620727231.htm)

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

*Articolo 1*

L'allegato C della direttiva 64/432/CEE è modificato conformemente all'allegato della presente decisione.

*Articolo 2*

L'articolo 1 della decisione 2004/226/CE è sostituito dal seguente:

*«Articolo 1*

Sono autorizzate ai fini della certificazione la prova di fissazione del complemento, la prova con antigene di *Brucella* tamponato [test del rosa bengala (RBT)], il test ELISA e la

polarizzazione di fluorescenza (FPA) realizzate in conformità a quanto stabilito dall'allegato C della direttiva 64/432/CEE.»

*Articolo 3*

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 10 dicembre 2008.

*Per la Commissione*

Androulla VASSILIOU

*Membro della Commissione*

## ALLEGATO

1. Nell'allegato C della direttiva 64/432/CEE, i punti 1, 2 e 3 sono sostituiti dal testo seguente:

## «ALLEGATO C

**BRUCELLOSI****1. IDENTIFICAZIONE DELL'AGENTE EZIOLOGICO**

La dimostrazione, mediante colorazione acido-resistente modificata o immunospecifica, di organismi con morfologia riferibile a *Brucella* nel materiale abortivo, nelle secrezioni vaginali o nel latte, costituisce una prova presuntiva della brucellosi, specie se tale dimostrazione è convalidata da prove sierologiche. I metodi di reazione a catena della polimerasi (PCR) forniscono ulteriori metodi di individuazione.

Ove possibile, la *Brucella* spp. deve essere isolata utilizzando mezzi semplici o selettivi mediante coltura di secrezioni uterine, feti abortiti, secrezioni mammarie o tessuti selezionati, quali linfonodi e organi riproduttivi maschili e femminili.

Dopo l'isolamento del batterio, devono essere identificate la specie e la biovariante mediante lisi fagica e/o studi del metabolismo ossidativo, criteri colturali, biochimici e sierologici. La PCR può essere utilizzata come metodo complementare e di biotipizzazione su sequenze genomiche specifiche.

Le tecniche e i materiali utilizzati, la loro standardizzazione e l'interpretazione dei risultati devono essere conformi a quanto prescritto nel Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri dell'OIE (sesta edizione, 2008), capitolo 2.4.3 (brucellosi bovina), capitolo 2.7.2 (brucellosi ovi-caprina) e capitolo 2.8.5 (brucellosi suina).

**2. PROVE IMMUNOLOGICHE****2.1. Materiali di riferimento**

2.1.1. Per la preparazione di tutti gli antigeni utilizzati nel test del rosa bengala (RBT), nel test di sieroaagglutinazione (SAT), nella prova di fissazione del complemento (CFT) e nella prova dell'anello sul latte (MRT) devono essere utilizzati i ceppi 99 (Weybridge) o 1119-3 (USDA) della biovariante 1 di *Brucella abortus*.

2.1.2. Il siero standard di riferimento per le prove RBT, SAT, CFT e MRT è il siero standard di riferimento internazionale dell'OIE (OIEISS), precedentemente denominato secondo siero internazionale standard anti-*Brucella abortus* dell'OMS (ISAbs).

2.1.3. I sieri standard di riferimento per le prove di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) sono:

- l'OIEISS,
- il siero standard ELISA debolmente positivo dell'OIE (OIEELISA<sub>WPSS</sub>),
- il siero standard ELISA fortemente positivo dell'OIE (OIEELISA<sub>SPSS</sub>),
- il siero standard ELISA negativo dell'OIE (OIEELISA<sub>NSS</sub>).

2.1.4. I sieri standard di riferimento per le prove a polarizzazione di fluorescenza (FPA) sono:

- il siero standard ELISA debolmente positivo dell'OIE (OIEELISA<sub>WPSS</sub>),
- il siero standard ELISA fortemente positivo dell'OIE (OIEELISA<sub>SPSS</sub>),
- il siero standard ELISA negativo dell'OIE (OIEELISA<sub>NSS</sub>).

2.1.5. I sieri standard di cui ai punti 2.1.3 e 2.1.4 sono disponibili presso il laboratorio comunitario di riferimento per la brucellosi o la Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Regno Unito.

- 2.1.6. I sieri standard OIEISS, OIEELISA<sub>WP</sub>SS, OIEELISA<sub>SP</sub>SS e OIEELISA<sub>N</sub>SS sono gli standard internazionali primari in base dai quali ogni Stato membro deve costituire i sieri standard nazionali di riferimento secondari ("standard di lavoro") per ciascuna prova di cui al punto 2.1.1.
- 2.2. **Prove di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) o altre prove di agglutinazione per la ricerca di anticorpi brucellari nel siero o nel latte**
- 2.2.1. *Materiali e reagenti*
- La tecnica utilizzata e l'interpretazione dei risultati devono essere state convalidate conformemente ai principi stabiliti nel capitolo 1.1.4 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri dell'OIE (sesta edizione, 2008) e devono comprendere almeno studi diagnostici e di laboratorio.
- 2.2.2. *Standardizzazione della prova*
- 2.2.2.1. Standardizzazione della procedura di prova per i campioni individuali di siero:
- una pre-diluizione <sup>(1)</sup> 1:150 dell'OIEISS o una pre-diluizione 1:2 dell'OIEELISA<sub>WP</sub>SS o una pre-diluizione 1:16 dell'OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) deve dare una reazione positiva;
  - una pre-diluizione 1:600 dell'OIEISS o una pre-diluizione 1:8 dell'OIEELISA<sub>WP</sub>SS o una pre-diluizione 1:64 dell'OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) deve dare una reazione negativa;
  - OIEELISA<sub>N</sub>SS deve sempre dare una reazione negativa.
- 2.2.2.2. Standardizzazione della procedura di prova per i pool di campioni di siero:
- una pre-diluizione 1:150 dell'OIEISS o una pre-diluizione 1:2 dell'OIEELISA<sub>WP</sub>SS o una pre-diluizione 1:16 dell'OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) ed ancora diluita con sieri negativi un numero di volte pari al numero di campioni che compongono il pool deve dare una reazione positiva;
  - OIEELISA<sub>N</sub>SS deve sempre dare una reazione negativa;
  - la prova deve essere in grado di individuare l'infezione in un singolo animale appartenente al gruppo di animali dei quali sono stati raggruppati i campioni di siero.
- 2.2.2.3. Standardizzazione della procedura di prova per campioni di latte di massa o pool di sieri di latte:
- una pre-diluizione 1:1 000 dell'OIEISS o una pre-diluizione 1:16 dell'OIEELISA<sub>WP</sub>SS o una pre-diluizione 1:125 dell'OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) e nuovamente diluita 1:10 in latte negativo deve dare una reazione positiva;
  - OIEELISA<sub>N</sub>SS diluito 1:10 in latte negativo deve sempre dare una reazione negativa;
  - la prova deve essere in grado di individuare l'infezione in un singolo animale appartenente al gruppo di animali dei quali sono stati raggruppati i campioni di latte o siero di latte.
- 2.2.3. *Condizioni di impiego del metodo ELISA per la diagnosi della brucellosi bovina*
- 2.2.3.1. Se per l'ELISA sui campioni di siero si utilizzano le condizioni di calibrazione di cui ai punti 2.2.2.1 e 2.2.2.2, la sensibilità diagnostica del test ELISA deve essere pari o superiore a quella delle prove RBT o CFT, tenuto conto della situazione epidemiologica di impiego.
- 2.2.3.2. Se per l'ELISA sui campioni di latte di massa si utilizzano le condizioni di calibrazione di cui al punto 2.2.2.3, la sensibilità diagnostica del test ELISA deve essere pari o superiore a quella della prova MRT, tenuto conto non soltanto della situazione epidemiologica, ma anche delle caratteristiche medie dei sistemi di allevamento e dei limiti massimo e minimo delle caratteristiche stesse.
- 2.2.3.3. Quando la metodica ELISA è usata ai fini della certificazione conformemente all'articolo 6, paragrafo 1, o ai fini dell'attribuzione e del mantenimento della qualifica di un allevamento conformemente all'allegato A, capitolo II, punto 10, il pool di campioni di siero deve essere effettuato in modo che i risultati delle prove permettano di risalire univocamente ai singoli animali inclusi nel pool. Eventuali prove di conferma devono essere effettuate su campioni di siero prelevato dai singoli animali.

<sup>(1)</sup> Ai fini del presente allegato, nelle diluizioni indicate per la composizione dei liquidi reattivi un valore di 1/150, ad esempio, significa una diluizione di 1 in 150.

2.2.3.4. La metodica ELISA può essere utilizzata su un campione di latte di massa proveniente da un'azienda in cui almeno il 30 % delle vacche da latte sia in lattazione. Se si ricorre a tale metodica, ci si deve assicurare che i campioni prelevati per l'analisi permettano di risalire univocamente ai singoli animali da cui proviene il latte esaminato. Eventuali prove di conferma devono essere effettuate su campioni di siero prelevato dai singoli animali.

### 2.3. Prova di fissazione del complemento (CFT)

2.3.1. L'antigene è costituito da una sospensione batterica in soluzione salina fenolata [NaCl allo 0,85 % (m/v) e fenolo allo 0,5 % (v/v)] o in tampone veronal. Gli antigeni possono essere forniti concentrati, purché il fattore di diluizione sia indicato sull'etichetta del flacone. L'antigene deve essere conservato a 4 °C e non deve essere congelato.

2.3.2. I sieri devono essere inattivati come segue:

— bovini: 56-60 °C per 30-50 minuti,

— suini: 60 °C per 30-50 minuti.

2.3.3. Per un'esecuzione corretta della prova, si deve usare una concentrazione di complemento più alta di quella minima necessaria ad un'emolisi totale.

2.3.4. Ogni volta che si esegue la prova di fissazione del complemento devono essere effettuati i seguenti controlli:

- a) controllo del potere anticomplementare del siero;
- b) controllo dell'antigene;
- c) controllo delle emazie sensibilizzate;
- d) controllo del complemento;
- e) controllo di sensibilità della reazione mediante l'utilizzo di un siero positivo;
- f) controllo della specificità della reazione mediante l'utilizzo di un siero negativo.

### 2.3.5. Calcolo dei risultati

L'OIEISS contiene 1 000 unità internazionali fissanti il complemento per ml (UICF/ml). Se l'OIEISS viene saggiato con un dato metodo, il risultato è espresso come titolo (ovvero massima diluizione diretta dell'OIEISS con il 50 % di emolisi,  $T_{\text{OIEISS}}$ ). Il risultato del siero in esame, dato come titolo ( $T_{\text{TESTSERUM}}$ ), deve essere espresso in UICF/ml. Per convertire il titolo di un siero in esame ( $T_{\text{TESTSERUM}}$ ) in unità internazionali fissanti il complemento, si utilizza il fattore (F), che si ricava dalla seguente formula:

$$F = 1\,000 \times 1/T_{\text{OIEISS}}$$

e il numero di unità internazionali fissanti il complemento per ml (UICF/ml) presenti nel siero in esame ( $\text{UICF}_{\text{TESTSERUM}}$ ), si ricava dalla seguente formula:

$$\text{UICF}_{\text{TESTSERUM}} = F \times T_{\text{TESTSERUM}}$$

### 2.3.6. Interpretazione dei risultati

Un siero che contiene 20 o più unità internazionali fissanti il complemento per ml è considerato positivo.

## 2.4. Prova dell'anello sul latte (MRT)

2.4.1. L'antigene è costituito da una sospensione batterica in una soluzione salina fenolata [NaCl allo 0,85 % (m/v) e fenolo allo 0,5 % (v/v)] colorata con ematossilina. L'antigene deve essere conservato a 4 °C e non deve essere congelato.

2.4.2. La sensibilità dell'antigene deve essere standardizzata rispetto all'OIEISS in modo che l'antigene dia una reazione positiva con una diluizione 1:500 dell'OIEISS in latte negativo e una reazione negativa con una diluizione 1:1 000.

- 2.4.3. La prova dell'anello sul latte deve essere effettuata su campioni che rappresentano il contenuto di ogni bidone di latte o il contenuto di ogni cisterna aziendale.
- 2.4.4. I campioni di latte non devono essere stati congelati, riscaldati o agitati violentemente.
- 2.4.5. La reazione deve essere effettuata con uno dei seguenti metodi:
- su una colonna di latte di almeno 25 mm di altezza e su un volume di latte di 1 ml cui sono stati aggiunti 0,03 ml o 0,05 ml di uno degli antigeni standardizzati colorati,
  - su una colonna di latte di almeno 25 mm di altezza e su un volume di latte di 2 ml cui sono stati aggiunti 0,05 ml di uno degli antigeni standardizzati colorati,
  - su un volume di latte di 8 ml cui sono stati aggiunti 0,08 ml di uno degli antigeni standardizzati colorati.
- 2.4.6. La miscela di latte e di antigene deve essere tenuta in incubazione a 37 °C per 60 minuti insieme agli standard di lavoro positivi e negativi. Una successiva incubazione di 16-24 ore a 4 °C aumenta la sensibilità del test.
- 2.4.7. Interpretazione dei risultati
- a) reazione negativa: latte colorato, crema decolorata;
  - b) reazione positiva:
    - latte e crema colorati in modo identico, oppure
    - latte decolorato e crema colorata.
- 2.5. **Prova con antigene di *Brucella* tamponato [test del rosa bengala (RBT)]**
- 2.5.1. L'antigene è costituito da una sospensione batterica in diluente per l'antigene di *Brucella* tamponato a pH 3,65 ± 0,05, colorato mediante rosa bengala. L'antigene deve essere consegnato pronto per l'uso; esso va conservato a 4 °C e non deve essere congelato.
- 2.5.2. L'antigene è preparato indipendentemente dalla concentrazione delle cellule, ma la sua sensibilità deve essere standardizzata rispetto all'OIEISS in modo che l'antigene dia reazione positiva ad una diluizione del siero 1:45 e reazione negativa ad una diluizione del siero 1:55.
- 2.5.3. La RBT deve essere effettuata nel modo seguente:
- a) il siero (20-30 µl) viene mescolato con un volume equivalente di antigene su una piastra bianca o un piatto smaltato in modo da formare un'area circolare di circa 2 cm di diametro. La miscela viene agitata delicatamente per quattro minuti a temperatura ambiente e quindi osservata con una buona illuminazione per verificare l'agglutinazione;
  - b) può essere utilizzato un metodo automatizzato, purché abbia sensibilità e precisione almeno pari al metodo manuale.
- 2.5.4. *Interpretazione dei risultati*
- Qualsiasi reazione visibile è considerata positiva, salvo che non si rilevi un'eccessiva essiccazione sui bordi.
- Per ciascuna serie di prove devono essere allestiti gli standard di lavoro positivi e negativi.
- 2.6. **Test di sieroagglutinazione (SAT)**
- 2.6.1. L'antigene è costituito da una sospensione batterica in una soluzione salina fenolata [NaCl allo 0,85 % (m/v) e fenolo allo 0,5 % (v/v)].
- Non deve essere utilizzata formaldeide.
- Gli antigeni possono essere forniti concentrati, purché il fattore di diluizione sia indicato sull'etichetta del flacone.
- Per ridurre il numero di falsi positivi al test di sieroagglutinazione, alla sospensione di antigene può essere aggiunto EDTA in quantità tale che la sua concentrazione finale nella prova sia 5 mM. In questo caso il pH della sospensione di antigene deve essere riportato ad un valore di 7,2.

- 2.6.2. L'OIEISS contiene 1 000 unità internazionali agglutinanti.
- 2.6.3. L'antigene è preparato indipendentemente dalla concentrazione delle cellule, ma la sua sensibilità deve essere standardizzata rispetto all'OIEISS in modo che l'antigene dia un'agglutinazione del 50 % con un diluizione finale del siero compresa tra 1:600 e 1:1 000 oppure un'agglutinazione del 75 % con un diluizione finale del siero compresa tra 1:500 e 1:750.

Può anche essere opportuno confrontare la reattività delle nuove partite di antigene con quella di partite standardizzate precedentemente, utilizzando un panel di sieri conosciuti.

- 2.6.4. La prova viene effettuata in provette o in micropiastre. La miscela di antigene e diluizioni di siero deve essere tenuta in incubazione a 37 °C per 16-24 ore.

Per ciascun siero devono essere preparate almeno tre diluizioni. Le diluizioni del siero sospetto devono essere effettuate in modo che la lettura della reazione al limite di positività avvenga nella provetta mediana (o nel pozzetto mediano se si utilizza il metodo in micropiastre).

- 2.6.5. *Interpretazione dei risultati*

Il grado di agglutinazione della *Brucella* in un siero deve essere espresso in unità internazionali per ml (UI/ml).

Un siero che contiene 30 o più unità internazionali per ml è considerato positivo.

## 2.7. **Polarizzazione di fluorescenza (FPA)**

- 2.7.1. La polarizzazione di fluorescenza può essere effettuata in provette di vetro o in micropiastre 96 pozzetti. La tecnica utilizzata, la sua standardizzazione e l'interpretazione dei risultati devono essere conformi a quanto prescritto nel Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri dell'OIE (sesta edizione, 2008), capitolo 2.4.3 (brucellosi bovina).

- 2.7.2. *Standardizzazione della prova*

La polarizzazione di fluorescenza deve essere standardizzata in modo che:

- l'OIEELISA<sub>SP</sub>SS e l'OIEELISA<sub>WP</sub>SS diano sistematicamente risultati positivi;
- una pre-diluizione 1:8 dell'OIEELISA<sub>WP</sub>SS o una pre-diluizione 1:64 dell'OIEELISA<sub>SP</sub>SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) dia sempre una reazione negativa;
- l'OIEELISA<sub>N</sub>SS dia sempre dare una reazione negativa.

I seguenti sieri devono essere inclusi in ogni serie di test: un siero standard di lavoro fortemente positivo, un siero standard di lavoro debolmente positivo e un siero standard di lavoro negativo (calibrato in base al siero di riferimento ELISA dell'OIE).

## 3. PROVE COMPLEMENTARI

### 3.1. **Intradermoreazione per la brucellosi (BST)**

- 3.1.1. *Condizioni per l'uso dell'intradermoreazione*

- L'intradermoreazione per la brucellosi non può essere utilizzata per la certificazione negli scambi intracomunitari.
- L'intradermoreazione per la brucellosi è una delle prove più specifiche per la ricerca della brucellosi in animali non vaccinati; tuttavia la diagnosi non deve essere effettuata esclusivamente sulla base di reazioni intradermiche positive.
- I bovini che sono risultati negativi ad una delle prove sierologiche descritte nel presente allegato e che reagiscono positivamente all'intradermoreazione brucellare devono essere considerati infetti o sospettati di essere infetti.
- I bovini che sono risultati positivi ad una delle prove sierologiche descritte nel presente allegato possono essere sottoposti all'intradermoreazione brucellare per rafforzare l'interpretazione dei risultati delle prove sierologiche, in particolare nei casi in cui negli allevamenti di bovini indenni o ufficialmente indenni da brucellosi non può essere esclusa una reazione incrociata con anticorpi contro altri batteri.

- 3.1.2. La prova deve essere condotta utilizzando un preparato allergenico della brucellosi standardizzato e definito, che non contenga antigene lipopolisaccaridico liscio (LPS), poiché questo potrebbe provocare reazioni infiammatorie non specifiche o interferire con le successive prove sierologiche.

Le prescrizioni per la produzione della brucellina devono essere conformi alla sezione C1 del capitolo 2.4.3 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri dell'OIE (sesta edizione, 2008).

3.1.3. *Procedura di prova*

- 3.1.3.1. 0,1 ml di brucellina vengono iniettati per via intradermica nella plica caudale, nella cute del fianco o in un lato del collo.

- 3.1.3.2. La lettura deve essere eseguita dopo 48-72 ore.

- 3.1.3.3. Lo spessore della cute deve essere misurato nel punto di inoculazione con un calibro di Vernier prima dell'inoculazione e al momento della lettura.

3.1.3.4. Interpretazione dei risultati

Una reazione molto evidente è facilmente riconoscibile dalla presenza di gonfiore e indurimento in sede locale.

L'intradermoreazione per la brucellosi deve essere considerata positiva quando si ha un ispessimento della cute di 1,5-2 mm.

3.2. **Prove di immunoassorbimento enzimatico competitivo (cELISA)**

3.2.1. *Condizioni per l'uso di un ELISA competitivo (cELISA)*

Il test cELISA non può essere utilizzato per la certificazione negli scambi intracomunitari.

I bovini che sono risultati positivi ad una delle altre prove sierologiche descritte nel presente allegato possono essere sottoposti al test cELISA per rafforzare l'interpretazione dei risultati delle altre prove sierologiche, in particolare nei casi in cui negli allevamenti di bovini indenni o ufficialmente indenni da brucellosi non può essere esclusa una reazione incrociata con anticorpi contro altri batteri oppure per eliminare reazioni dovute a anticorpi residui prodotti in risposta ad una vaccinazione con S19.

3.2.2. *Procedura di prova*

La prova deve essere eseguita conformemente a quanto previsto nella sezione B(2) del capitolo 2.4.3 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri dell'OIE (sesta edizione, 2008).»

2. Nell'allegato C della direttiva 64/432/CE il punto 4.1 è sostituito dal testo seguente:

«4.1. **Compiti e responsabilità**

I laboratori nazionali di riferimento hanno la responsabilità di:

- a) approvare i risultati degli studi di validazione che dimostrano l'affidabilità del metodo di prova utilizzato nello Stato membro interessato;
  - b) stabilire il numero massimo di campioni che devono formare i pool in relazione ai kit ELISA utilizzati;
  - c) calibrare gli standard di lavoro di cui al paragrafo 2.1.6;
  - d) controllare la qualità di tutte le partite di antigeni e di kit ELISA utilizzate nello Stato membro interessato;
  - e) seguire le raccomandazioni del laboratorio comunitario di riferimento per la brucellosi e cooperare con il medesimo.»
-