

REGOLAMENTO (CE) N. 535/2002 DELLA COMMISSIONE**del 21 marzo 2002****che modifica l'allegato C della direttiva 64/432/CEE del Consiglio e la decisione 2000/330/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⁽¹⁾, modificata da ultimo dalla direttiva 2001/298/CE 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 agli sviluppi scientifici in materia di tubercolosi, brucellosi e leucosi bovina enzootica.
- (2) Secondo tale relazione, le prove per la brucellosi 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 brucellosi.
- (4) Si è reso quindi necessario modificare l'allegato C della direttiva 64/432/CEE per definire, ai fini della sorveglianza e degli scambi intracomunitari, procedure d'analisi quanto più possibile conformi alle norme dell'OIE, ma anche per tener conto del parere del comitato scientifico e dei laboratori nazionali di riferimento negli Stati membri che collaborano nell'ambito della rete dei laboratori nazionali di riferimento per la brucellosi dell'Unione europea.

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

Fatto a Bruxelles, il 21 marzo 2002.

Per la Commissione

David BYRNE

Membro della Commissione

- (5) La decisione 2000/330/CE della Commissione, del 18 aprile 2000, che autorizza taluni test per la ricerca degli anticorpi della brucellosi bovina nel quadro della direttiva 64/432/CEE del Consiglio⁽⁴⁾, deve essere modificata di conseguenza.
- (6) Le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato veterinario permanente,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

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

Articolo 2

La decisione 2000/330/CE è modificata come segue:

- 1) il testo dell'articolo 1 è sostituito dal seguente:

«Articolo 1

Sono autorizzate ai fini della certificazione la prova di fissazione del complemento, le prove con antigene Brucella tamponato e le prove ELISA realizzate in conformità alle disposizioni di cui all'allegato C della direttiva 64/432/CEE.»;

- 2) l'allegato è soppresso.

Articolo 3

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

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

⁽²⁾ GU L 102 del 12.4.2001, pag. 63.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

⁽⁴⁾ GU L 114 del 13.5.2000, pag. 37.

ALLEGATO

«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.

Dopo l'isolamento batterico, la specie e la biovariante devono essere identificate mediante lisi fagica e/o prove di metabolismo ossidativo, caratteristiche colturali, biochimiche o sierologiche.

I materiali ed i metodi 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 (4^a edizione, 2000), capitolo 2.3.1 (brucellosi bovina), capitolo 2.4.2 (brucellosi ovi-caprina) e capitolo 2.6.2 (brucellosi suina).

2. PROVE IMMUNOLOGICHE

2.1. **Materiali di riferimento**

2.1.1. Per la preparazione di tutti gli antigeni utilizzati nella prova del rosa bengala (RBT), nella prova di sieroagglutinazione (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 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 l'ELISA sono:

- l'OIEISS,
- il siero standard ELISA debolmente positivo dell'OIE (OIEELISA_{WP}SS),
- il siero standard ELISA fortemente positivo dell'OIE (OIEELISA_{SP}SS),
- il siero standard ELISA negativo dell'OIE (OIEELISA_NSS).

2.1.4. I sieri standard sopra elencati sono disponibili presso la Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Regno Unito.

2.1.5. I sieri standard OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{SP}SS e OIEELISA_NSS sono gli standard internazionali primari in base ai quali ogni Stato membro deve costituire gli standard nazionali di riferimento secondari ("standard di lavoro") per ciascuna prova.

2.2. **Prove di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) o altre prove di agglutinazione per l'individuazione 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 validate conformemente ai principi stabiliti nel capitolo 1.1.3 del Manuale di norme per le prove diagnostiche e i vaccini dell'OIE (4^a edizione, 2000) e dovrebbero almeno comprendere studi diagnostici e di laboratorio.

2.2.2. *Standardizzazione della prova*

2.2.2.1. Standardizzazione della procedura di prova per i campioni di siero individuali:

- a) una pre-diluzione a 1/150 ⁽¹⁾ dell'OIEISS o una pre-diluzione a 1/2 dell'OIEELISA_{WP}SS o una pre-diluzione a 1/16 dell'OIEELISA_{SP}SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) deve dare una reazione positiva;
- b) una pre-diluzione a 1/600 dell'OIEISS o una pre-diluzione a 1/8 dell'OIEELISA_{WP}SS o una pre-diluzione a 1/64 dell'OIEELISA_{SP}SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) deve dare una reazione negativa;

⁽¹⁾ 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.

- c) l'OIEELISA_NSS deve sempre dare una reazione negativa.
- 2.2.2.2. Standardizzazione della procedura di prova per i pool di campioni di siero:
- a) una pre-diluizione a 1/150 dell'OIEISS o una pre-diluizione a 1/2 dell'OIEELISA_{WP}SS o una pre-diluizione a 1/16 dell'OIEELISA_{SP}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;
- b) l'OIEELISA_NSS deve sempre dare una reazione negativa;
- c) 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:
- a) una pre-diluizione a 1/1 000 dell'OIEISS o una pre-diluizione a 1/16 dell'OIEELISA_{WP}SS o una pre-diluizione a 1/125 dell'OIEELISA_{SP}SS realizzata in un siero negativo (o in un pool di sieri negativi) e nuovamente diluita a 1/10 in latte negativo deve dare una reazione positiva;
- b) l'OIEELISA_NSS diluito a 1/10 in latte negativo deve sempre dare una reazione negativa;
- c) 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 sopra, la sensibilità diagnostica dell'ELISA deve essere pari o superiore a quella delle prove RBT o CFT, tenuto conto della situazione epidemiologica in cui è utilizzata.
- 2.2.3.2. Se per l'ELISA sui campioni di latte di massa si utilizzano le condizioni di calibrazione di cui sopra, la sensibilità diagnostica dell'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.
- 2.2.3.4. L'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 prelevati 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 dovrebbe usare una concentrazione di complemento più alta della concentrazione minima necessaria ad un'emolisi totale.
- 2.3.4. Ogni volta che si esegue la 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 (T_{OIEISS}). Il risultato del siero in esame, dato come titolo (T_{SERUM}), deve essere espresso in UICF/ml. Per convertire il titolo di un siero in esame (T_{SERUM}) 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 ($\text{UICF}_{\text{SERUM}}$), 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 a 1/500 dell'OIEISS in latte negativo e una reazione negativa con una diluizione a 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 termostato a 37 °C per 60 minuti insieme agli standard di lavoro positivi e negativi. Un'incubazione successiva 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 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 $3,65 \pm 0,05$, colorato mediante rosa bengala. L'antigene deve essere consegnato pronto per l'uso, deve essere 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 4 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. Prova di sieroaagglutinazione (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 alla prova di sieroaagglutinazione, 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 % ad un diluizione finale del siero compresa tra 1/600 e 1/1 000 oppure un'agglutinazione del 75 % ad 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 pannello di sieri conosciuti.

2.6.4. La prova viene effettuata in provette o in micropiastre. La miscela di antigene e siero diluito deve essere tenuta in termostato 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 brucellare di 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.

3. ALTRE PROVE

3.1. Intradermoreazione brucellare (BST)

3.1.1. Condizioni per l'uso dell'intradermoreazione

a) L'intradermoreazione per la brucellosi non può essere utilizzata per la certificazione negli scambi intracomunitari.

b) L'intradermoreazione per la brucellosi è una delle prove più specifiche per l'individuazione della brucellosi in animali non vaccinati; tuttavia la diagnosi non deve essere effettuata esclusivamente sulla base di reazioni intradermiche positive.

c) 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.

d) 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, particolarmente nei casi in cui negli allevamenti 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 contro la 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.

Uno di questi allergeni è la Brucellina INRA preparata da un ceppo non liscio di *B. melitensis*. I requisiti per la sua produzione sono descritti nella sezione B2 del capitolo 2.4.2 del Manuale di norme per le prove diagnostiche e i vaccini dell'OIE (4ª edizione, 2000).

3.1.3. Procedura di prova

3.1.3.1. 0,1 ml di Brucellina vengono iniettati per via intradermica nella plica caudale, nella pelle 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 locale.

L'intradermoreazione brucellare deve essere considerata positiva quando si ha un ispessimento della cute di 1,5-2 mm o più.

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

3.2.1. *Condizioni per l'uso dell'ELISA competitiva (ELISAc)*

a) L'ELISAc non può essere utilizzata per la certificazione negli scambi intracomunitari.

b) L'ELISAc ha mostrato una specificità più alta, ad esempio, di quella dell'ELISA indiretta e quindi può essere utilizzata per rafforzare l'interpretazione dei risultati delle altre prove sierologiche.

3.2.2. *Procedura di prova*

La prova deve essere eseguita conformemente a quanto previsto nel capitolo 2.3.1(2)(a) del Manuale di norme per le prove diagnostiche e i vaccini dell'OIE (4ª edizione, 2000).

4. LABORATORI NAZIONALI DI RIFERIMENTO

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 i sieri standard nazionali secondari di riferimento ("standard di lavoro") con i sieri standard internazionali primari di riferimento di cui al paragrafo 2.1;

d) controllare la qualità di tutti i lotti di antigeni e di kit ELISA utilizzati nel rispettivo Stato membro;

e) collaborare nell'ambito della rete dei laboratori nazionali di riferimento per la brucellosi dell'Unione europea.

4.2. **Elenco dei laboratori nazionali di riferimento**

BELGIO

Centre d'études et de recherches vétérinaires et agrochimiques (CERVA/CODA)
Groeselenberg 99
B-1180 Bruxelles/Brussel

DANIMARCA

Danish Veterinary Laboratory
Bulowsvej 27
DK-1790 Copenhagen

GERMANIA

Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV)
Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor für Brucellose
Postfach 33 00 13
D-14191 Berlin

GRECIA

Veterinary Laboratory of Larissa
Department of Microbiology
6th km of National Road Larissa-Trikala
GR-4111 10 Larissa

SPAGNA

Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe
Camino del Jau S/N
E-18320 Santa Fe (Granada)

FRANCIA

Laboratoire national et OIE/FAO de référence pour la brucellose
Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)
BP 67
F-94703 Maisons-Alfort Cedex

IRLANDA

Brucellosis Laboratory
Model Farm Road
Cork
Ireland

ITALIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise
Via Campo Boario
I-64100 Teramo

LUSSEMBURGO

State Laboratory for Veterinarian Medicine
54, av Gaston Diderich
B.P. 2081
L-1020 Luxembourg

PAESI BASSI

Centraal Instituut voor DierziekteControle
CIDC-Lelystad
Houtribweg 39
PO Box 2004
8203 AA Lelystad
Nederland

AUSTRIA

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen
Robert-Koch-Gasse 17
A-2340 Modling

PORTOGALLO

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV)
Estrada de Benfica, n.º 701
P-1549-011 Lisboa

FINLANDIA

National Veterinary and Food Research Institute
Hämeentie 57
PO Box 45
FIN-00581 Helsinki

SVEZIA

National Veterinary Institute
S-751 89 Uppsala

REGNO UNITO

- 1) FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis
Veterinary Laboratories Agency
New Haw
Addlestone
Surrey KT15 3NB
United Kingdom
 - 2) Immunodiagnosics Department
Veterinary Sciences Division
Stoney Road Stormont
Belfast BT4 3SD
United Kingdom»
-