

32002R1226

9.7.2002

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 179/13

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 1226/2002**z dnia 8 lipca 2002 r.****zmieniające załącznik B do dyrektywy Rady 64/432/EWG**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 64/432/EWG z dnia 26 czerwca 1964 r. w sprawie problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na handel wewnątrzwspólnotowy bydłem i trzodą chlewną⁽¹⁾, ostatnio zmienioną rozporządzeniem Komisji (WE) nr 535/2002⁽²⁾, w szczególności jej art. 16 ust. 1 akapit drugi,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Dnia 11 października 1999 r. Komitet Naukowy ds. Zdrowia i Dobrostanu Zwierząt przyjął sprawozdanie⁽³⁾ dotyczące zmiany załączników technicznych do dyrektywy Rady 64/432/EWG celem uwzględnienia postępu naukowego w zakresie gruźlicy, brucelozy i enzootycznej białaczki bydła.
- (2) Zgodnie z powyższym sprawozdaniem próby tuberkulinowe należy przeprowadzać zgodnie ze wskazaniami Podręcznika Norm dla Testów Diagnostycznych oraz Szczepionek Międzynarodowego Biura Epizootii, wydanie trzecie 1996 r.
- (3) W sierpniu 2001 r. Międzynarodowe Biuro Epizootii opublikowało czwarte wydanie wspomnianego podręcznika (2000), zawierające pewne zmiany w opisie prób tuberkulinowych.

(4) W styczniu 2002 r. Europejska Dyrekcja ds. Jakości Leków opublikowała czwarte wydanie Farmakopei Europejskiej (2002), zawierające monografie 0535 i 0536 dotyczące oczyszczonej pochodnej białkowej tuberkuliny bydłowej i ptasiej.

(5) W związku z powyższym zachodzi konieczność wprowadzenia zmian w załączniku B do dyrektywy 64/432/EWG, celem ustanowienia procedur mających zastosowanie do celów nadzoru i handlu we Wspólnocie, z uwzględnieniem opinii Naukowego Komitetu Weterynaryjnego.

(6) Środki, przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z oceną Stałego Komitetu ds. Łańcucha Pokarmowego i Zdrowia Zwierząt,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Załącznik B do dyrektywy 64/432/EWG zastępuje się Załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich Państwach Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 8 lipca 2002 r.

W imieniu Komisji

David BYRNE

Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. 121 z 29.7.1964, str. 1977/64.

⁽²⁾ Dz.U. L 80 z 23.3.2002, str. 22.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

ZAŁĄCZNIK

„ZAŁĄCZNIK B

GRUŻLICA

1. IDENTYFIKACJA CZYNNIKA

Obecność *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), czynnika wywołującego gruźlicę bydła, można stwierdzić w próbkach klinicznych i pośmiertnych, w drodze badania barwionych wymazów lub technikami immunoperoksydazowymi, natomiast potwierdza się ją poprzez hodowlę organizmu na pierwotnym podłożu izolacyjnym.

Materiał do badania patologicznego celem potwierdzenia *M. bovis* pobiera się ze zmienionych węzłów chłonnych oraz organów mięsnych, takich jak płuca, wątroba, śledziona itd. W przypadku gdy zwierzę nie wykazuje zmian chorobowych, próbki do badań i hodowli pobiera się z węzłów pozagardłowych, oskrzelowych, śródpiersiowych, nadsutkowych, żuchwowych i niektórych węzłów krezkowych oraz z wątroby.

Identyfikację izolatów przeprowadza się zazwyczaj poprzez określenie cech wzrostu oraz cech biochemicznych. Celem zidentyfikowania kompleksu *M. tuberculosis* można zastosować technikę łańcuchowej polimerazy (PCR). W porównaniu do biochemicznych metod różnicowania *M. bovis* od innych członków kompleksu *M. tuberculosis* techniki analizy DNA mogą okazać się łatwiejsze i bardziej rzetelne niż metody biochemiczne. Genetyczny odcisk palca pozwala na rozróżnienie różnych szczepów *M. bovis* oraz umożliwia opisanie wzorów pochodzenia, transmisji i rozprzestrzeniania się *M. bovis*.

Zastosowane techniki i podłoża, ich standaryzacja oraz interpretacja wyników muszą być zgodne z informacjami wyszczególnionymi w Podręczniku Norm dla Testów Diagnostycznych oraz Szczepionek Międzynarodowego Biura Epizootii, wydanie czwarte 2000, rozdział 2.3.3. (gruźlica bydła).

2. TUBERKULINOWA PRÓBA SKÓRNA

Do wykonywania oficjalnych prób tuberkulinowych zgodnie z procedurami określonymi w ppkt 2.2 stosuje się tuberkulinę PPD (oczyszczone pochodne białkowe), spełniającą normy określone w ppkt 2.1.

2.1 Normy dla tuberkuliny (bydłęcej i ptasiej)

2.1.1 Definicja

Oczyszczona pochodna białkowa tuberkuliny (tuberkulina PPD, bydłęca lub ptasia) to preparat otrzymany z poddanych działaniu wysokiej temperatury produktów wzrostu i lizy *Mycobacterium bovis* lub *Mycobacterium avium* (w zależności od zastosowania), zdolny do wywoływania opóźnionej nadwrażliwości u zwierzęcia uczulonego na drobnoustroje tego samego gatunku.

2.1.2 Produkcja

Tuberkulinę otrzymuje się z rozpuszczalnych w wodzie frakcji, przygotowywanych poprzez podgrzanie w systemie swobodnego przepływu oraz przefiltrowanie hodowli *M. bovis* lub *M. avium* (w zależności od zastosowania), wzrastających na płynnym podłożu syntetycznym. Frakcja aktywna filtratu, składająca się głównie z białek, jest izolowana poprzez precypitację, przemylana i ponownie rozpuszczana. Można dodać czynnik przeciwbakteryjny, niewywołujący fałszywie pozytywnych reakcji, taki jak fenol. Końcowy sterylny preparat, pozbawiony prątków, jest aseptycznie umieszczany w sterylnych szklanych pojemnikach, odpornych na uszkodzenia, które się następnie zamyka celem zapobieżenia zanieczyszczeniom. Preparat może być liofilizowany.

2.1.3 Identyfikacja produktu

Odmierzone dawki wstrzykuje się śródskórnie do różnych miejsc odpowiednio uczulonych albinotycznych świnek morskich, z których każda waży nie mniej niż 250 g. Po 24-28 godzinach pojawiają się reakcje w postaci zaczerwienionych obrzęków, nawet z martwicą, w miejscach iniekcji. Wielkość i stopień reakcji różni się w zależności od dawki. Nieuczulone świnki morskie nie wykazują żadnej reakcji na podobne iniekcje.

2.1.4 Próby

2.1.4.1 pH: pH wynosi 6,5–7,5.

- 2.1.4.2 Fenol: jeśli badany preparat zawiera fenol, jego stężenie nie powinno przekraczać 5 g/l.
- 2.1.4.3 Efekt uwrażliwienia: należy zastosować grupę trzech świnek morskich, których nie poddawano działaniu żadnego materiału oddziałującego z próbą. Trzykrotnie, w odstępach pięciodniowych, każdej śwince należy wstrzyknąć śródskórnie dawkę badanego preparatu równoważną 500 CTU w 0,1 ml. Po upływie 15–21 dni od trzeciej iniekcji należy wstrzyknąć śródskórnie taką samą dawkę (500 CTU) tym samym zwierzętom oraz grupie kontrolnej trzech świnek morskich o tej samej masie, które nie były wcześniej poddawane iniekcjom z tuberkuliny. Po upływie 24–28 godzin od ostatnich iniekcji różnice w reakcjach obydwu grup nie są znaczące.
- 2.1.4.4 Toksyczność: należy zastosować dwie świnki morskie, przy czym każda ma ważyć nie mniej niż 250 g, których nie poddawano wcześniej działaniu żadnego materiału mogącego mieć wpływ na próbę. Każdej śwince należy wstrzyknąć podskórnie 0,5 ml badanego preparatu. Zwierzęta należy obserwować przez siedem dni. Podczas okresu obserwacji nie powinny wystąpić żadne odchylenia od normy.
- 2.1.4.5 Sterylność: pokrywa się z testem sterylności opisanym w monografii Farmakopei Europejskiej »Szczepionki do użytku weterynaryjnego«, wydanie 4.

2.1.5 Potencja

Potencje oczyszczonej pochodnej białkowej tuberkuliny (bydłęcej i ptasiej) określa się poprzez porównanie reakcji wywoływanych na uczulonych świnkach morskich, w drodze podskórnej iniekcji serii rozcieńczeń badanego preparatu, z reakcjami wywoływanymi przez znane stężenia referencyjnego preparatu oczyszczonej pochodnej białkowej tuberkuliny (bydłęcej lub ptasiej, w zależności od zastosowania) kalibrowanego w jednostkach międzynarodowych.

Celem zbadania potencji należy uczulić nie mniej niż dziewięć albinotycznych świnek morskich, przy czym każda ma ważyć 400–600 g, poprzez głęboką domięśniową iniekcję z 0,0001 mg mokrej masy żyjących *M. bovis* szczepu AN5, zawieszonych w 0,5 ml z 9 g/l roztworu chlorku sodowego R dla tuberkuliny bydłęcej, lub odpowiedniej dawki inaktywowanego lub żywego *M. avium* dla tuberkuliny ptasiej. Nie wcześniej niż cztery tygodnie po uwrażliwieniu świnek morskich należy ogolić im boki, celem zapewnienia miejsca na nie więcej niż cztery iniekcje po każdej stronie. Rozcieńczenia testowanego preparatu oraz preparatu referencyjnego przyrządza się, stosując izotoniczną buforowaną fosforanem sól fizjologiczną (pH 6,5–7,5), zawierającą 0,005 g/l polisorbatu 80 R. Do badań należy zastosować nie mniej niż trzy dawki preparatu referencyjnego i nie mniej niż trzy dawki badanego preparatu. Należy wybrać takie dawki, aby powstające zmiany miały średnicę nie mniejszą niż 8 mm i nie większą niż 25 mm. Dawki należy umieszczać przypadkowo, stosując wzór kwadratu łacińskiego. Każdą dawkę wstrzykuje się śródskórnie, w stałej objętości 0,1–0,2 ml. Średnicę zmian należy zmierzyć po 24–28 godzinach, a wyniki próby wylicza się z zastosowaniem zwykłych metod statystycznych, zakładając, że średnica zmian jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia tuberkuliny.

Test jest nieważny, jeśli punkty odniesienia błędu ($P = 0,95$) są nie mniejsze niż 50 % i nie większe niż 200 % szacowanej potencji. Szacowana potencja stanowi nie mniej niż 66 % i nie więcej niż 150 % określonej potencji tuberkuliny bydłęcej. Szacowana potencja stanowi nie mniej niż 75 % i nie więcej niż 133 % określonej potencji tuberkuliny ptasiej. Określona potencja wynosi nie mniej niż 20 000 CTU/ml dla obu tuberkulin (bydłęcej i ptasiej).

2.1.6 Przechowywanie

Należy przechowywać w miejscu chronionym od światła, w temperaturze 5 ± 3 °C.

2.1.7 Etykietowanie

Etykieta zawiera:

- potencję w międzynarodowych jednostkach na mililitr,
- nazwę i ilość dodanej substancji,
- dla preparatów liofilizowanych:
 - nazwę i objętość cieczy odtwarzającej, jaka ma zostać dodana,
 - informację o konieczności natychmiastowego zużycia preparatu po odtworzeniu.

2.2 Procedury testowe

2.2.1 Poniższe próby są uznawane za oficjalne śródskórne próby tuberkulinowe:

- pojedyncza próba śródskórna: próba ta wymaga jednokrotnej iniekcji z tuberkuliny bydłęcej,
- śródskórna próba porównawcza: próba wymaga jednej iniekcji z tuberkuliny bydłęcej i jednej iniekcji z tuberkuliny ptasiej, podanych jednocześnie.

- 2.2.2 Dawka tuberkuliny w iniekcji powinna wynosić:
- nie mniej niż 2 000 CTU tuberkuliny bydłowej,
 - nie mniej niż 2 000 CTU tuberkuliny ptasiej.
- 2.2.3 Objętość każdej dawki iniekcyjnej nie powinna przekraczać 0,2 ml.
- 2.2.4 Próby tuberkulinowe wykonuje się przez podskórne wstrzyknięcie tuberkuliny w szyję. Miejsca iniekcji powinny być usytuowane na granicy przedniej i środkowej trzeciej części szyi. W przypadku wykonywania temu samemu zwierzęciu jednocześnie iniekcji tuberkulin bydłowej i ptasiej miejsce iniekcji tuberkulin ptasich powinno być usytuowane około 10 cm od końca szyi, a miejsce iniekcji bydłowej tuberkuliny około 12,5 cm niżej, na linii mniej więcej równoległej do linii łopatki, lub po różnych stronach szyi; w przypadku młodych zwierząt, gdzie nie ma możliwości wystarczającego odseparowania miejsc iniekcji po jednej stronie szyi, z każdej strony szyi wykonuje się jedną iniekcję, w identycznych miejscach, w środku środkowej trzeciej części szyi.
- 2.2.5 Technika wykonania prób tuberkulinowych oraz interpretacja odczynów powinna być następująca:
- 2.2.5.1 Technika:
- Miejsca iniekcji należy wygolić i oczyścić. Fałd skórny wewnątrz wygolonego obszaru należy przytrzymać między palcem wskazującym i kciukiem, zmierzyć jego grubość i zanotować. Dawka tuberkuliny powinna być wstrzykiwana zgodnie z metodą zapewniającą śródskórne wprowadzenie tuberkuliny. Krótką sterylną igłę, z zamocowaną strzykawką z podziałką, zawierającą tuberkulinę, wbija się pod kątem, skośnym cięciem do góry, do głębszych warstw skóry. Poprawne wykonanie iniekcji potwierdza się poprzez wycucie niewielkiego opuchnięcia w kształcie groszku w każdym miejscu iniekcji. Grubość fałdu skórniego w każdym miejscu iniekcji ponownie mierzy się po upływie 72 godzin ($\pm$ 4 godziny) od iniekcji i rejestruje się.
- 2.2.5.2 Interpretacja odczynu
- Interpretacja wyniku odczynu powinna opierać się na obserwacjach klinicznych oraz na odnotowanym wzroście grubości fałdu skórniego w miejscach iniekcji po upływie 72 godzin od iniekcji tuberkulin(-y).
- a) Odczyn negatywny: jeżeli zaobserwowano jedynie ograniczony naciek, wraz ze wzrostem grubości fałdu skórniego nie większym niż 2 mm, bez objawów klinicznych takich jak rozproszona lub wyraźna opuchlizna, wysięk, martwica, ból lub stan zapalny naczyń limfatycznych w okolicy iniekcji lub zapalenie węzłów chłonnych.
 - b) Odczyn niejednoznaczny: jeżeli brak jest objawów klinicznych, takich jak te opisane w lit. a), ale wzrost grubości fałdu skórniego wynosi więcej niż 2 mm, lecz mniej niż 4 mm.
 - c) odczyn pozytywny: jeżeli zaobserwowano objawy kliniczne, takie jak opisane w lit. b), a wzrost grubości fałdu skórniego w miejscu iniekcji przekracza 4 mm.
- 2.2.5.3 Interpretacja oficjalnych śródskórnych prób tuberkulinowych:
- 2.2.5.3.1 Pojedyncza próba śródskórna:
- a) odczyn pozytywny: pozytywny odczyn bydła określony w ppkt 2.2.5.2 lit. c);
 - b) odczyn niejednoznaczny: odczyn niejednoznaczny określony w ppkt 2.2.5.2 lit. b);
 - c) odczyn negatywny: negatywny odczyn bydła określony w ppkt 2.2.5.2 lit. a).
- Zwierzęta wykazujące wynik niejednoznaczny w pojedynczej próbie śródskórnej poddaje się ponownej próbie po upływie przynajmniej 42 dni.
- Zwierzęta, które nie wykazały negatywnego wyniku w drugiej próbie, uważa się za wykazujące wynik pozytywny.
- Jeśli podejrzewana jest reakcja fałszywie pozytywna lub interferencja, zwierzęta wykazujące reakcję pozytywną po jednokrotnej próbie mogą zostać poddane śródskórnej próbie porównawczej.
- 2.2.5.3.2 Śródskórna próba porównawcza, wykonywana w celu określenia i utrzymania statusu stada oficjalnie uznanego za wolne od gruźlicy:
- a) odczyn pozytywny: pozytywny odczyn na tuberkulinę bydłową, ponad 4 mm większy niż odczyn na tuberkulinę ptasią lub obecność objawów klinicznych;
 - b) odczyn niejednoznaczny: pozytywny lub niejednoznaczny odczyn na tuberkulinę bydłową, od 1 do 4 mm większy niż odczyn na tuberkulinę ptasią, brak objawów klinicznych;
 - c) odczyn negatywny: negatywny odczyn na tuberkulinę bydłową lub pozytywny, albo niejednoznaczny odczyn na tuberkulinę bydłową, równy lub mniejszy niż pozytywny, lub niejednoznaczny odczyn na tuberkulinę ptasią, w obu przypadkach brak objawów klinicznych.
- Zwierzęta, które w śródskórnej próbie porównawczej wykazały wynik niejednoznaczny, poddaje się następnej próbie, po upływie przynajmniej 42 dni. Zwierzęta, które nie wykazały negatywnego wyniku w drugiej próbie, uważa się za wykazujące wynik pozytywny.

2.2.5.3.3 Status stada oficjalnie uznanego za wolne od gruźlicy może zostać zawieszony, a zwierzęta z tego stada nie będą dopuszczone do udziału w handlu wewnątrzwspólnotowym do czasu wyjaśnienia statusu następujących zwierząt:

- a) zwierząt, które wykazały niejednoznaczny wynik w pojedynczej śródskórnej próbie tuberkulinowej;
- b) zwierząt, które wykazały wynik pozytywny w pojedynczej śródskórnej próbie tuberkulinowej, ale oczekują na wynik śródskórnej próby porównawczej;
- c) zwierząt, które wykazały niejednoznaczny wynik w śródskórnej próbie porównawczej.

2.2.5.3.4 Jeżeli prawodawstwo wspólnotowe wymaga, aby zwierzęta były poddawane próbom śródskórnym przed ich przemieszczeniem, próbę należy tak interpretować, aby żadne zwierzę, które wykazało zwiększoną grubość fałdu skórniego o ponad 2 mm lub obecność objawów klinicznych, nie zostało dopuszczone do handlu wewnątrzwspólnotowego.

2.2.5.3.5 Celem wykrycia maksymalnej liczby zwierząt zakażonych i chorych w danym stadzie lub regionie Państwa Członkowskie mogą zmienić kryteria interpretacji próby, w celu poprawy jej czułości, uznając za pozytywne wszystkie reakcje niejednoznaczne określone w ppkt 2.2.5.3.1 lit. b) i ppkt 2.2.5.3.2 lit. b).

3. PRÓBY DODATKOWE

Celem wykrycia maksymalnej liczby zwierząt zakażonych i chorych w danym stadzie lub regionie Państwa Członkowskie mogą, oprócz próby tuberkulinowej, zezwolić na zastosowanie próby interferonu-gamma opisanej w Podręczniku Norm dla Testów Diagnostycznych oraz Szczepionek Międzynarodowego Biura Epizootii, wydanie czwarte 2000, rozdział 2.3.3 (gruźlica bydła).

4. INSTYTUTY PAŃSTWOWE I KRAJOWE LABORATORIA REFERENCYJNE

4.1 Zadania i obowiązki

Instytuty państwowe i laboratoria referencyjne w Państwach Członkowskich, wymienione w ppkt 3.2, są odpowiedzialne za oficjalne próby tuberkulinowe lub badanie odczynników określonych w pkt 2 i 3, celem zapewnienia adekwatności tuberkulin i odczynników w stosunku do norm określonych powyżej.

4.2 Wykaz instytutów państwowych i krajowych laboratoriów referencyjnych

1) Niemcy:

Paul-Erlich Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-23207 Langen; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin – Bereich Jena – D-07743 Jena;

2) Belgia:

Institut scientifique de la santé publique – Louis Pasteur, 14 Rue Juliette Wytsman – B 1050 Bruxelles – Belgique;

3) Francja:

Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fourgères;

4) Wielkie Księstwo Luksemburga:

Instytut kraju dostarczającego;

5) Włochy:

Istituto superiore di Sanità, Rzym;

6) Królestwo Niderlandów:

Centraal Instituut voor Dierziekte Controle Lelystad (CIDC-Lelystad), Lelystad;

7) Dania:

Danmarks Veterinærinstitut Bülowsvej 27, DK-1790 København;

8) Irlandia:

Instytut kraju dostarczającego;

9) Zjednoczone Królestwo:

Veterinary Laboratory Agency, Addlestone, Weybridge;

10) Grecja:

Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων, Νεαπόλεως 25, 153 10 Αθήνα;

- 11) Hiszpania:
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Granada;
 - 12) Portugalia:
Laboratorio Nacional de Investigação Veterinária, Lisbon;
 - 13) Austria:
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling;
 - 14) Finlandia:
Eläinlääkintä – ja elintarviketutkimus – laitos –Forskningsanstalten för veterinärmedicin och livsmedel,
Helsinki;
 - 15) Szwecja:
Statens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala.”
-