Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilitá delle istituzioni

►**B**

DIRETTIVA DEL CONSIGLIO

del 26 giugno 1990

relativa alle condizioni di polizia sanitaria che disciplinano i movimenti di equidi e le importazioni di equidi in provenienza dai paesi terzi

(90/426/CEE)

(GU L 224 del 18.8.1990, pag. 42)

Modificata da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►**M1**	Direttiva del Consiglio 90/425/CEE, del 26 giugno 1990	L 224	29	18.8.1990
►**M2**	Direttiva del Consiglio 91/496/CEE, del 15 luglio 1991	L 268	56	24.9.1991
►**M3**	Decisione 92/130/CEE della Commissione del 13 febbraio 1992	L 47	26	22.2.1992
►**M4**	Direttiva 92/36/CEE del Consiglio del 29 aprile 1992	L 157	28	10.6.1992
►**M5**	Decisione 2001/298/CE della Commissione del 30 marzo 2001	L 102	63	12.4.2001
►**M6**	Decisione 2002/160/CE della Commissione del 21 febbraio 2002	L 53	37	23.2.2002
►**M7**	Regolamento (CE) n. 806/2003 del Consiglio del 14 aprile 2003	L 122	1	16.5.2003
►**M8**	Direttiva 2004/68/CE del Consiglio del 26 aprile 2004	L 226	128	25.6.2004
►**M9**	Direttiva 2006/104/CE del Consiglio del 20 novembre 2006	L 363	352	20.12.2006

Modificata da:

►**A1**	Atto di adesione dell'Austria, della Finlandia e della Svezia	C 241	21	29.8.1994
	(adattado dalla decisione 95/1/CE, Euratom, CECA del Consiglio)	L 1	1	1.1.1995
►**A2**	Atto relativo alle condizioni di adesione della Repubblica ceca, della Repubblica di Estonia, della Repubblica di Cipro, della Repubblica di Lettonia, della Repubblica di Lituania, della Repubblica di Ungheria, della Repubblica di Malta, della Repubblica di Polonia, della Repubblica di Slovenia e della Repubblica slovacca e agli adattamenti dei trattati sui quali si fonda l'Unione europea	L 236	33	23.9.2003

Rettificato da:

►**C1** Rettifica, GU L 296 del 27.10.1990, pag. 66 (90/426/EEC)

▼B

DIRETTIVA DEL CONSIGLIO

del 26 giugno 1990

relativa alle condizioni di polizia sanitaria che disciplinano i movimenti di equidi e le importazioni di equidi in provenienza dai paesi terzi

(90/426/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, gli equidi figurano, in quanto animali vivi, nell'elenco dei prodotti enumerati nell'allegato II del trattato;

considerando che, per favorire uno sviluppo razionale della produzione di equidi e l'aumento della produttività del settore, occorre stabilire, a livello comunitario, norme che disciplinano i movimenti degli equidi tra gli Stati membri;

considerando che l'allevamento degli equidi e, in particolare, dei cavalli, rientra generalmente nell'ambito delle attività agricole; che esso costituisce una fonte di reddito per una parte della popolazione agricola;

considerando che è opportuno eliminare le disparità esistenti tra i diversi Stati membri in materia di polizia sanitaria, per promuovere gli scambi intracomunitari di equidi;

considerando che, per consentire uno sviluppo armonioso degli scambi intracomunitari, occorre definire una normativa comunitaria applicabile alle importazioni in provenienza da paesi terzi;

considerando che occorre anche disciplinare le condizioni di movimento sul territorio nazionale per quanto riguarda gli equidi registrati muniti di un documento di identificazione;

considerando che per partecipare agli scambi, gli equidi devono soddisfare taluni requisiti di polizia sanitaria intesi ad evitare la propagazione di malattie contagiose; che sembra opportuno in particolare prevedere una possibile regionalizzazione delle misure restrittive;

considerando che occorre altresì, nella stessa ottica, stabilire norme sul trasporto degli equini;

considerando che sembra necessario, per garantire il rispetto dei requisiti previsti, prescrivere il rilascio, da parte di un veterinario ufficiale di un certificato sanitario destinato ad accompagnare gli equidi fino al luogo di destinazione;

considerando che l'organizzazione ed il seguito dei controlli incombenti allo Stato membro di destinazione e le misure di salvaguardia devono essere fissati nell'ambito della regolamentazione che deve essere adottata per i controlli veterinari negli scambi intracomunitari di animali vivi nella prospettiva della realizzazione del mercato interno;

([1]) GU n. C 327 del 30. 12. 1989, pag. 61.
([2]) GU n. C 149 del 18. 6. 1990.
([3]) GU n. C 62 del 12. 3. 1990, pag. 46.

▼B

considerando che occorre prevedere la possibilità di controlli da parte della Commissione; che detti controlli devono essere effettuati in collaborazione con le autorità nazionali competenti;

considerando che la definizione di un regime comunitario applicabile alle importazioni in provenienza da paesi terzi presuppone l'adozione di un elenco di paesi terzi o di parti di paesi terzi dai quali possono essere importati gli equidi;

considerando che la scelta di tali paesi deve essere basata su criteri di ordine generale, come lo stato sanitario del patrimonio zootecnico, l'organizzazione e i poteri dei servizi veterinari e la regolamentazione sanitaria vigente;

considerando, inoltre, che non si devono autorizzare le importazioni di equidi in provenienza da paesi colpiti, o esenti soltanto da troppo poco tempo, da malattie contagiose degli animali le quali costituiscano un pericolo per il patrimonio zootecnico della Comunità; che le medesime considerazioni valgono per le importazioni in provenienza da paesi terzi in cui vengano effettuate vaccinazioni contro tali malattie;

considerando che le condizioni generali applicabili alle importazioni in provenienza da paesi terzi devono essere integrate da condizioni particolari stabilite in funzione della situazione sanitaria di ciascun paese terzo; che è necessario per la definizione di tali condizioni particolari, dato il loro carattere tecnico e la diversità dei criteri su cui si fondano, ricorrere ad una procedura comunitaria elastica e rapida nel cui corso la Commissione e gli Stati membri collaborino strettamente;

considerando che, la presentazione al momento dell'importazione degli equidi, di un certificato conforme ad un modello comune costituisce un mezzo efficace per accertare l'applicazione della regolamentazione comunitaria; che tale regolamentazione può contenere disposizioni particolari che possono variare secondo i paesi terzi e che i modelli dei certificati devono essere redatti di conseguenza;

considerando che è opportuno affidare agli esperti veterinari della Comunità l'incarico di verificare, in particolare nei paesi terzi, il rispetto dei requisiti della presente direttiva;

considerando che il controllo all'importazione deve riguardare l'origine e lo stato sanitario degli equidi;

considerando che occorre definire in un ambito globale le regole generali applicabili ai controlli che devono essere effettuati al momento dell'importazione;

considerando che ogni Stato membro deve avere la possibilità di vietare immediatamente le importazioni in provenienza da un determinato paese terzo, ove queste possano costituire un pericolo per la salute degli animali; che, in tal caso, e fatta salva la possibilità di modifiche dell'elenco dei paesi autorizzati ad esportare verso la Comunità, occorre garantire un tempestivo coordinamento della posizione degli Stati membri nei confronti di un tale paese terzo;

considerando che le disposizioni della presente direttiva devono essere riesaminate nel quadro della realizzazione del mercato interno;

considerando che è opportuno predisporre una procedura che instauri una cooperazione stretta ed efficace tra gli Stati membri e la Commissione in sede di comitato veterinario permanente;

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

▼B

CAPITOLO I

Disposizioni generali

Articolo 1

La presente direttiva definisce le condizioni di polizia sanitaria che disciplinano i movimenti di equidi tra Stati membri e le importazioni di equidi in provenienza dai paesi terzi.

Articolo 2

Ai fini della presente direttiva, si intende per:

a) azienda: l'azienda agricola o di addestramento, la stalla o, in generale, qualsiasi locale o impianto in cui siano tenuti o allevati abitualmente equidi indipendentemente dal loro impiego;

b) equidi: gli animali domestici o selvatici della specie equina — comprese le zebre — o asinina o gli animali derivati dall'incrocio di tali specie;

c) equide registrato: qualsiasi equide registrato in conformità della definizione di cui alla direttiva 90/427/CEE ([1]), identificato per mezzo di un documento di identificazione rilasciato dall'autorità di allevamento o da qualsiasi altra competente autorità del paese di origine dell'equide, la quale tenga il libro genealogico o il registro della razza dell'equide o da qualsiasi associazione o organismo internazionale che gestisca cavalli per competizioni o corse;

d) equidi da macello: gli equidi destinati ad essere condotti al macello per esservi macellati o direttamente o dopo essere transitati per un mercato o un centro di raccolta riconosciuto;

e) equidi di allevamento e da reddito: gli equidi diversi da quelli menzionati alle lettere c) e d);

f) Stato membro o paese terzo indenne da peste equina: qualsiasi Stato membro o paese terzo sul cui territorio nessuna prova clinica, sierologica (se gli equini non sono vaccinati) o epidemiologica abbia permesso di accertare la presenza di peste equina nel corso degli ultimi due anni e in cui la vaccinazione contro questa malattia non sia stata effettuata nel corso degli ultimi dodici mesi;

g) malattie soggette all'obbligo di denuncia: le malattie elencate all'allegato A;

h) veterinario ufficiale: il veterinario designato dalla competente autorità centrale dello Stato membro o di un paese terzo;

i) ammissione temporanea: la condizione giuridica di un equide registrato proveniente da un paese terzo ed ammesso nel territorio della Comunità per un periodo, non superiore a 90 giorni, che dovrà essere fissato dalla Commissione, secondo la procedura di cui all'articolo 24, in funzione della situazione sanitaria del paese d'origine.

CAPITOLO II

Regole per i movimenti di equidi

Articolo 3

Uno Stato membro autorizza il movimento nel proprio territorio di equidi registrati e spedisce equidi verso il territorio di un altro Stato

([1]) GU n. L 224 del 18. 8. 1990, pag. 55.

▼B

membro soltanto se detti equidi soddisfano le condizioni di cui agli articoli 4 e 5.

Tuttavia, le autorità competenti degli Stati membri di destinazione possono accordare deroghe generali o limitate per i movimenti di equidi:

— che siano montati o trasportati a scopo sportivo o ricreativo su strade che si trovano in prossimità delle frontiere interne della Comunità;

— che partecipino a manifestazioni culturali o di tipo analogo o ad attività organizzate da organismi locali abilitati, situati in prossimità delle frontiere interne della Comunità;

— che siano destinati esclusivamente al pascolo o al lavoro temporaneo in prossimità delle frontiere interne della Comunità.

Gli Stati membri che utilizzano questa autorizzazione informano la Commissione del contenuto delle deroghe accordate.

Articolo 4

1. Gli equidi non devono presentare alcun segno clinico di malattia al momento dell'ispezione. L'ispezione deve essere effettuata nelle 48 ore che precedono l'imbarco o il carico. Tuttavia, per gli equidi registrati, questa ispezione è richiesta solo per gli scambi intracomunitari, fatto salvo l'articolo 6.

2. Fatti salvi i requisiti di cui al paragrafo 5 per quanto riguarda le malattie soggette all'obbligo di denuncia il veterinario ufficiale deve assicurarsi — al momento dell'ispezione — in base, alle dichiarazioni del proprietario e dell'allevatore, che nulla permetta di concludere che gli equidi siano stati in contatto con equidi infetti o affetti da malattia contagiosa nei quindici giorni precedenti l'ispezione.

3. Gli equidi non devono essere animali da eliminare nel quadro di un programma di eradicazione di una malattia contagiosa, posto in atto in uno Stato membro.

4. Gli equidi devono essere soggetti a identificazione a cui si dovrà procedere

i) per i cavalli registrati, mediante un documento di identificazione prevista nella direttiva 90/427/CEE ([1]); detto documento deve attestare in particolare il rispetto dei paragrafi 5 e 6 del presente articolo e dell'articolo 5. La validità del documento dovrà essere sospesa dal veterinario ufficiale per tutta la durata dei divieti di cui al paragrafo 5 del presente articolo o all'articolo 5. Il documento dovrà essere restituito all'autorità che l'ha rilasciato dopo l'abbattimento del cavallo registrato. Le modalità di applicazione del presente punto saranno adottate dalla Commissione secondo la procedura prevista all'articolo 24;

ii) per gli equidi da allevamento e da reddito, secondo un metodo di identificazione che dovrà essere determinato dalla Commissione secondo la procedura prevista all'articolo 24.

In attesa dell'applicazione di questo metodo, restano applicabili i metodi di identificazione nazionali ufficialmente autorizzati, purché siano notificati alla Commissione ed agli altri Stati membri entro un termine di tre mesi a decorrere dalla data di adozione della presente direttiva.

5. Oltre a quanto stabilito all'articolo 5, gli equidi non devono provenire da un'azienda oggetto di una delle seguenti misure di divieto:

a) Qualora non siano stati abbattuti o ammazzati tutti gli animali che si trovano nell'azienda, delle specie sensibili alla malattia, la durata del divieto per l'azienda di provenienza deve essere pari ad almeno:

([1]) GU n. L 224 del 18. 8 1990, pag. 55.

▼B

— nel caso in cui si sospetti che gli equidi siano colpiti da durina, sei mesi a decorrere dalla data dell'ultimo contatto o del possibile contatto con un equide malato. Ove si tratti di uno stallone, il divieto vige fino alla sua castrazione,

— in caso di morva e di encefalomielite equina, sei mesi a decorrere dalla data in cui gli equidi infetti sono stati eliminati,

— in caso di anemia infettiva, il periodo necessario perché, a decorrere dalla data in cui gli equidi infetti sono stati eliminati, gli animali restanti abbiano reagito negativamente a due test di Coggins effettuati ad un intervallo di tre mesi,

— sei mesi a decorrere dall'ultimo caso di stomatite vescicolosa,

— un mese a decorrere dall'ultimo caso di rabbia accertata,

— quindici giorni a decorrere dall'ultimo caso di carbonchio ematico accertato.

b) qualora tutti gli animali delle specie sensibili che si trovano nell'azienda siano stati abbattuti o ammazzati e i locali siano stati disinfettati, la durata del divieto è di trenta giorni a decorrere dalla data in cui gli animali sono stati eliminati ed i locali disinfettati, tranne quando si tratta del carbonchio ematico, nel qual caso la durata del divieto è di quindici giorni.

Le autorità competenti possono derogare a queste misure di divieto per gli ippodromi e i campi di corse ed esse informano la Commissione della natura delle deroghe accordate.

6. Nel caso in cui uno Stato membro stabilisca o abbia stabilito un programma facoltativo o obbligatorio di lotta contro una malattia cui gli equidi siano sensibili, esso può, entro un termine di sei mesi a decorrere dalla notifica della presente direttiva, sottoporre detto programma alla Commissione, precisando in particolare:

— la situazione della malattia nel proprio territorio;

— la giustificazione del programma tenuto conto dell'importanza della malattia e dei vantaggi costo/beneficio;

— la zona geografica in cui il programma deve essere applicato;

— i vari statuti da applicare alle aziende e le norme che devono essere osservate per ciascuna specie, nonché le procedure per le prove;

— le procedure di controllo del programma;

— la conseguenza da trarre in caso di perdita dello statuto di azienda per una qualsiasi ragione;

— le misure da prendere in caso di risultati positivi constatati al momento dei controlli effettuati conformemente alle disposizioni del programma;

— la non discriminazione tra gli scambi sul territorio dello Stato membro interessato e gli scambi intracomunitari.

La Commissione esamina i programmi comunicati dagli Stati membri. Se necessario, essa li approva, rispettando i criteri di cui al primo comma secondo la procedura prevista all'articolo 24. Secondo la stessa procedura, possono essere precisate garanzie complementari generali o limitate esigibili negli scambi intracomunitari. Dette garanzie devono essere al massimo equivalenti a quelle che lo Stato membro applica nell'ambito nazionale.

I programmi presentati dagli Stati membri possono essere modificati o completati secondo la procedura prevista all'articolo 25. Secondo la stessa procedura, può essere approvata una modifica o un'aggiunta a un programma precedentemente approvato e alle garanzie definite conformemente al secondo comma.

▼M4

Articolo 5

1. Gli Stati membri non indenni da peste equina ai sensi dell'articolo 2, lettera f), possono spedire equidi in provenienza dalla parte di territorio considerata infetta ai sensi del paragrafo 2 del presente articolo soltanto alle condizioni stabilite nel paragrafo 3 del presente articolo.

2. a) Una parte del territorio di uno Stato membro è considerata infetta da peste equina qualora:

— nei due anni precedenti, prove cliniche, sierologiche (negli animali non vaccinati) e/o epidemiologiche abbiano permesso di accertare la presenza di peste equina, oppure

— nei dodici mesi precedenti sia stata praticata la vaccinazione contro la peste equina.

b) La parte del territorio considerata infetta da peste equina deve essere composta almeno:

— da una zona di protezione con un raggio minimo di 100 km intorno ad ogni focolaio;

— da una zona di sorveglianza profonda almeno 50 km, che si estenda oltre i limiti della zona di protezione ed in cui nei dodici mesi precedenti non sia stata praticata alcuna vaccinazione.

c) Le regole di controllo delle misure di lotta per i territori e le zone previsti alle lettere a) e b) nonché le relative deroghe sono precisate nella direttiva 92/35/CEE ([1]).

d) Tutti gli equidi vaccinati presenti nella zona di protezione devono essere registrati e identificati conformemente all'articolo 6, paragrafo 1 della direttiva 92/35/CEE.

Nel documento di identificazione e/o sul certificato sanitario deve figurare chiaramente l'indicazione di tale vaccinazione.

3. Uno Stato membro può spedire dal territorio di cui al paragrafo 2, lettera b) soltanto equidi che soddisfino i requisiti seguenti:

a) essere spediti unicamente in certi periodi dell'anno, in funzione dell'attività degli insetti vettori, da fissare secondo la procedura prevista all'articolo 25;

b) non presentare alcun segno clinico di peste equina il giorno dell'ispezione di cui all'articolo 4, paragrafo 1;

c) — se non sono stati vaccinati contro la peste equina, devono aver subito, con una reazione negativa, per due volte, la prova di fissazione del complemento per la peste equina descritta all'allegato D, ad un intervallo compreso tra ventuno e trenta giorni; la seconda prova deve essere effettuata entro i dieci giorni che precedono la spedizione,

— se sono stati vaccinati, la vaccinazione deve essere stata effettuata più di due mesi prima e devono aver subito la prova di fissazione descritta all'allegato D agli intervalli di cui sopra, senza che sia stato constatato un rialzo di anticorpi. Secondo la procedura di cui all'articolo 24, la Commissione può, previo parere del comitato scientifico veterinario, riconoscere altri metodi di controllo;

d) essere stati tenuti in un centro di quarantena per un periodo minimo di quaranta giorni prima della spedizione;

e) essere stati protetti dagli insetti vettori durante il periodo di quarantena e nel corso del trasporto dal centro di quarantena al luogo di spedizione.

([1]) GU n. L 157 del 10. 6. 1992, pag. 19.

▼B

Articolo 6

Gli Stati membri che applicano un regime alternativo di controllo che offra garanzie alternative equivalenti a quelle previste all'articolo 4, paragrafo 5 per i movimenti sul proprio territorio degli equidi e degli equidi registrati, in particolare mediante il documento di identificazione, possono accordare — su base reciproca — una deroga dell'articolo 4, paragrafo 1, seconda frase e dell'articolo 8, paragrafo 1, secondo trattino.

Essi ne informano la Commissione.

Articolo 7

1. Gli equidi debbono essere trasportati, entro il più breve tempo, dall'azienda di provenienza al luogo di destinazione, direttamente o tramite un mercato, una fiera o un centro di raccolta autorizzati, quali definiti dall'articolo 3, paragrafo 6 della direttiva 64/432/CEE, mediante mezzi di trasporto e di contenzione regolarmente puliti e disinfettati con un disinfettante, secondo una frequenza che deve essere stabilita dallo Stato membro di spedizione. I veicoli adibiti al trasporto devono essere concepiti in modo che le feci, lo strame o il foraggio degli equidi non possano colare o cascare dal veicolo durante il trasporto. Le modalità del trasporto debbono assicurare una protezione sanitaria efficace e il benessere degli equidi.

2. Lo Stato membro di destinazione può, in modo generale o limitato, accordare una deroga per quanto riguarda taluni requisiti di cui all'articolo 4, paragrafo 5, purché l'animale sia munito di un marchio particolare indicante che è esso destinato al macello e purché la menzione della deroga figuri sul certificato sanitario.

Se è accordata una deroga, gli equini da macello devono essere trasportati direttamente nel mattatoio designato affinché siano macellati entro un termine non superiore a 5 giorni dopo l'arrivo al mattatoio.

3. Il veterinario ufficiale deve annotare in un registro il numero di identificazione o il numero del documento di identificazione dell'equide abbattuto e trasmettere all'autorità competente del luogo di spedizione, a sua richiesta, un attestato che certifichi l'avvenuto abbattimento dell'equide.

Articolo 8

1. Gli Stati membri provvedono affinché:

— se lasciano l'azienda, gli equidi registrati siano accompagnati dal documento di identificazione di cui all'articolo 4, paragrafo 4, corredato dell'attestato di cui all'allegato B nel caso in cui detti equidi siano destinati agli scambi intracomunitari,

— durante il trasporto, gli equidi da allevamento, da produzione e da macello siano accompagnati da un certificato sanitario conforme all'allegato C.

Il certificato o, nel caso di un documento di identificazione, il foglio contenente le informazioni sanitarie, devono — fatto salvo l'articolo 6 — essere compilati rispettivamente 48 ore prima dell'imbarco o al più tardi l'ultimo giorno lavorativo che precede l'imbarco, nella lingua ufficiale o nelle lingue ufficiali dello Stato membro di spedizione e di destinazione. La validità del certificato è di 10 giorni. Il certificato deve constare di un solo foglio.

2. Le importazioni di equidi che non siano equidi registrati, possono aver luogo con un unico certificato sanitario per tutta la fornitura anziché col certificato individuale di cui al paragrafo 1, secondo trattino.

▼M1

Articolo 9

Le norme previste dalla direttiva 90/425/CEE del Consiglio, del 26 giugno 1990, relativa ai controlli veterinari e zootecnici applicabili negli scambi intracomunitari di taluni animali vivi e prodotti di origine animale, nella prospettiva della realizzazione del mercato interno [1], si applicano segnatamente per quanto riguarda i controlli all'origine, l'organizzazione e gli esiti dei controlli da effettuare da parte dello Stato membro destinatario e le misure di salvaguardia da attuare.

▼B

Articolo 10

Gli esperti veterinari della Commissione possono procedere a controlli in loco, nella misura in cui sia necessario per l'applicazione uniforme della presente direttiva ed in collaborazione con le autorità nazionali competenti. La Commissione informa gli Stati membri del risultato dei controlli effettuati.

Lo Stato membro sul cui territorio viene effettuato un simile controllo fornisce agli esperti tutta l'assistenza necessaria per l'espletamento dei compiti loro assegnati.

Le modalità di applicazione del presente articolo sono stabilite secondo la procedura prevista all'articolo 24.

CAPITOLO III

Norme per le importazioni in provenienza da paesi terzi

Articolo 11

1. Gli equidi importati nella Comunità devono soddisfare le condizioni stabilite negli articoli da 12 a 16.

2. Fino all'entrata in vigore delle relative decisioni adottate in applicazione degli articoli da 12 a 16, gli Stati membri applicano alle importazioni di equidi in provenienza dai paesi terzi condizioni almeno equivalenti a quelle risultanti dall'applicazione del capitolo II.

▼M8

Articolo 12

1. L'importazione nella Comunità di equidi è autorizzata unicamente in provenienza da paesi terzi autorizzati che figurano in un elenco o in elenchi da stilare o modificare secondo la procedura di cui all'articolo 24, paragrafo 2.

Alla luce della situazione sanitaria nel paese terzo interessato e delle garanzie fornite da quest'ultimo per quanto riguarda gli equidi, si può decidere, secondo la procedura di cui all'articolo 24, paragrafo 2, che l'autorizzazione prevista dal primo comma del presente paragrafo si applichi all'intero territorio del paese terzo o solo a una parte di questo.

A tale scopo e sulla base delle norme internazionali pertinenti, si terrà conto delle modalità di applicazione di tali norme da parte del paese terzo, in particolare del principio della regionalizzazione all'interno del suo territorio, tenuto conto delle norme sanitarie relative alle importazioni provenienti da altri paesi terzi e della Comunità.

2. Nell'elaborare o modificare gli elenchi di cui al paragrafo 1, va tenuto conto in particolare:

[1] GU n. L 224 del 18. 8. 1990, pag. 29.

▼M8

a) dello stato di salute degli equidi, di altri animali domestici e della fauna selvatica del paese terzo, prestando particolare attenzione alle malattie animali esotiche e a tutti gli aspetti della situazione sanitaria e ambientale generale del paese, nella misura in cui essa possa rappresentare un rischio per la situazione sanitaria e ambientale della Comunità;

b) della legislazione del paese terzo in materia di salute e benessere degli animali;

c) dell'organizzazione dell'autorità veterinaria competente e dei suoi servizi ispettivi, dei poteri di questi ultimi, della sorveglianza a cui essi sono soggetti, nonché dei mezzi di cui essi dispongono, anche sul piano del personale e delle capacità di laboratorio, ai fini della corretta applicazione della legislazione nazionale;

d) delle garanzie che l'autorità veterinaria competente del paese terzo può dare per quanto riguarda la conformità con le condizioni di polizia sanitaria in vigore nella Comunità o l'applicazione di condizioni equivalenti;

e) dell'appartenenza del paese terzo all'Ufficio internazionale delle epizoozie (OIE), nonché della regolarità e della rapidità delle informazioni fornite da tale paese circa l'esistenza di malattie equine infettive o contagiose sul suo territorio, in particolare di malattie registrate dall'OIE ed elencate nell'allegato A della presente direttiva;

f) delle garanzie fornite dal paese terzo circa l'informazione diretta della Commissione e degli Stati membri:

   i) entro 24 ore, della conferma della presenza di una malattia equina infettiva di cui all'allegato A e di ogni cambiamento nella politica di vaccinazione contro tali malattie;

   ii) entro un termine adeguato di ogni modifica proposta delle norme sanitarie nazionali relative agli equidi, in particolare per quanto concerne le importazioni;

   iii) a intervalli regolari, della situazione zoosanitaria del suo territorio per quanto riguarda gli equidi;

g) di ogni esperienza in materia di importazioni di equidi vivi provenienti dal paese terzo e dei risultati di eventuali controlli effettuati all'importazione;

h) dei risultati delle ispezioni e/o dei controlli comunitari realizzati nel paese terzo, in particolare dei risultati della valutazione effettuata dalle autorità competenti o, su richiesta della Commissione, della relazione presentata dalle autorità competenti sulle ispezioni condotte;

i) delle norme in vigore nel paese terzo in materia di prevenzione e di lotta contro le malattie animali infettive o contagiose e della loro applicazione, comprese le disposizioni relative alle importazioni di equidi provenienti da altri paesi terzi.

3. La Commissione adotta le disposizioni necessarie affinché le versioni aggiornate di tutti gli elenchi redatti o modificati a norma del paragrafo 1 siano accessibili al pubblico.

Tali elenchi possono essere combinati con altri elenchi redatti per proteggere la salute degli animali e la salute pubblica e possono includere anche modelli di certificati sanitari.

4. Le condizioni particolari di importazione per ciascun paese terzo o gruppo di paesi terzi, alla luce della situazione zoosanitaria, per quanto riguarda gli equidi, del paese terzo o dei paesi terzi interessati, sono stabilite secondo la procedura di cui all'articolo 24, paragrafo 2.

5. Le modalità d'applicazione del presente articolo, nonché i criteri di iscrizione dei paesi terzi o di parti dei paesi terzi negli elenchi previsti al

▼M8

paragrafo 1 possono essere adottate secondo la procedura di cui all'articolo 24, paragrafo 2.

▼B

Articolo 13

1. Gli equidi devono provenire da un paese terzo:

a) indenne da peste equina;

b) indenne da due anni da encefalomielite equina venezuelana (VEE);

c) indenne da sei mesi da durina e da morva.

2. La Commissione agendo secondo la procedura di cui all'articolo 24, può:

a) decidere che il paragrafo 1 è applicabile soltanto ad una parte del territorio di un paese terzo.

In caso di regionalizzazione dei requisiti per la peste equina, le misure di cui all'articolo 5, paragrafi 2 e 3, devono essere almeno rispettate;

b) esigere ulteriori garanzie per malattie esotiche per la Comunità.

Articolo 14

Prima del giorno in cui sono caricati per essere spediti nello Stato membro destinatario, gli equidi devono essere stati ininterrottamente nel territorio o in parte del territorio del paese terzo o, in caso di regionalizzazione, nella parte del territorio definita in applicazione dell'articolo 13, paragrafo 2, lettera a) per un periodo che verrà fissato al momento dell'adozione delle decisioni da prendere a norma dell'articolo 15.

Essi devono provenire da un'azienda posta sotto controllo veterinario.

Articolo 15

Le importazioni di equidi dal territorio di un paese terzo o da una parte di territorio di un paese terzo definita conformemente all'articolo 13, paragrafo 2, lettera a) figurante nell'elenco di cui all'articolo 12, paragrafo 1, possono aver luogo unicamente se, oltre ai requisiti di cui all'articolo 13:

a) essi rispondono alle norme di polizia sanitaria adottate, secondo la procedura prevista all'articolo 24, per le importazioni di equidi in provenienza da tale paese in funzione della specie in questione e delle categorie di equidi.

Per stabilire le norme di polizia sanitaria, conformemente al paragrafo 1, si applicano, come base di riferimento, le norme previste agli articoli 4 e 5 e

b) qualora si tratti di paesi terzi non indenni da stomatite vescicolosa o da arterite virale da almeno sei mesi, gli equidi devono soddisfare le seguenti condizioni:

i) gli equidi devono provenire da un'azienda indenne da stomatite vescicolosa da almeno sei mesi ed avere reagito negativamente ad una prova sierologica prima della loro spedizione;

ii) per l'arterire virale, gli equidi maschi devono — fatto salvo il disposto dell'articolo 19, punto ii) — aver reagito negativamente ad una prova sierologica o ad un virus d'isolamento o a qualsiasi altra prova che sia riconosciuta secondo la procedura dell'articolo 24 e che garantisca che l'animale è indenne da tale malattia.

▼B

La Commissione, agendo secondo la procedura di cui all'articolo 24 e previo parere del comitato scientifico veterinario, può delimitare le categorie di equidi maschi cui si applica questa condizione.

Articolo 16

1. Gli equidi devono essere identificati conformemente all'articolo 4, paragrafo 4 ed essere scortati da un certificato compilato da un veterinario ufficiale del paese terzo esportatore. Il certificato deve:

a) essere rilasciato il giorno del carico degli equini per la spedizione verso lo Stato membro destinatario ovvero, qualora si tratti di cavalli registrati, l'ultimo giorno lavorativo precedente l'imbarco;

b) essere redatto almeno in una delle lingue ufficiali dello Stato membro destinatario e in una di quelle dello Stato membro in cui viene effettuato il controllo all'importazione;

c) accompagnare gli animali nell'esemplare originale;

d) attestare che gli equidi rispondono alle norme previste nella presente direttiva ed a quelle stabilite in applicazione della stessa per le importazioni dal paese terzo;

e) constare di un solo foglio;

f) essere rilasciato per un solo destinatario o, nel caso di equidi da macello, per una fornitura debitamente marchiata ed identificata.

Gli Stati membri informano la Commissione se ricorrono a questa possibilità.

2. Il certificato deve essere redatto su un formulario conforme ad un modello stabilito secondo la procedura prevista all'articolo 24.

Articolo 17

Esperti veterinari degli Stati membri e della Commissione effettuano controlli in loco per verificare se le disposizioni della presente direttiva, e in particolare quelle dell'articolo 12, paragrafo 2, sono effettivamente applicate.

Se, nel corso di un'ispezione effettuata in applicazione del presente articolo si riscontrano fatti gravi riguardo ad un'azienda, la Commissione ne informa immediatamente gli Stati membri ed adotta senza indugio una decisione di sospensione provvisoria dell'autorizzazione. La decisione finale al riguardo viene adottata secondo la procedura prevista all'articolo 25.

Gli esperti degli Stati membri incaricati di tali controlli sono designati dalla Commissione su proposta degli Stati membri.

Tali controlli sono svolti per conto della Comunità che si sobbarca le spese relative.

La periodicità e la modalità di detti controlli sono determinate secondo la procedura di cui all'articolo 24.

Articolo 18

1. Al loro arrivo nello Stato membro destinatario, gli equidi da macello devono essere condotti direttamente o dopo essere transitati per un mercato o un centro di raccolta, in un macello ed essere abbattuti conformemente ai requisiti di polizia sanitaria entro un termine che deve essere fissato al momento dell'adozione delle decisioni da prendere in applicazione dell'articolo 15.

▼B

2. Fatte salve le norme particolari eventualmente stabilite secondo la procedura prevista all'articolo 24, l'autorità competente dello Stato membro destinatario può, per motivi di polizia sanitaria, designare il macello verso cui gli equidi devono essere avviati.

Articolo 19

La Commissione, agendo secondo la procedura prevista all'articolo 24:

i) può limitare le importazioni in provenienza da un paese terzo o da una parte di paese terzo, a specie o categorie particolari di equidi;

ii) stabilisce in deroga all'articolo 15, le condizioni particolari secondo cui può essere effettuata l'ammissione temporanea nel territorio della Comunità, ovvero la reintroduzione in detto territorio dopo che è stata effettuata l'esportazione temporanea di equidi registrati o di equidi destinati a fini particolari;

iii) determina le condizioni che consentono di trasformare un'ammissione temporanea in ammissione definitiva;

▼M8

iv) può designare una laboratorio comunitario di riferimento per una o più malattie degli equidi di cui all'allegato A e definisce le funzioni, i compiti e le procedure per la collaborazione con i laboratori incaricati della diagnosi delle malattie infettive degli equidi negli Stati membri.

▼M2

———————

▼B

CAPITOLO IV

Disposizioni finali

Articolo 22

Le disposizioni della presente direttiva e in particolare quelle dell'articolo 4, paragrafo 1, seconda frase, e degli articoli 6, 8 e 21 verranno riesaminate prima del 1º gennaio 1993 nel quadro delle proposte che sono intese ad assicurare la realizzazione del mercato interno e su cui il Consiglio si pronuncerà a maggioranza qualificata.

Articolo 23

Gli allegati del presente regolamento sono modificati dalla Commissione secondo la procedura prevista all'articolo 25.

▼M7

Articolo 24

1. La Commissione è assistita dal comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali, istituito dall'articolo 58 del regolamento (CE) n. 178/2002 ([1]).

2. Nei casi in cui è fatto riferimento al presente articolo, si applicano gli articoli 5 e 7 della decisione 1999/468/CE ([2]).

Il periodo di cui all'articolo 5, paragrafo 6, della decisione 1999/468/CE è fissato a tre mesi.

([1]) GU L 31 dell'1.2.2002, pag. 1.
([2]) GU L 184 del 17.7.1999, pag. 23.

▼M7

3. Il comitato adotta il proprio regolamento interno

Articolo 25

1. La Commissione è assistita dal comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali.

2. Nei casi in cui è fatto riferimento al presente articolo, si applicano gli articoli 5 e 7 della decisione 1999/468/CE.

Il periodo di cui all'articolo 5, paragrafo 6, della decisione 1999/468/CE è fissato a quindici giorni.

▼B

Articolo 26

L'articolo 34 della direttiva 72/462/CEE è applicabile ai requisiti previsti dal capitolo III della presente direttiva.

Articolo 27

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva al più tardi il 1º gennaio 1992. Essi ne informano la Commissione.

Articolo 28

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

▼B

ALLEGATO A

MALATTIE SOGGETTE A OBBLIGO DI DENUNCIA

Sono soggette a obbligo di denuncia le seguenti malattie:

— Durina

— Morva

— Encefalomielite equina (tutte le forme, compresa la VEE)

— Anemia infettiva

— Rabbia

— Carbonchio ematico

— Peste equina

— Stomatite vescicolosa

▼M3

ALLEGATO B

INFORMAZIONI SANITARIE (a)

Passaporto n. .....

Il sottoscritto certifica (b) che l'equide sopra indicato risponde alle condizioni seguenti:

a) è stato esaminato in data odierna e non presenta alcun segno clinico di malattia;

b) non deve essere eliminato nel quadro di un programma di eradicazione di una malattia contagiosa in applicazione nello Stato membro;

c) — non proviene dal territorio o da una parte del territorio di uno Stato membro/paese terzo oggetto di misure restrittive a causa della peste equina, oppure

— proviene dal territorio o da una parte del territorio di uno Stato membro oggetto di misure restrittive a causa della peste equina ed è stato sottoposto con risultati soddisfacenti, nel centro di quarantena di ..... fra il ..... e il ..... alle prove contemplate all'articolo 5, paragrafo 3 della direttiva 90/426/CEE (c),

— non è stato vaccinato contro la peste equina oppure

— è stato vaccinato contro la peste equina in data ..... (c) (d);

d) non proviene da un allevamento cui si applicano misure di divieto per motivi di polizia sanitaria e non ha avuto contatti con gli equidi di un'azienda cui si applica un divieto per motivi di polizia sanitaria:

— per gli equidi sospetti di essere colpiti da durina, per la durata di sei mesi a decorrere dalla data dell'ultimo contatto o del possibile contatto con un equide malato. Tuttavia, ove si tratti di uno stallone, il divieto vige fino alla sua castrazione,

— in caso di morva e di encefalomielite equina, per la durata di sei mesi a decorrere dalla data in cui gli equidi infetti sono stati eliminati,

— in caso di anemia infettiva, per il periodo necessario affinché, a decorrere dalla data in cui gli equidi infetti sono stati eliminati, gli animali restanti abbiano reagito negativamente a due test di Coggins effettuati ad un intervallo di 3 mesi,

— per la durata di sei mesi a decorrere dall'ultimo caso accertato di stomatite vescicolosa,

— per la durata di un mese a decorrere dall'ultimo caso accertato di rabbia,

— per la durata di quindici giorni a decorrere dall'ultimo caso accertato di carbonchio ematico,

— se tutti gli animali dell'azienda appartenenti a specie sensibili sono stati macellati o abbattuti e se i locali sono stati disinfettati, per la durata di 30 giorni a decorrere dalla data di eliminazione degli animali e di disinfezione dei locali, tranne in caso di carbonchio ematico, per il quale la durata del divieto è di 15 giorni;

e) non ha, a quanto mi consta, avuto contatti con equidi colpiti da malattia o da infezione contagiosa nel corso degli ultimi 15 giorni;

►(1) f) al momento dell'ispezione era idoneo ad essere trasportato lungo il tragitto previsto, conformemente alle disposizioni della direttiva 91/628/CEE (e).◄

Data	Luogo	Timbro e firma del veterinario ufficiale (f)

(f) Nome in stampatello e qualifica.

(a) Queste informazioni non sono richieste in caso di accordo bilaterale concluso conformemente all'articolo 6 della direttiva 90/426/CEE.

(b) Valido dieci giorni.

(c) Cancellare la menzione inutile.

(d) L'indicazione della vaccinazione deve figurare nel passaporto.

(e) La presente dichiarazione non esenta i trasportatori dagli obblighi che incombono loro in virtù delle disposizioni comunitarie vigenti, in particolare per quanto riguarda l'idoneità degli animali al trasporto.

►(1) M5

▼M3

ALLEGATO C

MODELLO

CERTIFICATO SANITARIO

per gli scambi tra gli Stati membri della CEE

EQUIDI

N. .....

Stato membro di spedizione .....

Ministero competente .....

Servizio territoriale competente .....

I. **Numero di equidi :** .....

II. **Identificazione degli equidi**

Numero di equidi (1)	Specie : cavalli, asini, muli, bardotti	Razza, età, sesso	Metodo di identificazione e identificazione (2)

(1) Per gli animali da macello, occorre indicare la natura del marchio speciale.
(2) Al presente certificato può essere allegato un documento di identificazione dell'equino purché ne venga indicato il numero.

III. **Origine e destinazione dell'equide/degli equidi**

L'equide/gli equidi è/sono spedito(i) :

da .....
(luogo di spedizione)

a .....
(Stato membro e luogo di destinazione)

Nome e indirizzo dello speditore .....

.....

Nome e indirizzo del destinatario .....

.....

IV. **Informazioni sanitarie** (*)

Il sottoscritto certifica che l'equide/gli equidi sopra indicato(i) risponde/rispondono alle condizioni seguenti :

1) è/sono stato(i) esaminato(i) in data odierna e non presenta/presentano alcun segno clinico di malattia ;

2) non deve/devono essere eliminato(i) nel quadro di un programma di eradicazione di una malattia contagiosa in applicazione nello Stato membro ;

(*) Queste informazioni non sono richieste in caso di accordo concluso conformemente all'articolo 6 della direttiva 90/426/CEE.

▼M3

3) — non proviene/provengono dal territorio o da una parte del territorio di uno Stato membro/paese terzo oggetto di misure restrittive a causa della peste equina,

oppure

— proviene/provengono dal territorio o da una parte del territorio di uno Stato membro oggetto di misure restrittive a causa della peste equina ed è/sono stato(i) sottoposto(i) con risultati soddisfacenti, nel centro di quarantena di ..... fra il ..... e il .... alle prove contemplate all'articolo 5, paragrafo 3 della direttiva 90/426/CEE (b),

— non è/sono stato(i) vaccinato(i) contro la peste equina,

oppure

— è/sono stato(i) vaccinato(i) contro la peste equina in data ..... (b);

4) non proviene/provengono da un allevamento cui si applicano misure di divieto per motivi di polizia sanitaria e non ha/hanno avuto contatti con gli equidi di un'azienda cui si applica un divieto per motivi di polizia sanitaria:

— per gli equidi sospetti di essere colpiti da durina, per la durata di sei mesi a decorrere dalla data dell'ultimo contatto o del possibile contatto con un equide malato. Tuttavia, ove si tratti di uno stallone, il divieto vige fino alla sua castrazione,

— in caso di morva e di encefalomielite equina, per la durata di sei mesi a decorrere dalla data in cui gli equidi infetti sono stati eliminati,

— in caso di anemia infettiva, per il periodo necessario affinché, a decorrere dalla data in cui gli equidi infetti sono stati eliminati, gli animali restanti abbiano reagito negativamente a due test di Coggins effettuati ad un intervallo di 3 mesi,

— per la durata di sei mesi a decorrere dall'ultimo caso accertato di stomatite vescicolosa,

— per la durata di un mese a decorrere dall'ultimo caso accertato di rabbia,

— per la durata di quindici giorni a decorrere dall'ultimo caso accertato di carbonchio ematico,

— se tutte gli animali dell'azienda appartenenti a specie sensibili sono stati macellati o abbattuti e se i locali sono stati disinfettati, per la durata di 30 giorni a decorrere dalla data di eliminazione degli animali e di disinfezione dei locali, tranne in caso di carbonchio ematico, per il quale la durata del divieto è di 15 giorni;

5) non ha/hanno, a quanto mi consta, avuto contatti con equidi colpiti da malattia o da infezione contagiosa nel corso degli ultimi quindici giorni;

►(2) 6) al momento dell'ispezione era/erano idoneo/i ad essere trasportato/i lungo il tragitto previsto, conformemente alle disposizioni della direttiva 91/628/CEE (d). ◄

V. **Il presente certificato ha una validità di 10 giorni.**

Fatto a ....., il .....

Timbro

.....

(Firma)
Nome in stampatello e
qualifica del veterinario (c)

(a) Cancellare la menzione inutile.

(c) In Germania "Beamteter Tierarzt"; in Belgio "Inspecteur vétérinaire" o "Inspecteur Dierenarts"; in Francia "Vétérinaire officiel"; in Italia "Veterinario ufficiale"; in Lussemburgo "Inspecteur vétérinaire"; nei Paesi Bassi "Officieel Dierenarts"; in Danimarca "Embeds Dyrlæge"; in Irlanda "Veterinary Inspector"; nel Regno Unito "Veterinary Inspector"; in Grecia "Επίσημος κτηνίατρος"; in Spagna "Inspector Veterinario"; in Portogallo "Inspector Veterinário"; ►(1) in Austria "Amtstierarzt"; in Finlandia "Kunnaneläinlääkäri" o "Kaupungineläinlääkäri" o "Lääninеläinlääkäri" / "Kommunalveterinär" o "Stadsveterinär" o "Länsveterinär"; in Svezia "länsveterinär", "distriktsveterinär" o "gränsveterinär"; ◄ ►(3) nella Repubblica ceca "veterinární inspektor"; in Estonia "veterinaarjärelevalve ametnik"; a Cipro "Επίσημος Κτηνίατρος"; in Lettonia "veterinārais inspektors"; in Lituania "veterinarijos inspektorius"; in Ungheria "hatósági állatorvos"; a Malta "veterinarju uffiċjali"; in Polonia "urzędowy lekarz weterynarii"; in Slovenia "veterinarski inšpektor"; in Slovacchia "veterinárny inšpektor"; ◄ ►(4) in Bulgaria "ветеринарен инспектор"; in Romania "medic veterinar autorizat". ◄

(d) La presente dichiarazione non esenta i trasportatori dagli obblighi che incombono loro in virtù delle disposizioni comunitarie vigenti, in particolare per quanto riguarda l'idoneità degli animali da trasportare.

►(1) A1

►(2) M5

►(3) A2

►(4) M9

▼M6

ALLEGATO D

Peste equina

DIAGNOSI

I reagenti necessari per la metodica immunoenzimatica (ELISA) di seguito riportata sono disponibili presso il Laboratorio comunitario di riferimento oppure presso i laboratori di riferimento dell'OIE per la peste equina.

1. TECNICA ELISA COMPETITIVA PER L'INDIVUAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELLA PESTE EQUINA (AHSv) (PROVA OBBLIGATORIA)

La tecnica ELISA competitiva è usata per evidenziare la presenza di anticorpi specifici nei confronti del virus AHS nei sieri degli equidi di ogni specie. Il siero policlonale di cavia anti AHSv iperimmune nei confronti del virus della peste equina (in appresso, antisiero di cavia) è gruppo specifico ed è in grado di reagire con tutti i sierotipi conosciuti di AHSv.

La metodica si basa sul fatto che il siero in esame possa impedire il legame tra l'antigene AHSv e l'antisiero di cavia. Gli anticorpi anti-AHSv se presenti nel siero in esame andranno a competere con quelli dell'antisiero di cavia determinando una riduzione della reazione colorimetrica (dopo l'aggiunta di anti-IgG di cavia coniugati con un enzima e di substrato). Il siero in esame può essere saggiato singolarmente alla diluizione di 1:5 (metodo del test puntuale) o può essere titolato con diluizioni in serie (metodo di titolazione del siero). Si considerano positivi quei campioni che danno valori di inbizione superiori al 50 %.

Il protocollo operativo di seguito descritto è quello utilizzato dal laboratorio di riferimento regionale per la peste equina di Pirbright nel Regno Unito.

1.1. **Procedura**

1.1.1. *Preparazione delle piastre*

1.1.1.1. Far adsorbire le piastre ELISA con antigene AHSv estratto da colture cellulari infette e diluito in una soluzione tampone di carbonato/bicarbonato a pH 9,6. Incubare le piastre per una notte a 4 °C.

1.1.1.2. Lavare le piastre tre volte, riempiendo e svuotando i pozzetti con tampone fosfato (PBS), a pH 7,2-7,4, ed infine asciugarle su di un tampone di carta bibula.

1.1.2. *Pozzetti di controllo*

1.1.2.1. Nella colonna 1 dispensare 50 µl per pozzetto di siero positivo partendo dalla diluizione 1:5 e diluendo per raddoppio fino a 1/640, utilizzando come diluente una soluzione (tampone di bloccaggio) composta da 0,05 % (v/v) di Tween 20,5 % (w/v) polvere di latte scremato (Cadbury's MarvelTM) e 1 % (v/v) di siero di bovino adulto in PBS.

1.1.2.2. Dispensare 50 µl del siero di controllo negativo alla diluizione di 1/5 (10 µl di siero + 40 µl di tampone di bloccaggio) nei pozzetti A e B della colonna 2.

1.1.2.3. Dispensare 100 µl di tampone di bloccaggio nei pozzetti C e D della colonna 2 (bianco).

1.1.2.4. Dispensare 50 µl di tampone di bloccaggio nei pozzetti E, F, G e H della colonna 2 (controllo del siero iperimmune).

1.1.3. *Metodo del test puntuale*

1.1.3.1. Aggiungere una diluizione 1:5 di ogni siero nel tampone di bloccaggio ai pozzetti delle colonne dal numero 3 a 12 (10 µl di siero + 40 µl di soluzione bloccaggio).

oppure

1.1.4. *Metodo di titolazione*

1.1.4.1. Preparare una serie di diluizioni per raddoppio di ogni campione in esame (da 1:5 a 1:640) in soluzione di bloccaggio e quindi dispensare 50 µl di ciascuna diluizione negli otto pozzetti (A-H) delle colonne da 3 a 12.

▼M6

quindi

1.1.5. Aggiungere 50 µl di antisiero di cavia, diluito in tampone di bloccaggio, in tutti i pozzetti della piastra ELISA tranne in quello del bianco (a questo punto tutti i pozzetti contengono un volume di 100 µl).

1.1.5.1. Incubare per un'ora alla temperatura di 37 °C in un agitatore di piastra.

1.1.5.2. Lavare le piastre tre volte e asciugare su carta bibula come descritto nel paragrafo 1.1.1.

1.1.5.3. Aggiungere 50 µl di siero di coniglio anticavia coniugato con perossidasi di rafano (HRP) prediluito in tampone di bloccaggio.

1.1.5.4. Incubare per un'ora alla temperatura di 37 °C in un agitatore di piastra.

1.1.5.5. Lavare le piastre tre volte e asciugare su carta bibula come come descritto nel paragrafo 1.1.1.

1.1.6. *Cromogeno*

Preparare la soluzione di cromogeno ODP (ODP = ortofenildiammina) secondo le istruzioni della ditta produttrice (0,4 mg/ml in acqua distillata sterile) subito prima dell'uso. Aggiungere substrato (perossido di idrogeno = H_2O_2) fino ad arrivare a una concentrazione finale di 0,05 % (v/v) (1/2000 di una soluzione di H_2O_2 al 30 %). Dispensare 50 µl della soluzione di OPD in ogni pozzetto e lasciare le piastre per 10 minuti a temperatura ambiente. Arrestare la reazione aggiungendo in ogni pozzetto 50 µl di acido solforico (H_2SO_4) 1M.

1.1.7. *Lettura*

Leggere mediante lettura spettrofotometrica usando un filtro a 492 nm.

1.2. **Espressione dei risultati**

1.2.1. Usando un programma informatico stampare i valori di densità ottica (OD) e di percentuale di inibizione (PI) dei sieri di prova e di controllo a partire dal valore medio registrato nei quattro pozzetti del controllo del siero iperimmune di cavia. I dati espressi in valori OD e PI si utilizzano per stabilire se la prova è da ritenere valida. I limiti di controllo superiori (LCS) e inferiori (LCI) del siero iperimmune di cavia devono essere compresi tra i valori 1,4 e 0,4 di OD, rispettivamente. Il titolo del controllo positivo, che si basa su una percentuale di inibizione del 50 %, dovrebbe corrispondere a 1:240 (compreso tra 1:120 e 1:480). Qualora i controlli non rispettino i suddetti criteri, i risultati non possono essere presi in considerazione. Se il titolo del controllo positivo, tuttavia, è superiore a 1:480 ed i campioni di prova continuano ad essere negativi, in tal caso i campioni di prova negativi possono essere accettati.

I pozzetti contenenti il siero di controllo negativo in duplicato e i pozzetti del bianco in duplicato dovrebbero registrare valori IP compresi tra + 25 % e – 25 %, e tra + 95 % e + 105 %, rispettivamente. Quando si ottengono valori non compresi entro questi limiti, vuol dire che si è in presenza di un elevata colorazione di fondo di natura aspecifica che non invalida la prova.

1.2.2. Il valore soglia che discrimina un siero positivo da uno negativo (cut-off) è PI 50 %. Un siero che ha una PI superiore a 50 % del siero iperimmune di cavia è considerato positivo mentre uno che ha una PI inferiore al 50 % è considerato negativo.

I campioni che registrano valori PI al di sotto o al di sopra della soglia nei pozzetti in doppio sono da considerarsi dubbi e possono essere nuovamente analizzati con una prova secondo il metodo puntuale e di titolazione. I campioni positivi possono essere titolati per valutare il grado di positività.

▼**M6**

Schema metodo qualitativo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C +		Sieri in esame									
A	1:5	C –	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	C –	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	Bianco										
D	1:40	Bianco										
E	1:80	CC										
F	1:160	CC										
G	1:320	CC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	CC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

C – = controllo negativo.
C + = controllo positivo.
CC = controllo di cavia.

Schema metodo quantitativo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C +		Sieri di prova									
A	1:5	C –	1:5									1:5
B	1:10	C –	1:10									1:10
C	1:20	Bianco	1:20									1:20
D	1:40	Bianco	1:40									1:40
E	1:80	CC	1:80									1:80
F	1:160	CC	1:160									1:160
G	1:320	CC	1:320									1:320
H	1:640	CC	1:640									1:640

C – = controllo negativo.
C + = controllo positivo.
CC = controllo di cavia.

2. PROVA ELISA INDIRETTA PER L'EVIDENZIAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELLA PESTE EQUINA (AHSv) (PROVA OBBLIGATORIA)

La prova descritta è conforme a quella riportata nel capitolo 2.1.11 del Manuale sulle norme per le prove diagnostiche ed i vaccini dell'OIE, quarta edizione del 2000.

L'impiego come antigene della proteina ricombinante VP7, stabile e non infettiva conferisce a questa prova elevati livelli di sensibilità, specificità, accuratezza e sicurezza.

2.1. **Procedura**

2.1.1. *Fase solida*

2.1.1.1. Far adsorbire le piastre ELISA con la proteina VP7 ricombinante derivata dal sierotipo 4 del virus della peste equina (AHSv-4), diluita in tampone carbonato/bicarbonato, a pH 9,6. Incubare le piastre per una notte alla temperatura di 4 °C.

2.1.1.2. Lavare le piastre per cinque volte con acqua distillata contenente 0,01 % (v/v) di Tween 20 (soluzione di lavaggio).

▼M6

Scuotere piano le piastre su materiale assorbente per eliminare ogni residuo di lavaggio.

2.1.1.3. Saturare le piastre dispensando in ogni pozzetto 200 µl di tampone fosfato (PBS) contenente 5 % (w/v) di polvere di latte scremato (latte scremato in polvere Nestlé TM) e lasciare un'ora a 37 °C.

2.1.1.4. Eliminare la soluzione di saturazione e scuotere piano le piastre su materiale assorbente.

2.1.2. *Campioni di prova*

2.1.2.1. Dispensare i campioni di siero da saggiare ed i sieri di controllo positivi e negativi, precedentemente diluiti 1:25 in PBS con l'aggiunta di 5 % (w/v) di latte scremato in polvere e 0,05 % (v/v) di Tween 20, in quantità di 100 µl per pozzetto. Incubare per 1 ora alla temperatura di 37 °C.

Per la prova di titolazione, creare serie di diluizione per raddoppio a partire dalla diluizione 1:25 e dispensare, nella quantità di 100 µl per pozzetto, un siero per ogni colonna della piastra. Eseguire la stessa operazione per i controlli negativo e positivo. Incubare per 1 ora alla temperature di 37 °C.

2.1.2.2. Lavare le piastre come descritto al punto 2.1.1.2.

2.1.3. *Coniugato*

2.1.3.1. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di gamma globulina anticavallo coniugata con perossidasi di rafano (HRP) diluita in PBS + 5 % di latte + 0,05 % di Tween 20, a pH 7,2. Incubare per 1 ora alla temperatura di 37 °C.

2.1.3.2. Lavare le piastre come descritto al punto 2.1.1.2.

2.1.4. *Cromogeno/Substrato*

2.1.4.1. Aggiungere in ogni pozzetto 200 µl di soluzione di cromogeno/substrato [10 ml di 80,6 mM di DMAB (dimetilamminobenzaldeide) + 10 ml di 1,56 mM di MBTH (3-metil-2-benzotiazolina idrazone idrocloruro) + 5 µl H_2O_2).

Bloccare dopo circa 5-10 minuti (prima che il controllo negativo inizi a colorarsi) la reazione colorimetrica aggiungendo 50 µl di H_2SO_4 3N.

Possono essere usati altri cromogeni come ABTS (2,2′-Azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-acido solfonico]), TMB (tetrametil benzidina), o OPD (orto-fenildiammina).

2.1.4.2. Leggere le piastre a 600 nm (o 620 nm).

2.2. **Interpretazione dei risultati**

2.2.1. Determinare il valore soglia (cut-off) aggiungendo 0,6 al valore di assorbanza del controllo negativo (0,6 è la deviazione standard ottenuta testando un gruppo di 30 sieri negativi).

2.2.2. I campioni di prova che danno valori di assorbanza (densità ottica) inferiori al valore soglia sono da considerarsi negativi.

2.2.3. I campioni di prova che danno valori di assorbanza (densità ottica) superiori al valore soglia sono da considerarsi positivi.

2.2.4. I campioni di prova che danno valori di assorbanza (densità ottica) intermedi sono da considerarsi dubbi e si deve applicare un altro metodo per confermare i risultati.

3. PROVA ELISA BLOCCANTE PER L'INDIVIDUAZIONE DI ANTICORPI DEL VIRUS DELLA PESTE EQUINA (AHSv) (PROVA OBBLIGATORIA)

Il test ELISA bloccante è usato per evidenziare la presenza di anticorpi specifici del virus AHSv nei sieri di ogni specie sensibile. La VP7 è la principale proteina antigenica del virus della peste equina e si conserva nei 9 sierotipi. Dato che anche l'anticorpo monoclonale è diretto contro la VP7, il saggio sarà caratterizzato da un elevato livello di sensibilità e specificità. L'antigene ricombinante VP7, inoltre, è del tutto innocuo e garantisce pertanto un'elevata sicurezza.

▼M6

Alla base della prova vi è la mancata reazione tra la proteina ricombinante VP7, adsorbita alla piastra ELISA, ed il suo anticorpo monoclonale specifico. Gli anticorpi anti-AHSv, se presenti nel siero in esame, bloccheranno la reazione tra antigene ed anticorpo monoclonale determinando una riduzione della reazione colorimetrica.

La prova ELISA, di seguito descritta, è quella utilizzata dal laboratorio comunitario di riferimento per la peste equina ad Algete in Spagna.

3.1. **Procedura**

3.1.1. *Piastre ELISA*

3.1.1.1. Far adsorbire le piastre ELISA con la proteina VP7 ricombinante da AHSv-4, diluita in tampone carbonato/bicarbonato (pH 9,6). Incubare le piastre per una notte alla temperatura di 4 °C.

3.1.1.2. Lavare le piastre 5 volte con soluzione salina tamponata a fosfato contenente 0,05 % (v/v) di Tween 20 (PBST).

3.1.1.3. Stabilizzare la piastra con soluzione stabilizzante (per poterla conservare a lungo a + 4 °C senza perdita di attività) ed asciugare su materiale adsorbente.

3.1.2. *Campioni di prova e controlli*

3.1.2.1. Per lo screening: Diluire 1:10 con PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20 i sieri in esame ed i controlli direttamente su piastra per raggiungere un volume di 100 µl in ogni pozzetto. Incubare per 1 ora alla temperatura di 37 °C.

3.1.2.2. Per la titolazione: Preparare una serie di diluizioni per raddoppio di siero in esame e di controllo positivo (100 µl per pozzetto) da 1:10 fino a 1:1 280, attraverso otto pozzetti. Il controllo negativo è esaminato alla diluizione di 1:10.

3.1.3. *Coniugato*

Aggiungere a ciascun pozzetto 50 µl di Mab (anticorpo monoclonale specifico VP7) coniugato con perossidasi del rafano (HRP), precedentemente diluito, e mescolare delicatamente per avere una miscela omogenea. Incubare per 30 minuti alla temperatura di 37 °C.

3.1.4. Lavare le piastre 5 volte con PBST e asciugare come indicato più sopra.

3.1.5. *Cromogeno/Substrato*

Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di cromogeno/substrato (1ml di ABTS (2,2′-Azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-acido solfonico]) 5 mg/ml + 9 ml di tampone substrato (fosfato-citrato 0,1M a pH 4 contenente 0,03 % di H_2O_2) ed incubare 10 minuti a temperatura ambiente. La colorazione viene arrestata aggiungendo ad ogni pozzetto 100 µl di una soluzione al 2 % (w/v) di SDS (sodio dodecilsolfato).

3.1.6. *Lettura*

Leggere i risultati con un lettore ELISA usando un filtro a 405 nm.

3.2. **Interpretazione dei risultati**

3.2.1. *Validazione della prova*

I risultati sono da considerare validi se la densità ottica (OD) del controllo negativo (NC) ha un valore superiore a 1,0 e la OD del controllo positivo (PC) è inferiore a 0,2.

3.2.2. *Calcolo del valore soglia (cut-off)*

$$\text{Limite positivo} = NC - ((NC - PC) \tilde{n} 0,3)$$

▼**M6**

Limite negativo $= NC - ((NC - PC)ñ0,2)$

dove NC è la OD del controllo negativo e PC è la OD del controllo positivo.

3.2.3. *Interpretazione dei risultati*

Si considerano positivi nei confronti del virus della peste equina quei campioni che hanno un valore di OD inferiore al limite positivo.

Si considerano negativi quelli che presentano un valore di OD superiore al limite negativo.

Quei campioni i cui valori di OD sono compresi tra il limite negativo ed il positivo sono da considerarsi dubbi. In questo caso è necessario prelevare altri campioni dagli animali a distanza di 2-3 settimane dal primo prelievo.