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

►**B**

DIRETTIVA 92/40/CEE DEL CONSIGLIO

del 19 maggio 1992

che istituisce delle misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria

(GU L 167 del 22.6.1992, pag. 1)

Modificata da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►**M1**	Regolamento (CE) n. 806/2003 del Consiglio del 14 aprile 2003	L 122	1	16.5.2003

Modificata da:

►**A1**	Atto di adesione dell'Austria, della Finlandia e della Svezia	C 241	21	29.8.1994
	(adattato 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

▼B

DIRETTIVA 92/40/CEE DEL CONSIGLIO

del 19 maggio 1992

che istituisce delle misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria

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 i volatili sono compresi nell'allegato II del trattato; che la commercializzazione dei volatili costituisce un'importante fonte di reddito per la popolazione agricola;

considerando la necessità di istituire, a livello comunitario, le misure di lotta da prendere in caso di insorgenza dell'influenza aviaria in forma altamente patogena, provocata da un virus dell'influenza con caratteristiche specifiche, in prosieguo denominata «influenza aviaria» allo scopo di garantire lo sviluppo del settore avicolo e contribuire alla protezione sanitaria degli animali nella Comunità;

considerando che l'insorgere dell'influenza aviaria può rapidamente assumere un carattere di epizoozia provocando mortalità e perturbazioni tali da compromettere gravemente la redditività dell'allevamento dei volatili in generale;

considerando che è indispensabile agire non appena si sospetta la presenza di tale malattia, in modo da prendere provvedimenti immediati ed efficaci di lotta in caso di successiva conferma;

considerando che occorre evitare la diffusione della malattia fin dalla sua prima comparsa, sottoponendo ad attento controllo gli spostamenti degli animali e l'uso di prodotti che possano essere contaminati e procedendo ad eventuale vaccinazione;

considerando che la diagnosi della malattia deve essere effettuata sotto l'egida di laboratori responsabili, il cui operato deve essere coordinato da un laboratorio comunitario di riferimento;

considerando che il mantenimento di un livello zoosanitario uniforme nella Comunità presuppone l'adozione di misure comuni per la lotta contro l'influenza aviaria;

considerando che, al momento della comparsa dell'influenza aviaria, sono applicabili le disposizioni dell'articolo 3 della decisione 90/424/CEE del Consiglio, del 26 giugno 1990, relativa a talune spese nel settore veterinario ([4]);

considerando l'opportunità di affidare alla Commissione il compito di prendere le necessarie misure di applicazione,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

La presente direttiva definisce le misure comunitarie di lotta da applicare in caso di comparsa dell'influenza aviaria negli allevamenti di volatili da cortile, fatte salve le disposizioni che disciplinano gli scambi intracomunitari.

([1]) GU n. C 231 del 5. 9. 1991, pag. 4.
([2]) GU n. C 326 del 16. 12. 1991, pag. 242.
([3]) GU n. C 79 del 30. 3. 1992, pag. 8.
([4]) GU n. L 224 del 18. 8. 1990, pag. 19. Decisione modificata dalla decisione 91/133/CEE (GU n. L 66 del 13. 3. 1991, pag. 18).

▼B

La presente direttiva non si applica se la malattia viene individuata in altri volatili: tuttavia, in questo caso, lo Stato membro interessato segnala alla Commissione tutte le misure che ha adottato.

Articolo 2

Ai fini della presente direttiva si applicano, se del caso, le definizioni di cui all'articolo 2 della direttiva 90/539/CEE del Consiglio, del 15 ottobre 1990, relativa alle norme di polizia sanitaria per gli scambi intracomunitari e le importazioni in provenienza dai paesi terzi di pollame e uova da cova ([1]).

Inoltre si intende per:

a) *volatile infetto qualsiasi volatile:*

   — in cui sia stata ufficialmente confermata la presenza dell'influenza aviaria ai sensi dell'allegato I, a seguito di un esame effettuato da un laboratorio riconosciuto, oppure

   — in cui siano stati constatati, se si tratta di un secondo focolaio o di un focolaio successivo, sintomi clinici o lesioni post mortem propri dell'influenza aviaria;

b) *volatile sospetto di infezione:* qualsiasi volatile che presenti sintomi clinici o lesioni post mortem tali da indurre ragionevolmente a sospettare la presenza dell'influenza aviaria, o qualsiasi volatile in cui sia stata accertata la presenza del virus A dell'influenza, sottotipo H5 o H7;

c) *volatile sospetto di contaminazione:* qualsiasi volatile che abbia potuto essere esposto, direttamente o indirettamente, al virus dell'influenza aviaria, oppure al virus A dell'influenza, sottotipo H5 o H7;

d) *autorità competente:* l'autorità competente ai sensi dell'articolo 2, punto 6 della direttiva 90/425/CEE ([2]);

e) *veterinario ufficiale:* il veterinario designato dall'autorità competente.

Articolo 3

Gli Stati membri si adoperano affinché il sospetto dell'esistenza di influenza aviaria sia oggetto di notifica obbligatoria ed immediata all'autorità competente.

Articolo 4

1. Qualora in un'azienda siano presenti volatili sospetti di infezione di influenza aviaria, gli Stati membri si adoperano affinché il veterinario ufficiale applichi immediatamente i mezzi ufficiali di investigazione allo scopo di confermare o escludere la presenza della malattia e, in particolare, prelevare o far prelevare i campioni idonei per gli esami di laboratorio.

2. Non appena è notificato un caso sospetto di infezione, l'autorità competente pone l'azienda interessata sotto controllo ufficiale e dispone in particolare che:

a) venga compilato un registro di tutte le categorie di volatili presenti nell'azienda specificando, per ciascuna di esse, quanti volatili sono morti, quanti presentano sintomi clinici e quanti non presentano sintomi; il registro dovrà essere aggiornato per tener conto dei volatili nati e morti nel corso del periodo in cui si sospetta l'infezione; i dati di detto registro dovranno essere tenuti aggiornati, essere presentati su richiesta, e potranno essere controllati in occasione di ciascuna visita;

([1]) GU n. L 303 del 31. 10. 1990, pag. 6. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 91/496/CEE (GU n. L 268 del 24. 9. 1991, pag. 56).

([2]) GU n. L 224 del 18. 8. 1990, pag. 29. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 91/496/CEE (GU n. L 268 del 24. 9. 1991, pag. 56).

▼B

b) tutti i volatili presenti nell'azienda siano tenuti nei locali in cui sono allevati o confinati in altri locali in cui possano essere isolati per non essere in contatto con altri volatili;

c) siano proibiti gli spostamenti di volatili provenienti o destinati all'azienda;

d) sia subordinato all'autorizzazione dell'autorità competente:

— qualsiasi movimento di persone, di altri animali e di veicoli in provenienza dall'azienda o a destinazione della stessa;

— qualsiasi movimento di carni o di carcasse di volatili, mangimi, materiale, rifiuti, deiezioni, lettiere, letami o tutto ciò che è suscettibile di trasmettere l'influenza aviaria;

e) dall'azienda non siano fatte uscire uova, tranne le uova inviate direttamente in uno stabilimento riconosciuto per la fabbricazione e/o il trattamento degli ovoprodotti conformemente all'articolo 6, punto 1 della direttiva 89/437/CEE ([1]), e che vengono trasportate conformemente ad un'autorizzazione rilasciata dall'autorità competente. Questa autorizzazione dovrà soddisfare i requisiti dell'allegato I;

f) venga fatto ricorso a mezzi appropriati di disinfezione alle entrate ed alle uscite dei fabbricati in cui sono allevati i volatili, nonché dell'azienda stessa;

g) venga effettuata un'indagine epidemiologica conformemente all'articolo 7.

3. In attesa dell'entrata in vigore delle misure ufficiali, previste al paragrafo 2, il proprietario o il detentore di qualsiasi allevamento di volatili sospetti di infezione si adopera per garantire il rispetto delle disposizioni di cui al paragrafo 2, ad esclusione della lettera g).

4. L'autorità competente può estendere qualsiasi misura di cui al paragrafo 2 ad altre aziende qualora, tenuto conto dell'ubicazione e della configurazione dei fabbricati o di eventuali contatti con l'azienda nella quale si sospetta la presenza della malattia, vi siano fondati motivi per sospettare un'eventuale contaminazione.

5. Le misure previste ai paragrafi 1 e 2 rimangono applicabili finché la sospetta presenza dell'influenza aviaria sia esclusa dal veterinario ufficiale.

Articolo 5

1. Non appena viene confermata ufficialmente la presenza dell'influenza aviaria in un'azienda, gli Stati membri si adoperano affinché l'autorità competente dispogna, oltre all'applicazione delle misure previste all'articolo 4, paragrafo 2:

a) che tutti i volatili presenti nell'azienda siano abbattuti in loco senza indugio. I volatili morti o abbattuti e tutte le uova devono essere distrutti. Queste operazioni devono essere eseguite in modo da ridurre al minimo il rischio di diffusione della malattia;

b) che tutti i materiali o tutti i rifiuti, come il mangime, le lettiere ed il letame, suscettibili di essere contaminati vengano distrutti o sottoposti a trattamento idoneo. Quest'ultimo, eseguito conformemente alle istruzioni del veterinario ufficiale, deve garantire la distruzione del virus dell'influenza aviaria eventualmente presente;

c) che, qualora i volatili siano stati macellati durante il periodo presunto di incubazione della malattia, le carni da essi ottenute vengano, nella misura del possibile, individuate e distrutte;

d) che le uova da cova deposte durante il presunto periodo di incubazione e uscite dall'azienda siano individuate e distrutte; i pulcini già nati da queste uova devono essere posti sotto sorveglianza ufficiale; le uova da mensa deposte durante il presunto periodo di incubazione e uscite dall'azienda devono, nella misura del possibile, essere indi-

([1]) GU n. L 212 del 22. 7. 1989, pag. 87. Direttiva modificata dalla direttiva 89/662/CEE (GU n. L 395 del 30. 12. 1989, pag. 13).

▼B

viduate e distrutte, a meno che non siano state precedentemente disinfettate in modo corretto;

e) che, ultimate le operazioni di cui alle lettere a) e b), i fabbricati adibiti all'allevamento dei volatili e le loro vicinanze nonché i veicoli usati per il trasporto e qualsiasi materiale suscettibile di essere contaminato vengano puliti e disinfettati conformemente all'articolo 11;

f) che nell'azienda non vengano reintrodotti volatili per almeno 21 giorni a decorrere dall'ultimazione delle operazioni di cui alla lettera e);

g) che venaga effettuata un'indagine epidemiologica conformemente all'articolo 7.

2. L'autorità competente può estendere le misure di cui al paragrafo 1 ad altre aziende vicine qualora la loro ubicazione, topografia o contatto con l'azienda in cui è stata confermata la presenza della malattia permettano di sospettare un'eventuale contaminazione.

Articolo 6

Nel caso di allevamenti costituiti da due o più branchi separati, l'autorità competente può, sulla base dei criteri stabiliti dalla Commissione secondo la procedura prevista all'articolo 21, derogare ai requisiti dell'articolo 5, paragrafo 1, per i branchi sani di un'azienda infetta, a condizione che il veterinario ufficiale confermi che le operazioni ivi effettuate lasciano i branchi completamente separati per quanto riguarda la stabulazione, il governo e l'alimentazione, in modo che il virus non può propagarsi da un branco all'altro.

Articolo 7

1. L'indagine epidemiologica verte sugli aspetti seguenti:

— la durata del periodo in cui l'influenza aviaria può essere stata presente nell'azienda;

— l'origine probabile dell'influenza aviaria nell'azienda e l'identificazione delle altre aziende i cui volatili possono essere stati infettati o contaminati dalla stessa fonte del virus;

— i movimenti di persone, volatili o altri animali, veicoli, uova, carni e carcasse, nonché qualsiasi materiale o materia suscettibile di aver veicolato il virus dell'influenza aviaria nell'azienda in questione o in provenienza da essa.

2. Viene istituita un'unità di crisi per coordinare pienamente tutte le misure necessarie all'eradicazione dell'influenza aviaria con la massima tempestività e per condurre l'indagine epidemiologica.

Le norme generali riguardanti le unità di crisi nazionali e l'unità di crisi comunitaria sono adottate dal Consiglio che delibera a maggioranza qualificata, su proposta della Commissione.

Articolo 8

1. Qualora il veterinario ufficiale abbia motivo per sospettare che i volatili di un'azienda possano essere stati contaminati in conseguenza di movimenti di persone, animali o veicoli o in qualsiasi altro modo, l'azienda in questione è sottoposta a controllo ufficiale conformemente al paragrafo 2.

2. Il controllo ufficiale ha lo scopo di individuare immediatamente qualsiasi caso sospetto di influenza aviaria, di tenere un registro dei volatili detenuti nell'azienda e di controllarne i movimenti nonché, ove occorra, di prendere le misure elencate al paragrafo 3.

3. Quando un'azienda è sottoposta a controllo ufficiale conformemente ai paragrafi 1 e 2, l'autorità competente vieta l'uscita di volatili dall'azienda tranne per il loro trasferimento diretto in un macello, sotto controllo ufficiale, ai fini della loro immediata macellazione. L'autorizzazione è concessa previa esecuzione, da parte del veterinario ufficiale, di un esame clinico dei volatili dal quale risulti l'assenza dell'influenza

▼B

aviaria nell'azienda. Le restrizioni ai movimenti degli animali previste nel presente articolo sono applicate per un periodo di almeno 21 giorni a decorrere dall'ultima data in cui può essersi verificata la contaminazione; tali restrizioni devono comunque essere applicate per un periodo di almeno 7 giorni.

4. Qualora ritenga che le condizioni lo permettono, l'autorità competente può limitare le misure di cui al presente articolo ad una parte dell'azienda ed ai volatili che si trovano in tale parte, a condizione che i volatili in questione siano stati completamente separati dal restante quanto al ricovero, al governo e all'alimentazione e che le relative operazioni siano state eseguite da addetti diversi.

Articolo 9

1. Non appena è ufficialmente confermata la presenza dell'influenza aviaria gli Stati membri si adoperano affinché l'autorità competente delimiti, attorno all'azienda infetta, una zona di protezione di almeno 3 km di raggio, inserita in una zona di sorveglianza di almeno 10 km di raggio. Nel delimitare queste zone si tiene conto dei fattori d'ordine geografico, amministrativo, ecologico ed epizooziologico connessi all'influenza aviaria, nonché delle strutture di controllo.

2. Le misure applicate nella zona di protezione comprendono:

a) l'identificazione di tutte le aziende che detengono volatili all'interno della zona;

b) visite periodiche di tutte le aziende che detengono volatili, l'esame clinico dei volatili in questione, compresa, ove occorra, la raccolta di campioni da sottoporre ad esami di laboratorio; va tenuto inoltre un registro delle visite e dei risultati degli esami;

c) il sequestro di tutti i volatili nei locali in cui sono allevati o in qualsiasi altro locale in cui possano essere tenuti isolati;

d) il ricorso a mezzi appropriati di disinfezione agli ingressi e alle uscite delle aziende;

e) il controllo dei movimenti degli addetti alle manipolazione dei volatili, delle carcasse di volatili e delle uova, nonché dei veicoli adibiti al trasporto di volatili, di carcasse e di uova all'interno della zona; in linea di massima il trasporto di volatili è vietato, fatta eccezione per il transito sui grandi assi stradali o ferroviari;

f) il divieto di uscita dei volatili e di uova da cova dall'azienda in cui si trovano, tranne qualora l'autorità competente abbia autorizzato il trasporto:

   i) di volatili destinati alla macellazione immediata in un macello situato, di preferenza, nella zona infetta o, in casi di impossibilità, in un macello designato dall'autorità competente al di fuori della zona infetta. Le carni di tali volatili devono recare il marchio sanitario speciale previsto all'articolo 5, paragrafo 1 della direttiva 91/494/CEE ([1]);

   ii) di pulcini di un giorno o di pollastre pronte per la deposizione in un'azienda situata nella zona di sorveglianza, in cui non sono presenti altri volatili. L'azienda destinataria deve essere sottoposta al controllo ufficiale di cui all'articolo 8, paragrafo 2;

   iii) di uova da cova in un incubatoio designato dall'autorità competente; prima della spedizione, le uova e gli imballaggi che le contengono devono essere disinfettati. Gli spostamenti previsti ai punti i), ii) e iii) devono essere effettuati direttamente e sotto controllo ufficiale. Essi sono autorizzati soltanto previa esecuzione, da parte del veterinario ufficiale, di una ispezione sanitaria dell'azienda. I mezzi di trasporto usati devono essere puliti e disinfettati prima e dopo l'uso;

g) il divieto di spostare o spandere letame o lettiere usate di volatili senza autorizzazione;

([1]) GU n. L 268 del 24. 9. 1991, pag. 35.

▼B

h) il divieto di fiere, mercati, esposizioni e altri raduni di volatili o di altri uccelli.

3. Le misure applicate nella zona di protezione restano in vigore per almeno 21 giorni dopo l'esecuzione delle operazioni preliminari di pulizia e di disinfezione dell'azienda infetta, conformemente all'articolo 11. La zona di protezione entra allora a far parte della zona di sorveglianza.

4. Le misure applicate nella zona di sorveglianza comprendono:

a) l'identificazione di tutte le aziende che detengono volatili situate nella zona;

b) il controllo dei movimenti dei volatili e di uova da cova nell'ambito della zona;

c) il divieto di uscita dalla zona dei volatili per i primi 15 giorni, tranne per il trasporto diretto dei volatili ad un macello situato fuori dalla zona di sorveglianza, designato dall'autorità competente. Le carni di tali volatili devono recare il marchio sanitario speciale previsto all'articolo 5 della direttiva 91/494/CEE;

d) il divieto di uscita dalla zona di sorveglianza di uova da cova, tranne per il trasporto ad un incubatoio designato dall'autorità competente. Prima della spedizione le uova e gli imballaggi che le contengono devono essere disinfettati;

e) il divieto di uscita dalla zona di concime e lettiere usate di volatili;

f) il divieto di fiere, mercati, esposizioni o altri raduni di volatili o di altri uccelli;

g) fatte salve le disposizioni di cui alle lettere a) e b), il divieto di trasporto di volatili, fatta eccezione per il transito sui grandi assi stradali o ferroviari.

5. Le misure applicate nella zona di sorveglianza restano in vigore per almeno 30 giorni dopo l'esecuzione delle operazioni preliminari di pulizia e di disinfezione dell'azienda infetta, conformemente all'articolo 11.

6. Qualora le zone siano situate sul territorio di più Stati membri, le autorità competenti degli Stati membri interessati collaborano allo scopo di delimitare le zone di cui al paragrafo 1. Tuttavia, se necessario, la zona di protezione e la zona di sorveglianza sono delimitate secondo la procedura di cui all'articolo 21.

Articolo 10

Gli Stati membri si adoperano affinché:

a) l'autorità competente stabilisca le procedure che le consentono di seguire i movimenti di uova e di volatili;

b) il proprietario o il detentore di volatili debba fornire, a richiesta dell'autorità competente, le informazioni relative ai volatili e alle uova che entrano o escono dall'azienda;

c) le persone addette al trasporto o alla commercializzazione di volatili e di uova devono poter comunicare all'autorità competente le informazioni relative agli spostamenti dei volatili e delle uova da esse trasportati o commercializzati e a fornire qualsiasi altro dettaglio in materia.

Articolo 11

Gli Stati membri si adoperano affinché:

a) i disinfettanti da usare e le relative concentrazioni siano ufficialmente approvati dall'autorità competente;

b) le operazioni di pulizia e disinfezione siano effettuate sotto controllo ufficiale, conformemente:

   i) alle istruzioni impartite dal veterinario ufficiale,

   ii) alla procedura per la pulizia e la disinfezione delle aziende infette prevista all'allegato II.

▼B

Articolo 12

La raccolta dei campioni e gli esami di laboratorio volti ad accertare la presenza del virus dell'influenza aviaria devono essere effettuati conformemente all'allegato III.

Articolo 13

Gli Stati membri si adoperano affinché l'autorità competente adotti tutte le misure necessarie per informare le persone stabilite nelle zone di protezione e di sorveglianza in merito alle restrizioni in vigore e prendano tutte le disposizioni necessarie ai fini di un'adeguata applicazione delle suddette misure.

Articolo 14

1. Gli Stati membri si adoperano affinché in ogni Stato membro sia designato:

a) un laboratorio nazionale munito delle attrezzature e del personale specializzato necessari per poter procedere alla valutazione della patogenesi degli isolati del virus dell'influenza conformemente all'allegato III, capitolo 7, nonché all'identificazione dei virus A dell'influenza e dei sottotipi H5 o H7;

b) un laboratorio nazionale incaricato del controllo dei reagenti da usare nei laboratori regionali di diagnosi;

c) un istituto o laboratorio nazionale in grado di controllare che i vaccini autorizzati siano conformi alle specificazioni stabilite dall'autorizzazione di immissione sul mercato.

2. I laboratori nazionali di cui all'allegato IV sono responsabili del coordinamento delle norme e dei metodi di diagnosi, per l'uso dei reagenti e per la prova dei vaccini.

3. I laboratori nazionali di cui all'allegato IV sono responsabili del coordinamento delle norme e dei metodi di diagnosi stabiliti da ciascun laboratorio di diagnosi dell'influenza aviaria all'interno dello Stato membro. A questo scopo essi:

a) possono fornire i reagenti diagnostici ai laboratori regionali;

b) controllano la qualità di tutti i reagenti diagnostici usati in detto Stato membro;

c) organizzano periodicamente prove comparative;

d) conservano isolati del virus dell'influenza aviaria, provenienti da casi confermati in detto Stato membro;

e) garantiscono la conferma di risultati positivi ottenuti nei laboratori diagnostici regionali.

4. I laboratori nazionali indicati nell'allegato IV cooperano con il laboratorio comunitario di riferimento previsto all'articolo 15.

Articolo 15

Il laboratorio comunitario di riferimento per l'influenza aviaria è indicato nell'allegato V. Le competenze ed i compiti di questo laboratorio sono quelli che figurano nell'allegato, fatte salve le disposizioni della decisione 90/424/CEE, in particolare l'articolo 28.

Articolo 16

La vaccinazione contro l'influenza aviaria mediante vaccini autorizzati dall'autorità competente può essere praticata soltanto per integrare le misure di lotta prese al momento della comparsa della malattia e conformemente alle disposizioni seguenti:

a) La decisione di introdurre la vaccinazione per integrare le misure di lotta viene presa, in collaborazione con lo Stato membro interessato, dalla Commissione che delibera secondo la procedura prevista all'articolo 21. Tale decisione tiene conto dei criteri seguenti:

— la concentrazione di volatili nella zona colpita,

▼B

— le caratteristiche e la composizione di ciascun vaccino utilizzato,

— le modalità di controllo della distribuzione, dell'ammasso e dell'impiego dei vaccini,

— le specie e le categorie di volatili che possono o devono essere sottoposti a vaccinazione,

— le zone in cui può o deve essere eseguita la vaccinazione.

Tuttavia in deroga al primo comma, lo Stato membro interessato può, previa notifica alla Commissione, prendere la decisione di effettuare la vaccinazione d'emergenza intorno ad un focolaio, purché non siano pregiudicati gli interessi fondamentali della Comunità. questa decisione sarà immediatamente riesaminata nell'ambito del comitato veterinario permanente, secondo la procedura prevista all'articolo 21.

b) Qualora uno Stato membro venga autorizzato, a norma della lettera a), ad effettuare la vaccinazione d'emergenza in una parte delimitata del proprio territorio, tale misura non modifica la qualifica del territorio restante purché le misure di immobilizzazione degli animali vaccinati restino in vigore per un periodo da determinare secondo la procedura prevista all'articolo 21.

Articolo 17

1. Ciascuno Stato membro redige un piano d'allarme nel quale vengono specificate le misure nazionali da applicare in caso di comparsa dell'influenza aviaria.

Il piano deve consentire l'accesso alle installazioni, alle attrezzature, al personale e a tutti gli altri materiali idonei necessari per una rapida ed efficace eradicazione del focolaio.

2. I criteri da applicare per la redazione dei piani figurano nell'allegato VI.

3. I piani redatti in conformità con i criteri indicati all'allegato VI vengono presentati alla Commissione entro 6 mesi dalla messa in applicazione della presente direttiva.

4. La Commissione esamina i piani allo scopo di determinare se essi consentano di raggiungere l'obiettivo perseguito e propone allo Stato membro in questione qualsiasi emendamento necessario, in particolare per garantirne la compatibilità con quelli degli altri Stati membri.

La Commissione approva i piani, se necessario modificati, secondo la procedura prevista all'articolo 21.

I piani possono essere successivamente modificati o completati secondo la stessa procedura, in modo da tener conto dell'evoluzione della situazione.

Articolo 18

1. Nella misura in cui ciò sia necessario all'applicazione uniforme della presente direttiva, ed in collaborazione con le autorità competenti, gli esperti della Commissione possono effettuare controlli in loco. A tal fine, essi possono verificare, controllando una percentuale rappresentativa di stabilimenti se le autorità competenti controllano il rispetto della presente direttiva da parte di detti stabilimenti. La Commissione informa gli Stati membri del risultato dei controlli effettuati.

Lo Stato membro sul cui territorio viene effettuato un controllo presta tutta l'assistenza necessaria affinché gli esperti possano espletare le loro mansioni.

Le modalità de applicazione del presente articolo sono adottate secondo la procedura prevista all'articolo 21.

Articolo 19

Le condizioni di partecipazione finanziaria della Comunità alle azioni connesse all'attuazione dalla presente direttiva sono definite nella decisione 90/424/CEE.

▼B

Articolo 20

Gli allegati sono modificati, se necessario, dal Consiglio che delibera a maggioranza qualificata su proposta della Commissione, in particolare per tener conto dell'evoluzione delle ricerche e delle procedure di diagnosi.

▼M1

Articolo 21

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.

3. Il comitato adotta il proprio regolamento interno.

▼B

Articolo 22

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva anteriormente al 1º gennaio 1993. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate da un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità di tale riferimento sono decise dagli Stati membri.

Articolo 23

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

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

▼B

ALLEGATO I

AUTORIZZAZIONE A FAR USCIRE UOVA DALL'AZIENDA CONFORMEMENTE ALL'ARTICOLO 4, PARAGRAFO 2, LETTERA e) DELLA PRESENTE DIRETTIVA

L'autorizzazione dell'autorità competente ai fini del trasporto delle uova da un'azienda sospetta soggetta alle disposizioni dell'articolo 4, paragrafo 2, lettera e), verso uno stabilimento riconosciuto per la fabbricazione ed il trattamento di ovoprodotti conformemente all'articolo 6, paragrafo 1 della direttiva 89/437/CEE, di seguito denominato «stabilimento designato», dovrà rispettare le condizioni seguenti:

1) per poter lasciare l'azienda sospetta le uova dovranno:

   a) soddisfare i requisiti dell'allegato, capitolo IV della direttiva 89/437/CEE;

   b) essere inviate direttamente dall'azienda sospetta allo stabilimento designato; ogni spedizione dovrà essere sigillata prima della partenza dal veterinario ufficiale dell'azienda sospetta e dovrà restare sigillato per tutta la durata del trasporto fino allo stabilimento designato;

2) il veterinario ufficiale dell'azienda sospetta informa l'autorità competente dello stabilimento designato dell'intenzione di inviargli delle uova;

3) l'autorità competente responsabile dello stabilimento designato si assicurerà che:

   a) le uova di cui al punto 1, lettera b) siano mantenute isolate dalle altre uova dal momento del loro arrivo fino a quando non siano trattate;

   b) i gusci di tali uova siano considerati materiale ad alto rischio conformemente all'articolo 2, paragrafo 2 della direttiva 90/667/CEE [1] e siano trattati conformemente ai requisiti del capitolo II della direttiva summenzionata;

   c) il materiale d'imballaggio, i veicoli utilizzati per il trasporto delle uova di cui al punto 1, lettera b), nonché tutti i luoghi con cui le uova sono entrate in contatto siano puliti e disinfettati in modo tale che qualsiasi virus dell'influenza aviaria sia distrutto;

   d) il veterinario ufficiale dell'azienda sospetta sia informato di qualsiasi spedizione di uova trattate.

[1] GU n. L 363 del 27. 12. 1990, pag. 51.

▼B

ALLEGATO II

PROCEDURA PER LA PULIZIA E LA DISINFEZIONE DI UNA AZIENDA INFETTA

I. **Pulizia e disinfezione preliminari**

a) Non appena le carcasse dei volatili siano state rimosse per essere distrutte, quelle parti dei locali in cui sono allevati i volatili e qualsiasi parte di edifici, cortili, ecc. contaminati durante l'abbattimento o l'ispezione post mortem devono essere irrorati con disinfettanti approvati conformemente all'articolo 11 della presente direttiva.

b) Qualsiasi tessuto di volatili e uova che avrebbero potuto contaminare gli edifici, i cortili, gli utensili ecc. deve essere accuratamente recuperato ed eliminato con le carcasse.

c) Il disinfettante utilizzato deve rimanere sulla superficie trattata per almeno 24 ore.

II. **Pulizia e disinfezione finale**

a) Il grasso ed il sudiciume devono essere eliminati da tutte le superfici con l'applicazione di un prodotto sgrassante e successivamente lavate con acqua.

b) Una volta lavate con acqua come indicato alla lettera a), le superfici di cui sopra devono essere irrorate di nuovo con un disinfettante.

c) Dopo sette giorni i locali devono essere trattati con un prodotto sgrassante, sciacquati con acqua fredda, irrorati con un disinfettante e nuovamente sciacquati con acqua.

d) Il concime e le lettiere usate devono essere trattati con un metodo atto ad uccidere il virus. Questo metodo deve comprendere una delle procedure seguenti:

   i) essere bruciati o sottoposti a vapore ad una temperatura di 70º C;

   ii) essere seppelliti ad una profondità tale da impedirne l'accesso ai parassiti ed agli uccelli selvatici;

   iii) essere accumulati ed inumiditi (se necessario per facilitare la fermentazione), coperti per mantenere il calore in modo tale che raggiungano una temperatura di 20º C, e rimanere coperti per 42 giorni in maniera da impedirne l'accesso ai parassiti ed agli uccelli selvatici.

▼B

ALLEGATO III

METODI DIAGNOSTICI PER LA CONFERMA E LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELL'INFLUENZA AVIARIA

I metodi per isolare e individuare i virus dell'influenza aviaria, descritti qui di seguito, devono essere considerati come orientamenti e criteri minimi da applicare nella diagnosi della malattia.

Ai fini dei metodi diagnostici per la conferma e la diagnosi differenziale dell'influenza aviaria si applica la definizione seguente:

per «influenza aviaria», si intende un'infezione dei volatili causata da qualsiasi virus A dell'influenza avente un indice di patogenicità intravenosa superiore a 1,2 nei pulcini di sei settimane, ovvero qualsiasi infezione provocata da virus A dell'influenza, sottotipo H5 o H7, per il quale il sequenziamento dei nucleotidi abbia rilevato la presenza di molteplici amminoacidi basici nel sito di clivaggio dell'emoagglutinina.

CAPITOLO 1

Campionature e trattamento dei campioni

1. *Campioni*

   Frammenti prelevati mediante tampone nell'intestino (o feci) e nella trachea di volatili malati; feci o contenuti degli organi (intestino, tessuti cerebrali, trachea, polmoni, fegato, milza e altri) dell'animale malato, prelevati da volatili morti di recente.

2. *Trattamento dei campioni*

   Gli organi e i tessuti menzionati al paragrafo 1 sopra elencati possono essere trattati insieme, salvo per quanto riguarda le feci, per le quali è essenziale un trattamento separato. I materiali prelevati devono essere immersi completamente in un quantitativo sufficiente di antibiotico. I campioni di feci e gli organi devono essere omogeneizzati (in un miscelatore chiuso o in un mortaio con pestello e sabbia sterile) in un mezzo antibiotico e portati in sospensione in tale mezzo al 10—20 % p/v. Le sospensioni devono essere lasciate riposare per circa due ore a temperatura ambiente (o per un intervallo superiore a 4 ºC) e successivamente chiarificati mediante centrifugazione (ad esempio da 800 a 1 000 % g per 10 minuti).

3. *Mezzo antibiotico*

   Numerosi laboratori hanno utilizzato con successo mezzi antibiotici di varia composizione e i laboratori nazionali potranno essere consultati in proposito nei rispettivi paesi. Per i campioni di feci occorre una elevata concentrazione di antibiotici; una miscela tipica è la seguente: 10 000 unità/ml di penicillina, 10 mg/ml di streptomicina, 0,25 mg/ml di gentamicina e 5 000 unità/ml di micostatina in una soluzione salina tampone di fosfato. Queste dosi possono essere ridotte fino a 5 volte per i tessuti e i prelievi di trachea. Per l'accertamento della Clamidia, si possono aggiungere 50 mg/ml di ossitetraciclina. Nella preparazione del mezzo antibiotico, occorre assolutamente controllare il pH dopo l'aggiunta degli antibiotici e portarlo ad un valore compreso tra 7,0 e 7,4.

CAPITOLO 2

Isolamento del virus

Isolamento del virus nelle uova embrionale di galline

Inoculare 0,1—0,2 ml del liquido sopranatante chiarificato nella cavità allantioca di almeno 4 uova embrionale di gallina previamente sottoposto a incubazione per 8—10 giorni. Idealmente si dovrebbero utilizzare uova provenienti da un branco indenne da organismi patogeni specifici, ma, in caso di impossibilità, si possono utilizzare uova provenienti da un branco in cui sia comprovata l'assenza di anticorpi dell'influenza aviaria. Le uova inoculate sono mantenute alla temperatura di 37 ºC ed esaminate ogni giorno in controluce. Le uova in cui si constata che l'embrione è morto o è morente, nonché tutte le uova restanti 6 giorni dopo l'inoculazione, vengono refrigerate a 4 ºC e il liquido allantoico/amniotico sottoposto alla prova dell'attività emoagglutinante. Qualora non si constati emoagglutinazione, il procedimento sopra descritto deve essere ripetuto inoculando nelle uova liquido allantoico/amniotico non diluito.

▼B

Quando viene constatata emoagglutinazione, la presenza di batteri deve essere esclusa mediante coltura. In caso di presenza di batteri, far passare i liquidi attraverso un filtro a membrana di 450 nm, quindi aggiungere altri antibiotici e procedere nuovamente, come indicato sopra, alla inoculazione in uova embrionate.

CAPITOLO 3

Diagnosi differenziale

1. *Differenziazione preliminare*

   Data l'importanza di porre in atto al più presto possibile provvedimenti volti a limitare la propagazione del virus, ciascun laboratorio regionale dovrebbe essere in grado di identificare qualsiasi virus isolato che provoca emoagglutinazione, come il virus dell'influenza di sottotipo H5 o H7, oltre al virus della malattia di Newcastle. Occorre pertanto utilizzare i liquidi emoagglutinanti eseguendo una prova di inibizione dell'emoagglutinazione come descritto ai capitoli 5 e 6. Una inibizione positiva, cioè pari a 2^4 ou più, con l'antisiero policionale specifico dei sottotipi H5 o H7 dell'influenza A ed avente un titolo noto, pari almeno a 2^9, potrà servire per una identificazione preliminare sulla cui base istituire misure provvisorie di contenimento.

2. *Identificazione di conferma*

   Dal momento che esistono 13 sottotipi di emoagglutinina e 9 sottotipi di neuramnidasi del virus dell'influenza, con varianti all'interno di ciascuno di essi, non è pratico né economicamente fattibile, per i singoli laboratori nazionali, conservare antisieri che consentano di effettuare una caratterizzazione antigenica completa degli isolati d'influenza. Nondimeno, ciascun laboratorio nazionale è tenuto a:

   i) confermare che l'isolato è un virus A dell'influenza, mediante prova di doppia immunodiffusione atta a rivelare l'antigene del gruppo, secondo il procedimento indicato al capitolo 9 (si possono impiegare altresì, secondo le preferenze del laboratorio nazionale, le tecniche di immunofluorescenza o ELISA);

   ii) determinare se l'isolato appartiene al sottotipo H5 o H7;

   iii) eseguire una prova dell'indice di patogenicità intravenosa su pulcini di sei settimane, secondo il procedimento indicato al capitolo 7, indici di patogenicità intravenosa superiori a 1,2 denotano la presenza di virus e richiedono quindi la gamma completa delle misure profilattiche (è utile che i laboratori nazionali eseguano prove anche per determinare l'attitudine di un isolato a produrre placche nelle colture di cellule, come specificato al capitolo 8).

   I laboratori nazionali devono trasmettere immediatamente al laboratorio comunitario di riferimento, per una caratterizzazione completa, tutti gli isolati di influenza aviaria e di virus H5 e H7.

3. *Altre prove di individuazione del tipo e delle caratteristiche degli isolati*

   Il laboratorio comunitario di riferimento dovrebbe ricevere tutti i virus emoagglutinanti dei laboratori nazionali, da sottoporre ad ulteriori esami antigenici e genetici, ai fini di una maggiore comprensione dell'epidemiologia della o delle malattie nella Comunità, conformemente alle competenze ed ai compiti del laboratorio comunitario di riferimento.

   Oltre a queste funzioni, il laboratorio comunitario di riferimento effettua una tipizzazione antigenica completa di tutti i virus dell'influenza ricevuti. Per i virus H5 e H7 con indici di patogenicità intravenosa non superiori a 1,2, si dovrebbe effettuare altresì un sequenziamento dei nucleotidi del gene dell'emoagglutinina per determinare la presenza di amminoacidi basici multipli nel sito di clivaggio della proteina dell'emoagglutinina. Virus dotati di amminoacidi basici multipli nel sito del clivaggio, anche se presentano deboli indici di patogenicità, richiedono la piena applicazione delle misure di lotta contro l'influenza aviaria.

CAPITOLO 4

Prove sierologiche per individuare gli anticorpi dei virus dell'influenza aviaria

1. Nei programmi di eradicazione in cui è noto il sottotipo H dei virus, oppure se si usa come antigene il virus omologo, il monitoraggio sierologico per la rivelazione dell'infezione può essere effettuato mediante le prove d'inibizione dell'emoagglutinazione secondo il procedimento indicato ai capitoli 5 e 6.

▼B

Se il sottotipo di emoagglutinina non è noto, l'infezione da virus A dell'influenza può essere dimostrata mediante la rivelazione di anticorpi contro gli antigeni specifici del gruppo.

A questo scopo si può ricorrere alla prova di doppia immunodiffusione (descritta al capitolo 9) oppure alla prova ELISA (che presenta peraltro il problema di essere specifica all'ospite, in quanto dipende dalla rivelazione delle immunoglobuline dell'ospite). La prova di doppia immunodiffusione dà raramente risultati positivi negli uccelli acquatici, tranne quando è noto il sottotipo; si può quindi utilizzare su questo tipo di volatili soltanto per la ricerca di anticorpi dei sottotipi H5 e H7.

2. a) *Campioni*

Prelevare campioni di sangue da tutti i volatili, se il branco è costituito da meno di 20 capi, e da 20 esemplari in caso di branchi più numerosi (si ha, in tal modo, una probabilità superiore al 99 % di individuare almeno un caso sieropositivo se almeno il 25 % degli individui del branco è positivo, indipendentemente dalle dimensioni del branco stesso). Lasciar coagulare il sangue e asportare il siero da sottoporre alla prova.

b) *Ricerca degli anticorpi*

Verificare la capacità di singoli campioni di siero di inibire l'antigene emoagglutinante del virus dell'influenza, mediante prove standard di inibizione dell'emoagglutinazione come indicato nel capitolo 6.

Un aspetto discusso è se nella prova di inibizione dell'emoagglutinante occorra usare 4 o 8 unità di emoagglutinina. Entrambe le ipotesi sembrano valide; la scelta deve essere quindi lasciata a discrezione dei laboratori nazionali.

Tuttavia l'antigene usato incide sul livello al quale un siero è considerato positivo: usando 4 unità di emoagglutinina, un siero è considerato positivo se rivela un titolo uguale o superiore a 2^4; usando 8 unità di emoagglutinina, un siero è considerato positivo se rivela un titolo uguale o superiore a 2^3.

CAPITOLO 5

Prova di emoagglutinazione (HA)

Reagenti

1. Soluzione salina isotonica tamponata con fosfato (SPT) (0,05M) al pH compreso tra 7,0 e 7,4.

2. Prelevare globuli rossi da almeno 3 volatili esenti da organismi patogeni specifici (in caso di impossibilità, il sangue può essere prelevato da volatili che sono regolarmente sottoposti a controllo e che non presentano anticorpi dell'influenza aviaria), raggrupparli e aggiungerli ad un volume uguale di soluzione di Alsever. Prima dell'uso, i globuli rossi devono essere lavati 3 volte in soluzione salina tamponata con fosfato. Per l'esecuzione della prova si raccomanda una sospensione all'1 % (globuli confezionati v/v) in soluzione salina tamponata.

3. Il laboratorio comunitario di riferimento fornirà o raccomanderà, come antigene standard, i virus H5 e H7 a bassa virulenza.

Procedimento

1. Porre 0,025 ml di soluzione in ciascuno dei pozzetti di una piastra di microtitolazione in materiale plastico (usare pozzetti a V).

2. Versare 0,025 ml di sospensione del virus (ad esempio liquido allantoico) nel primo pozzetto.

3. Usare un diluente da microtitolazione per raddoppiare la diluzione (da 1/2 a 1/4096) di virus nella piastra.

4. Aggiungere altri 0,025 ml di soluzione salina in ogni pozzetto.

5. Aggiungere 0,025 ml di globuli rossi all'1 % in ogni pozzetto.

6. Mescolare agitando leggermente e porre a riposo alla temperatura di 4 ºC.

7. La lettura viene effettuata 30—40 minuti dopo, una volta stabilizzati i globuli rossi di controllo. La lettura si effettua inclinando la piastra ed osservando la presenza o l'assenza di globuli rossi raggruppati a forma di goccia. Il flusso nei pozzetti che non presentano emoagglutinazione deve essere identico a quello constatato presso i globuli rossi di controllo esenti dal virus.

8. Il titolo di emoagglutinazione è costituito dalla diluizione più elevata che provoca agglutinazione dei globuli rossi. Tale diluizione può essere conside-

▼B

rata come contenente una unità emoagglutinante (HAU). Un metodo più accurato per la determinazione del titolo di emoagglutinazione consiste nell'effettuare prove di agglutinazione sul virus in una serie di diluizioni iniziali progressive, ad esempio 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, ecc. Si raccomanda questa procedura per una preparazione accurata dell'antigene per le prove di inibizione dell'emoagglutinazione (capitolo 6).

CAPITOLO 6

Prova di inibizione dell'emoagglutinazione

Reagenti

1. Soluzione salina tamponata con fosfato (SPT).
2. Liquido allantoico contenente il virus, diluito nella soluzione salina in modo da avere un contenuto di 4 o 8 unità di emoagglutinazione per 0,025 ml.
3. Globuli rossi di pollame: 1 %.
4. Siero di pollame negativo di controllo.
5. Siero positivo di controllo.

Procedimento

1. Versare 0,025 ml di soluzione salina tamponata con fosfato in tutti i pozzetti di una piastra di microtitolazione in materiale plastico (i pozzetti devono avere una forma a V).
2. Versare 0,025 ml di siero nel primo pozzetto della piastra.
3. Usare un diluente da microtitolazione per ottenere una diluizione di 1/2 di siero sulla piastra.
4. Aggiungere 0,025 ml di liquido allantoico diluito contenente 4 o 8 unità di emoagglutinazione.
5. Mescolare picchiettando leggermente e conservare alla temperatura di 4 ºC per almeno 60 minuti o a temperatura ambiente per almeno 30 minuti.
6. Aggiungere 0,025 ml di globuli rossi all'1 % in tutti i pozzetti.
7. Mescolare picchiettando leggermente e porre a riposo alla temperatura di 4 ºC.
8. La lettura delle piastre è effettuata dopo 30—40 minuti, dopo che i globuli rossi di controllo si sono stabilizzati. La lettura viene effettuata inclinando la piastra e osservando se nel flusso del liquido vi è o meno formazione di gocce in misura uguale a quelle dei pozzetti di controllo che contengono unicamente globuli rossi (0,025 ml) e soluzione salina (0,05 ml).
9. Il titolo di inibizione dell'emoagglutinazione è costituito dalla diluizione massima di antisiero che comporta una inibizione totale di 4 o 8 unità di virus (ciascuna prova dovrebbe comprendere una titolazione di emoagglutinazione a scopo di conferma della presenza delle unità di agglutinazione richieste).
10. I risultati sono validi se si ottiene un titolo inferiore a 2^3 per 4 unità di agglutinazione o 2^2 per 8 unità di agglutinazione con il siero negativo di controllo ed un titolo inferiore o uguale a 1 con una diluizione del siero di controllo positivo del titolo noto.

CAPITOLO 7

Prova dell'indice di patogenicità endovenosa (IVPI)

1. Diluire da 10^{-1}, in una soluzione isotonica salina sterile, liquido allantoico infetto prelevato dall'ultimo livello di passaggio disponibile, preferibilmente dall'isolamento iniziale senza selezione.
2. Iniettare per via endovenosa 0,1 ml di virus diluito in dieci pulcini di sei settimane (deve trattarsi di animali esenti dallo specifico patogeno).
3. Esaminare i pulcini per 10 giorni, ad intervalli di 24 ore.
4. Classificare ognuno dei pulcini ad ogni osservazione nel modo seguente: 0 = normale; 1 = malato; 2 = gravemente malato; 3 = morto.
5. L'indice è calcolato come nell'esempio che segue:

▼B

Sintomi clinici	Giorni successivi all'inoculazione										Totale punteggio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
normale	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 × 0 = 0
malato	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 × 1 = 6
gravemente malato (*)	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 × 2 = 12
morto	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 × 3 = 228
											Totale = 246

L'indice è costituito dal punteggio medio per pulcino per ogni osservazione ossia $\frac{246}{100} = 2,46$.

(*) Deve trattarsi di un giudizio clinico soggettivo; in questo caso, tuttavia, i volatili presentano generalmente uno o più dei sintomi seguenti: complicazioni respiratorie, depressione, diarrea, cianosi dell'epidermide o del bargiglio, edema facciale o cranico, sintomi neuropatologici.

CAPITOLO 8

Valutazione della capacità di formazione di placca

1. Il procedimento migliore consiste nell'utilizzare tutta una gamma di diluizioni di virus per essere certi di disporre sulla piastra dei numeri ottimali di placche. Dieci diluizioni fino a 10^{-7} in soluzione salina fosfatata dovrebbero essere sufficienti.

2. Monostrati confluenti di cellule di embrione di volatile o una linea cellulare adeguata (ad esempio rene bovino Madin-Darby) sono preparati e disposti in scatole di Petri aventi 5 cm di diametro.

3. Aggiungere in due scatole di Petri 0,2 ml di ciascuna delle diluizioni di virus e lasciar assorbire il virus per 30 minuti.

4. Lavare 3 volte con la soluzione salina le cellule infette, indi ricoprirle con il mezzo pertinente, contenente l'1 % p/v di agar e 0,01 mg/ml di tripsina, oppure non contenente tripsina; è importante non aggiungere siero al mezzo di copertura.

5. Dopo una incubazione a 37 ºC per 72 ore, le placche dovrebbero avere una dimensione sufficiente. Per una migliore osservazione delle placche, asportare lo strato di agar di copertura e colorare il monostrato cellulare con cristalvioletto (0,5 % p/v) in metanolo al 25 % v/v.

6. Tutti i virus dovrebbero fornire placche evidenti, se incubati alla presenza di tripsina nello strato di copertura. Se nel mezzo di copertura non vi è tripsina, soltanto i virus virulenti per i volatili producono placche.

CAPITOLO 9

Immunodiffusione doppia

Il metodo raccomandato per rivelare la presenza del virus A dell'influenza consiste nell'individuare gli antigeni del nucleocapside o della matrice, che sono cumuni a tutti i virus A dell'influenza. A ciò si perviene generalmente mediante le prove di immunodiffusione doppia, utilizzando preparazioni di virus concentrati o estratti di membrana corio-allantoidea infetta.

Idonei preparati di virus concentrati si possono ottenere semplicemente centrifugando ad alta velocità liquido allantoico infetto e sottoponendolo ad un trattamento a base di detergente lauroilsarcosinato di sodio, in modo che dal frazionamento del virus siano liberati gli antigeni che si trovano all'interno del nucleocapside e della matrice. Si può usare anche un precipitante acido, aggiungendo al liquido allantoico HCL 1N, per ottenere un pH finale compreso tra 3,5 e 4,0, refrigerando per circa un'ora a 0 ºC e centrifugando a bassa velocità (1 000 g) per 10 minuti.

Il liquido supernatante può essere eliminato ed il precipitato contenente il virus può essere rimesso in sospensione in un volume minimo di tampone glicina-sarcosile (lauroilsarcosinato di sodio all'1 % tamponato con glicina 0,5 M, fino ad ottenere un pH di 9,0). Queste preparazioni possiedono antigeni sia del nucleocapside che della matrice.

Beard (1970) ha descritto la preparazione di antigeni ricchi di nucleocapside ottenuti dalle membrane corio-allantoidee prelevate da uova infette. Il procedi-

▼B

mento si svolge come segue: si estraggono le membrane corio-allantoidee dalle uova infette con emoagglutinina positiva; si frantumano od omogeneizzano le membrane; si congela e sgela tre volte, centrifugando quindi per 10 minuti a 1 000 g; si elimina il deposito formatosi e si tratta il liquido supernatante con formalina allo 0,1 % per utilizzarlo come antigene.

Entrambi questi antigeni possono essere utilizzati per la prova di immunodiffusione doppia, con 1 % di agarosio o di agar o gel contenenti cloruro di sodio all'8 % portato a molarità di 0,1 M con tampone fosfato a pH 7,2. Il virus A dell'influenza è confermato dalle linee di precipitina formate dall'antigene di prova e dall'antigene positivo noto, prendendo come termine di riferimento un antisiero positivo noto che, coalescendo, producono una linea d'identità.

▼B

ALLEGATO IV

ELENCO DEI LABORATORI NAZIONALI PER L'INFLUENZA AVIARIA

Belgio	Institut National de Recherches Vétérinaires Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles
Danimarca	National Veterinary Laboratory, Poultry Disease Division Hangøvej 2, DK-8200 Aarhus N
Germania	Institut für Kleintierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode, Postfach 280, D-3100 Celle
Francia	Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires — Laboratoire Central de Recherches Agricoles et Porcines B.P. 53, F-22440 Ploufragan
Grecia	Institut des Maladies infectieuses et parasitaires 66, rue du 26 octobre, 54627 — Thessaloniki
Irlanda	Veterinary Research Laboratory Abbotstown, Castleknock, Dublin 15
Italia	Istituto Patologie Aviaire, Facoltà di medicina veterinaria, Università di Napoli via Aniezzo, Falcone 334, I-80127 Napoli F Delpino 1
Lussemburgo	Institut National de Recherches Vétérinaires Groeselenberg 99, B 1180 Bruxelles
Paesi Bassi	Centraal Diergeneeskundig Instituut, Vestiging Virologie Houtribweg 39, NL-8221 RA Lelystad
Portogallo	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) Estrada de Benfica 701, 1500 Lisboa
Spagna	Centro Nacional de Referencia para la Peste Aviar — Laboratorio Nacional de Sanidad y Producción Animal de Barcelona Zona Franca Circunvalación-Tramo 6, Esquina Calle 3. Barcelona
Regno Unito	Central Veterinary Laboratory New Haw, Weybridge, GB-Surrey KT15 3NB
▼A1	
Austria	Bundesanstalt für Virusseuchenbekämpfung bei Haustieren, Wien-Hetzendorf
Finlandia	Eläinlääkintä- ja elintarvikelaitos, Helsinki — Anstalten för veterinärmedicin och livsmedel, Helsingfors
Svezia	Statens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala
▼A2	
Repubblica ceca	Státní veterinární ústav Praha, Sídlištní 24/136, 165 03 Praha 6
Estonia	Veterinaar- ja Toidulaboratoorium, Väike-Paala 3, 11415 Tallinn
Cipro	Εργαστήριο Αναφοράς για τις Ασθένειες των Ζώων, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, 1417 Λευκωσία (National Reference Laboratory for Animal Health Veterinary Services, CY-1417 Nicosia)
Lettonia	Valsts veterinārmedicīnas diagnostikas centrs, Lejupes iela 3, LV-1076 Rīga

▼A2

Lituania	Nacionalinė veterinarijos laboratorija, J. Kairiūkščio g. 10, LT-2021 Vilnius
Ungheria	Országos Állategészségügyi Intézet (OÁI), Pf. 2., Tábornok u. 2., HU-1581 Budapest
Malta	Istituto Zooprofilatico Sperimentale delle Venezie, Padova, Italy
Polonia	Laboratorium Zakładu Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, PL-24-100 Puławy
Slovenia	Nacionalni veterinarski inštitut, Gerbičeva 60, SI-1000 Ljubljana
Slovacchia	Štátny veterinárny ústav, Pod dráhami 918, SK-96086 Zvolen

▼B

ALLEGATO V

LABORATORIO COMUNITARIO DI RIFERIMENTO PER L'INFLUENZA AVIARIA

Nome del laboratorio

Central Veterinary Laboratory
New Haw
Weybridge
Surrey KT 15 3NB
Regno Unito

Il laboratorio comunitario di riferimento per l'influenza aviaria ha le competenze ed i compiti seguenti:

1) coordinare in consultazione con la Commissione, i metodi di diagnosi dell'influenza aviaria negli Stati membri, segnatamente mediante:

   a) la specificazione, la detenzione e il rilascio dei ceppi di virus dell'influenza aviaria ai fini dei testi sierologici e della preparazione dell'antisiero;

   b) il rilascio dei sieri di riferimento e di altri reagenti di riferimento ai laboratori di riferimento nazionali ai fini della standardizzazione delle prove e dei reagenti utilizzati in ogni Stato membro;

   c) la creazione e la conservazione di una collezione di ceppi e di isolanti del virus dell'influenza aviaria;

   d) l'organizzazione periodica di prove comparative comunitarie delle procedure di diagnosi;

   e) la raccolta e il raffronto dei dati e delle informazioni concernenti i metodi di diagnosi utilizzati ed i risultati delle prove effettuate nella Comunità;

   f) la caratterizzazione degli isolati del virus dell'influenza aviaria mediante metodi più avanzati al fine di consentire una migliore comprensione della epizooziologia dell'influenza aviaria;

   g) il controllo dell'evoluzione della situazione in tutto il mondo in materia di sorveglianza di epizooziologia e di prevenzione dell'influenza aviaria;

   h) il mantenimento di una perizia sul virus dell'influenza aviaria e su altri virus in causa, in modo tale da permettere una rapida diagnosi differenziale;

   i) l'acquisizione di una conoscenza approfondita della preparazione e dell'utilizzazione dei prodotti di medicina veterinaria immunologica utilizzati per l'eradicazione ed il controllo dell'influenza aviaria;

2) apportare un aiuto efficace all'identificazione dei focolai di influenza aviaria negli Stati membri mediante lo studio degli isolati di virus che gli vengono inviati per conferma della diagnosi, dell'individuazione delle caratteristiche e degli studi epizooziologi. Il laboratorio dovrebbe in particolare essere in grado di analizzare sequenziamente dei nucleotidi per permettere la determinazione della sequenza di amminoacidi dedotta nel sito di clivaggio della molecola di emoagglutinina dei virus influenzali di sottotipo H5 o H7;

3) facilitare la formazione o riqualificazione professionale degli esperti in diagnosi di laboratorio in vista dell'armonizzazione delle tecniche diagnostiche in tutta la Comunità.

▼B

ALLEGATO VI

CRITERI PER I PIANI DI INTERVENTO

I piani di intervento devono prevedere almeno:

1) la creazione di un nucleo di emergenza a livello nazionale incaricato del coordinamento di tutte le misure di urgenza adottate dallo Stato membro interessato;
2) un elenco dei centri locali di urgenza dotati di strutture adeguate per il coordinamento delle misure di controllo a livello locale;
3) informazioni dettagliate sul personale incaricato delle misure di urgenza, con riferimento alle sue qualifiche e responsabilità;
4) la possibilità per qualsiasi centro locale di controllo di urgenza di contattare rapidamente le persone o organizzazioni direttamente o indirettamente interessate dall'insorgenza di un focolaio;
5) la disponibilità di attrezzature e materiale adatti per la corretta esecuzione delle misure di urgenza;
6) istruzioni dettagliate sulle azioni da adottare in caso di infezione o contagio sospetti o confermati, comprendenti i mezzi di distruzione delle carcasse;
7) programmi di formazione per l'aggiornamento e lo sviluppo delle conoscenze relative alle procedure amministrative;
8) per i laboratori di diagnosi, un servizio per gli esami post mortem, la capacità necessaria per gli esami sierologici ed istologici, ecc. e l'aggiornamento delle tecniche di diagnosi rapida (a tal fine occorre adottare disposizioni per il trasporto rapido di campioni);
9) precisioni relative al quantitativo di vaccini contro l'influenza aviaria ritenuto necessario in caso di ripristino della vaccinazione di emergenza;
10) le disposizioni regolamentari per realizzare piani di intervento.