II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

COMMISSIONE

DECISIONE DELLA COMMISSIONE

del 25 febbraio 1991

che stabilisce i protocolli per la normalizzazione di materiali e procedure di prove veterinarie nonché i requisiti per il riconoscimento dei mercati in relazione all'importazione di animali domestici delle specie bovina e suina in provenienza da paesi terzi

(91/189/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 72/462/CEE del Consiglio, del 12 dicembre 1972, relativa a problemi sanitari e di polizia sanitaria all'importazione di animali delle specie bovina e suina e di carni fresche in provenienza da paesi terzi [1], modificata da ultimo dalla direttiva 91/69/CEE [2], in particolare l'articolo 8, paragrafo 1,

considerando che la direttiva 72/462/CEE autorizza l'importazione di animali domestici delle specie bovina e suina in provenienza dai paesi terzi che figurano nell'elenco allegato alla decisione 79/542/CEE del Consiglio [3], modificata da ultimo dalla decisione 90/485/CEE [4];

considerando che le norme sanitarie per l'importazione di animali vivi provenienti da un paese terzo devono essere stabilite in funzione della situazione zoosanitaria esistente in tale paese;

considerando che, sebbene tali norme sanitarie possano variare da un paese all'altro, i protocolli per le prove veterinarie e le condizioni di riconoscimento dei mercati dei paesi terzi per il commercio di animali destinati all'esportazione verso la Comunità si applicano a tutti i paesi terzi;

considerando che, al fine di semplificare le decisioni sulle norme sanitarie da applicare all'importazione di animali domestici delle specie bovina e suina in provenienza da paesi terzi, sembra opportuno far riferimento ad un'unica decisione comune sui protocolli per le prove veterinarie e i requisiti di riconoscimento dei mercati;

considerando che una decisione recante i protocolli per prove veterinarie nonché i requisiti per il riconoscimento dei mercati può applicarsi soltanto a quei paesi terzi per i quali siano state adottate decisioni concernenti specificamente la situazione zoosanitaria in tali paesi;

considerando che le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato veterinario permanente,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

1. La presente decisione stabilisce i protocolli per prove veterinarie nonché i requisiti per il riconoscimento dei

(1) GU n. L 302 del 31. 12. 1972, pag. 28.
(2) GU n. L 46 del 19. 2. 1991, pag. 37.
(3) GU n. L 146 del 14. 6. 1979, pag. 15.
(4) GU n. L 276 del 27. 9. 1990, pag. 46.

mercati dei paesi terzi nei quali si svolge il commercio di animali destinati all'esportazione nella Comunità, in relazione all'importazione di animali vivi delle specie bovina e suina in provenienza dai paesi terzi inclusi nell'elenco allegato alla decisione 79/542/CEE.

2. I requisiti indicati negli allegati I e II si applicano soltanto ai paesi terzi per i quali siano state adottate decisioni recanti norme sanitarie specifiche ai sensi dell'articolo 8 della direttiva 72/462/CEE.

Articolo 2

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 25 febbraio 1991.

Per la Commissione

Ray Mac SHARRY

Membro della Commissione

ALLEGATO I

PROTOCOLLI PER LA NORMALIZZAZIONE DI MATERIALI E PROCEDURE DI PROVA

CAPITOLO I

Animali della specie bovina

1. *Tubercolosi*

L'intradermotubercolinizzazione unica con tubercolina bovina dev'essere effettuata conformemente all'allegato B della direttiva 64/432/CEE del Consiglio, del 26 giugno 1964, relativa a problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina [1].

2. *Brucellosi*

La prova di sieroagglutinazione e di fissazione del complemento dev'essere effettuata conformemente all'allegato C, lettere A e B, della direttiva 64/432/CEE del Consiglio.

3. *Leucosi bovina enzootica*

La prova di immunodiffusione su gel di agar dev'essere effettuata conformemente all'allegato G della direttiva 64/432/CEE del Consiglio.

4. *Febbre catarrale maligna*

A. Il saggio ELISA di arresto (blocking test) o competitivo dev'essere effettuato secondo la seguente procedura:

Il saggio ELISA competitivo mediante anticorpo monoclonale 3-17-A3 serve a individuare anticorpi di tutti i sierotipi noti del virus della febbre catarrale maligna (BTV).

Il principio su cui si basa la prova consiste nell'interruzione della reazione tra l'antigene BTV e un anticorpo monoclonale specifico del gruppo (3-17-A3) mediante aggiunta di diluizioni del siero da esaminare. Gli anticorpi del BTV presenti nel siero da esaminare bloccano la reattività dell'anticorpo monoclonale (Mab) e riducono lo sviluppo di colore previsto dietro aggiunta di substrato enzimatico.

Materiali e reagenti

1. Piastre da microtitolazione a fondo piatto.
2. Antigene: preparato come descritto più sotto.
3. Tampone di arresto: blocking buffer: latte in polvere essiccato «Marvel» al 5 %, Tween-20 allo 0,1 %, (V/V) (fornito come sciroppo di pollossietilensorbitan monolaurato) in PBS.
4. Anticorpo monoclonale: 3-17-A3 (fornito come supernatante di coltura tissulare di ibridoma) conservato a – 20 °C o liofilizzato, diluito a 1/50 con tampone di arresto prima dell'uso, diretto contro il polipeptide p_7 specifico del gruppo.
5. Coniugato: globulina coniglio anti-topo (adsorbita ed eluita), coniugata con perossidasi di rafano e tenuta al buio a 4 °C.
6. Substrato e cromogeno: 0,2 g di ortofenilendiammina (OPD) sciolta in un tampone costituito da 2,553 g di acido citrico e 4,574 g di idrogenoortofosfato di sodio portato a volume di 500 ml con acqua distillata, suddiviso in aliquote di 25 ml e tenuto al buio a – 20 °C, aggiungendo immediatamente prima dell'uso 12 µl/25 ml di acqua ossigenata (al 30 % p/v).

Maneggiare l'OPD con cautela — indossare guanti di gomma — Sospetto mutageno.

7. Acido solforico 1 molare: 26,6 ml di acido aggiunti a 473,4 ml di acqua distillata.

Ricordarsi di aggiungere sempre l'acido all'acqua, mai l'acqua all'acido.

---

(1) GU n. 121 del 29. 7. 1964, pag. 1977/64.

8. Agitatore orbitale.

9. Lettore di piastra ELISA (la prova può essere letta visivamente).

Schema della prova:

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Bianco			Antigene + Coniugato						1
Controllo Mab			Antigene + Mab + Coniugato						2
Controllo +ve	1/2	1/4	Antigene + Siero positivo + Mab + Coniugato 1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3
	1/2	1/4	Sieri da esaminare 1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Sieri da esaminare									7
									8
									9
									10
									11
									12

Protocollo di riferimento

Controllo in bianco

La serie 1 A — H è un controllo in bianco costituito da antigene BTV e coniugato. Essa può essere usata come bianco per il lettore ELISA.

Controllo Mab

La serie 2 A — H è un controllo dell'anticorpo monoclonale ed è costituita da antigene BTV, anticorpo monoclonale e coniugato. Essa rappresenta un controllo negativo. La media delle letture di densità ottica effettuata su questa serie di controllo rappresenta un valore di inibizione pari allo 0 %.

Controllo positivo

La serie 3 A — H è un controllo positivo. Essa consiste in antigene BTV, diluizioni di antisiero positivo BTV, Mab e coniugato. Essa sta ad indicare che la prova funziona adeguatamente e che livelli analoghi di inibizione dovrebbero essere ottenuti dalle varie prove.

Sieri da esaminare

Nello schema sperimentale di cui sopra 18 sieri possono essere analizzati ad un tasso di diluizione di 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16. Ciò fornirà qualche indicazione sul titolo dell'anticorpo nei sieri da esaminare. La gamma di diluizione potrebbe essere ulteriormente estesa per ottenere titoli dei punti finali della diluizione del siero. Alternativamente, per esami sierologici su vasta scala i sieri potrebbero essere analizzati a una singola diluizione (1/4) o a due diluizioni (1/2 e 1/4) come una rapida prova di selezione.

Procedimento

1. Diluire l'antigene BTV a una concentrazione pretitolata in PBS, sottoporre brevemente agli ultrasuoni per disperdere il virus aggregato (se gli ultrasuoni non sono disponibili, pipettare vigorosamente) e aggiungere 50 µl in tutti i pozzetti della piastra ELISA. Picchiettare i bordi della piastra per disperdere l'antigene.

2. Incubare a 37 °C per 60 minuti su un agitatore orbitale. Lavare le piastre tre volte, immergendole e vuotando i pozzetti con PBS non sterile e asciugare su carta assorbente.

3. Aggiungere 50 µl di tampone bloccante per pozzetto. Aggiungere i sieri da esaminare ed il siero positivo negli opportuni pozzetti e diluire su tutta la piastra usando una pipetta a più canali. Non aggiungere sieri al controllo in bianco o al controllo del Mab.

4. Immediatamente dopo l'aggiunta dei sieri da esaminare, diluire il Mab in tampone bloccante (alla diluizione pretitolata) ed aggiungere 50 µl a tutti i pozzetti della piastra, eccettuato il controllo in bianco.

5. Incubare a 37 °C per 60 minuti su un agitatore orbitale. Lavare tre volte con PBS e asciugare.

6. Diluire il concentrato di coniglio anti-topo a 1/5000 in tampone bloccante ed aggiungere 50 µl a tutti i pozzetti della piastra.

7. Incubare a 37 °C per 60 minuti su agitatore orbitale. Lavare tre volte con PBS e asciugare.

8. Sgelare l'OPD e, immediatamente prima dell'uso, aggiungere 12 µl di acqua ossigenata al 30 % a ogni porzione di 25 ml di OPD. Aggiungere 50 µl a tutti i pozzetti della piastra. Lasciar sviluppare il colore per circa 10 minuti e interrompere la reazione con acido solforico 1 M (50 µl per pozzetto). Il colore dovrebbe svilupparsi nei pozzetti di controllo del Mab ed in quei pozzetti che contengono siero nel quale non vi sono anticorpi del BTV.

9. Esaminare e registrare le piastre visivamente oppure facendo uso di un lettore spettrofotometrico.

Analisi dei risultati

Calcolare la densità ottica (OD) media dai controlli Mab. Essa rappresenta un valore di inibizione dello 0 %. Le densità ottiche (OD) dei sieri di riferimento vengono espresse in percentuali di inibizione con la seguente formula:

$$\text{Percentuali di inibizione} = 100 - \frac{\text{OD in presenza del siero da esaminare}}{\text{OD in assenza del siero da esaminare}} \times 100$$

Valori di inibizione superiori al 40 %, a una diluizione di siero di 1/4, vengono considerati positivi. La lettura visiva è possibile, dato che una inibizione del 40 % è il valore più basso facilmente apprezzabile dall'occhio.

Preparazione dell'antigene ELISA BTV

1. Lavare 10 «roux» di cellule confluenti BHK-21 tre volte con mezzo di Eagle esente da siero ed infettare con siero tipo 1 del virus della febbre catarrale maligna in mezzo di Eagle esente da siero.

2. Incubare a 37 °C ed esaminare quotidianamente l'effetto citopatico (CPE).

3. Quando il CPE è evidente nell'80-90 % dello strato di cellule di ciascun «roux», raccogliere il virus scuotendo dal recipiente eventuali cellule ancora attaccate.

4. Centrifugare a 2 000-3 000 giri al minuto per agglomerare le cellule.

5. Allontanare il supernatante e risospendere le cellule in circa 30 ml di PBS contenente l'1% di «Sarkosyl» e 2 ml di fenolmetilsufonilfluoruro (tampone di lisi). Se le cellule formano un gen, è possibile aggiungere un'aliquota ulteriore di tampone di lisi per ridurre questo effetto.

   Nota: il fenilmetilsolfonilfluoruro è pericoloso: trattare con estrema cautela.

6. Frantumare le cellule per 60 secondi usando una sonda ultrasonica ad una ampiezza di 30 micron.

7. Centrifugare a 10 000 giri al minuto per 10 minuti.

8. Conservare il supernatante a +4 °C e risospendere l'agglomerato di cellule in 10-20 ml di tampone di lisi.

9. Sottoporre ad ultrasuoni e chiarificare, conservando il supernatante ogni volta, per un totale di tre volte.

10. Raccogliere i supernatanti e centrifugare a 24 000 giri al minuto per 120 minuti a +4 °C sopra uno strato costituito da 5 ml di saccarosio al 40 % (p/v in PBS) usando provette da centrifuga Beckmann da 30 ml ed un rotore SW 28.

11. Eliminare il supernatante, asciugare accuratamente le provette e risospendere l'agglomerato in PBS mediante ultrasuoni. Conservare l'antigene in varie porzioni a −70 °C.

Titolazione dell'antigene ELISA del BTV

L'antigene ELISA per la febbre catarrale maligna viene titolato mediante ELISA indiretto. Diluizioni doppie di antigene vengono titolate rispetto a una diluizione costante (1/50) di anticorpo monoclonale 3-17-A3. Il metodo è il seguente:

1. Diluire l'antigene BTV in PBS, su tutta la piastra di microtitolazione, in una serie di diluizioni doppie (50 µl/pozzetto) usando una pipetta a molti canali.

2. Incubare per un'ora a 37 °C su un agitatore orbitale.

3. Lavare le piastre tre volte con PBS.

4. Aggiungere 50 µl di anticorpo monoclonale 3-17-A3 (diluito a 1/50) in ciascun pozzetto della piastra di microtitolazione.

5. Incubare per un'ora a 37 °C su agitatore orbitare.

6. Lavare tre volte le piastre con PBS.

7. Aggiungere 50 µl di globulina di coniglio anti-topo coniugata con perossidasi di rafano, diluita a una concentrazione ottimale pretitolata, in ciascun pozzetto della piastra di microtitolazione.

8. Incubare per un'ora a 37 °C su agitatore orbitale.

9. Aggiungere substrato e cromogeno come descritto in precedenza. Arrestare la reazione dopo 10 minuti aggiungendo acido solforico 1 molare (50 µl/pozzetto).

Nella prova competitiva l'anticorpo monoclonale deve essere in eccesso, per cui viene scelta una diluizione di antigene tale da ricadere sulla curva di titolazione (non sulla zona piatta) e da dare approssimativamente una densità ottica di 0,8 dopo 10 minuti.

B. La reazione di immunodiffusione su gel di agar viene effettuata secondo il seguente metodo:

Antigene

L'antigene precipitante viene preparato in un sistema di coltura cellulare capace di sostenere la moltiplicazione rapida di un ceppo di riferimento del virus della malattia emorragica epizootica. Si raccomandano le cellule BHK oppure Vero. L'antigene è presente nel fluido supernatante alla fine dello sviluppo del virus, ma per essere efficace deve essere concentrato da 50 a 100 volte. Tale concentrazione può essere ottenuta con qualsiasi metodo normalmente applicabile alle proteine; il virus dell'antigene può essere inattivato mediante aggiunta di beta-propiolattone allo 0,3 % (v/v).

Siero positivo di riferimento

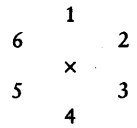
Impiegando il siero e l'antigene di riferimento internazionali si produce un siero standard nazionale. Questo viene standardizzato per ricavare le proporzioni ottimali rispetto al siero di riferimento internazionale, liofilizzato e usato in ciascuna prova come siero di riferimento positivo.

Siero da esaminare

Procedimento

Versare agarosio all'1 %, preparato in tampone al borato o al sodio barbital, a pH 8,5-9,0, in una scatola di Petri in modo da ottenere uno spessore minimo di 3,0 mm di agarosio.

Praticare nell'agar 7 pozzetti esenti da umidità, ciascuno avente 5,0 mm di diametro. Di questi pozzetti uno deve trovarsi in centro e gli altri sei devono essere sistemati attorno ad esso in un circolo avente un raggio di 3 mm.



Riempire il pozzetto centrale con l'antigene standard. Riempire i pozzetti periferici 2, 4 e 6 con siero positivo di riferimento, ed i pozzetti 1, 3 e 5 con i sieri da esaminare.

Porre in incubazione per 72 ore a temperatura ambiente in camera chiusa ed umida.

Interpretazione

Il siero in esame è positivo se forma una linea specifica di precipitina con l'antigene e una linea completa di identificazione col siero di riferimento. Un siero in esame è negativo se non forma una linea specifica con l'antigene e se non fa incurvare la linea del siero di riferimento. Le scatole di Petri devono essere esaminate in illuminazione indiretta contro sfondo scuro.

5. *Malattia emorragica epizootica*

La prova di immunodiffusione su gel di agar viene effettuata secondo la seguente metodica:

Antigene

L'antigene precipitante viene preparato in un sistema di coltura cellulare capace di sostenere la moltiplicazione rapida del (dei) sierotipo(i) opportuno(i) del virus della malattia emorragica epizootica. Si raccomandano le cellule BHK oppure Vero. L'antigene è presente nel fluido supernatante alla fine dello sviluppo del virus, ma per essere efficace deve essere concentrato da 50 a 100 volte; tale concentrazione può essere ottenuta con qualsiasi metodo normalmente applicabile alle proteine; il virus dell'antigene può essere inattivato per aggiunta di beta-propiolattone allo 0,3 % (v/v).

Siero positivo di riferimento

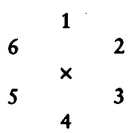
Impiegando il siero e l'antigene di riferimento internazionali si produce un siero standard nazionale. Questo viene standardizzato per ricavare le proporzioni ottimali rispetto al siero di riferimento internazionale, liofilizzato e usato in ciascuna prova come siero di riferimento positivo.

Siero da esaminare

Procedimento

Versare agarosio all'1 %, preparato in tampone al borato o al sodio barbital, a pH 8,5-9,0, in una scatola di Petri in modo da ottenere uno spessore minimo di 3,0 mm di agarosio.

Praticare nell'agar 7 pozzetti esenti da umidità, ciascuno avente 5,0 mm di diametro. Di questi pozzetti uno deve trovarsi in centro e gli altri sei devono essere sistemati attorno ad esso in un circolo avente un raggio di 3 mm.



Riempire il pozzetto centrale con l'antigene standard. Riempire i pozzetti periferici 2, 4 e 6 con siero positivo di riferimento ed i pozzetti 1, 3 e 5 con i sieri da esaminare.

Porre in incubazione per 72 ore a temperatura ambiente in camera chiusa ed umida.

Interpretazione

Il siero in esame è positivo se forma una linea specifica di precipitina con l'antigene e una linea completa di identificazione col siero di riferimento. Un siero in esame è negativo se non forma una linea specifica con l'antigene e se non fa incurvare la linea del siero di riferimento. La scatole di Petri devono essere esaminate in illuminazione indiretta contro sfondo scuro.

6. *Leptospirosi*

La prova di agglutinazione microscopica dev'essere effettuata secondo la seguente procedura:

Colture

Mantenere in terreni Korthof o EMJH a 30 °C.

Antigene

Deve contenere 2 × 10^8 microrganismi per ml di terreno di coltura.

Procedura

Mescolare quantità eguali di antigene e di siero in piastre da microtitolazione a fondo piatto ed incubare a 30 °C per 2 ore, ovvero a 37 °C per 1 ora - 1 ora e mezza. Leggere i risultati in luce attenuata su campo scuro, impiegando un ingrandimento compreso fra 60 e 100.

Interpretazione

Un'agglutinazione inferiore al 50 %, alla diluizione di 1/50, è considerata risultato negativo.

7. *Rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva*

La prova di sieroneutralizzazione dev'essere effettuata secondo la seguente procedura:

Siero

Prima dell'impiego tutti i sieri devono essere inattivati termicamente a 56 °C per 30 minuti.

Procedura

La prova di sieroneutralizzazione a virus costante e siero variabile dev'essere effettuata su piastre da microtitolazione impiegando cellule MDBK o altre cellule recettive. Il ceppo di riferimento del virus (Colorado, Oxford od altro) dev'essere impiegato a 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml; i campioni di siero, inattivati e non diluiti, devono essere mescolati con un volume uguale (0,025 ml) di sospensione di virus. Prima di aggiungere le cellule MDBK, le miscele virus/siero devono essere poste in incubazione per 2 ore a 37 °C nelle piastre per microtitolazione. Le cellule devono essere impiegate a una concentrazione capace di formare un monostrato completo dopo 24 ore.

Controlli

Prova di infettività del virus
Controlli di tossicità del siero
Controlli su colture di cellule non inoculate
Antisieri di riferimento.

Interpretazione

I risultati della prova di neutralizzazione e il titolo del virus impiegato per la prova devono essere registrati dopo 3-6 giorni di incubazione a 37 °C. I titoli del siero sono considerati negativi qualora non si abbia neutralizzazione alla diluizione 1/2 (siero non diluito).

8. *Dissenteria virale bovina (BVD)*

A. La prova di isolamento del virus dev'essere effettuata con la seguente procedura:

Materiale per la prova e metodi di rilevamento

Si fa uso di sospensioni di siero, di «buffy coat» o di coaguli di sangue non inattivato dal calore, prelevati di recente da capi di bestiame di età superiore ai sei mesi. Viene usata una procedura di colorazione immunologica, quale la tecnica degli anticorpi fluorescenti (FA) oppure una prova dell'anticorpo a collegamento con un enzima, quale ad esempio l'immunoperossidasi (IPX), per individuare il virus del BVD nelle colture inoculate.

Reattivi di prova

Per la prova FA è necessario un antisiero specifico del BVD. Per il test IPX sono necessari un coniugato specifico anti BVD di origine bovina, un antisiero antibovino coniugato con perossidasi e un opportuno substrato enzimatico (quale il 3-amino-9-etilcarbazone). Può essere usato un siero anti BVD prelevato da una specie diversa da quella bovina, a condizione che il coniugato con perossidasi sia diretto contro sieroglobuline di quella specie. Tutti i sieri antivirali usati devono essere di specificità comprovata ed avere un'ampia reattività.

Procedura

Nella prova vengono usate cellule recettive, quali quelle dei turbinati di bovini, del rene o del testicolo di vitello esente da virus endogeno del BVD.

Campioni di siero: il siero da analizzare e le cellule di coltura tissulare vengono sistemati in colture su vetrino oppure in pozzetti di piastre da microtitolazione od altri contenitori in modo che la diluizione finale del siero sia del 10 %.

«Buffy coat» e coaguli di sangue: i campioni vengono aggiunti a colture monostrato di cellule congluenti per 1 ora a 37 °C, poi le colture vengono lavate e spalmate di mezzo di coltura contenente siero di feto di vitello al 10 % esente da BVD.

Le colture vengono quindi incubate a 37 °C, fissate e colorate con metodi FA oppure IPX.

Controlli

Controllo positivo del virus BVD
Controllo negativo senza aggiunta di virus

Interpretazione

La prova FA viene colorata dopo una incubazione di 4-6 giorni e letta alla luce ultravioletta. La fluorescenza nelle cellule incubate col campione da analizzare viene interpretata come un risultato positivo.

La prova IPX viene colorata dopo incubazione di 4 giorni e letta al microscopio ottico. La colorazione marrone scura nel citoplasma di alcune delle cellule viene interpretata come risultato positivo.

B. La prova di sieroneutralizzazione dev'essere effettuata secondo la seguente procedura:

Siero

Prima dell'impiego tutti i sieri devono essere inattivati termicamente a 56 °C per 30 minuti.

Procedura

La prova di sieroneutralizzazione a virus costante e siero variabile su piastre di microtitolazione ricorre ad adeguate cellule bovine recettive propagate in serie (ad esempio cellule dei turbinati di bovini come quelle descritte da McClurkin ed altri, 1974, *Arch. Ges. Virusforsch.*, 45, pag. 285-289).

È essenziale che tutti i reagenti e le cellule non siano contaminati da virus avventizio non citopatico DVB/MD.

Il virus per la prova, che può essere qualsiasi ceppo citopatico di riferimento adeguato (come ad esempio il ceppo NADL), è impiegato ad una concentrazione di 100 dosi mediante infettive di coltura cellulare per 0,025 ml. Le diluizioni di sieri inattivati devono essere mescolate con volumi uguali di sospensione di virus (0,025 ml) e le miscele virus-siero devono essere poste in incubazione per 1 ora a 37 °C prima che vengano aggiunti uguali volumi di sospensione cellulare. Le cellule devono essere impiegate ad una concentrazione capace di formare un monostrato completo entro 2 giorni.

Controlli

I controlli devono comprendere:

Prova di infettività del virus
Controlli di tossicità del siero
Controlli su colture di cellule non inoculate
Antisieri di riferimento.

Interpretazione

Con il ceppo NADL, il tempo ottimale di lettura è dopo cinque giorni di incubazione a 37 °C. Un titolo di neutralizzazione mediano di 1/10 è considerato indicativo di un responso immunitario ad una infezione acuta avuta in passato.

9. *Analisi del latte per la ricerca delle malattie*

L'analisi del latte deve essere effettuata secondo l'allegato D della direttiva 64/432/CEE.

10. *Afta epizootica (FMD)*

A. Il prelievo di campioni esofagei/faringei e la prova devono essere effettuati secondo la seguente metodica:

Reagenti

Prima della campionatura si prepara il mezzo di trasporto. Volumi di 2 ml vengono versati in un numero di contenitori corrispondente a quello degli animali da campionare. I contenitori che vengono usati debbono resistere al congelamento in CO_2 solida o in azoto liquido.

I campioni vengono ottenuti usando un apposito raccoglitore (tazza) di espettorato o «probang».

Per ottenere un campione la tazza probang viene fatta passare attraverso la bocca, sopra il dorso della lingua e giù nella parte superiore dell'esofago. Si cerca di grattare l'epitelio superficiale dell'esofago superiore e la faringe facendo movimenti orientati lateralmente e dorsalmente. Si ritira quindi il probang, di preferenza dopo che l'animale ha deglutito. La tazza dovrà essere piena di una miscela di muco, saliva, liquido esofageo e residui cellulari. Sarà necessario assicurarsi che ciascun esemplare contenga del materiale cellulare visibile. Dovrà essere evitata una manipolazione molto maldestra che possa causare emorragie.

I campioni prelevati da alcuni animali potrebbero essere fortemente frammisti a contenuto del rumine. Siffatti campioni dovranno essere scartati e la bocca dell'animale sciacquata con acqua o preferibilmente con soluzione fisiologica, prima di ripetere il prelievo.

Trattamento dei campioni

Ciascun campione prelevato nella tazza probang subisce un esame qualitativo, vi si aggiungono 2 ml di un volume equivalente di mezzo di trasporto in un contenitore resistente al congelamento. I contenitori vengono chiusi ermeticamente, sigillati, disinfettati ed etichettati. I campioni vengono tenuti al fresco (+4 °C) ed esaminati entro 3-4 ore o conservati in ghiaccio secco (– 69 °C) o idrogeno liquido e mantenuti congelati fino al momento dell'esame.

Tra un animale e l'altro il probang viene disinfettato e lavato con tre porzioni di acqua pulita.

Ricerca del virus FMD

I campioni vengono inoculati in colture di cellule primarie di tiroide bovina usando almeno 3 provette per campione. È possibile usare altre cellule recettive, ad esempio cellule primarie del rene di animali della specie bovina o suina, ma è necessario tener presente che per alcuni ceppi di virus FMD esse sono meno sensibili. Le provette vengono incubate a 37 °C in un apparecchio rotante ed esaminate quotidianamente per 48 ore per individuare l'eventuale presenza di un effetto citopatico (CPE). In caso negativo, le colture vengono fatte passare alla cieca su nuove colture e riesaminate per 48 ore. La specificità di qualsiasi CPE deve essere confermata.

Mezzi di trasporto raccomandati

1. Tampone fosfato 0,08 M a pH 7,2, contenente lo 0,01 % di sieroalbumina bovina, lo 0,002 % di rosso fenolo ed antibiotici.

2. Mezzo di coltura tissulare (ad esempio MEM di Eagle) contenente tampone HEPES 0,04 M, lo 0,01 % di sieroalbumina bovina ed antibiotici, pH 7,2.

Gli antibiotici che devono essere aggiunti al mezzo di trasporto (per ml finale) possono essere, ad esempio, i seguenti:

penicillina	1000 Uµl
solfato di neomicina	100 Uµl
solfato di polimixina B	50 Uµl
micostatina	100 Uµl

B. La prova di neutralizzazione del virus deve essere effettuata secondo la seguente procedura:

Reagenti

L'antigene FMDV di riserva deve essere preparato in colture cellulari oppure su lingue di bestiame e conservato a una temperatura non superiore a – 70 °C oppure a – 20 °C previa aggiunta di glicerolo al 50 %. Questo è l'antigene di riserva. In queste condizioni l'FMDV è stabile e il titolo varia molto poco per parecchi mesi.

Procedura:

La prova viene effettuata in piastre da microtitolazione a fondo piatto, di qualità idonea alla coltura di tessuti facendo uso di cellule recettive quali le IB-RS-2, le BHK-21 o cellule di rene di vitello.

I sieri destinati alla prova vengono diluiti a 1/4 in mezzo di coltura cellulare esente da siero con l'aggiunta di 100 µl di neomicina o altro antibiotico idoneo. I sieri vengono inattivati a 56 °C per 30 minuti e vengono usati quantitativi di 0,05 ml per preparare una duplice serie di piastre da microtitolazione facendo uso di anse di diluizione da 0,05 ml. A ciascun pozzetto viene quindi aggiunto virus pretitolato diluito in mezzo di coltura, esente da siero e contenente 100 $TCID_{50}$/0,05 ml. A seguito di incubazione a 37 °C per 1 ora, onde favorire la neutralizzazione, a ciascun pozzetto vengono aggiunti 0,05 ml di cellule di sospensione contenenti 0,5-1,0 × 10^6 cellule per 1 ml in mezzo di coltura cellulare contenente siero esente da anticorpo di FMD; le piastre vengono sigillate.

Le piastre vengono incubate a 37 °C. I monostrati sono, di norma, confluenti entro 24 ore. Di solito il CPE è sufficientemente avanzato a 48 ore per una lettura *microscopica* della prova. A questo punto è possibile eseguire una lettura *microscopica* finale, oppure le piastre possono essere fissate e colorate per la lettura *macroscopica*, ad esempio facendo uso di soluzione fisiologica contenente il 10 % di formolo e di blu di metilene allo 0,05 %.

Controlli

In ciascuna prova i controlli comprendono antisiero omologo a titolo noto, un controllo cellulare, un controllo di sierotossicità, un controllo del mezzo e una titolazione del virus dal quale viene calcolato il quantitativo effettivo di virus nella prova.

Interpretazione

I pozzetti con prove evidenti di CPE vengono considerati infetti e i titoli di neutralizzazione vengono espressi come reciproco della diluizione finale del siero presente nelle miscele siero/virus al 50 % del punto finale valutato col metodo di Spearman-Karber. (Karber, G., 1931, *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162, pag. 480).

Le prove vengono considerate valide se il quantitativo effettivo di virus usato per pozzetto è compreso tra $10^{1,5}$ e $10^{2,5}$ di $TCID_{50}$ e se il titolo del siero di riferimento non supera il doppio di quello previsto, desunto dalle titolazioni precedenti. Se i controlli sono al di fuori di questi limiti, le prove vengono ripetute.

Se il punto finale della titolazione è pari o inferiore a 1/11, esso viene considerato negativo.

C. L'individuazione e quantificazione dell'anticorpo col sistema ELISA deve essere effettuata con la seguente metodica:

Reagenti

Antisieri di coniglio per l'antigene 146S di 7 tipi di virus dell'afta epizootica (FMDV) usati a una concentrazione ottimale predeterminata in tampone carbonato/bicarbonato, a pH 9,6.

Gli antigeni vengono preparati da ceppi selezionati di virus coltivati su monostrati di cellule BHK-21. I supernatanti non purificati vengono usati e pretitolati secondo il metodo, ma senza siero, in modo da ottenere una diluizione che, dopo l'aggiunta di un volume eguale di PBST (soluzione salina tamponata con fosfato contenente lo 0,05 % di Tween-20 e indicatore rosso fenolo), darebbe una lettura di densità ottica compresa tra 1,2 e 1,5. I virus possono essere usati inattivati. Il PBST viene usato come diluente. Gli antisieri di porcellini d'India vengono preparati inoculando a porcellini d'India l'antigene 146S di ciascun sierotipo. Una concentrazione ottimale predeterminata viene preparata nel PBST contenente siero bovino normale al 10 % e siero di coniglio normale al 5 %.

L'immunoglobulina coniglio anti porcellino d'India coniugata a perossidasi di rafano viene usata a una concentrazione ottimale predeterminata in PBST contenente siero bovino normale al 10 % e siero di coniglio normale al 5 %.

I sieri da esaminare vengono diluiti in PBST.

Procedura

1. Le piastre di ELISA vengono coperte con 50 µl di sieri antivirali di coniglio, per una notte, in una camera umida, a temperatura ambiente.

2. 50 microlitri di una doppia serie, ripetuta 2 volte, di ciascun siero da analizzare cominciando da 1/4 vengono preparati in piastre a pozzetti multipli aventi il fondo a U (piastre trasportatrici). 50 microlitri di una dose costante di antigene vengono aggiunti a ciascun pozzetto e le miscele vengono lasciate per tutta la notte a 4 °C. L'aggiunta di antigene riduce la diluzione del siero iniziale a 1/8.

3. Le piastre ELISA vengono lavate 5 volte con PBST.

4. 50 microlitri di miscele siero/antigene vengono quindi trasferite dalle piastre trasportatrici alle piastre ELISA coperte di siero di coniglio ed incubate a 37 °C per 1 ora su un agitatore rotante.

5. Dopo il lavaggio, 50 µl, di antisiero di porcellino d'India per l'antigene usato al punto 4 vengono aggiunti a ciascun pozzetto. Le piastre vengono incubate a 37 °C per 1 ora su un agitatore rotante.

6. Le piastre vengono lavate e a ciascun pozzetto vengono aggiunti 50 µl di immunoglobulina coniglio anti porcellino d'India coniugata a perossidasi di rafano. Le piastre vengono incubate a 37 °C per 1 ora in un agitatore rotante.

7. Le piastre vengono lavate e 50 µl di ortofunilendiammina contenenti acqua ossigenata allo 0,05 % (30 %) p/v vengono aggiunti a ciascun pozzetto.

8. La reazione viene arrestata dopo 15 minuti con H_2SO_4 1,25 M.

Le piastre vengono lette spettrofotometricamente a 492 nm su un lettore ELISA connesso con un microcomputer.

Controlli

Per ciascun antigene usato, 40 pozzetti non contengono siero, bensì antigene diluito in PBST.

Una doppia serie, ripetuta 2 volte, di diluizioni di antisiero di riferimento bovino, omologo.

Una doppia serie, ripetuta 2 volte, di siero bovino, negativo.

Interpretazione

I titoli di anticorpi vengono espressi come diluizione finale di siero da analizzare, che danno il 50 % del valore medio della densità ottica registrata nei pozzetti di controllo del virus nei quali il siero da analizzare è assente. I titoli in eccesso di 1/40 vengono considerati positivi.

Riferimenti

Hamblin C., Barnett ITR y Hedger RS (1986), A new enzyme-linked Immunosorbent essays (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus - I. Development and method of ELISA, *Journal of Immunological Methods*, 93, pag. 115-121.11.

CAPITOLO II

Animali della specie suina

1. *Tubercolosi*

L'intradermotubercolinizzazione unica con tubercolina aviare deve essere effettuata secondo l'allegato B della direttiva 64/432/CEE del Consiglio, salvo il fatto che l'inoculazione va praticata nella pelle floscia alla base dell'orecchio.

2. *Brucellosi*

Le prove di sieroagglutinazione e di fissazione del complemento devono essere effettuate secondo l'allegato C, lettere A e B della direttiva 64/432/CEE.

3. *Malattia di Aujeszky*

La prova di sieroneutralizzazione deve essere effettuata secondo la seguente procedura:

Siero

Prima dell'impiego tutti i sieri devono essere inattivati termicamente a 56 °C per 30 minuti.

Procedura

La prova di neutralizzazione a virus costante e siero variabile deve essere effettuata su piastre da microtitolazione facendo uso di sistemi cellulari Vero o altri sistemi cellulari sensibili. Il virus della malattia di Aujeszky deve essere impiegato a 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml; i campioni di siero inattivati e non diluiti devono essere mescolati con un volume eguale (0,025 ml) di sospensione virale. Prima di aggiungere le opportune cellule, le miscele virus/siero devono essere poste in incubazione per 2 ore a 37 °C nelle piastre per microtitolazione. Le cellule devono essere impiegate a una concentrazione capace di formare un monostrato completo dopo 24 ore.

Controlli

Prova di infettività del virus.
Controlli di tossicità del siero.
Controlli su colture di cellule non inoculate.
Altri sieri di riferimento.

Interpretazione

I risultati della prova di neutralizzazione e il titolo del virus impiegato per la prova devono essere registrati dopo 3-7 giorni di incubazione a 37 °C. I sieri con titolo inferiore a 1/2 (sperma non diluito) vengono considerati negativi.

4. *Gastroenterite trasmissibile*

La prova di sieroneutralizzazione deve essere effettuata con la seguente procedura:

Siero

Prima dell'impiego tutti i sieri devono essere inattivati termicamente a 56 °C per 30 minuti.

Procedura

Nella prova di neutralizzazione a virus costante e siero variabile su piastre di microtitolazione si usano cellule A72 (tumore del cane) o altri sistemi cellulari sensibili. Il virus della GET deve essere impiegato a 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml; i campioni di siero inattivato non diluito devono essere mescolati con un volume uguale (0,025 ml) di sospensione di virus. Le miscele virus/siero devono essere incubate per 30-60 minuti a 37 °C nelle piastre di microtitolazione prima che vengano aggiunte le cellule opportune. Le cellule devono essere impiegate a una concentrazione capace di formare un monostrato completo dopo 24 ore. Ogni cellula riceve 0,1 ml di sospensione cellulare.

Controlli

Prova di infettività del virus.
Controlli di tossicità del siero.
Controlli su colture di cellule non inoculate.
Antisieri di riferimento.

Interpretazione

I risultati della prova di neutralizzazione ed il titolo del virus impiegato nella prova devono essere registrati dopo 3-5 giorni di incubazione a 37 °C. I sieri con titoli inferiori a 1/2 (diluizione finale) sono da considerarsi negativi. Se i campioni di siero non diluiti sono tossici per le colture tissulari, essi possono essere diluiti a 1/2 prima di essere usati nella prova. Ciò sarà equivalente a una diluizione finale del siero di 1/4. I titoli di siero inferiori a 1/4 (diluizione finale) vengono considerati negativi in questi casi.

5. *Influenza dei suini*

La prova di emoagglutinazione-inibizione deve essere effettuata secondo la seguente procedura:

Procedura

Le prove vanno effettuate secondo metodi standard (*US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series no. 6).*

Per distruggere inibitori non specifici, i sieri di suino devono essere trattati a 37 °C per una notte con enzima distruttore dei recettori (filtrato di vibrione del colera) e successivamente riscaldati a 56 °C per 30 minuti in modo da distruggere l'attività enzimatica residua, oppure essere trattati a 4 °C per una notte con caolino al 25 % (Clark and Casals, 1958, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 7, pag. 561).

Dopo assorbimento con una sospensione al 10 % di eritrociti di pollo (1 ora a 37 °C), i sieri devono essere controllati facendo riferimento a 4 unità emoagglutinanti del virus opportuno, impiegando eritrociti di pollo all'1 %. Prima di aggiungere gli eritrociti, il virus e il siero devono essere mantenuti a contatto per 60 minuti a temperatura ambiente.

Interpretazione

I titoli pari a 1/10 o superiori vengono considerati positivi.

6. *Afta epizootica*

Le prove per l'afta epizootica negli animali della specie suina devono essere effettuate conformemente alle procedure di cui al capitolo I, punto 10.

7. *Malattia vescicolosa dei suini*

La prova di sieroneutralizzazione deve essere effettuata secondo la seguente procedura:

Siero

Prima dell'impiego tutti i sieri devono essere inattivati termicamente a 56 °C per 30 minuti.

Procedura

Nella prova di sieroneutralizzazione a virus costante e siero variabile su piastre di microtitolazione si usano cellule IB-RS-2 o altri sistemi cellulari sensibili. L'UKG 27/72 o qualsiasi altro ceppo di riferimento del virus viene usato a 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml. I sieri per la prova vengono diluiti a 1/4 ed inattivati e viene preparata una doppia serie di diluizioni, ripetuta due volte. I campioni di siero vengono mescolati con un volume eguale di sospensioni di virus ed incubati per 1 ora a 37 °C nelle piastre di microtitolazione prima di aggiungere 0,025 ml di sospensione cellulare contenente 3×10^6 cellule/ml.

Controlli

Prova di infettività del virus.
Controlli di tossicità del siero.
Controlli su colture di cellule non inoculate.
Antisieri di riferimento.

Interpretazione

I risultati della prova di neutralizzazione e il titolo del virus impiegato per la prova devono essere registrati dopo 3 giorni di incubazione a 37 °C. I titoli di siero vengono ritenuti negativi se non vi è neutralizzazione a una diluizione di 1/11.

8. *Peste suina classica*

Le prove per la peste suina classica vengono effettuate secondo l'allegato I della direttiva 80/217/CEE del Consiglio (1).

9. *Leptospirosi*

Le prove per la leptospirosi negli animali della specie suina vengono effettuate conformemente al capitolo I, punto 6 del presente allegato.

---

(1) GU n. L 47 del 21. 2. 1980, pag. 11.

ALLEGATO II

CONDIZIONI MINIME PER L'APPROVAZIONE DEI MERCATI DI ANIMALI DELLE SPECIE BOVINA E SUINA DESTINATI ALL'ESPORTAZIONE VERSO LA COMUNITÀ EUROPEA

1. I mercati devono essere sottoposti alla supervisione di un veterinario ufficiale.

2. Ciascun mercato deve essere situato al centro di un'area del diametro di 20 km nella quale, stando alle risultanze ufficiali, non è stato rilevato nessun caso di afta epizootica almeno nei 30 giorni precedenti l'utilizzazione del mercato e, qualora quest'ultimo sia stato approvato per il commercio di suini, nessun caso di peste suina, di stomatite vescicolare dei suini o di encefalomielite infettiva dei suini (morbo di Teschen).

3. Prima della sua utilizzazione, il mercato deve essere pulito e disinfettato con un disinfettante ufficialmente autorizzato nel paese esportatore, di comprovata efficacia ai fini della lotta contro le malattie menzionate al punto 2.

4. I punti di raccolta, di carico e scarico ed altri luoghi di passaggio dei bovini o dei suini destinati all'esportazione verso la Comunità europea devono rispondere ai requisiti di cui ai punti 1, 2 e 3 del presente allegato.

5. Tutti i capi bovini o suini che passano per i mercati approvati devono ottemperare alle norme sanitarie stabilite per l'importazione della relativa categoria di animali nella Comunità europea.

6. Gli animali destinati all'esportazione verso la Comunità europea, che passano per un mercato approvato, devono essere caricati e trasportati direttamente alla frontiera del paese esportatore entro 6 giorni:

   (a) senza venire a contatto con animali fissipedi diversi dai bovini o suini rispondenti ai requisiti sanitari prescritti per l'importazione della relativa categoria di animali nella Comunità europea;

   (b) separati in lotti, in modo tale che gli animali da riproduzione o da ingrasso non si trovino insieme agli animali da macello in uno stesso lotto;

   (c) in veicoli o container previamente puliti e disinfettati con un disinfettante ufficialmente autorizzato nel paese esportatore, di comprovata efficacia ai fini della lotta contro le malattie menzionate al punto 2, e costruiti in modo tale che le feci, l'urina, lo strame o il foraggio non possano fuoriuscirne durante il trasporto.

7. Qualora le condizioni per l'esportazione di animali verso la Comunità prescrivano l'espletamento di un controllo entro un determinato periodo di tempo precedente la spedizione, tale periodo comprenderà la sosta degli animali successiva al loro passaggio per un mercato approvato, fino ad un massimo di 6 giorni.

8. Il paese esportatore designa i mercati approvati per animali da riproduzione e da ingrasso e quelli per animali da macello e notifica alla Commissione e alle competenti autorità nazionali i nomi e gli indirizzi di tali mercati.

9. Il paese esportatore determina le procedure per la supervisione ufficiale dei mercati, delle aree di sosta e dei punti di carico e scarico e garantisce l'effettivo espletamento di tale supervisione.

10. Il paese esportatore provvede affinché le indicazioni relative ai mercati e alle aree di sosta siano riportate nella parte pertinente del certificato sanitario che accompagna gli animali esportati verso la Comunità europea.