

REGULAMENTO (CE) N.º 1226/2002 DA COMISSÃO
de 8 de Julho de 2002
que altera o anexo B da Directiva 64/432/CEE do Conselho

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 64/432/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1964, relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais das espécies bovina e suína ⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 535/2002 da Comissão ⁽²⁾, e, nomeadamente, o n.º 1, segundo parágrafo, do seu artigo 16.º,

Considerando o seguinte:

- (1) Em 11 de Outubro de 1999, o Comité Científico da Saúde e do Bem-Estar dos Animais adoptou um relatório ⁽³⁾ relativo à alteração dos anexos técnicos da Directiva 64/432/CEE, a fim de ter em conta o progresso científico no que respeita à tuberculose, à brucelose e à leucose bovina enzoótica.
- (2) De acordo com esse relatório, os testes da tuberculose devem estar em conformidade com a terceira edição (de 1996) do *Manual de normas aplicáveis aos testes para diagnóstico e às vacinas*, do Gabinete Internacional de Epizootias (OIE).
- (3) Em Agosto de 2001, o OIE publicou a quarta edição (de 2000) do referido manual, que inclui certas alterações na descrição dos testes da tuberculose.

- (4) Em Janeiro de 2002, a Direcção Europeia de Qualidade dos Medicamentos publicou a quarta edição (de 2002) da Farmacopeia Europeia, incluindo as monografias 0535 e 0536 sobre o derivado proteico purificado da tuberculina aviária e bovina.
- (5) É necessário, por conseguinte, alterar o anexo B da Directiva 64/432/CEE, por forma a estabelecer métodos de diagnóstico aplicáveis na Comunidade para fins de vigilância e trocas comerciais que tenham em conta o parecer do Comité Científico Veterinário.
- (6) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O anexo B da Directiva 64/432/CEE é substituído pelo texto do anexo do presente regulamento.

Artigo 2.º

O presente regulamento entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 8 de Julho de 2002.

Pela Comissão

David BYRNE

Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO L 121 de 29.7.1964, p. 1977/64.

⁽²⁾ JO L 80 de 23.3.2002, p. 22.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

ANEXO

«ANEXO B

TUBERCULOSE

1. IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE

A presença de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agente da tuberculose bovina, em amostras clínicas ou *post mortem* pode ser demonstrada pela observação de esfregaços corados ou por técnicas de imunoperoxidase, e confirmada por cultura do organismo num meio de isolamento primário.

O material anatomopatológico para confirmação da presença de *M. bovis* deve ser colhido em gânglios linfáticos anormais e em órgãos parenquimatosos tais como os pulmões, o fígado, o baço, etc. Caso o animal não apresente lesões patológicas, dever-se-ão colher para observação e cultura amostras dos gânglios linfáticos retrofaringeos, brônquicos, mediastínicos, supramamários e mandibulares, e de alguns gânglios linfáticos mesentéricos, bem como do fígado.

A identificação de isolados pode ser feita geralmente por determinação das propriedades culturais e bioquímicas. A polimerização em cadeia (PCR) também pode ser utilizada na detecção do complexo *M. tuberculosis*. As técnicas de análise do ADN podem revelar-se mais rápidas e fiáveis que os métodos bioquímicos, para distinguir a *M. bovis* de outros membros do complexo *M. tuberculosis*. A identificação genética permite distinguir entre diversas estirpes de *M. bovis* e tornará possível a descrição de padrões de origem, transmissão e disseminação de *M. bovis*.

A técnica e meios utilizados, a sua normalização e a interpretação dos resultados devem ser conformes às especificações do capítulo 2.3.3 (tuberculose bovina) da quarta edição (de 2000) do *Manual de normas aplicáveis aos testes para diagnóstico e às vacinas*, do OIE.

2. PROVA CUTÂNEA DE TUBERCULINA

Em provas cutâneas de tuberculina oficiais utilizar-se-ão, de acordo com o método referido no ponto 2.2, derivados proteicos purificados ("Purified Protein Derivatives, PPD") da tuberculina conformes às normas estabelecidas no ponto 2.1.

2.1. Normas relativas à tuberculina (bovina e aviária)

2.1.1. Definição

O derivado proteico purificado da tuberculina (tuberculina PPD, bovina e aviária) é um preparado obtido a partir dos produtos do crescimento e lise de *Mycobacterium bovis* ou de *Mycobacterium avium*, conforme o caso, tratados termicamente, capazes de revelar uma hipersensibilidade retardada num animal sensibilizado a microrganismos da mesma espécie.

2.1.2. Produção

É obtido a partir das fracções hidrossolúveis preparadas por aquecimento em vapor livre e posterior filtração de culturas de *M. bovis* ou de *M. avium* (conforme o caso) em meio sintético líquido. A fracção activa do filtrado, constituída principalmente por proteína, é isolada por precipitação, lavada e de novo dissolvida. Pode ser adicionado um conservante antimicrobiano que não dê origem a falsas reacções positivas, tal como o fenol. O preparado final estéril, isento de micobactérias, é depositado assepticamente em recipientes de vidro estéreis e invioláveis, que serão em seguida fechados de forma a impedir contaminações. O preparado pode ser liofilizado.

2.1.3. Identificação do produto

Injectar por via intradérmica uma série progressiva de doses em diferentes sítios, em cobaias albinas convenientemente sensibilizadas, de peso não inferior a 250 g. Após 24 a 28 horas, surgem reacções sob forma de inchaços edematosos com eritema, com ou sem necrose no ponto de injeccção. A extensão e severidade das reacções variam em função da dose. As cobaias não sensibilizadas não apresentam reacção a injeccções semelhantes.

2.1.4. Controlos

2.1.4.1. pH: O pH é de 6,5 a 7,5.

- 2.1.4.2. Fenol: Caso o preparado a examinar contenha fenol, a sua concentração não deverá exceder 5 g/l.
- 2.1.4.3. Efeito de sensibilização: utilizar um grupo de três cobaias que não tenham sido previamente tratadas com qualquer material que venha a interferir com o controlo. Injectar por via intradérmica em cada cobaia, por três vezes e com intervalos de cinco dias, uma dose do preparado a examinar equivalente a 500 UI em 0,1 ml. 15 a 21 dias após a terceira injeção, injectar por via intradérmica a mesma dose (500 UI) nestes animais e num grupo testemunha de três cobaias com a mesma massa, que não tenham recebido previamente injeções de tuberculina. 24 a 28 horas após as últimas injeções, as reacções dos dois grupos não apresentam diferença significativa.
- 2.1.4.4. Toxicidade: utilizar duas cobaias, cada uma com 250 g, no mínimo, que não tenham sido previamente tratadas com qualquer material que venha a interferir com o controlo. Injectar, por via subcutânea, em cada cobaia 0,5 ml do preparado a examinar. Observar os animais durante sete dias. Não ocorrem quaisquer efeitos anormais durante o período de observação.
- 2.1.4.5. Esterilidade: satisfaz o controlo de esterilidade prescrito na monografia sobre vacinas de uso veterinário da quarta edição (de 2002) da Farmacopeia Europeia.

2.1.5. *Actividade*

A actividade do derivado proteico purificado da tuberculina (bovina ou aviária) é determinada por comparação das reacções produzidas em cobaias sensibilizadas por injeção, por via intradérmica, de uma série de diluições do preparado a examinar com as reacções produzidas por concentrações conhecidas de um preparado de referência de derivado proteico purificado da tuberculina (bovina ou aviária, conforme o caso), aferido em unidades internacionais.

Para controlar a actividade, sensibilizar pelo menos nove cobaias albinas, cada uma com um peso de 400 a 600 g, por injeção intramuscular profunda de 0,0001 mg (massa húmida) de *M. bovis* viva da estirpe AN5, suspendidos em 0,5 ml de uma solução de 9 g/l de cloreto de sódio R, para a tuberculina bovina, ou de uma dose adequada de *M. avium* inactivada ou viva, para a tuberculina aviária. Quatro semanas, pelo menos, após a sensibilização das cobaias, raspar-lhes os pêlos dos flancos, numa área suficiente para quatro injeções de cada lado, no máximo. Fazer diluições do preparado a examinar e do preparado de referência em solução-tampão de fosfatos isotónica (pH 6,5-7,5) com 0,005 g/l de polissorbato 80 R. Utilizar pelo menos três doses do preparado de referência e pelo menos três doses do preparado a examinar. Escolher as doses de forma a que o diâmetro das lesões produzidas não seja inferior a 8 mm nem superior a 25 mm. Atribuir de forma aleatória as diluições aos sítios de injeção, segundo o método do quadrado latino. Injectar cada dose por via intradérmica, num volume constante de 0,1 ou 0,2 ml. Medir o diâmetro das lesões após 24 a 28 horas e calcular o resultado do teste utilizando os métodos estatísticos habituais, admitindo que o diâmetro das lesões é directamente proporcional ao logaritmo da concentração das tuberculinas.

O teste só é válido se os limites do intervalo de confiança ($P = 0,95$) não forem, respectivamente, inferior a 50 por cento e superior a 200 por cento da actividade estimada. Para a tuberculina bovina, a actividade estimada não é inferior a 66 por cento, nem superior a 150 por cento, da actividade declarada. Para a tuberculina aviária, a actividade estimada não é inferior a 75 por cento, nem superior a 133 por cento, da actividade declarada. Para ambas as tuberculinas (bovina e aviária), a actividade declarada não é inferior a 20 000 UI/ml.

2.1.6. *Armazenagem*

Conservar ao abrigo da luz, à temperatura de 5 ± 3 °C.

2.1.7. *Rotulagem*

O rótulo indica:

- a actividade em unidades internacionais por mililitro,
- a denominação e a quantidade de qualquer substância adicionada,
- para os preparados liofilizados:
 - a denominação e o volume do líquido de reconstituição a adicionar,
 - que o produto deve ser utilizado imediatamente após a reconstituição.

2.2. **Métodos para a realização das provas**

2.2.1. Consideram-se provas oficiais de tuberculina:

- a intradermotuberculinação simples: esta prova exige uma única injeção de tuberculina bovina;
- a intradermotuberculinação de comparação: esta prova exige uma só injeção de tuberculina bovina e uma só injeção de tuberculina aviária, administradas simultaneamente.

- 2.2.2. A dose de tuberculina injectada será:
- 2 000 UI, no mínimo, de tuberculina bovina,
 - 2 000 UI, no mínimo, de tuberculina aviária.
- 2.2.3. O volume de cada dose injectada não deverá exceder 0,2 ml.
- 2.2.4. As provas de tuberculina devem ser realizadas por injeção da ou das tuberculinas na pele do pescoço. Os pontos de injeção situar-se-ão no limite entre os terços anterior e médio do pescoço. Caso sejam injectadas no mesmo animal tuberculinas aviária e bovina, o ponto de injeção da tuberculina aviária deve situar-se a cerca de 10 cm da linha superior do pescoço e o ponto de injeção da tuberculina bovina deve situar-se 12,5 cm abaixo, numa linha mais ou menos paralela à linha da espádua, ou em lados diferentes do pescoço; nos animais jovens, em que ainda não seja possível separar suficientemente os pontos de injeção de um dos lados do pescoço, será aplicada uma injeção de cada lado em sítios idênticos, no centro do terço médio do pescoço.
- 2.2.5. A técnica de administração da tuberculina e a interpretação das reacções serão as seguintes:
- 2.2.5.1. Técnica
- Nas zonas de injeção os pêlos devem ser cortados, e a pele limpa. Segura-se uma prega da pele de cada zona em que os pêlos foram cortados, entre o indicador e o polegar, mede-se com uma craveira e anota-se o resultado. Injectar em seguida a dose de tuberculina, por um método que assegure a sua administração por via intradérmica. Poderá ser utilizada uma pequena agulha estéril ligada a uma seringa graduada contendo tuberculina, que se introduzirá obliquamente nas camadas mais profundas da pele com o bordo biselado voltado para o exterior. Uma injeção bem dada provocará, à palpação, um ligeiro inchaço com as dimensões de uma ervilha em cada ponto de injeção. A espessura da prega de pele em cada ponto de injeção voltará a ser medida e registada 72 horas (+/- 4 h) depois da injeção.
- 2.2.5.2. Interpretação das reacções
- A interpretação das reacções basear-se-á na observação clínica e no aumento ou aumentos registados na espessura da prega de pele nos pontos de injeção, 72 horas depois da injeção da ou das tuberculinas.
- a) Reacção negativa: se apenas se observar um inchaço limitado, com um aumento máximo de 2 mm de espessura da prega da pele, sem sinais clínicos tais como edema difuso ou extenso, exsudação, necrose, dor ou reacção inflamatória dos canais linfáticos da região ou dos gânglios;
 - b) Reacção duvidosa: se não se observar nenhum dos sinais clínicos indicados na alínea a), mas o aumento de espessura da prega da pele for superior a 2 mm e inferior a 4 mm;
 - c) Reacção positiva: se se observarem os sinais clínicos indicados na alínea a) ou um aumento de espessura da prega de pele de 4 mm ou mais no sítio da injeção.
- 2.2.5.3. A interpretação das provas oficiais de tuberculina é a seguinte:
- 2.2.5.3.1. Intradermotuberculinação simples:
- a) Positiva: reacção tal como definida na alínea c) do ponto 2.2.5.2;
 - b) Duvidosa: reacção idêntica à definida na alínea b) do ponto 2.2.5.2;
 - c) Negativa: reacção tal como definida na alínea a) do ponto 2.2.5.2.
- Os animais em que a intradermotuberculinação simples tenha dado resultados duvidosos serão submetidos a uma outra tuberculinação passado um prazo mínimo de 42 dias.
- Os animais em que esta segunda prova não dê resultados negativos devem ser considerados como tendo reagido positivamente à prova de tuberculina.
- Os animais com resultados positivos na prova intradérmica simples podem ser submetidos a uma intradermotuberculinação de comparação, caso haja suspeitas de falsas reacções positivas ou de reacções de interferência.
- 2.2.5.3.2. Intradermotuberculinação de comparação para a determinação e manutenção do estatuto de efectivo oficialmente indemne de tuberculose:
- a) Positiva: reacção bovina superior em mais de 4 mm à reacção aviária ou presença de sinais clínicos;
 - b) Duvidosa: reacção bovina positiva ou duvidosa e superior em 1 a 4 mm à reacção aviária, e ausência de sinais clínicos;
 - c) Negativa: reacção bovina negativa ou reacção bovina positiva ou duvidosa mas igual ou inferior a uma reacção aviária positiva ou duvidosa e ausência de sinais clínicos nos dois casos.
- Os animais em que a intradermotuberculinação de comparação tenha dado resultados duvidosos devem ser submetidos a uma outra prova de tuberculina passado um prazo mínimo de 42 dias. Os animais em que esta segunda prova não dê resultados negativos devem ser considerados como tendo reagido positivamente à prova de tuberculina.

- 2.2.5.3.3. O estatuto de efectivo oficialmente indemne de tuberculose pode ser suspenso, ficando os animais do efectivo excluídos do comércio intracomunitário, até estar regularizado o estatuto dos animais seguintes:
- Animais considerados como tendo tido uma reacção duvidosa à prova de tuberculina simples;
 - Animais considerados como tendo reagido positivamente à prova de tuberculina simples mas que devem ser submetidos a uma prova de tuberculina de comparação;
 - Animais considerados como tendo tido uma reacção duvidosa à prova de tuberculina de comparação.
- 2.2.5.3.4. Nos casos em que a legislação comunitária exige que os animais sejam submetidos a uma prova intradérmica antes da sua deslocação, a prova deve ser interpretada de forma a que sejam excluídos do comércio intracomunitário os animais em que o aumento de espessura da prega de pele seja superior a 2 mm, ou em que se verifique a presença de sinais clínicos.
- 2.2.5.3.5. Para permitir a detecção de um número máximo de animais infectados e doentes num efectivo ou região, os Estados-Membros podem alterar os critérios de interpretação da prova de forma a melhorar a sua sensibilidade, considerando como reacções positivas todas as reacções duvidosas referidas na alínea b) do ponto 2.2.5.3.1 e na alínea b) do ponto 2.2.5.3.2.

3. PROVA SUPLEMENTAR

Para permitir a detecção de um número máximo de animais infectados e doentes num efectivo ou região, os Estados-Membros podem autorizar a utilização, além da prova de tuberculina, do ensaio de interferão-gama referido no capítulo 2.3.3 (tuberculose bovina) da quarta edição (de 2000) do *Manual de normas aplicáveis aos testes para diagnóstico e às vacinas*, do OIE.

4. ORGANISMOS OFICIAIS E LABORATÓRIOS NACIONAIS DE REFERÊNCIA

4.1. Tarefas e responsabilidades

Os organismos oficiais e laboratórios de referência constantes do ponto 4.2 serão encarregados do controlo oficial, nos respectivos Estados, das tuberculinas e reagentes indicados nos pontos 2 e 3, a fim de garantir a conformidade de cada um deles com as normas acima referidas.

4.2. Lista dos organismos oficiais e laboratórios nacionais de referência

- Alemanha:
Paul-Ehrlich Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-23207 Langen; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin — Bereich Jena — D-07743 Jena;
- Bélgica:
Institut Scientifique de la Santé Publique — Louis Pasteur, 14 Rue Juliette Wytsman — B 1050 Bruxelles — Belgique;
- França:
Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fougères;
- Grão-Ducado do Luxemburgo:
instituto do país fornecedor;
- Itália:
Istituto superiore di sanità, Roma;
- Países Baixos:
Centraal Instituut voor Dierziekte Controle Lelystad (CIDC-Lelystad), Lelystad;
- Dinamarca:
Danmarks Veterinærinstitut, Bülowsvej 27, DK-1790 København;
- Irlanda:
instituto do país fornecedor;
- Reino Unido:
Veterinary Laboratory Agency, Addlestone, Weybridge;
- Grécia:
Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων, Νεαπόλεως 25, 153 10 Αθήνα

11. Espanha:
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Granada;
 12. Portugal:
Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa;
 13. Áustria:
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling;
 14. Finlândia:
Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos — Forskningsanstalten för veterinärmedicin och livsmedel,
Helsinki;
 15. Suécia:
Statens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala.»
-