

SAN MARINO

Decreto 20 maggio 1996 n. 46

Condizioni di polizia sanitaria in materia di interscambio, fra la Repubblica di San Marino e Paesi della CE, di animali della specie bovina e suina.

Noi Capitani Reggenti

la Serenissima Repubblica di San Marino

Visto il Decreto 2 dicembre 1992 n. 98 che dà esecuzione all'Accordo interinale del commercio e unione doganale del 27 novembre 1992 fra la Repubblica di San Marino e la CEE;

Vista La Legge 17 marzo 1993 n. 41;

Vista la decisione n. 1/94 adottata in data 28 giugno 1994 dal Comitato di Cooperazione San Marino-CEE di cui all'art. 13 dell'Accordo interinale sopra citato;

Visto il Decreto 4 ottobre 1984 n. 87;

Vista la Delibera del Congresso di Stato del 6 maggio 1996 n. 36;

ValendoCi delle Nostre Facoltà;

Decretiamo, promulghiamo e mandiamo a pubblicare:

Art. 1

Il presente Decreto regola l'interscambio degli animali da allevamento, da produzione o da macello, della specie bovina e suina, fra San Marino e i Paesi della CE in attuazione delle disposizioni di cui alla direttiva 64/432/CEE del Consiglio del 26/6/64 e successive modifiche, adottate con la decisione n. 1/94 del Comitato di Cooperazione San Marino-CEE.

Art. 2

Ai sensi del presente Decreto s'intende per:

- a) azienda: il complesso agricolo o la stalla del commerciante ufficialmente controllata, situati nel territorio di S. Marino o di uno Stato CE e nei quali sono tenuti o allevati abitualmente animali da allevamento, da produzione o da macello;
- b) animale da macello: l'animale delle specie bovina comprese le specie Bubalus-bubalus e suina destinato, subito dopo l'arrivo nel Paese destinatario, ad essere condotto direttamente al macello o ad un mercato;
- c) animali da allevamento o da produzione: gli animali delle specie bovina comprese le specie Bubalus -bubalus e suina diversi da quelli menzionati alla lettera b), in particolare quelli destinati all'allevamento, alla produzione di latte, di carne o al lavoro;

- d) allevamento bovino ufficialmente indenne da tubercolosi: l'allevamento bovino che risponde alle condizioni indicate nell'allegato A, punto 6;
- e) allevamento bovino ufficialmente indenne da brucellosi: l'allevamento bovino che risponde alle condizioni indicate nell'allegato B, punto 3;
- f) allevamento bovino indenne da brucellosi: l'allevamento bovino che risponde alle condizioni indicate nell'allegato B, punto 4;
- g) suino indenne da brucellosi: l'animale della specie suina che risponde alle condizioni indicate nell'allegato D, punto 1;
- h) allevamento suino indenne da brucellosi: l'allevamento che risponde alle condizioni indicate nell'allegato D, punto 2;
- i) zona indenne da epizootia: la zona di un diametro di 20 Km, entro la quale, secondo accertamenti ufficiali, non si è avuto da almeno 30 giorni prima del carico:
- i) per gli animali della specie bovina: alcun caso di afta epizootica;
- ii) per gli animali della specie suina: alcun caso di afta epizootica, di malattia vescicolare dei suini o da paralisi suina contagiosa (morbo di Teschen);
- k) malattie soggette a denuncia obbligatoria: le malattie elencate nell'allegato F;
- l) veterinario ufficiale: il veterinario del Servizio Veterinario di Stato;
- m) Paese speditore: lo Stato dal quale gli animali delle specie bovina e suina sono spediti verso un altro Stato;
- n) Paese destinatario: lo Stato a destinazione del quale sono spediti gli animali della specie bovina e suina proveniente da un altro stato;
- o) Regione: Parte del territorio di uno Stato membro, la cui superficie è di almeno 2000 Km². sottoposta ad un controllo da parte delle autorità competenti e comprendente almeno una delle seguenti circoscrizioni amministrative:
- per il Belgio: Province/Province;
 - per la Germania : Regierungsbezirk;
 - per la Danimarca: Amt o isola;
 - per la Francia: Département;
 - per l'Italia: Provincia;
 - per il Lussemburgo:-----;
 - per i Paesi Bassi: RVV.Kring;
 - per il Regno Unito:
 - per l'Inghilterra, il Galles e l'Irlanda del nord: County;

- per la Scozia: District o Island Area;
- per l'Irlanda: County;
- per la Grecia: Nomos;
- per la Spagna: Provincia;
- per il Portogallo continentale: distretto, e per il resto del territorio: regione autonoma;
- per la Repubblica di San Marino: il territorio nella sua totalità.

p) allevamento indenne da leucosi bovina enzootica: un allevamento che soddisfa le condizioni previste all'Allegato c, Punto 3.

Art. 3

1. Ogni Stato vigila affinché vengano spediti dal suo territorio verso il territorio di un altro Stato unicamente animali delle specie bovina e suina che rispondano alle condizioni generali stabilite nel paragrafo 2, tenuto conto, se del caso, delle disposizioni del paragrafo 7, nonché alle condizioni speciali stabilite nei paragrafi da 2 a 6 per alcune categorie di animali delle specie bovina e suina.

2. Gli animali della specie bovina e suina, indicati nel presente Decreto devono:

- a) non presentare segni clinici di malattia il giorno del carico;
- b) non essere stati acquistati in un'azienda oggetto di un divieto per motivi di polizia sanitaria in seguito all'insorgere delle malattie seguenti alle quali gli animali in causa sono ricettivi; afta epizootica o malattia vescicolare dei suini, paralisi contagiosa dei suini, brucellosi bovina, brucellosi suina, carbonchio ematico, restando inteso che:
 - i) se non tutti gli animali delle specie sensibili alla malattia sono stati macellati ed i locali disinfettati, la durata del divieto deve essere, a decorrere dall'ultimo caso constatato, di almeno trenta giorni per l'fta epizootica o malattia vescicolare dei suini, di almeno quaranta giorni la paralisi contagiosa dei suini, di almeno sei settimane per la brucellosi bovina o suina e di almeno quindici giorni per il carbonchio ematico;
- c) nel caso in cui si tratti di animali da allevamento o da produzione, essere stati acquistati in una azienda che risponda ufficialmente alle condizioni seguenti:

I - essere situata al centro di una zona indenne da epizootia;

II - essere indenne da almeno 3 mesi prima del carico, da afta epizootica e da brucellosi bovina per gli animali della specie bovina e inoltre, per gli animali della specie suina, da afta epizootica, da malattia vescicolare dei suini, da brucellosi bovina e suina, e da paralisi contagiosa dei suini (morbo di Teschen);

III - essere indenne da almeno 30 giorni prima del carico da qualsiasi altra malattia contagiosa per la specie animale considerata e soggetta a denuncia obbligatoria;

d) avere soggiornato in un'azienda qual'è definita alla lettera c) durante gli ultimi 30 giorni prima del carico o dopo la loro nascita per gli animali da allevamento e da produzione. Il veterinario ufficiale potrà certificare il soggiorno degli animali nell'azienda negli ultimi 30 giorni prima del carico e dopo la loro nascita, quando si tratti di animali identificati nelle condizioni di cui alla lettera e) e posti sotto controllo di un veterinario ufficiale che consenta di certificare la loro appartenenza all'azienda;

e) essere identificati mediante un contrassegno ufficiale come previsto dal Decreto 20 maggio 1996 n.50;

f) essere avviati direttamente dall'azienda verso il preciso luogo di spedizione:

I - senza entrare in contatto con gli animali biungulati diversi dagli animali delle specie bovina e suina rispondenti alle condizioni previste per gli scambi fra San Marino e i Paesi CE;

II - previa separazione in animali da allevamento o da produzione, da una parte, e animali da macello, dall'altra;

III - con mezzi di trasporto e di contenzione previamente puliti e disinfettati con un disinfettante ufficialmente autorizzato nel Paese speditore;

g) essere caricati per il trasporto, verso il Paese destinatario conformemente alle spedizioni della lettera f), in un punto situato al centro di zona indenne da epizootia; i veicoli da trasporto devono essere costruiti in modo che il letame, lo stame o il foraggio degli animali non possono scolare o cadere fuori dal veicolo durante il trasporto;

h) dopo il carico, essere avviati direttamente ed entro il più breve tempo verso il posto di frontiera del Paese speditore;

i) essere scortati durante il trasporto verso il Paese destinatario da un certificato sanitario rilasciato il giorno del carico almeno nella lingua del Paese destinatario, e la cui validità è di giorni 10;

3) I bovini da allevamento o da produzione devono inoltre:

a) provenire da un allevamento bovino ufficialmente indenne da tubercolosi, e, in particolare quando si tratta di animali di età superiore a 6 settimane aver avuto una reazione negativa a una intradermotubercolizzazione effettuata entro 30 giorni precedenti il carico e praticata conformemente alle disposizioni dell'allegato B;

b) provenire da un allevamento bovino ufficialmente indenne da brucellosi, e in particolare quando si tratta di animali di età superiore a 12 mesi, aver presentato un tasso brucellare inferiore a 30 unità internazionali (UI) agglutinanti per millilitro, alla siero-agglutinazione praticata entro i 30 giorni precedenti il carico e praticata conformemente alle disposizioni dell'allegato B capitolo II punto A;

c) quando si tratta di vacche da latte, non presentare segni clinici di mastite; inoltre, l'analisi del loro latte, praticata conformemente alle disposizioni dell'allegato E, non deve aver rilevato né indizi di uno stato infiammatorio caratteristico, né germi specificatamente patogeni;

d) provenire da un allevamento indenne da leucosi bovina enzootica ai sensi dell'Art. 2, lettera P);

e) oltre al requisito di cui alla lettera d), se sono di età superiore a 12 mesi e qualora provengano da una regione o da uno Stato CE, che non abbia ricevuto la qualifica di indenne da leucosi bovina enzootica, aver reagito negativamente ad un esame individuale effettuato in conformità all'Allegato C Capitolo II, nei 30 giorni precedenti la data del carico.

f) non essere soggetti ai requisiti delle lettere d) ed e), quando si tratta di bovini di età inferiore a 30 mesi destinati alla produzione di carne, i quali:

I -provengono da un allevamento nel quale nessun caso di leucosi bovina enzootica è stato notificato e confermato negli ultimi due anni;

II -siano contrassegnati con uno speciale marchio al momento del carico e restino sotto sorveglianza sino alla macellazione, semprechè lo Stato di destinazione prenda tutte le misure per evitare la contaminazione degli allevamenti locali.

4) I suini da allevamento e da produzione devono inoltre provenire da un allevamento suino indenne da brucellosi. Quando si tratta di suini riproduttori di età superiore a 4 mesi, devono aver presentato, prove effettuate entro 30 giorni precedenti il carico:

I -un tasso brucellare inferiore a 30 unità internazionali agglutinanti per millilitro alla siero-agglutinazione praticata conformemente alle disposizioni dell'Allegato B Capitolo II Punto A;

II -una reazione di fissazione del complemento negativa all'esame sierologico praticato secondo le disposizioni dell'Allegato B.

5 -Gli animali, inoltre, non devono essere animali delle specie bovina o suina da eliminare nell'ambito di un programma di eradicamento delle malattie contagiose applicato da uno Stato membro.

6 -I bovini da macello, purchè siano d'età superiore a 4 mesi, devono inoltre:

a) quando non provengono da un allevamento bovino ufficialmente indenne da tubercolosi, aver avuto una reazione negativa ad una intradermotuberculinizzazione effettuata entro 30 giorni precedenti il carico e praticata conformemente alle disposizioni dell'Allegato A Capitolo II.

b) quando non provengono da un allevamento bovino ufficialmente indenne da brucellosi, nè da un allevamento bovino indenne da brucellosi, aver presentato, alla sieroagglutinazione praticata conformemente alle disposizioni dell'Allegato B Capitolo II Punto A, un tasso brucellare inferiore a 30 unità internazionali agglutinanti per millilitro.

7 -Sono altresì ammessi agli scambi intracomunitari: gli animali da allevamento o da produzione o gli animali da macello acquistati su un mercato ufficialmente autorizzato per la spedizione verso un altro Stato membro, purchè tale mercato risponda alle condizioni seguenti:

a) essere sotto il controllo di un veterinario ufficiale;

b) essere situato al centro di zona indenne da epizootia;

c) dopo la disinfezione, servire solo ad animali da allevamento o da produzione o solo ad animali da macello, che rispondano alle condizioni degli scambi intracomunitari quali sono previste ai paragrafi da 2 a 6, ed all'articolo 4 nella misura in cui tali condizioni siano applicabili alla specie animale considerata. In particolare, tali animali devono essere stati avviati al mercato conformemente alle disposizioni del paragrafo 2, lettera f).

Tuttavia, l'intradermotuberculinizzazione e la sieroagglutinazione prescritte a norma del paragrafo 3, lettere a) e b), non devono necessariamente essere state effettuate prima dell'introduzione sul mercato. Prima di essere avviati al luogo di carico dall'azienda o da un mercato che risponda alle disposizioni del presente paragrafo, gli animali possono conformemente alle disposizioni del paragrafo 2, lettera f), essere condotti in un luogo di raccolta controllato ufficialmente purchè tale luogo risponda alle medesime condizioni fissate per il mercato.

Gli animali acquistati su tali mercati devono essere condotti direttamente dal mercato o dal luogo di raccolta all'esatto luogo di carico conformemente alle disposizioni del paragrafo 2, lettere f) e h), e spediti verso il Paese destinatario.

La durata dell'operazione di raccolta di detti animali fuori dall'azienda d'origine in particolare sul mercato, nel luogo di raccolta o nel luogo preciso di carico deve essere imputata al periodo di 30 giorni previsto dal paragrafo 2, lettera d), senza che il tempo necessario a questa operazione superi 6 giorni.

8 -Il Paese speditore designa i mercati autorizzati di animali da allevamento o da produzione ed i mercati autorizzati di animali da macello, previsti dal paragrafo 7. Esso comunica tali autorizzazioni alle autorità centrali competenti degli altri Stati membri e alla Commissione.

9 -Il Paese speditore determina le modalità secondo le quali deve essere effettuato il controllo ufficiale dei mercati e dei luoghi di raccolta di cui al paragrafo 7, e si accerta dell'applicazione di tale controllo.

10 -Nel caso previsto dal paragrafo 7, occorre apportare le menzioni corrispondenti sui certificati sanitari.

11 -Il paese speditore determina le modalità secondo le quali deve essere effettuato il controllo ufficiale delle stalle dei commercianti e si accerta dell'applicazione di tale controllo.

12 -Qualora l'azienda o la zona in cui essa si trova fossero colpite da misure ufficiali di divieto adottate in seguito all'insorgenza di una malattia contagiosa per la specie animale considerata, i termini indicati nel paragrafo 2, lettera c), sub ii) e iii), e nell'articolo 2, lettera i), hanno effetto a decorrere dalla data in cui sono state ufficialmente abrogate tali misure di divieto.

Art. 4

1 -Tutti gli animali destinati all'interscambio fra San Marino e Paesi CE devono aver soggiornato sul territorio dello Stato speditore prima del giorno del carico:

a) da almeno 6 mesi, se si tratta di animali da allevamento o da produzione;

b) da almeno 3 mesi, se si tratta di animali da macello. Qualora tali animali siano di età inferiore a 6 o rispettivamente 3 mesi, essi devono aver soggiornato nel territorio dello Stato membro speditore dalla nascita.

2 -In tutti i casi previsti dal paragrafo 1 occorre apportare le indicazioni corrispondenti sui certificati.

Art. 5

Per quanto riguarda le garanzie supplementari che possono essere richieste in materia di afta epizootica e di malattia vescicolosa dei suini, si applicano le disposizioni seguenti:

1 -Gli Stati membri indenni da afta epizootica da almeno due anni, che non praticano la vaccinazione da almeno 12 mesi e non ammettono nel proprio territorio la presenza di animali vaccinati da meno di un anno possono subordinare l'introduzione nel rispettivo territorio di animali vivi della specie bovina e suina alle condizioni seguenti:

A) -Qualora gli animali provengano da uno Stato membro che presenta gli stessi requisiti: non essere vaccinati contro l'afta epizootica;

B) -Qualora l'animale provenga da uno Stato membro che negli ultimi dodici mesi abbia praticato la vaccinazione profilattica o abbia effettuato in circostanze eccezionali la vaccinazione d'emergenza nel proprio territorio:

a) non essere stati vaccinati contro l'afta epizootica;

b) per gli animali della specie bovina: essere stati sottoposti ad un esame per la ricerca del virus aftoso con il metodo del raschiamento laringo-faringeo (detto "probang-test"), con esito negativo;

c) per gli animali della specie bovina e suina: essere stati sottoposti a ricerca sierologica per accertare la presenza di anticorpi aftosi con esito negativo;

d) per gli animali della specie bovina e suina: essere stati isolati per 14 giorni, nel Paese speditore, in una azienda o in una stazione di quarantena, sotto la sorveglianza di un veterinario ufficiale. A questo riguardo, nessun animale che si trovi, secondo il caso, nell'azienda d'origine e nella stazione di quarantena può essere stato sottoposto a vaccinazione antiaftosa nel periodo di 21 giorni precedente la spedizione e nessun altro animale, ad eccezione di quelli che formano oggetto della spedizione, deve essere stato introdotto nell'azienda e nella stazione di quarantena in questo stesso periodo;

e) essere stati sottoposti a 21 giorni di quarantena; in questo caso le garanzie precisate possono essere richieste per un periodo di 12 mesi dopo il completamento delle operazioni di vaccinazione di emergenza.

C) -Qualora gli animali provengano da uno Stato membro che non sia indenne da afta epizootica da almeno due anni;

a) alle stesse condizioni menzionate al punto B, fatta eccezione della quarantena nell'azienda d'origine;

2) gli Stati membri che praticano eccezionalmente la vaccinazione di emergenza nella totalità del proprio territorio e che ammettono la presenza nel proprio territorio di animali vaccinati subordinano l'introduzione nel proprio territorio degli animali vivi della specie bovina.

a) qualora gli animali provengano da uno Stato membro che presenta gli stessi requisiti:

I -per i bovini da allevamento o da reddito di età superiore a 4 mesi: essere stati vaccinati 15 giorni al minimo e 4 mesi al massimo prima dell'imbarco contro i tipi A, O e C del virus aftoso per mezzo di un vaccino preparato a partire da virus inattivati, registrato e controllato dall'autorità competente del Paese di spedizione;

II -per i bovini da macello di età superiore a 4 mesi: essere stati vaccinati 15 giorni al minimo e 4 mesi al massimo prima dell'imbarco contro tipi A, O e C del virus aftoso per mezzo di un vaccino preparato a partire da virus inattivi, registrato e controllato dall'autorità competente del Paese di spedizione; la durata di validità della vaccinazione è tuttavia estesa a 12 mesi per i bovini rivaccinati negli Stati membri in cui tali animali siano sottoposti a vaccinazione annuale e vengano sistematicamente abbattuti qualora contraggano l'afta epizootica;

b) -qualora gli animali provengano da uno Stato membro indenne da afta epizootica da almeno due anni, che non pratica la vaccinazione e non ammette nel proprio territorio la presenza di animali vaccinati: non essere stati vaccinati contro l'afta epizootica, senza pregiudizio di un'eventuale vaccinazione contro l'afta epizootica, degli animali prima della loro ammissione nel gregge di destinazione. In questo caso, le garanzie precitate possono essere richieste per un periodo di dodici mesi dopo il completamento delle operazioni di vaccinazione di emergenza.

3) -Gli Stati membri di cui al paragrafo 1 possono inoltre, sottoporre l'introduzione sul loro territorio di animali da allevamento o da reddito della specie suina al risultato negativo della ricerca di anticorpi della malattia vescicolosa dei suini, effettuata nei trenta giorni precedenti la spedizione.

4) -Se gli esami menzionati nel presente articolo vengono effettuati dall'azienda, gli animali destinati alla spedizione devono essere tenuti separati dagli altri animali fino al momento della spedizione stessa.

Art. 6

In aggiunta alle misure previste dal presente Decreto, l'interscambio dei suini è regolato anche dal Decreto 20 maggio 1996 n.49 che stabilisce misure di lotta contro la peste suina classica.

Art. 7

Qualora i vaccini previsti dall'articolo 5, punto 2, non siano fabbricati dall'Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, con sede a Brescia, devono essere acquistati in un altro Stato membro, salvo nel caso in cui nuovi dati scientifici o la mancanza di vaccini considerati fino a quel momento adeguati rendano necessario un acquisto all'esterno della CE.

Art. 8

Gli animali da macello che sono stati condotti, appena arrivati nel Paese di destinazione, direttamente o attraverso un mercato o centro di raccolta riconosciuto, in un macello devono essere macellati il più rapidamente possibile, conformemente ai requisiti della polizia sanitaria.

Art. 9

Per quanto riguarda in particolare la leucosi bovina enzootica, San Marino esige altresì che tutti gli animali dell'allevamento di provenienza, di età superiore a 24 mesi alla data dell'esame, abbiano, nel corso degli ultimi 12 mesi, reagito negativamente ad un esame effettuato conformemente all'allegato C. Tali garanzie non possono però essere richieste per l'introduzione di animali provenienti da uno Stato membro o da una regione indenne da leucosi bovina enzootica.

Art. 10

San Marino può subordinare l'introduzione sul proprio territorio di bovini da allevamento o da produzione destinati ad essere integrati in allevamenti bovini non sospetti di leucosi, alla presentazione di certificato compilato il giorno del carico da un veterinario ufficiale competente redatto in lingua italiana dal quale risulti che:

- a) il predetto veterinario non è stato a conoscenza di fatti da cui si possa desumere l'esistenza di casi di leucosi bovina enzootica nell'allevamento di provenienza negli ultimi tre anni e che il proprietario dell'allevamento ha dichiarato di non essere a conoscenza di tali fatti e ha inoltre dichiarato per iscritto che l'animale o gli animali destinati agli scambi sono nati e cresciuti nell'allevamento stesso o ne hanno fatto parte integrante negli ultimi 12 mesi;
- b) negli ultimi 12 mesi, tutti i bovini di oltre 24 mesi d'età alla data dell'esame, appartenenti all'allevamento di provenienza, hanno reagito negativamente a un esame eseguito conformemente all'allegato C. Sono dispensati da tale esame gli animali provenienti da uno Stato membro, da una regione o da un'azienda indenne da leucosi bovina enzootica.

Art. 11

Qualora il Dirigente del Servizio Igiene Ambientale, ai sensi dell'art. 5 del Decreto 04/10/84 n. 87, predisponga programmi nazionali organici di lotta contro una malattia contagiosa che non figuri nell'allegato E del presente Decreto, è tenuto a sottoporre alla Commissione apposita della CE il programma precisando:

- la situazione della malattia nel suo territorio;

- la giustificazione del programma, data l'entità della malattia e il rapporto costi/benefici previsti;
- la zona geografica in cui il programma sarà applicato;
- i vari statuti applicabili agli stabilimenti e il livello normativo imposto per ciascuna categoria nonché le procedure relative ai test;
- la procedure di controllo del programma;
- le conseguenze da trarre in caso di perdita dello statuto da parte dello stabilimento per qualsiasi motivo;
- le misure da prendere in caso di risultati positivi accertati all'atto di controlli effettuati conformemente alle disposizioni del programma.

Tali programmi possono essere approvati dalla Commissione, che preciserà le eventuali garanzie complementari generali o limitate richieste negli scambi. Le garanzie potranno essere al massimo equivalenti a quelle che il Servizio veterinario prevede nel proprio ambito nazionale.

Art. 12

Qualora il territorio della Repubblica di San Marino sia totalmente indenne da una delle malattie cui sono sensibili i bovini e i suini, presenta alla Commissione apposita della CE , le giustificazioni appropriate precisando:

- la natura della malattia e la cronistoria della sua comparsa sul proprio territorio;
- i risultati dei test di controllo basati su una ricerca sierologica, microbiologica o patologica ed epidemiologica e sul fatto che la malattia deve essere obbligatoriamente dichiarata alle competenti autorità;
- la durata del controllo effettuato;
- eventualmente, il periodo durante il quale è stata vietata la vaccinazione contro la malattia e la zona geografica cui si estende il divieto;
- le norme che consentono di controllare l'assenza della malattia.

La Commissione esamina le giustificazioni comunicate e preciserà le garanzie complementari generali o limitate richieste negli scambi. Tali garanzie devono essere al massimo equivalenti a quelle che il Servizio Veterinario applica nel proprio ambito territoriale.

Art. 13

Chiunque non ottemperi alle disposizioni del presente Decreto incorrerà nella sanzione da £. 50.000 a £. 5.000.000 salvo che il fatto non costituisca piu' grave reato. Per quanto riguarda la non osservanza delle misure obbligatorie stabilite dai piani di profilassi di cui agli allegati A, B, C, si rimanda alle specifiche sanzioni previste nei singoli allegati.

Art. 14

Le disposizioni di cui alle Leggi 26 Febbraio 1971 n. 8, 16 Aprile 1971 n. 16 e l'Ordinanza n. 1 del 1987, non sono piu' applicabili.

Dato dalla Nostra Residenza, addì 20 maggio 1996/1695 d.F.R.

I CAPITANI REGGENTI

Pier Paolo Gasperoni - Pietro Bugli

IL SEGRETARIO DI STATO

PER GLI AFFARI INTERNI

Antonio Lazzaro Volpinari

ALLEGATO A

CAPITOLO I

NORME DI PROFILASSI PER LA TUBERCOLOSI

1. Il risanamento degli allevamenti dalla tubercolosi è obbligatorio per tutto il bestiame bovino esistente sul territorio nazionale.

2. Tutti i bovini di età superiore a 6 settimane sono sottoposti alla intradermotuberculinizzazione, la cui esecuzione e valutazione è affidata al Servizio Veterinario di Stato.

3. Sono considerati infetti di tubercolosi:

a) gli animali che abbiano fornito esito positivo alla prova della tubercolina eseguita con il metodo intradermico;

b) gli animali nei quali, indipendentemente dall'esito della prova allergica, la malattia risulti clinicamente manifesta o sia evidenziata dall'esito positivo delle opportune ricerche di laboratorio.

4. Negli allevamenti in cui vengono rilevate reazioni positive alla prova tubercolinica, tutti gli animali che li compongono devono essere sottoposti all'esame clinico e, all'occorrenza, alle opportune prove di laboratorio al fine di identificare i casi di malattia clinicamente manifesta, nel qual caso il Servizio Veterinario prenderà i seguenti provvedimenti: isolamento e sequestro in separato ricovero o almeno in un idoneo posto della stalla comune fino ad avvenuta macellazione, con divieto di usare abbeveratoi adibiti per altri animali; disinfezione periodica della stalla e particolarmente delle poste occupate dagli animali infetti; divieto di

utilizzare il latte per l'alimentazione umana (questo può essere utilizzato per gli animali dell'allevamento, purché bollito e comunque risanato); divieto di monta.

Ferma restando l'applicazione delle misure più sopra citate nei confronti dei capi con manifestazioni cliniche, tutti i bovini riconosciuti infetti ai sensi del presente Decreto debbono essere separati dagli altri sia nei ricoveri che nei pascoli, abbeverati separatamente e infine esclusi dalla monta.

I vitelli nati da vacche infette debbono essere separati dalle rispettive madri e alimentati con latte o suoi derivati ottenuti da bovine non riconosciute infette ovvero risanati mediante un trattamento termico di sicura efficacia nei confronti del bacillo tubercolare.

Tali norme si applicano anche per gli animali che, pur risultando negativi agli accertamenti di cui al precedente articolo 3, debbano essere ritenuti sospetti in relazione alla diffusione della malattia rilevata nell'allevamento di cui fanno parte.

Gli animali infetti devono essere marcati, all'atto del controllo, in corrispondenza della parte mediana del margine inferiore dell'orecchio (di norma nel destro) con asportazione, a mezzo di apposita tenaglia, di un lembo di padiglione a forma di T iscritto in un quadrato avente il lato di cm.2-3 con l'asta disposta normalmente al margine del padiglione medesimo.

L'esito degli accertamenti viene riportato, per ogni singolo animale, sulla scheda di stalla prevista dall'apposito Decreto.

5. Gli animali riconosciuti infetti ai sensi del presente Decreto, possono essere allontanati dall'allevamento soltanto per essere avviati direttamente al macello. Tuttavia in deroga a quanto stabilito nel precedente comma il Servizio Veterinario può autorizzare per comprovate esigenze, escluso il commercio, il trasferimento degli animali infetti in altre sedi sottoposte a vigilanza veterinaria.

Il periodo di tempo entro il quale tali animali devono essere abbattuti decorre dal giorno della notifica al proprietario o al detentore della constatazione della malattia ed è stabilito in giorni 15 per i soggetti colpiti da tubercolosi clinicamente manifesta o riconosciuti eliminatori di bacilli tubercolari.

CAPITOLO II

Allevamenti riconosciuti ufficialmente indenni da tubercolosi

6. E' riconosciuto ufficialmente indenne da tubercolosi ogni allevamento nel quale:

a) nessun bovino presenta manifestazioni cliniche di tubercolosi;

b) tutti i bovini di età superiore a sei settimane, esclusi quelli destinati alla macellazione come vitelli da latte, hanno reagito negativamente ad almeno due prove tubercoliniche intradermiche eseguite a distanza di tempo non inferiore a sei mesi. Nel caso in cui l'allevamento sia stato sottoposto a risanamento, la prima di tali prove deve essere eseguita quando sono trascorsi almeno sei mesi dalla eliminazione di tutti gli animali infetti;

c) non è stato introdotto alcun bovino senza attestato di un veterinario ufficiale in cui si certifichi che detto animale proviene da un allevamento bovino ufficialmente indenne da tubercolosi e, se è di età superiore a sei settimane, ha avuto una reazione negativa

all'intradermotuberculinizzazione valutata secondo i criteri previsti dal Capitolo IV del presente Allegato.

Negli allevamenti riconosciuti ufficialmente indenni da tubercolosi, il controllo periodico con la prova tubercolinica deve essere effettuato una volta all'anno.

Qualora, in un allevamento bovino ufficialmente indenne da tubercolosi, la reazione di un animale ad una tuberculinizzazione di routine sia considerata positiva o qualora, nello stesso allevamento, sia diagnosticato un caso clinico di tubercolosi nel corso dell'ispezione post-mortem di routine su un animale proveniente da un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi, la qualifica "ufficialmente indenne", deve essere sospesa fintanto che tutti i rimanenti animali, di età superiore alle sei settimane, non avranno reagito negativamente ad almeno due intradermotuberculinizzazioni ufficiali conformemente al presente Allegato, la prima delle quali effettuata almeno due mesi dopo l'eliminazione dell'animale dall'allevamento in questione, e la seconda da almeno 42 giorni di distanza.

CAPITOLO III

Divieto negli allevamenti controllati

7. Negli allevamenti sottoposti al controllo dello Stato per la profilassi della tubercolosi bovina è vietato:

- a) l'uso dei vaccini e di prodotti terapeutici o profilattici antitubercolari, nonché di qualsiasi altro prodotto capace di alterare il risultato della prova allergica;
- b) l'esecuzione di prove tubercoliniche, se non previamente autorizzate dal Servizio Veterinario;
- c) l'uso, per l'alimentazione degli animali, del latte o suoi derivati ottenuti da bovine non ufficialmente indenni da tubercolosi, anche se provenienti da caseifici o latterie, se non previamente risanati;
- d) trasferire animali su pascoli nei quali non sia assicurata la più completa separazione da bovini di allevamento non riconosciuti ufficialmente indenni;
- e) l'impiego di personale di stalla affetto da tubercolosi;
- f) introdurre bovini non scortati da certificati comprovanti che gli animali provengono da allevamenti bovini ufficialmente indenni da tubercolosi e, se sono di età superiore a sei settimane, che hanno fornito esito negativo da almeno una prova della tubercolina.

8. Negli allevamenti indirizzati esclusivamente alla produzione della carne, nei quali non siano presenti capi adibiti alla riproduzione, non si applicano le norme del presente Allegato.

Tuttavia in tali allevamenti è consentita solo l'introduzione di bovini che provengono da allevamenti riconosciuti ufficialmente indenni da tubercolosi, o che non presentano manifestazioni cliniche di tubercolosi e abbiano reagito negativamente ad una prova della tubercolina eseguita da non più di 30 giorni.

La prova della tubercolina, di cui al precedente comma, non è richiesta per l'introduzione di vitelli di età non superiore a sei settimane.

9. I commercianti che intendono fornire bovini agli allevamenti, oltre ad essere muniti di regolare licenza, devono a tale scopo attivare un'apposita stalla completamente isolata nella quale fare affluire soltanto animali che abbiano i requisiti indicati al punto 7, lettera f).

10. L'abbattimento degli animali infetti ai sensi del presente Decreto è obbligatorio e deve essere attuato nei termini stabiliti.

I contravventori alle misure obbligatorie, stabilite dal presente piano di profilassi e di risanamento, sono puniti con l'ammenda da L. 80.000 a L. 400.000.

CAPITOLO IV

NORME PER LA FABBRICAZIONE DELLE TUBERCOLINE BOVINE ED AVIARIE; ISTRUZIONI PER L'ESECUZIONE DELLA INTRADERMOTUBERCOLINIZZAZIONE

1. Le tuberculinizzazioni controllate ufficialmente devono essere effettuate mediante tubercoline PPD o tubercoline preparate sinteticamente o concentrate a caldo ("tubercoline sintetiche").

2. Gli standard di fabbricazione per il controllo delle tubercoline PPD bovine e delle tubercoline cosiddette "sintetiche" devono essere titolati in unità tuberculiniche comunitarie (UTC) mediante prove biologiche secondo le norme CE per la tubercolina standard CE.

3. Gli standard di fabbricazione per il controllo delle tubercoline aviariae devono essere espressi in unità internazionali e titolati per via biologica, secondo lo standard CE della tubercolina PPD aviaria.

4. Lo standard CE per la tubercolina PPD bovina è fornito dal "Centraal Diergeneeskundig Instituut", Afdeling Rotterdam, Paesi Bassi.

5. Lo standard CE per la tubercolina "sintetica" bovina è fornito dall'"Institut Pasteur" di Parigi, Francia.

6. Lo standard CE per la tubercolina aviaria è fornito dal "Central Veterinary Laboratory", Weybridge, Surrey, Regno Unito.

7. Le tubercoline bovine devono essere preparate con uno dei ceppi di *Mycobacterium bovis* indicati qui di seguito:

a)AN5;

b)Vallée.

8. Le tubercoline aviariae devono essere preparate con uno dei ceppi di *Mycobacterium avium* indicati qui di seguito:

a)D4ER;

b)TB56.

9. Il pH delle tubercoline deve essere compreso fra 6,5 e 7,5.

10. Per quanto concerne l'aggiunta alle tubercoline di conservanti antimicrobici o di altre sostanze, deve risultare dimostrato, a giudizio dell'istituto statale responsabile del controllo ufficiale della tebercolina, che tale aggiunta non altera l'innocuità nè l'efficacia del prodotto.

Le concentrazioni massime consentite per il fenolo e la glicerina sono le seguenti:

a) fenolo -- 0,5% M/v,

b) glicerina -- 10% v/v.

11. Superata con esito favorevole l'ultima prova di attività, le tubercoline, conservate a temperature comprese fra 2 °C e 8 °C ed al riparo dalla luce, rimangono valide per tutta la durata dei periodi sotto indicati:

a) tubercoline PPD liquide: due anni,

tubercoline PPD liofilizzate: otto anni;

b) tubercoline "sintetiche" diluite: due anni.

12. Nei rispettivi Paesi, gli istituti statali seguenti sono incaricati del controllo ufficiale delle tubecoline:

a) Germania: Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt/Main;

b) Belgio: Institut d'hygiène et d'épidémiologie, rue J. Wytsman 14, B 1050 Bruxelles;

c) Francia: Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fougères;

d) Granducato del Lussemburgo: Istituto del Paese fornitore;

e) Italia: Istituto Superiore di Sanità, Roma;

f) Paesi Bassi: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;

g) Danimarca: Statens Veterinære Serumlaboratorium, København V;

h) Irlanda: Istituto del Paese fornitore;

i) Regno Unito: The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey;

k) Spagna: Laboratorio de Sanidad y Produccion Animal de Granada;

l) Portogallo: Laboratorio Nacional de InvestigaËcao Veterinaria Lisboa;

j) Grecia:

m) San Marino: Istituto Superiore di Sanità, Roma.

13. Ciascuna partita di tubercoline infialate e pronte per l'uso dev'essere oggetto di un controllo ufficiale.

14. Le tubercoline devono essere controllate con metodi biologici e chimici.

15. Le tubercoline devono essere sterili. Le prove di sterilità devono essere effettuate secondo le norme della farmacopea europea.

16. Le tubercoline devono risultare esenti da proprietà tossiche od irritanti in base a una prova effettuata secondo le norme della farmacopea europea.

17. Le tubercoline devono essere sottoposte a un'analisi chimica per determinare l'esatta concentrazione della glicerina e/o del fenolo, nonché la concentrazione di altri eventuali conservanti.

18. Una prova di non sensibilizzazione alla tubercolina deve essere effettuata secondo le norme della farmacopea europea.

19. L'attività delle tubercoline deve essere valutata con metodi biologici, applicabili alle tubercoline PPD e a quelle "sintetiche" e basati sul confronto delle tubercoline in esame con tubercoline standard.

20. Il contenuto proteico delle tubercoline PPD (tubercoloproteina) si ottiene secondo il metodo di Kjeldahl. Il fattore di conversione dell'azoto in tubercoloproteine è 6,25.

21. Lo standard CE per la tubercolina "sintetica" bovina ha un'attività di 65.000 unità tubercoliniche comunitarie (UTC) provvisorie per ml, e viene distribuito in fiale da 5 ml.

22. Lo standard CE per la tubercolina PPD bovina ha un'attività di 50.000 UTC per mg di PPD, e viene distribuito allo stato liofilizzato in fiale contenenti 1,8 mg di PPD (0,00002 mg di PPD corrispondono cioè ad 1 unità tubercolinica comunitaria di attività).

23. La tubercolina PPD aviaria della norma CE ha un'attività di 50.000 unità internazionali (VI) per mg di derivato proteico purificato essiccato e viene distribuito allo stato liofilizzato in fiale contenenti 10 mg di PPD più 26,3 mg di sali (0,0000726 mg dello standard corrispondono cioè ad 1 unità internazionale di attività).

24. Le tubercoline che i fabbricanti presentano per il controllo agli istituti statali di cui al paragrafo 12 devono essere state oggetto di una prova biologica di attività in paragone con gli opportuni standard elencati ai paragrafi 2 e 3.

25. a) Prove di attività su cavie.

La prova dev'essere effettuata su cavie albine di peso fra 400 e 600 g. Tali cavie devono essere in buona salute al momento dell'inoculazione della tubercolina. Per ciascuna prova vanno impiegate non meno di otto cavie. La prova dev'essere effettuata a non meno di un mese di distanza dalla sensibilizzazione.

aa) Per il controllo delle tubercoline bovine, le cavie devono essere sensibilizzate con uno dei metodi seguenti:

1) iniezione di *Mycobacterium bovis* del ceppo AN5, ucciso col calore, in coadiuvante oleoso;

2) iniezione di *Mycobacterium bovis* del ceppo AN5, vivo in emulsione salina fisiologica;

3) iniezione di vaccino BCG.

bb) Per il controllo delle tubercoline aviarie, le cavie devono essere sensibilizzate mediante inoculazione di 2 mg di micobatteri tubercolari di tipo aviario, uccisi col calore, sospesi in 0,5 ml di paraffina liquida sterile, ovvero mediante inoculazione di micobatteri tubercolari vivi del tipo aviario in emulsione salina fisiologica. Il ceppo da impiegare è quello del tipo aviario D4.

cc) Qualunque tubercolina esaminata dev'essere titolata mediante inoculazione intradermica in paragone con l'opportunità tubercolina standard, impiegando gruppi di cavie opportunamente sensibilizzate.

Le cavie devono essere tostate sui due fianchi. La prova deve essere effettuata confrontando le reazioni indotte da una serie di inoculazioni intracutanee di dosi da 0,2 ml al massimo di diluizioni della tubercolina standard in soluzione salina isotonica tamponata contenente lo 0,0005% di Tween 80, con una corrispondente serie di inoculazioni della tubercolina in esame. Le diluizioni devono essere preparate in serie geometrica ed essere iniettate nelle cavie secondo una distribuzione irregolare in quadrato latino (otto iniezioni, da praticarsi in quattro punti su ciascun lato). Il diametro delle aree di reazione su ciascun lato deve essere misurato e registrato dopo 24-28 ore.

Per ciascun campione di tubercolina sotto prova deve essere effettuata una valutazione dell'attività relativa e dei suoi limiti di affidabilità, basata su metodi statistici, impiegando come metametri i diametri delle aree di reazioni ed i logaritmi delle dosi. L'attività della tubercolina bovina in esame è accettabile se, in base alla valutazione, ogni dose destinata ai bovini risulta contenere 2.000 UTC (= 25%). L'attività di qualunque tubercolina in esame deve essere espressa, secondo i casi, in unità tubercoliniche comunitarie o in UI/ml.

b) Controllo dell'attività sui bovini.

Un controllo dell'attività delle tubercoline bovine può essere effettuato periodicamente su bovini infetti da tubercolosi per via naturale o artificiale. Dette prove di attività, da praticarsi su gruppi di bovini tubercolotici, devono essere effettuate per inoculazione intradermica della tubercolina in esame in 4 o 6 punti, in paragone con l'opportuno standard; l'attività della tubercolina deve essere valutata con metodi statistici come nella prova su cavie.

26. Per l'etichettatura dei contenitori e degli imballaggi delle tubercoline devono essere rispettate le seguenti norme.

L'etichetta del contenitore e quella dell'imballaggio devono indicare:

- il nome del preparato;
- per i preparati liquidi, il volume totale del contenitore;
- il numero di unità comunitarie o di unità internazionali per ml. o per mg.;
- il nome del fabbricante;
- il numero della partita;
- per i preparati liofilizzati, la natura e la quantità del liquido di ricostituzione.

L'etichetta del contenitore o dell'imballaggio deve indicare:

- data di scadenza;

- condizioni di conservazione;
- denominazione e, se possibile, proporzione di ogni sostanza aggiunta;
- tipo di bacillo dal quale è stata ricavata la tubercolina.

27. Laboratori Comunitari verranno incaricati di controlli complementari delle tubercoline normalmente utilizzate nei vari Stati membri per assicurare che l'attività di ciascuna di queste tubercoline sia conforme a quella della corrispondente tubercolina standard comunitaria. Tali analisi devono essere effettuate su bovini tubercolotici, su cavie opportunamente sensibilizzate e mediante appropriate reazioni chimiche.

28. Sono riconosciute ufficialmente le seguenti tecniche di intradermotuber-colinizzazione:

- a) intradermotubercolinizzazione unica: inoculazione singola di tubercolina bovina;
- b) intradermotubercolinizzazione comparativa: inoculazione simultanea delle due tubercoline (aviaria e bovina).

29. La dose di tubercolina inoculata non deve essere inferiore:

- 1.a 2.000 UTC di tubercolina bovina;
- 2.a 2.000 UI di tubercolina aviaria.

Il volume di ciascuna dose non deve superare 0,2 ml.

30. La tubercolinizzazione deve essere effettuata inoculando la tubercolina, o le tubercoline, nella pelle del collo. I punti di inoculazione devono trovarsi al limite tra il terzo anteriore ed il terzo mediano del collo. Quando nello stesso animale vengono inoculate ambedue le tubercoline il punto di iniezione della tubercolina aviaria deve trovarsi a 10 cm. circa dalla cresta del collo ed il punto di inoculazione della tubercolina bovina a 12,5 cm. al di sotto di una linea approssimativamente parallela a quella delle spalle, o su diversi punti del collo; negli animali giovani, sul cui collo non vi è abbastanza spazio per effettuare le due inoculazioni a distanza sufficiente sullo stesso lato, ciascuna inoculazione va praticata su uno dei due lati del collo, in punti identici, al centro del terzo mediano del collo.

31. Tecnica ed interpretazione delle reazioni di tubercolinizzazione:

a) Tecnica.

Tosare e pulire i punti di inoculazione. Prendere fra il pollice e l'indice una piega di pelle in ciascuna delle zone depilate, misurarne lo spessore con un calibro e annotarne il risultato. Introdurre obliquamente negli strati piu' profondi della pelle, tenendo il taglio trasversale della punta rivolto verso l'esterno, un ago corto sterile, collegato ad una siringa graduata caricata con la tubercolina in esame. Iniettare la dose di tubercolina. L'inoculazione è avvenuta in modo corretto se la palpazione rivela un piccolo gonfiore, delle dimensioni di un pisello, in ciascun punto di inoculazione. A distanza di 72 ore dall'inoculazione, misurare nuovamente lo spessore della piega cutanea in ciascun punto di inoculazione e annotarne il risultato.

b) Interpretazione delle reazioni.

L'interpretazione delle reazioni deve essere fondata su osservazioni cliniche e sulla registrazione dell'aumento o degli aumenti, dello spessore della piega cutanea nei punti di inoculazione, 72 ore dopo l'inoculazione della tubercolina o delle tubercoline.

ba) Reazione negativa: si osserva solo un gonfiore circoscritto con aumento di spessore della piega cutanea non superiore a 2 mm., senza segni clinici, quali edema diffuso od esteso, essudazione, necrosi, dolore o infiammazione dei dotti linfatici della regione o dei linfonodi.

bb) Reazione dubbia: non si osservano segni clinici del tipo di quelli menzionati al punto "ba)", e l'aumento dello spessore della piega cutanea è superiore a 2 mm. ed inferiore a 4 mm.

bc) Reazione positiva: si osservano segni clinici del tipo di quelli menzionati al punto "ba)", o si riscontra un aumento di 4 mm. o più dello spessore della piega cutanea nel punto di iniezione.

32. Interpretazione delle intradermotuberculinizzazioni ufficiali:

a) Intradermotuberculinizzazione singola:

Positiva: reazione secondo la definizione del paragrafo "31 bc)";

Dubbia: reazione secondo la definizione del paragrafo "31 bb)";

Negativa: reazione secondo la definizione del paragrafo "31 ba)".

Gli animali per i quali l'intradermotuberculinizzazione singola non dà esito conclusivo devono essere sottoposti ad un'altra prova a distanza di almeno 42 giorni.

Gli animali che non risultano negativi a questa seconda prova devono essere ritenuti positivi.

Gli animali che risultano positivi all'intradermotuberculinizzazione singola possono essere sottoposti ad un'intradermotuberculinizzazione comparativa.

b) Intradermotuberculinizzazione comparativa per il riconoscimento degli allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi e per il mantenimento di tale qualifica:

Positiva: reazione bovina positiva, superiore di oltre 4 mm. alla reazione alla tubercolina aviaria, ovvero presenza di segni clinici;

Dubbia: reazione bovina positiva o dubbia, superiore da 1 a 4 mm. alla reazione alla tubercolina aviaria, ed assenza di segni clinici;

Negativa: reazione bovina negativa, ovvero reazione bovina positiva o dubbia, ma di intensità pari o inferiore ad una reazione positiva o dubbia alla tubercolina aviaria ed assenza di segni clinici in ambedue i casi.

Gli animali per i quali l'intradermotuberculinizzazione comparativa non dà esito conclusivo devono essere sottoposti ad un'altra prova a distanza di almeno 42 giorni. Gli animali che non risultano negativi a questa seconda prova devono essere ritenuti positivi.

c) Per gli allevamenti dove siano presenti animali per i quali si ritenga che:

1. abbiano avuto una reazione dubbia ad una intradermotuberculinizzazione singola;

2. siano risultati positivi all'intradermotuberculinizzazione singola, ma che sono in attesa di un nuovo controllo per intradermotuberculinizzazione comparativa;

3. abbiano avuto una reazione dubbia ad una intradermotuberculinizzazione comparativa, la qualifica di "allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi" può essere sospesa fino al momento in cui sia chiarito lo stato degli animali di cui sopra.

33. Gli animali destinati al commercio intracomunitario devono essere sottoposti a intradermotuberculinizzazione singola nei 30 giorni precedenti lo spostamento; gli animali che mostrano un aumento dello spessore della piega cutanea superiore a 2 mm. o la presenza di segni clinici non possono essere ammessi allo scambio intracomunitario.

Gli animali provenienti dagli allevamenti di cui al paragrafo 32, lettera "c)", sono esclusi dagli scambi intracomunitari fino a quando non sarà stato chiarito lo stato sanitario degli animali ivi contemplati.

ALLEGATO B

CAPITOLO I

NORME DI PROFILASSI PER LA BRUCELLOSI

1. Il risanamento degli allevamenti dalla brucellosi è obbligatorio per tutto il bestiame bovino esistente sul territorio nazionale.

2. Tutti i bovini di età superiore a 12 mesi sono sottoposti ad indagine sierologica per la ricerca della brucellosi da parte del Servizio Veterinario di Stato.

3. E' da considerare ufficialmente indenne da brucellosi un allevamento bovino in cui:

a) non vi sono animali della specie bovina vaccinati contro la brucellosi, salvo che non si tratti di femmine che siano state vaccinate da almeno tre anni;

b) tutti i bovini sono immuni da manifestazioni cliniche di brucellosi da almeno sei mesi;

c) tutti i bovini di età superiore a 12 mesi:

1) hanno presentato, in occasione di due sieroagglutinzioni praticate ufficialmente ad intervallo di tre mesi almeno e di dodici mesi al massimo e secondo le disposizioni dell'allegato B, Capitolo II, un tasso brucellare inferiore a 30 U.I. agglutinanti per millilitro, rimanendo inteso che:

- le prove di sieroagglutinazione di cui al primo paragrafo possono essere sostituite da due prove ufficiali all'antigene di brucella tamponato o da due prove di microagglutinazione effettuate conformemente alle disposizioni dell'allegato B, Capitolo II punti "d" e "g". Anche queste prove devono essere effettuate ad intervalli non inferiori a tre mesi e non superiori a dodici mesi;

- la prima sieroagglutinazione può essere sostituita da tre prove dell'anello (ring test) effettuate ad intervalli di tre mesi purchè tuttavia la seconda sieroagglutinazione sia effettuata almeno sei settimane dopo la terza prova dell'anello;

2) sono controllati annualmente per stabilire l'assenza di brucellosi mediante tre prove dell'anello, oppure tre saggi ELISA su latte, effettuati ad intervalli di almeno tre mesi o mediante due prove dell'anello, o due saggi ELISA su latte, effettuati a intervalli di almeno tre mesi e una prova sierologica (prova di sieroagglutinazione, prova all'antigene di brucella tamponato, prova di plasmoagglutinazione, prova dell'anello di latte su plasma sanguigno, prova di microagglutinazione o saggio singolo ELISA su sangue) effettuata non meno di sei settimane dopo la seconda prova dell'anello o il secondo saggio ELISA su latte. Se non vengono effettuate le prove dell'anello o il saggio ELISA sul latte, si devono effettuare ogni anno due prove sierologiche (prova di sieroagglutinazione, prova all'antigene di brucella tamponato, prova di plasmoagglutinazione, prova dell'anello di latte su plasma sanguigno, prova di microagglutinazione o saggio singolo ELISA su sangue) ad un intervallo non inferiore a tre mesi e non superiore a sei mesi.

Se in uno Stato membro o in una regione di uno Stato membro in cui tutti gli allevamenti bovini sono sottoposti ad operazioni ufficiali di lotta contro la brucellosi la percentuale degli allevamenti di bovini infetti non supera l'1%, è sufficiente effettuare ogni anno due prove dell'anello o due saggi ELISA su latte a intervalli di almeno tre mesi, oppure una prova sierologica (prova di sieroagglutinazione, prova all'antigene di brucella tamponato, prova di plasmoagglutinazione o saggio singolo ELISA su sangue).

In caso di controllo mediante prove dell'anello sulle cisterne gli esami di cui ai commi precedenti devono essere raddoppiati e gli intervalli tra le prove devono essere ridotti della metà.

d) non è stato introdotto alcun bovino senza un attestato di un veterinario ufficiale che certifichi che detto animale proviene da un allevamento bovino ufficialmente indenne da brucellosi e, se è di età superiore a dodici mesi, che ha presentato un tasso brucellare inferiore a 30 UI agglutinanti per/millimetro alla siero-agglutinazione praticata secondo le disposizioni dell'allegato B, Capitolo II, nei 30 giorni che precedono l'introduzione nell'allevamento.

4. Un allevamento bovino è considerato indenne da brucellosi quando:

a) non comprende maschi vaccinati contro la brucellosi;

b) tutte le femmine della specie bovina, o una parte di esse, sono state vaccinate:

-entro i primi 6 mesi di età, con vaccino vivo Buck 19 o con altri vaccini autorizzati secondo la procedura dell'articolo 12,

-entro i primi 15 mesi di età, con vaccino ucciso con adiuvante 45/20, controllato e riconosciuto ufficialmente;

c) tutti i bovini soddisfano le condizioni indicate nel punto 1, lettere "b)" e "c)", rimanendo inteso che i bovini di età inferiore a 30 mesi, vaccinati con vaccino vivo Buck 19, possono presentare un tasso brucellare pari o superiore a 30 unità internazionali agglutinanti per millilitro, ma inferiore a 80 unità internazionali agglutinanti per millilitro, semprechè presentino, alla reazione di fissazione del complemento:

-un tasso inferiore a 30 unità CE, se si tratta di femmine vaccinate da meno di dodici mesi,

- un tasso inferiore a 20 unità CE in tutti gli altri casi.

Le prove di sieroagglutinazione di cui al punto 1."c) 1)", primo trattino, possono essere sostituite da prove all'antigene di brucella tamponato effettuate conformemente alle

disposizioni dell'allegato B, Capitolo II, lettera D, o da provedi microagglutinazione effettuate conformemente alle disposizioni dell'allegato B, Capitolo II, lettera G;

d) non è stato introdotto nessun bovino senza un attestato di veterinario ufficiale con cui si certifichi che l'animale risponde alle condizioni previste al numero 1, lettera "d)", oppure che esso proviene da un allevamento riconosciuto indenne da brucellosi e, in questo caso, se è di età superiore a 12 mesi, ha presentato nei 30 giorni precedenti l'introduzione nell'allevamento, secondo le disposizioni dell'allegato B, Capitolo II, un tasso brucellare inferiore a 30 UI agglutinanti per millilitro e una reazione negativa di fissazione del complemento.

Tuttavia, un bovino vaccinato con vaccino vivo 19 di età inferiore a 30 mesi può presentare un tasso brucellare uguale o superiore a 30 UI agglutinanti per millilitro ma inferiore a 80 UI agglutinanti per millilitro, purchè alla reazione di fissazione del complemento presenti:

-un tasso inferiore a 30 unità CE, se si tratta di una femmina vaccinata da meno di dodici mesi,

-un tasso inferiore a 20 unità CE, dopo il dodicesimo mese successivo alla vaccinazione.

5. Un allevamento bovino indenne da brucellosi può essere qualificato allevamento bovino ufficialmente indenne da brucellosi dopo un termine minimo di 3 anni se:

a) non vi sia alcun animale vaccinato contro la brucellosi da meno di tre anni;

b) durante questi tre anni sono state rispettate senza interruzione le condizioni di cui al numero 4, lettera "c)";

c) al termine del terzo anno gli animali di più di dodici mesi hanno presentato un tasso brucellare inferiore a 30 UI agglutinanti per millilitro alla siero-agglutinazione ed una reazione negativa alla fissazione del complemento. Tali prove sono praticate secondo le disposizioni dell'allegato B, Capitolo II.

6. In un allevamento bovino ufficialmente riconosciuto indenne da brucellosi possono essere introdotti anche bovini provenienti da un allevamento indenne da brucellosi quando:

-al momento della loro introduzione hanno un'età di almeno 18 mesi,

-nel caso in cui siano stati vaccinati contro la brucellosi, la vaccinazione è stata effettuata da oltre un anno,

-entro i 30 giorni che precedono la loro introduzione, conformemente alle disposizioni dell'allegato B, Capitolo II, hanno presentato un tasso brucellare inferiore a 30 UI agglutinanti per millilitro e una reazione negativa alla fissazione del complemento.

Se un bovino è introdotto, conformemente al primo comma, in un allevamento ufficialmente riconosciuto indenne da brucellosi, questo ultimo, ai fini degli scambi intracomunitari, è considerato indenne da brucellosi per un periodo di due anni a decorrere dalla data di introduzione dell'animale.

7. Se in un allevamento ufficialmente indenne da brucellosi si constata un sospetto di brucellosi presso uno o più bovini, la qualifica di questo allevamento può essere provvisoriamente sospesa piuttosto che ritirata, purchè l'animale o gli animali siano immediatamente eliminati o isolati.

La sospensione provvisoria può essere tolta qualora due sieroagglutinzioni, praticate secondo le disposizioni dell'allegato B, Capitolo II, con intervalli da sei ad otto settimane su tutti gli animali d'età superiore a dodici mesi, diano un tasso inferiore a 30 UI agglutinanti per millilitro.

Gli animali isolati possono essere reintrodotti nell'allevamento se, nell'intervallo dalle sei alle otto settimane, due siero-agglutinzioni hanno dato un tasso inferiore a 30 UI agglutinanti per millilitro e due fissazioni del complemento hanno dato risultato negativo. Tali prove sono praticate secondo le disposizioni dell'allegato B, Capitolo II.

Le disposizioni di cui sopra sono applicabili altresì agli allevamenti indenni da brucellosi quando un sospetto di tale malattia è constatato presso uno o più bovini d'età superiore a trenta mesi.

8. Le prove di cui ai paragrafi da 1 a 6 non sono richieste per gli animali maschi castrati in età inferiore a 4 mesi.

9. Ai sensi del presente Decreto, un bovino è considerato infetto di brucellosi quando sia possibile ritenerlo tale in base all'esito dell'esame sierologico o dell'esame batteriologico.

Negli allevamenti in cui vengono identificati animali da ritenere infetti ai sensi della presente legge, si deve procedere alla marcatura dei capi infetti, all'atto del controllo, in corrispondenza della parte mediana del margine inferiore dell'orecchio (di norma il sinistro) con asportazione, a mezzo di apposita tenaglia, di un lembo di padiglione a forma di T, iscritto in un quadrato avente il lato di cm. 2 - 3 con l'asta disposta normalmente al margine del padiglione medesimo.

L'esito degli accertamenti viene riportato, per ogni singolo animale, sull'apposita scheda di stalla prevista dall'apposito Decreto.

10. Gli animali riconosciuti infetti ai sensi del presente Decreto, possono essere allontanati dall'allevamento soltanto per essere avviati direttamente al macello.

Tuttavia, in deroga a quanto stabilito nel precedente comma, il Servizio Veterinario, può autorizzare per comprovate esigenze, escluso il commercio, il trasferimento degli animali infetti in altre sedi sottoposte a vigilanza sanitaria.

Gli animali eliminatori di brucelle per via genitale debbono essere macellati entro quindici giorni dalla data della notifica con la quale l'accertamento viene portato a conoscenza del proprietario o del detentore.

Il periodo per la macellazione dei bovini riconosciuti infetti ma non eliminatori di brucelle per via genitale, deve essere contenuto entro i tre mesi.

11. Un allevamento è considerato infetto da brucellosi nei seguenti casi:

a) a seguito della constatazione, in occasione del primo controllo o di quelli successivi, della presenza di animali da ritenere infetti ai sensi del presente Decreto;

b) a seguito della constatazione, nell'intervallo tra due successivi controlli previsti nei programmi di profilassi e risanamento, della presenza di animali da ritenere infetti ai sensi del presente Decreto.

Negli allevamenti in cui è in corso il risanamento della brucellosi, i vitelli nati da vacche infette debbono essere allevati in condizioni di isolamento.

12. Negli allevamenti sottoposti a controllo dello Stato per la profilassi della brucellosi, è vietato:

- a) l'uso dei prodotti capaci di alterare il risultato delle prove diagnostiche nonché dei vaccini antibrucellari, non autorizzati dal Servizio Veterinario;
- b) il trasferimento di animali su pascoli nei quali non sia stata assicurata la più completa separazione da bovini di allevamenti non riconosciuti "ufficialmente indenni";
- c) introdurre bovini non scortati da certificati comprovanti che gli animali provengono da allevamenti bovini "ufficialmente indenni" da brucellosi e, se sono di età superiore a 12 mesi, che hanno presentato reazione negativa ad almeno una prova sierologica nei trenta giorni precedenti.

13. I commercianti di bestiame che intendono fornire bovini agli allevamenti oltre ad essere muniti di regolare licenze, devono, a tale scopo, attivare una apposita stalla, completamente isolata, nella quale far affluire soltanto animali che abbiano i requisiti indicati al punto 12, lettera "c)".

14. Negli allevamenti indirizzati esclusivamente alla produzione di carne, nei quali non siano presenti capi destinati alla riproduzione, non si applicano le norme del presente Allegato.

Tuttavia, in tali allevamenti è consentita solo la introduzione di bovini che provengono da allevamenti riconosciuti "ufficialmente indenni" da brucellosi ovvero che siano stati sottoposti, da non più di 30 giorni, ad una prova sierologica con esito negativo.

La prova sierologica di cui al precedente comma non è richiesta per l'introduzione di animali in età inferiore a 12 mesi.

15. L'abbattimento degli animali infetti è obbligatorio.

I contravventori alle misure obbligatorie stabilite dal presente piano di profilassi e di risanamento sono puniti con l'ammenda da L. 80.000 a L. 400.000.

CAPITOLO II

BRUCELLOSI

A. Siero-agglutinazione

1. Il siero agglutinante tipo deve essere conforme al siero campione preparato dal Veterinary Laboratory Weybridge/Surrey, Inghilterra.

L'ampolla deve contenere 1.000 unità internazionali (UI) agglutinantanti provenienti dalla liofilizzazione di 1 ml. di siero bovino.

2. La fornitura del siero tipo deve essere assicurata dal Bundesgesundheitsamt Berlino.

3. Il tasso delle agglutinine brucellari di un siero deve essere espresso in unità internazionali per ml. (ad esempio: siero X = 80 UI per ml.).

4. La lettura della siero-agglutinazione lenta in tubi deve avvenire al 50% o al 75% di agglutinazione; l'antigene utilizzato dovrà essere stato titolato nelle identiche condizioni in presenza di siero tipo.

5. L'agglutinabilità dei vari antigeni nei confronti del siero tipo deve essere compresa entro i seguenti limiti:

- se la lettura è fatta al 50% tra 1/600 e 1/1000;

- se la lettura è fatta al 75% tra 1/500 e 1/750.

6. Per la preparazione dell'antigene destinato alla siero-agglutinazione in tubi (metodo lento) devono essere utilizzati i ceppi Weybridge n. 99 e USDA 1119 o qualsiasi altro ceppo di sensibilità equivalente.

7. I terreni di coltura utilizzati sia per la conservazione del ceppo nel laboratorio che per la produzione dell'antigene devono essere scelti in modo da non favorire la dissociazione batterica (S-R); si dovrà impiegare di preferenza l'agarpatata.

8. L'emulsione batterica deve essere effettuata con soluzione fisiologica (NaCl 8,5%) fenicato allo 0,5%. Non deve essere usato il formolo.

9. Si devono incaricare del controllo ufficiale degli antigeni i seguenti istituti ufficiali:

a) Germania: Bundesgesundheitsamt Berlino;

b) Belgio: Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelles;

c) Francia: Laboratoire central de recherches vétérinaires, Alfort;

d) Granducato del Lussemburgo: Istituto del Paese fornitore;

e) Italia: Istituto superiore di sanità, Roma;

f) Paesi Bassi: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;

g) Danimarca: Statens Veterinære Serumlaboratorium, København V.;

h) Irlanda: The Veterinary Research Laboratory, Department of Agriculture and Fisheries, Thorndale, Beaumont Road, Dublin 9;

i) Regno Unito: - Gran Bretagna: The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, England;

- Irlanda del Nord: The Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast;

k) Spagna: Centro Nacional de Brucelosis de Murcia;

l) Portogallo: Laboratório Nacional de Investigaç o Veterinária, Lisboa;

j) Grecia:

m) San Marino: Istituto Superiore di Sanità, Roma.

10. Gli antigeni possono essere forniti concentrati purchè il coefficiente di diluizione richiesto sia indicato sull'etichetta del flacone.

11. Per effettuare una siero-agglutinazione occorre preparare almeno tre diluizioni per ogni siero. Le diluizioni del siero sospetto devono essere effettuate in modo che la lettura della reazione al limite d'infezione avvenga nel tubo mediano. In caso di reazione positiva in questo tubo il siero sospetto conterrà quindi almeno la quantità di 30 UI agglutinanti per millimetro.

B. Reazione di fissazione del complemento

1. Come siero standard vale lo stesso substandard del siero della brucellosi di cui al punto A 1 del presente allegato. Oltre alle unità di agglutinazione internazionali (UAI), devono essere presenti in un millilitro di questo siero della brucellosi liofilizzato 1.000 unità sensibilizzanti che fissano il complemento. Queste unità sensibilizzanti sono denominate unità sensibilizzanti CE (USC).

2. La fornitura del siero standardizzato è assicurata dal Bundesgesundheitsamt di Berlino.

3. Il tenore di anticorpi che fissano il complemento, in un siero, va espresso in unità sensibilizzanti CE (USC) (esempio: siero X = USC/ml.).

4. Un siero contenente in 1/ml. 20 unità sensibilizzanti CE (il che corrisponde ad un'attività del 20% dell'attività del siero di riferimento) o più, deve essere considerato positivo.

5. I sieri devono essere inattivati come segue:

a) bovini: 56° - 60°C per 30-50 minuti;

b) suini: 60°C per 30-50 minuti.

6. Per la produzione dell'antigene si devono usare i ceppi Weybridge n. 99 o USDA 1119. L'antigene è costituito da un'emulsione batterica in soluzione fisiologica allo 0,85% o in soluzione tampone veronal.

7. Per la reazione si deve usare una dose di complemento che sia maggiore della dose minima necessaria per una emolisi totale.

8. Nell'esecuzione della reazione, si devono effettuare ogni volta i seguenti controlli:

a) controllo dell'effetto anticomplementare del siero;

b) controllo dell'antigene;

c) controllo delle emazie sensibilizzate;

d) controllo del complemento;

e) controllo di sensibilità della reazione con l'aiuto di un siero positivo;

f) controllo della specificità della reazione con l'aiuto di un siero negativo.

9. La sorveglianza e il controllo ufficiale dei sieri standard e degli antigeni sono affidati agli organismi di cui al punto A 9 del presente allegato.

10. Gli antigeni possono essere forniti in forma concentrata, purchè sull'etichetta sia indicato il coefficiente di diluizione necessario.

C. Prova dell'anello (Ring Test)

1. La prova dell'anello deve essere effettuata sul contenuto di ogni bidone di latte o sul contenuto di ogni grande contenitore dell'azienda.

2. L'antigene tipo da impiegare deve provenire da uno degli istituti elencati al punto A. 9, lettere da "a)" a "j)". Si raccomanda di impiegare antigeni standardizzati secondo le raccomandazioni dell'OMS/FAO.

3. L'antigene può essere colorato solo con ematossilina e tetrazolo; occorre dare la preferenza all'ematossilina.

4. Se non sono utilizzati metodi di conservazione, la reazione deve essere effettuata tra la 18a e la 24a ora successiva alla mungitura.

Qualora la prova sul latte debba essere effettuata oltre 24 ore dopo il prelievo del campione, si devono adottare sistemi di conservazione. Come conservanti si possono utilizzare il formolo o il cloruro mercurico; in tal caso, la prova deve essere effettuata entro 14 giorni successivi al giorno in cui è stato prelevato il campione. In caso di utilizzazione del formolo, la concentrazione finale nel campione di latte deve essere dello 0,2%; la proporzione tra la quantità di latte e la soluzione di formolo da aggiungere deve essere almeno di 10 a 1. Al posto del formolo si può utilizzare il cloruro mercurico; anche in tal caso la concentrazione finale nel latte deve essere dello 0,2% e la proporzione tra quantità di latte e la soluzione del cloruro mercurico da aggiungere, di 10 a 1.

5. La reazione deve essere effettuata secondo uno dei seguenti metodi:

-su una colonna di latte di almeno 25 mm. di altezza e su un volume di latte di 1 ml. cui sono stati aggiunti 0,03 ml. di uno degli antigeni standardizzati colorati;

-su una colonna di latte di almeno 25 mm. di altezza e su un volume di latte di 1 ml. cui sono stati aggiunti 0,05 ml. di uno degli antigeni standardizzati colorati;

-su un volume di latte di 8 ml. cui sono stati aggiunti 0,08 ml. di uno degli antigeni standardizzati colorati;

-su una colonna di latte di almeno 25 mm. di altezza e su un volume di latte di 2 ml. cui sono aggiunti 0,05 ml. di uno degli antigeni standardizzati colorati.

6. La miscela di latte e di antigeni deve essere tenuta in termostato a 37°C per almeno 45 e al massimo 60 minuti. La prova deve essere valutata entro 15 minuti dalla rimozione della soluzione dal termostato.

7. La reazione deve essere valutata secondo il seguente criterio:

a) reazione negativa: latte colorato, crema decolorata;

b) reazione positiva: latte e crema colorati in modo identico o latte decolorato e crema colorata.

D. Prova all'antigene di Brucella tamponato

La prova all'antigene di Brucella tamponato può essere effettuata secondo uno dei seguenti metodi:

A. Metodo manuale

1. Come siero standard è impiegato il secondo siero internazionale standard anti Brucella abortus, fornito dal Central Veterinary Laboratory, Weybridge Surrey, Inghilterra.
2. L'antigene è preparato senza riferimento alla concentrazione delle cellule, ma la sua sensibilità deve essere standardizzata rispetto al secondo siero internazionale standard anti-Brucella abortus, in modo tale che l'antigene dia reazione positiva con siero diluito 1: 47,5 e reazione negativa con un siero diluito 1: 55.
3. L'antigene deve essere sospeso in diluente per l'antigene di Brucella tamponato a pH 3,65 = 0,5, e può essere stato colorato mediante rosa Bengala.
4. Per la preparazione dell'antigene devono essere utilizzati il ceppo Weybridge n. 99 oppure l'USDA 1119 o qualunque altro ceppo di sensibilità equivalente.
5. I terreni di coltura impiegati per la conservazione del ceppo in laboratorio e per la produzione dell'antigene devono essere tali da non provocare la dissociazione batterica (S-R); sono raccomandabili il terreno agarpatata oppure i metodi di coltura continua.
6. L'antigene deve essere controllato nei confronti di 8 sieri liofilizzati riconosciuti rispettivamente positivi e negativi.
7. La sorveglianza e il controllo ufficiale dei sieri e degli antigeni standard sono effettuati dagli organismi ufficiali elencati nell'allegato C, punto A 9.
8. L'antigene deve essere fornito pronto per l'uso.
9. La prova all'antigene di Bruxelles tamponato deve essere effettuata nel modo seguente:
 - a) porre una goccia (0,03 ml.) di antigene a fianco di una goccia (0,03 ml.) del siero su una piastra bianca;
 - b) mescolare con un agitatore, prima in linea retta, poi tracciando dei cerchi del diametro di 10-12 mm. circa;
 - c) agitare la piastra alternativamente per 4 minuti (circa 30 movimenti al minuto);
 - d) effettuare la lettura della prova in buone condizioni d'illuminazione; in mancanza di agglutinazione la prova sarà considerata negativa; qualsiasi grado di agglutinazione va considerato positivo, salvo quando appare chiara un'eccessiva essiccazione intorno ai margini.

B. Metodo automatizzato

Il metodo automatizzato deve essere sensibile ed esatto almeno quanto il metodo manuale.

E. Prova dell'anello di latte, effettuata su plasma sanguigno

A. Prelievo del plasma sanguigno

Le provette con il sangue reso non coagulabile mediante aggiunta di EDTA sono centrifugate per 3 minuti a 3.000 giri al minuto e poi conservate per 12-24 ore a 37°C.

B. Impostazione diagnostica

Si versano 0,2 ml. di plasma stabilizzato in una provetta contenente 1 ml. di latte crudo. Dopo aver agitato, si aggiunge una goccia (0,05 ml.) di antigene ABR e si agita nuovamente. L'antigene è standardizzato rispetto ad un antigene standard messo a disposizione dall'istituto menzionato al punto A 9 "a)".

Dopo aver lasciato riposare per 45 minuti ad una temperatura di 37°C, si esamina il risultato entro 15 minuti. La prova è considerata positiva se l'anello di latte ha la stessa colorazione o una colorazione più pronunciata di quella della colonna di latte.

F. Agglutinazione del plasma sanguigno

Il plasma sanguigno ottenuto conformemente al metodo di cui alla sezione E, punto A, può essere utilizzato immediatamente dopo centrifugazione senza che sia necessario procedere alla stabilizzazione termica.

Si mescolano 0,05 ml. di plasma con 1 ml. di antigene per la sieroagglutinazione al 50%, il che corrisponde ad un titolo di diluizione 1 : 20 nel caso della sieroagglutinazione. Si esamina il risultato dopo aver lasciato riposare per 18-24 ore alla temperatura di 37°C. La prova è considerata positiva se l'agglutinazione è uguale o superiore al 50%.

G. Prova di microagglutinazione

1. Il diluente è costituito da una soluzione salina fisiologica 0,85% fenicata allo 0,5%;
2. L'antigene è preparato nel modo descritto nei punti 6, 7 e 8 dell'allegato C, punto A, e titolato nel modo descritto al punto A. 5 dell'allegato C. Al momento dell'uso dell'antigene si aggiunge safranina 0 allo 0,02% (diluizione finale).
3. Il siero standard è lo stesso siero di cui al punto A. 1 dell'allegato C.
4. La fornitura del siero standard è assicurata dal Bundesgesundheitsamt di Berlino.
5. La prova di microagglutinazione utilizza piastre fornite di pozzetti a fondo conico e della capacità di 0,250 ml. La prova viene eseguita nella maniera seguente:
 - a) Prediluizioni dei sieri: a ciascun pozzetto di una piastra contenente 0,075 ml. di diluente si aggiungono 0,050 ml. di ogni siero in esame. Le mescolanze vengono agitate per 30 secondi.

b) Diluizioni scalari dei sieri: per ogni siero preparare almeno tre diluizioni. A tale scopo a partire dalle prediluizioni (1 : 2,5) si prelevano 0,025 ml. di ciascun siero e si trasferiscono su una piastra contenente 0,025 ml. di diluente. In tal modo la prima diluizione viene portata al valore di 1 : 5 e le successive vengono eseguite per raddoppio;

c) Aggiunta dell'antigene: nei singoli pozzetti contenenti le diverse diluizioni dei sieri in esame si aggiunge antigene in volume di 0,025 ml. Previa agitazione per 30 secondi le piastre vengono chiuse con i rispettivi coperchi e poste a 37°C per 20-24 ore in atmosfera umidificata;

d) Lettura dei risultati: si valuta il quadro della sedimentazione dell'antigene mediante esame del fondo del pozzetto riflesso da uno specchio concavo posto al di sotto di esso. Nel caso di prova negativa l'antigene sedimenta sotto forma di un bottone compatto, a margini netti e di colore rosso intenso. In caso di positività si forma invece un velo diffuso, di colorito rosa ed uniformemente distribuito. Le diverse percentuali di agglutinazione vengono determinate per raffronto con controlli dell'antigene indicanti 0, 25, 50, 75 e 100% di agglutinazione. Il titolo di ciascun siero viene espresso in UIA/ml.

Nella prova è opportuno inserire controlli costituiti da siero negativo e siero positivo diluito in modo da contenere 30 UIA/ml.

H. Il saggio ELISA

Il saggio ELISA per la brucellosi bovina come descritto all'allegato G.

ALLEGATO C

CAPITOLO I

NORME DI PROFILASSI PER LA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

1. Il risanamento degli allevamenti dalla leucosi bovina enzootica è obbligatorio per tutto il bestiame bovino esistente sul territorio nazionale.

2. Tutti i bovini di età superiore ai dodici mesi sono sottoposti ad esame sierologico per la ricerca della leucosi da parte del Servizio Veterinario di Stato.

Allevamento indenne da leucosi bovina enzootica

3. Un allevamento nel quale:

I) nessun caso di leucosi bovina enzootica sia stato constatato, clinicamente oppure come risultato degli esami effettuati conformemente al Capitolo II, nè confermato nel corso degli ultimi due anni; e

II) tutti gli animali di età superiore ai 24 mesi abbiano, nel corso dei precedenti 12 mesi, reagito negativamente a due esami praticati conformemente al presente allegato ad un intervallo di almeno quattro mesi; e

III) al termine degli esami di cui al sottopunto "II)", si trovino unicamente gli animali nati in detto allevamento o che provengano da un allevamento indenne da leucosi bovina enzootica e nel quale, dopo la sua qualifica, gli animali di più di 24 mesi, abbiano continuato a reagire negativamente ad uno degli esami praticati conformemente al Capitolo II ad un intervallo di 3 anni e, le condizioni previste ai punti "I)" e "III)" continuino ad essere soddisfatte;

IV) tutti i bovini introdotti in detto allevamento devono essere scortati da certificazione comprovante che provengono da allevamento riconosciuto indenne da leucosi bovina enzootica, e sono stati sottoposti, con esito negativo, ad un esame sierologico effettuato da meno di un anno.

Sospensione della qualifica di indennità dopo l'insorgere della leucosi

4. Se in un allevamento indenne da leucosi bovina enzootica un animale ha reagito positivamente ad uno degli esami di cui al punto "II)", viene sospesa la qualifica di tale allevamento fino a quando non vengano adottate le seguenti misure:

I) l'animale che ha reagito positivamente e, se si tratta di una vacca, l'eventuale vitello debbono abbandonare l'allevamento ed essere macellati sotto il controllo delle autorità veterinarie;

II) gli altri animali debbono essere sottoposti ad un esame sierologico individuale, che deve dare un risultato negativo, effettuato conformemente al Capitolo II almeno 3 mesi dopo l'eliminazione dell'animale positivo e della sua eventuale discendenza;

III) un'indagine epidemiologica deve essere svolta e gli allevamenti epidemiologicamente collegati all'allevamento infetto debbono essere sottoposti alle misure di cui al punto "II)".

Tuttavia, il Servizio Veterinario, può concedere una deroga all'obbligo della macellazione del vitello di una vacca infetta, qualora il vitello sia stato separato dalla madre dopo il parto. In questo caso il vitello è sottoposto ai requisiti di cui al punto 5, "II)";

5. Se uno o più animali di un allevamento indenne da leucosi bovina enzootica hanno reagito positivamente, viene sospesa la qualifica di tale allevamento fino a quando non vengano adottate le seguenti misure:

I) gli animali infetti e, se si tratta di vacche infette - salvo deroga concessa dal Servizio Veterinario, a norma del punto 4, "iii)", secondo comma -, i loro eventuali vitelli devono abbandonare l'allevamento ed essere macellati sotto il controllo delle autorità veterinarie;

II) gli altri animali - compresi eventualmente i vitelli degli animali infetti - di età inferiore a sei mesi debbono, previa identificazione, restare nell'azienda fino a quando non siano soddisfatte le condizioni relative agli esami di cui al punto 3, "II)";

III) l'allevamento deve restare sotto controllo ufficiale fino a quando non siano nuovamente soddisfatte le condizioni di cui al punto 3, "II)" ed "III)";

IV) dev'essere effettuata un'indagine epidemiologica e gli allevamenti epidemiologicamente collegati all'allevamento infetto debbono essere sottoposti alle misure di cui al punto 3, "II").

6. Negli allevamenti sotto controllo in cui è stata riscontrata la presenza di animali infetti da leucosi bovina enzootica, si applicano inoltre i seguenti provvedimenti:

- a) isolamento o idonea separazione dei bovini infetti;
- b) disinfezione e disinfestazione periodica delle stalle e particolarmente dei reparti occupati dai bovini infetti;
- c) esclusione dalla monta dei bovini infetti;
- d) obbligo di eliminare il colostro delle vacche infette oppure di risanarlo con idoneo trattamento prima di somministrarlo ai vitelli;
- e) obbligo di bollire il latte delle vacche infette destinato all'alimentazione dei vitelli;
- f) divieto di allontanamento dall'allevamento dei capi infetti salvo che non siano avviati direttamente al macello.

I provvedimenti di cui al comma precedente devono essere altresì adottati, in via cautelativa, per gli animali che hanno reagito positivamente ad un primo accertamento sierologico.

7. L'abbattimento dei capi infetti è obbligatorio e sarà effettuato nei modi e nei tempi dal Servizio Veterinario, secondo i piani aziendali concordati.

8) I contravventori alle misure obbligatorie stabilite dal presente piano di profilassi sono puniti con una ammenda da L. 80.000 a L. 400.000

CAPITOLO II

ESAMI PER LA RICERCA DELLA LEUCOSI BOVINA

ENZOOTICA E BRUCELLOSI BOVINA

A. Reazione di immunodiffusione su gel di agar

1. L'antigene da impiegare nella prova deve contenere glicoproteine del virus della leucosi bovina. Esso va standardizzato rispetto a un siero di riferimento (siero E 1) fornito dal laboratorio sierologico veterinario statale danese di Copenaghen.

2. La responsabilità della standardizzazione degli antigeni di laboratorio rispetto al siero ufficiale CE di riferimento (siero E 1) fornito dal laboratorio sierologico veterinario di Stato di Copenaghen è affidata ai seguenti istituti:

- a) Germania: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere-Tübingen;
- b) Belgio: Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelles;
- c) Francia: Laboratoire national de pathologie bovine, Lyon;

- d) Granducato del Lussemburgo - ;
- e) Italia: Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Perugia;
- f) Paesi Bassi: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;
- g) Danimarca: Statens Veterinære Serumlaboratorium, København;
- h) Irlanda: Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin;
- i) Regno Unito: 1. Gran Bretagna: The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England,
2. Irlanda del Nord: The Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast;
- j) Spagna: Subdirección general de sanidad animal. Laboratorio de sanidad y producción animal ALGETE (Madrid);
- k) Portogallo: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária Lisboa;
- m) San Marino: Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Perugia.

3. Gli antigeni standard di laboratorio devono essere presentati almeno una volta all'anno ai laboratori di riferimento CE elencati al paragrafo 2 per essere esaminati in rapporto al siero CE. Indipendentemente da detta standardizzazione, l'antigene in uso può essere standardizzato secondo la tecnica descritta alla lettera B.

4. I reattivi da impiegare sono i seguenti:

a) antigene: esso dovrà contenere le glicoproteine specifiche del virus della leucosi bovina enzootica standardizzato rispetto al siero ufficiale CE;

b) siero in esame;

c) siero di controllo riconosciuto positivo;

d) gel di agar

0,8 % di agar

8,5% di NaCl

tampone Tris 0,05 M a pH 7,2;

versare 15 ml. di questo terreno in una scatola Petri del diametro di 85 mm., in modo da ottenere uno strato dello spessore di 2,6 mm.

5. Nell'agar sul fondo della scatola ricavare sette pozzetti, esenti da umidità e distribuiti come segue: un pozzetto centrale e 6 pozzetti disposti in cerchio attorno ad esso;

di diametro del pozzetto centrale: 4 mm.,

di diametro dei pozzetti periferici: 6 mm.,

distanza fra il pozzetto centrale e i pozzetti periferici: 3 mm..

6. Riempire il pozzetto centrale con l'antigene standard, i pozzetti periferici 1 e 4 (vedi lo schema) con un siero riconosciuto come positivo e i pozzetti 2, 3, 5, e 6 con i sieri in esame. Il riempimento va effettuato fino a scomparsa del menisco.

1

O

6 O O 2

O

5 O O 3

O

4

7. Le quantità di reattivi da impiegare sono dunque le seguenti:

- antigene: 32 microlitri,
- siero di controllo: 73 microlitri,
- sieri in esame: 73 microlitri.

8. Incubare per 72 ore a temperatura ambiente (20-27°C), in atmosfera confinata ed umida.

9. La lettura può essere effettuata dopo 24 e 48 ore, ma non è possibile ottenere il risultato finale prima di 72 ore.

a) il siero in esame è positivo se forma una linea specifica di precipitazione con l'antigene del virus della LBE e una linea completa di indentità con il siero di riferimento;

b) il siero in esame è negativo se non forma una linea specifica di precipitazione con l'antigene della LBE e se non provoca l'incurvamento della linea del siero di riferimento;

c) la reazione è considerata non conclusiva:

I) se la linea del siero di riferimento si incurva verso l'antigene della LBE senza formare con l'antigene una linea di precipitazione visibile, ovvero

II) se non può essere interpretata come negativa o positiva.

Quando la reazione non è conclusiva, la prova può essere ripetuta e può essere impiegato siero concentrato.

B. Metodo per la standardizzazione dell'antigene

Soluzioni e materiali necessari:

1.40 ml. di agarosio all'1,6% in tampone Tris/HCl 0,05 a pH 7,2, contenente l'8,5% di NaCl;

2.15 ml. di siero della leucosi bovina, contenente anticorpi delle sole glicoproteine del virus della leucosi bovina, diluito 1 : 10 in tampone Tris/HCl 0,05 M a pH 7,2, contenente l'8,5% di NaCl;

3.15 ml. di siero della leucosi bovina, contenente anticorpi delle sole glicoproteine del virus della leucosi bovina, diluito 1 : 5 in tampone Tris/HCl 0,05 M a pH 7,2, contenente l'8,5% di NaCl;

4.4 scatole Petri in plastica, del diametro di 85 mm.;

5.un punzone del diametro di 4 - 6 mm.;

6.antigene di riferimento;

7.antigene da standardizzare;

8.bagnomaria (56°C).

Modo di operare:

Sciogliere l'agarosio (1,6%) nel tampone Tris/HCl, riscaldando cautamente a 100°C. Mettere in bagnomaria a 56°C per circa 1 ora. Porre in bagnomaria a 56°C anche diluizioni di siero della leucosi bovina.

Mescolare 15 ml. della soluzione di agarosio a 56°C con 15 ml. di siero della leucosi bovina (1 : 10), agitare rapidamente e versare due porzioni da 15 ml. della miscela in due scatole Petri. Ripetere il procedimento con il siero della leucosi bovina diluito 1:5.

Quando l'agarosio si è solidificato, praticare i pozzetti secondo il seguente schema:

Aggiunta di antigene

I. Scatole Petri 1 e 3:

pozzetto A - antigene di riferimento non diluito,

pozzetto B - antigene di riferimento, diluito 1 : 2,

pozzetti C + E - antigene di riferimento,

pozzetto D - antigene da controllare, non diluito.

II. Scatole Petri 2 e 4:

pozzetto A - antigene in esame, non diluito,

pozzetto B - antigene in esame, diluito 1 : 2,

pozzetto C - antigene in esame, diluito 1 : 4,

pozzetto D - antigene in esame, diluito 1 : 8.

Istruzioni complementari

1. Per realizzare una precipitazione ottimale, l'esperimento va effettuato con due diluizioni di siero (1 : 5 e 1 : 10).
2. Se il diametro di precipitazione è troppo piccolo ad ambedue le diluizioni, il siero va ulteriormente diluito.
3. Se la precipitazione per ambedue le diluizioni è indistinta e il diametro è troppo grande, per il siero va scelta una diluizione inferiore.
4. La concentrazione finale dell'agarosio deve essere dello 0,8%; quella dei sieri deve essere rispettivamente del 5% e del 10%.
5. Riportare i diametri misurati sull'accluso sistema di assi coordinati. La diluizione di lavoro deve corrispondere alla diluizione dell'antigene sotto prova che ha lo stesso diametro dell'antigene di riferimento.

"C. Saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per la ricerca della leucosi bovina enzootica e della brucellosi bovina.

1. Per procedere al saggio ELISA occorrono le attrezzature ed i reattivi qui indicati:

- a) micropiastre, cuvette o qualsiasi altro recipiente per la fase solida;
- b) L'antigene è fissato sulla fase solida con o senza l'ausilio di anticorpi leganti policlonali o monoclonali. Se la fase solida è rivestita direttamente dall'antigene, tutti i campioni in esame che presentano reazione positiva devono essere riesaminati facendo riferimento all'antigene di controllo nel caso dell'EBL. L'antigene di controllo dovrebbe essere identico all'antigene in questione, fatta eccezione per gli antigeni del virus della leucosi bovina. Se gli anticorpi leganti sono distribuiti sulla fase solida, gli anticorpi non devono reagire ad antigeni diversi da quelli del virus della leucosi bovina;
- c) il fluido biologico da esaminare;
- d) controlli positivi e controlli negativi corrispondenti;
- e) il coniugato;
- f) un substrato adatto all'enzima impiegato;
- g) una soluzione di arresto, se necessario;
- h) soluzioni per la diluizione dei campioni per la preparazione dei reattivi e per il lavaggio;
- i) un sistema di lettura corrispondente al substrato impiegato.

2. Standardizzazione e sensibilità della prova:

a) Per la leucosi bovina enzootica la sensibilità del saggio ELISA deve essere di livello tale che il siero E 4 risulti positivo quando è diluito 10 volte (campioni di siero) o 250 volte (campioni di latte) più della diluizione ottenuta da singoli campioni presi congiuntamente. Nelle prove in cui i campioni (siero e latte) sono esaminati individualmente, il siero E 4 diluito nella proporzione di 1 : 10 (nel siero negativo) o di 1 : 250 (nel latte negativo) deve presentare una reazione positiva quando è esaminato in una diluizione di prova uguale a quella impiegata per le prove individuali. Gli istituti ufficiali indicati nel punto "a) 2", sono responsabili del controllo di qualità del metodo ELISA, in particolare per determinare per ogni lotto di produzione, il numero di campioni da mettere in comune in funzione del titolo ottenuto per il siero E 4.

Il siero E 4 è fornito dal laboratorio veterinario nazionale di Copenhagen.

b) Per brucellosi:

1) i campioni di latte sfuso vengono classificati negativi se danno una reazione inferiore al 50% di quella data da una diluizione 1 : 10.000 del secondo siero standard internazionale della brucellosi diluito in latte negativo;

2) i campioni singoli di siero vengono classificati negativi se danno una reazione inferiore al 10% di quella data da una diluizione di 1 : 200 del secondo siero standard internazionale della brucellosi diluito in soluzione salina o qualsiasi altra soluzione riconosciuta secondo la procedura prevista all'articolo 12 previo parere del comitato scientifico veterinario.

Gli standard ELISA della brucellosi devono essere quelli specificati nell'allegato C, punti A. 1 e A. 2 (da usare alle diluizioni indicate sull'etichetta).

3. Condizioni di impiego del saggio ELISA per la ricerca della leucosi bovina enzootica e della brucellosi bovina:

Il metodo ELISA può essere utilizzato su un campione di latte o di siero prelevato dal latte proveniente da un'azienda in cui almeno il 30% delle vacche da latte sono in lattazione.

In caso di ricorso alla facoltà precisata devono essere prese misure per assicurare una corrispondenza tra i campioni prelevati e gli animali da cui provengono il latte o i sieri esaminati.

In caso di risultato positivo su uno dei campioni, sono applicabili le disposizioni previste nell'allegato A, Capitolo II, punto A 1 "c) i)" per quanto concerne la brucellosi bovina e nel presente allegato, Capitolo I, punto A 1 per quanto concerne la EBL".

ALLEGATO D

Suini e allevamenti suini

1. E' considerato indenne da brucellosi un suino che:

a) non presenta manifestazioni cliniche di tale mala

b) se è di peso superiore a 25 chilogrammi, presenta all'esame sierologico praticato secondo le disposizioni dell'allegato B, Capitolo II:

I) un tasso brucellare inferiore a 30 UI agglutinanti per millilitro alla siero-agglutinazione;

II) una reazione negativa alla fissazione del complemento praticata simultaneamente.

2. E' considerato indenne da brucellosi un allevamento suino in cui:

a) tutti i suini sono esenti da manifestazioni cliniche della malattia da almeno un anno;

b) i bovini che si trovano contemporaneamente nell'azienda appartengono ad un allevamento ufficialmente indenne o a un allevamento indenne da brucellosi.

ALLEGATO E

ANALISI DEL LATTE

1. Tutte le analisi del latte devono essere effettuate presso il laboratorio microbiologico del Servizio Igiene Ambientale.

2. I campioni di latte devono essere prelevati osservando le seguenti condizioni:

a) i capezzoli devono essere disinfettati precedentemente con alcool al 70%;

b) durante la riempitura i tubi devono essere mantenuti in posizione inclinata;

c) i campioni di latte devono essere prelevati all'inizio della mungitura, dopo l'eliminazione dei primi getti di ogni capezzolo;

d) un campione dev'essere prelevato su ogni quarto mammario; il latte di tali campioni non può essere mescolato;

e) ogni campione deve comportare almeno 10 ml. di latte;

f) qualora sia necessario un conservativo, si dovrà impiegare l'acido borico allo 0,5%;

g) ogni tubo dev'essere munito di etichetta comprendente le seguenti indicazioni:

- il numero del contrassegno auricolare o qualsiasi altro mezzo d'identificazione dell'animale,

- la designazione del quarto mammario,

- la data e l'ora del prelevamento;

h) i campioni devono essere accompagnati da un documento contenente le seguenti indicazioni:

- il nome e l'indirizzo del veterinario ufficiale,

- il nome e l'indirizzo del proprietario,

- gli elementi di identificazione dell'animale,

- lo stato di lattazione.

3. L'analisi del latte dev'essere praticata non oltre 30 giorni prima del carico e deve sempre comportare un esame batteriologico nonché un White-Side-Test (WST) o un California-Mastitis-Test (CMT).

I risultati di ambedue gli esami devono essere negativi, fatte salve le seguenti disposizioni:

a) se il risultato dell'esame batteriologico è positivo - anche in mancanza di uno stato infiammatorio caratteristico - mentre il risultato del WST (o del CMT) è negativo, deve essere effettuato un secondo esame batteriologico almeno 10 giorni dopo - entro il termine di 30 giorni summenzionato. Questo secondo esame deve stabilire:

aa) la scomparsa dei germi patogeni,

bb) l'assenza di antibiotici.

Inoltre, l'assenza di uno stato infiammatorio deve essere accertata da un nuovo WST (o un nuovo CMT) che deve dare risultato negativo;

b) qualora il risultato dell'esame batteriologico sia negativo, mentre il WST (o CMT) è positivo, si deve procedere ad un esame citologico completo che deve dare risultato negativo.

4. L'esame batteriologico deve comportare:

a) l'inseminazione del latte, su agar con sangue di bue o di montone in piastre di Petri;

b) l'inseminazione del latte, in terreno T.K.T. o in terreno di Edwards.

L'esame batteriologico ha lo scopo di identificare qualsiasi germe patogeno e non può essere limitato a mettere in evidenza streptococchi e stafilococchi specificamente patogeni. A tale scopo, l'identificazione delle colonie sospette, ottenute mediante inseminazione sui terreni suddetti, deve essere effettuata mediante le classiche tecniche batteriologiche di differenziazione, quali l'uso del terreno di Chapman per l'identificazione dei stafilococchi e di vari terreni selettivi per l'isolamento degli enterobatteri.

5. L'esame citologico completo è destinato a mettere in evidenza, eventualmente, uno stato infiammatorio caratteristico, indipendentemente da qualsiasi sintomo clinico.

Questo stato infiammatorio viene rilevato quando la numerazione leucocitaria secondo la tecnica di Breed raggiunge 1 milione di leucociti per ml. e il rapporto tra mononucleati e polinucleati è inferiore a 0,5.

ALLEGATO F

Sono soggette a denuncia obbligatoria le malattie seguenti:

a) Malattie della specie bovina:

- rabbia,

- tubercolosi,
- brucellosi,
- afta epizootica,
- carbonchio ematico,
- peste bovina,
- pleuropolmonite,
- leucosi bovina enzootica.

b) Malattie della specie suina:

- rabbia,
- brucellosi,
- carbonchio ematico,
- afta epizootica,
- peste suina,
- malattia vescicolare dei suini,
- peste suina africana,
- paralisi contagiosa dei suini (morbo di Teschen).