

## DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

### MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO 15 dicembre 1995, n. 592.

Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della tubercolosi negli allevamenti bovini e bufalini.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

DI CONCERTO CON

IL MINISTRO DELLE RISORSE  
AGRICOLE, ALIMENTARI E FORESTALI

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320, concernente il regolamento di polizia veterinaria;

Visto l'art. 2, comma 6, della legge 9 giugno 1964, n. 615, concernente la bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi;

Vista la legge 23 gennaio 1968, n. 33, concernente modifiche alla predetta legge n. 615;

Vista la legge 23 dicembre 1978, n. 833, concernente la istituzione del Servizio sanitario nazionale;

Vista la legge 28 maggio 1981, n. 296, che attua le direttive CEE 77/391, 78/52 e 79/110 e stabilisce norme per l'accelerazione della bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi;

Visto l'art. 17, comma 3, della legge 23 agosto 1988, n. 400, concernente la disciplina dell'attività di Governo e ordinamento della Presidenza del Consiglio dei Ministri;

Visto il decreto ministeriale 1° giugno 1968, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 233 del 13 settembre 1968, concernente il piano nazionale di profilassi della tubercolosi bovina, e successive modifiche;

Considerato che con decreto del Presidente della Repubblica 1° marzo 1992, n. 230, è stato pubblicato il regolamento di attuazione delle direttive CEE 79/109, 79/111, 80/219, 80/1098, 80/1099, 80/1274, 82/893, 83/646, 84/336, 85/586, 87/489 e 88/406, concernenti norme sanitarie in materia di scambi intracomunitari di animali della specie bovina e suina, tenuto anche conto delle direttive 84/643, 90/422 e 90/423;

Considerato che l'art. 9 del decreto del Presidente della Repubblica n. 230 recita: «Il Ministro della sanità, con propri decreti, adotta regolamenti ai sensi dell'art. 17 della legge 23 agosto 1988, n. 400, per estendere al territorio nazionale le norme sanitarie previste negli allegati»;

Visto l'art. 13 del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502, concernente il riordino della disciplina in materia sanitaria;

Vista la decisione del Consiglio CEE n. 87/58 del 22 dicembre 1986 che istituisce un'azione complementare della Comunità per l'eradicazione della brucellosi, della tubercolosi e della leucosi dei bovini;

Vista l'ordinanza ministeriale 2 gennaio 1993 concernente norme integrative per l'eradicazione della tubercolosi dagli allevamenti bovini, pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 13 del 18 gennaio 1993;

Sentita la commissione prevista dall'art. 2 della legge 23 gennaio 1968, n. 33, nella seduta del 14 giugno 1994;

Visto il parere del Consiglio superiore di sanità, espresso nella seduta del 18 gennaio 1995;

Udito il parere del Consiglio di Stato reso nell'adunanza generale dell'8 giugno 1995;

Vista la comunicazione alla Presidenza del Consiglio dei Ministri eseguita in data 30 settembre 1995;

## ADOTTA

il seguente regolamento:

### Capitolo I

#### GENERALITÀ

#### Art. 1.

##### Obiettivi

1. Il presente regolamento stabilisce le misure sanitarie da applicare agli allevamenti di bovini e bufalini dell'intero territorio nazionale per conseguire la eradicazione della tubercolosi bovina.

2. Il piano nazionale di profilassi della tubercolosi bovina ha l'obiettivo di eradicare in tre anni la tubercolosi

dagli allevamenti bovini e bufalini ai fini della tutela della salute pubblica e della protezione degli allevamenti ufficialmente indenni.

## Art. 2.

### Definizioni

1. Ai sensi del presente regolamento si intende per:

a) bovino e bufalino da macello: l'animale della specie bovina o bufalina destinato ad essere inviato al macello direttamente o dopo essere passato attraverso un mercato o un centro di raccolta riconosciuto, per esservi macellato nelle condizioni stabilite dall'art. 6 della direttiva n. 64/432/CEE recepita con legge 30 aprile 1976, n. 397, e successive modificazioni;

b) bovini o bufalini da riproduzione, da allevamento e da ingrasso: gli animali della specie bovina e bufalina diversi da quelli menzionati al punto a) destinati ad essere avviati verso il luogo di destinazione direttamente o dopo essere passati per un mercato o per un centro di raccolta riconosciuto;

c) allevamento bovino o bufalino ufficialmente indenne da tubercolosi: l'allevamento che soddisfa le condizioni di cui al capitolo IV art. 12 del presente regolamento;

d) azienda: il complesso agricolo o la stalla del commerciante ufficialmente autorizzata e controllata situati nel territorio nazionale, nei quali sono tenuti od allevati abitualmente bovini e/o bufalini da riproduzione, da ingrasso o da macello;

e) veterinario ufficiale: il veterinario dipendente dal Ministero della sanità, dalle regioni, dalle province autonome, o dalle unità sanitarie locali, o libero professionista formalmente incaricato dell'esecuzione delle operazioni di risanamento;

f) eradicazione: l'eliminazione della tubercolosi e del relativo agente eziologico dagli allevamenti bovini e bufalini tramite le opportune operazioni di profilassi;

g) mercato o centro di raccolta riconosciuto: qualsiasi luogo, diverso dall'azienda, in cui vengono venduti o acquistati, e/o in cui sono stati raccolti, caricati od imbarcati bovini e/o bufalini, che sia conforme all'art. 9 della legge 30 aprile 1976, n. 397;

h) prove diagnostiche: tutti gli accertamenti effettuati secondo gli allegati 1 e 2 al presente regolamento per confermare o escludere l'infezione tubercolare o la presenza dei suoi agenti eziologici;

i) animale infetto: quello che risponde positivamente alla prova diagnostica ufficiale eseguita conformemente alle modalità riportate nell'allegato 1 al presente regolamento o riconosciuto infetto secondo quanto previsto dall'art. 7;

l) animali allo stato brado: gli animali che vivono in libertà in un determinato territorio nel quale alimentazione, riproduzione e movimenti sono liberi senza governo diretto da parte dell'uomo se non in occasione della

cattura per la marcatura, per l'avvio al mercato, per trattamenti prifilattico-terapeutici e per l'alimentazione integrativa quali-quantitativa. Tali animali hanno tuttavia un proprietario.

2. Ai sensi del presente regolamento secondo le disposizioni di cui al decreto del Presidente della Repubblica 1° marzo 1992, n. 230, la parte minima del territorio nazionale a cui può essere attribuita la qualifica sanitaria di «ufficialmente indenne» deve avere un'estensione non inferiore a 2000 km<sup>2</sup> e comprendere almeno il territorio di una provincia. Per l'Italia tale area è identificabile col territorio di una provincia.

#### Art. 3.

##### *Obblighi*

1. Il piano di eradicazione della tubercolosi dagli allevamenti bovini e bufalini è obbligatorio su tutto il territorio nazionale secondo la procedura prevista dalla legge 23 gennaio 1968, n. 33, e successive modifiche ed integrazioni, nonché dal presente regolamento.

2. Con l'entrata in vigore del presente regolamento tutti gli allevamenti bovini e bufalini e tutti i capi devono essere identificati e registrati in modo da permettere di risalire all'allevamento, all'azienda o al centro di provenienza o di passaggio dei singoli soggetti. In tutti gli allevamenti bovini e bufalini che non siano destinati esclusivamente all'ingrasso, anche se allo stato brado, i capi superiori a sei settimane di età devono essere posti sotto controllo con le modalità previste dall'allegato 1 al presente regolamento, con l'obiettivo di pervenire alla eradicazione della tubercolosi.

3. Negli allevamenti da ingrasso devono essere introdotti soltanto capi provenienti da allevamenti ufficialmente indenni e scortati dalla relativa certificazione. Per questi allevamenti le regioni e province autonome predispongono, in collaborazione con gli istituti zooprofilattici sperimentali, specifici piani di sorveglianza; attività pianificate di controllo devono essere altresì intraprese in tale ambito quando si intendono attivare canali di esportazione, ai fini della rispondenza ad eventuali requisiti richiesti dai Paesi di destinazione.

4. Entro il 30 aprile di ogni anno i titolari di allevamenti bovini e bufalini devono notificare al servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio il proprio domicilio e la sede legale, la ragione sociale della ditta, nonché la sede e la consistenza dell'allevamento, l'età e la categoria dei capi. Essi devono altresì comunicare, entro otto giorni, la costituzione di una nuova azienda od ogni eventuale trasferimento o variazione numerica dei capi allevati e comunque ogni mutamento di ditta, ragione o denominazione sociale che si verifichi successivamente alla notifica.

5. Entro il 30 giugno di ogni anno il servizio veterinario della unità sanitaria locale provvede, previa verifica, a redigere l'elenco completo degli allevamenti esistenti nel territorio di competenza.

## Capitolo II

### IDENTIFICAZIONE DEGLI ANIMALI ED ESECUZIONE DELLE PROVE DIAGNOSTICHE

#### Art. 4.

##### *Identificazione*

1. Il codice di identificazione dell'allevamento, dei bovini e dei bufalini, è riportato nelle singole schede di allevamento (mod. 2/33), che devono essere conservate in apposito schedario della unità sanitaria locale competente per territorio. Una copia di tali schede deve essere conservata dal titolare dell'azienda presso la sede dell'allevamento per almeno due anni.

2. Con l'entrata in vigore del presente regolamento sono ritenuti comunque validi i contrassegni già applicati nel corso di piani di profilassi ufficiali attuati in precedenza. Sono altresì ritenuti validi i contrassegni applicati agli animali iscritti ai libri genealogici o sottoposti ai controlli funzionali ufficiali.

#### Art. 5.

##### *Prove diagnostiche e competenze*

1. Le prove ufficiali per la diagnosi della tubercolosi sono quelle indicate nell'allegato 1 che fa parte integrante del presente regolamento.

2. Gli interventi diagnostici di cui al presente regolamento sono effettuati dai veterinari ufficiali.

3. È vietato allontanare per qualsiasi motivo i bovini e i bufalini sottoposti alle prove diagnostiche, prima della avvenuta diagnosi, salvo autorizzazione della unità sanitaria locale competente per territorio qualora si prospetti la necessità di una macellazione.

4. A prescindere dalla sede legale o di residenza dei titolari degli allevamenti, le operazioni di controllo diagnostico nei confronti degli animali che effettuano alpeggio, transumanza o monticazione devono essere eseguite, di norma, a cura dei servizi veterinari delle unità sanitarie locali dove esistono strutture di ricovero o, comunque, dove gli animali stazionano per il periodo più lungo.

5. Salvo che per l'invio ai macello, a partire dall'entrata in vigore del presente regolamento possono spostarsi, per le ragioni di cui al comma 4 del presente articolo, soltanto i bovini e i bufalini appartenenti ad allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi. Gli uffici veterinari regionali provvedono per tempo ad emanare specifiche disposizioni per regolamentare la materia.

6. L'esito degli accertamenti è riportato per ogni singolo animale sull'apposita scheda di stalla (mod. 2/33).

*Capitolo III*MISURE PREVISTE PER GLI ANIMALI  
SOSPETTI D'INFEZIONE O INFETTI

## Art. 6.

*Animali sospetti*

1. Un bovino o un bufalino è considerato sospetto di infezione tubercolare quando:

- a) viene in contatto con capi di allevamenti infetti;
- b) le prove diagnostiche effettuate secondo l'allegato 1 al presente regolamento ed interpretate dal veterinario ufficiale sono da considerarsi dubbie.

2. I casi di sospetto di tubercolosi nei bovini e nei bufalini devono essere ufficialmente segnalati alla unità sanitaria locale competente per territorio ai sensi dell'art. 2 del decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320.

3. Nei confronti degli animali di cui al comma 1 del presente articolo devono essere immediatamente applicate opportune misure di isolamento al fine di evitare ogni possibile contagio nell'attesa della diagnosi definitiva.

4. Nessun bovino o bufalino può entrare o uscire da un allevamento in cui vi siano animali sospetti d'infezione tubercolare salvo autorizzazione per l'uscita di animali destinati all'immediata macellazione, da rilasciarsi ai sensi del decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320, e successive modifiche, nell'attesa della diagnosi definitiva.

## Art. 7.

*Animali ed allevamenti infetti*

1. Un bovino o un bufalino è considerato infetto da tubercolosi quando:

- a) reagisce positivamente alle prove diagnostiche ufficiali;
- b) anche in presenza di un esito negativo alle prove diagnostiche ufficiali, la malattia risulta clinicamente manifesta o l'infezione è evidenziata dall'esito positivo di adeguate ricerche di laboratorio (allegato 2).

2. Un allevamento è considerato infetto da tubercolosi qualora uno o più capi sono dichiarati infetti in base ai riscontri diagnostici in vita di cui al comma 1 o effettuati *post-mortem*.

3. I casi di tubercolosi nei bovini o nei bufalini devono essere ufficialmente segnalati alla unità sanitaria locale competente per territorio ai sensi dell'art. 2 del decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320.

4. Qualora gli animali riconosciuti infetti provengano da aziende ubicate nel territorio di competenza di altra unità sanitaria locale, il servizio veterinario della unità sanitaria locale che tramite i veterinari dipendenti ha operato la diagnosi notifica l'episodio infettivo alla unità

sanitaria locale di provenienza e alla regione. Se gli animali provengono dall'estero l'unità sanitaria locale inoltra immediato avviso all'Assessorato regionale alla sanità e al Ministero della sanità - Direzione generale dei servizi veterinari.

5. I medici veterinari delle unità sanitarie locali addetti all'ispezione delle carni devono segnalare tempestivamente ogni riscontro di lesioni tubercolari, negli animali da macello, tramite l'apposito modello (mod. 10/33), fatta eccezione per i bovini o bufalini abbattuti in applicazione del piano di profilassi di Stato contro la tubercolosi bovina, per i quali è prevista la compilazione del modello 9/33.

6. Al più presto, e comunque entro otto giorni dalla avvenuta macellazione, il modello 10/33, debitamente compilato in ogni sua parte e vistato dal responsabile del servizio veterinario dell'unità sanitaria locale dove ha sede il macello, deve essere trasmesso ai servizi veterinari dell'unità sanitaria locale e della regione ove ha sede l'allevamento di origine dell'animale infetto. Nel caso in cui l'allevamento di provenienza ha sede nel territorio di competenza della medesima unità sanitaria locale dove è avvenuta la macellazione, il modello 10/33 deve comunque essere inviato alla regione competente. L'unità sanitaria locale competente provvede a svolgere, non oltre quindici giorni, le opportune indagini e le prove diagnostiche, previste dall'allegato 1 al presente regolamento, nell'allevamento di provenienza trasmettendo al servizio veterinario regionale una sintetica relazione sull'attività svolta e sui provvedimenti adottati.

## Art. 8.

*Provvedimenti per gli animali infetti*

1. I bovini o bufalini dichiarati infetti devono essere subito isolati e macellati, sotto controllo ufficiale, al più presto e comunque non oltre trenta giorni dalla notifica ufficiale al proprietario o al detentore. In via eccezionale, quando l'abbattimento riguarda un numero di capi superiore a trenta, l'unità sanitaria locale competente per territorio, previo parere favorevole del servizio veterinario regionale e sentito il Ministero della sanità - Direzione generale dei servizi veterinari, può autorizzare un programma di abbattimento differito che comunque non si protragga oltre novanta giorni dalla data della notifica. Nell'eventualità che l'allevatore non provveda a macellare tutti gli animali infetti, entro il termine massimo fissato nel programma di abbattimento, il sindaco, su proposta del servizio veterinario competente per territorio, adotta apposita ordinanza di abbattimento per i capi rimasti.

2. I capi destinati all'abbattimento devono essere marcati immediatamente, all'atto dell'accertamento diagnostico a cura del veterinario ufficiale, in corrispondenza della parte mediana del margine inferiore dell'orecchio (di norma il destro) con asportazione, a mezzo di apposita tenaglia, di un lembo del padiglione auricolare 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, adottando opportune misure per limitare al massimo dolore e sofferenza agli animali.

3. L'invio al macello dei bovini infetti deve avvenire sotto vincolo sanitario presso impianti della provincia ove ha sede il focolaio o nei macelli di altra provincia della stessa regione su autorizzazione del servizio veterinario della unità sanitaria locale competente, qualora sia dimostrata l'impossibilità di procedere alla macellazione nella provincia di origine del focolaio o per problemi legati alla commercializzazione delle carni. Nei predetti impianti la macellazione deve avvenire in modo tale da garantire la sicurezza degli addetti alle operazioni i quali devono essere preventivamente informati.

4. Qualora venga diagnosticata la tubercolosi in bovini che abbiano avuto contatti con soggetti di altri allevamenti, in particolare al pascolo, o all'alpeggio, l'autorità sanitaria competente dispone che tali allevamenti siano considerati tutti sospetti di infezione e siano sottoposti alle prove diagnostiche ufficiali di cui all'allegato 1 che fa parte integrante del presente regolamento.

5. Inoltre, dopo l'eliminazione dei bovini di cui all'art. 7 del presente regolamento e le relative disinfezioni:

a) vengono effettuate nell'allevamento infetto le prove ufficiali, previste dall'allegato 1 al presente regolamento per confermare l'avvenuta eliminazione della malattia;

b) il ripopolamento di tale allevamento può avvenire soltanto dopo che i soggetti, di età superiore a sei settimane, abbiano fornito risultato negativo ad almeno due prove ufficiali, la prima delle quali eseguita ad almeno quarantadue giorni dalla eliminazione dell'ultimo capo infetto, come indicato all'art. 11 del presente regolamento.

#### Art. 9.

##### Provvedimenti

1. Negli allevamenti dichiarati infetti ai sensi del presente regolamento si adottano le seguenti disposizioni:

a) accurata indagine epidemiologica da parte del veterinario ufficiale in collaborazione con gli osservatori epidemiologici regionali veterinari, mirata a individuare l'origine della malattia e gli eventuali contatti avvenuti con altri allevamenti;

b) segnalazione al servizio di igiene pubblica dell'unità sanitaria locale territorialmente competente della presenza dell'infezione, unitamente alle misure urgenti adottate per impedire il contagio all'uomo;

c) censimento per specie e categoria di tutti gli animali esistenti nell'allevamento;

d) isolamento e sequestro degli animali infetti e sospetti dal resto dell'effettivo dell'allevamento;

e) macellazione degli animali infetti entro i termini indicati al punto 1 del precedente art. 8;

f) accurata pulizia e disinfezione ai sensi dell'art. 10 del presente regolamento;

g) divieto di monta;

h) la mungitura degli animali sospetti o infetti deve essere effettuata separatamente e comunque dopo la mungitura dei soggetti sani, seguita da accurato lavaggio, pulizia e disinfezione delle attrezzature e dei locali adibiti alla mungitura con le modalità previste dall'art. 10 del presente regolamento;

i) divieto di qualsiasi movimento da e per l'allevamento infetto, salvo autorizzazione per l'uscita di animali destinati all'immediata macellazione, da rilasciarsi ai sensi del decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320, e successive modificazioni;

l) i vitelli o annuoli nati da madri infette devono essere allevati in condizioni di isolamento e sottoposti alle opportune prove diagnostiche previste dall'allegato 1 al presente regolamento al fine di escludere l'eventuale trasmissione della malattia;

m) impiego del latte delle bovine infette prima dell'abbattimento, qualora non venga distrutto, unicamente per l'alimentazione animale, previo trattamento di risanamento nell'ambito dello stesso allevamento;

n) rimozione dall'allevamento del latte di animali sani appartenenti ad allevamenti infetti in contenitori separati, identificati con appositi contrassegni e utilizzato esclusivamente per la fabbricazione di latte trattato termicamente o di prodotti a base di latte, dopo essere stato sottoposto ad un idoneo trattamento termico da effettuarsi sotto il controllo delle autorità competenti. Tuttavia detto latte può essere risanato direttamente nell'azienda di produzione, a condizione che l'azienda stessa sia in possesso di specifico impianto per il risanamento del latte autorizzato dall'autorità sanitaria locale e sotto il costante controllo del servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio;

o) sistemazione del letame proveniente dai ricoveri o da altri locali di stabulazione utilizzati dagli animali in luogo inaccessibile agli animali dell'allevamento; il letame raccolto deve essere sottoposto ad appropriata disinfezione o conservato per almeno cinque mesi prima dell'uso. Parimenti devono essere sottoposti ad adeguati trattamenti secondo gli allegati al presente regolamento, i liquami provenienti dai ricoveri o da altri locali di stabulazione utilizzati dagli animali, qualora non vengano raccolti contemporaneamente al letame.

#### Art. 10.

##### Disinfezioni

1. Entro sette giorni dall'eliminazione dei capi di cui all'art. 7 e comunque prima di ricostituire l'allevamento, i ricoveri e gli altri locali di stabulazione, nonché tutti i contenitori, le attrezzature e gli utensili usati per gli animali, devono essere puliti e disinfettati sotto controllo ufficiale secondo l'allegato 3 al presente regolamento; il veterinario rilascia il relativo certificato di disinfezione. Il reimpiego dei pascoli sui quali hanno precedentemente pascolato tali animali non può aver luogo prima di sessanta giorni dall'allontanamento degli stessi.

2. Tutti i mezzi di trasporto, i contenitori e le attrezzature devono essere puliti e disinfettati, sotto controllo ufficiale, dopo ogni trasporto di animali provenienti da un allevamento infetto, nonché di prodotti, avanzi, materiale e sostanze provenienti da tali animali e che comunque siano stati a contatto con essi. Le aree di carico e di scarico degli animali devono essere pulite e disinfettate dopo l'uso.

3. Le disinfezioni previste per l'attuazione del presente regolamento sono effettuate sotto controllo della unità sanitaria locale competente per territorio utilizzando, ove presenti, le stazioni mobili di disinfezione.

#### Art. 11.

##### Controlli

1. Negli allevamenti riconosciuti infetti, i controlli su tutti i bovini e bufalini di età superiore a sei settimane riprendono dopo almeno sei settimane dall'eliminazione o l'allontanamento dei capi infetti e relative disinfezioni. Il ripopolamento è consentito dopo che tali animali abbiano reagito negativamente a due controlli tubercolinici distanziati di almeno sei settimane. Le misure di cui all'art. 9 del presente regolamento rimangono in vigore fino a che la seconda prova non abbia dato esito negativo.

#### Capitolo IV

##### ALLEVAMENTI, PROVINCE E REGIONI RICONOSCIUTI «UFFICIALMENTE INDENNI» DA TUBERCOLOSI

#### Art. 12.

##### Allevamento bovino o bufalino ufficialmente indenne da tubercolosi

1. È riconosciuto come allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi l'allevamento in cui:

a) tutti i capi sono esenti da manifestazioni cliniche di tubercolosi;

b) tutti gli animali di età superiore a sei settimane hanno avuto una reazione negativa ad almeno due prove diagnostiche ufficiali eseguite la prima sei mesi dopo la fine delle operazioni di risanamento di cui all'art. 11, la seconda sei mesi dopo la prima e le successive ad un anno di intervallo. Quando sul territorio nazionale o in una sua regione, in cui tutti i capi sono soggetti alle misure ufficiali di lotta contro la tubercolosi, la percentuale degli allevamenti infetti da tubercolosi non è superiore all'1% in occasione di due controlli succedentisi a distanza di un anno, tale intervallo può essere portato a due anni. Quando la percentuale degli allevamenti infetti non è superiore allo 0,2% in occasione di due controlli succedentisi a distanza di due anni, l'intervallo tra le prove può essere portato a tre anni. Quando la percentuale degli allevamenti infetti non è superiore allo 0,1% in occasione di due controlli successivi a distanza di tre anni, l'intervallo tra le prove può essere portato a

quattro anni e/o l'età alla quale gli animali devono essere sottoposti a tali controlli può essere portata a ventiquattro mesi. Le regioni, su parere conforme del Ministero della sanità, possono aumentare l'intervallo tra i controlli previa predisposizione di specifici piani di sorveglianza in collaborazione con l'osservatorio epidemiologico regionale veterinario, o in mancanza di questo con l'istituto zooprofilattico sperimentale territorialmente competente;

c) non è stato introdotto alcun bovino o bufalino senza la prevista certificazione (mod. D) di un veterinario ufficiale in cui si attesti che detto animale proviene da un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi. Ogni capo deve essere sottoposto all'arrivo nella nuova azienda a prova tubercolinica non prima di quindici giorni e non oltre quarantadue giorni dopo la partenza dall'allevamento di origine. Durante il periodo necessario per eseguire la prova allergica l'animale deve essere tenuto in isolamento.

2. Gli animali che si spostano nell'ambito di un territorio con qualifica di «ufficialmente indenne da tubercolosi», da almeno due anni e con il 99,8% di allevamenti in possesso della qualifica inedita, non sottostanno all'obbligo dell'effettuazione della prova diagnostica di cui alla lettera c) del precedente comma.

3. La prova diagnostica di cui alla lettera c) del comma 1, non è richiesta quando sul territorio nazionale la percentuale degli allevamenti infetti da tubercolosi è inferiore allo 0,2% e risulti da un attestato del veterinario ufficiale che l'animale:

a) è debitamente identificato;

b) proviene da un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi;

c) in occasione del trasporto non è entrato in contatto con bovini o bufalini non provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi.

4. L'attestato previsto alla lettera c) del comma 1, può non essere richiesto quando sul territorio nazionale da almeno 4 anni almeno il 99,8% degli allevamenti è ufficialmente riconosciuto indenne da tubercolosi e in cui gli allevamenti non ufficialmente indenni si trovano sotto controllo ufficiale, ed è vietato il trasferimento di capi da tali allevamenti salvo che gli stessi siano portati direttamente al macello sotto controllo ufficiale.

#### Art. 13.

##### Attestazione sanitaria

1. Per gli allevamenti bovini o bufalini riconosciuti ufficialmente indenni il servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio rilascia una apposita attestazione di «allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi sotto il controllo dello Stato» (mod. E). Tale attestazione ha una validità di un anno.

2. Per i singoli bovini e bufalini o per gruppi di tali animali appartenenti ad allevamenti ufficialmente indenni il servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio rilascia, su richiesta degli interessati, uno speciale certificato comprovante che gli

animali provengono da un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi sotto controllo dello Stato (modello D). Tale attestazione ha una validità di quindici giorni.

#### Art. 14.

##### *Province e regioni ufficialmente indenni da tubercolosi*

1. Il Ministro della sanità può dichiarare ufficialmente indenne da tubercolosi bovina il territorio delle singole province, di una o più regioni, qualora tutti gli allevamenti presenti sul territorio sono sottoposti a controllo ufficiale e il 99,8% degli allevamenti risulta ufficialmente indenne durante l'anno.

2. Per tutto il 1995, al fine di consentire agli uffici interessati il graduale adeguamento alla disposizione di cui sopra, per la concessione della qualifica in oggetto è sufficiente che la percentuale di infezione sia inferiore all'1%, calcolato sulla base di tutti gli allevamenti riscontrati infetti durante l'anno.

3. Una regione può essere dichiarata ufficialmente indenne da tubercolosi solo qualora tutte le sue province godano di tale qualifica.

#### Art. 15.

##### *Riscontro di tubercolosi in allevamenti già ufficialmente indenni*

1. Qualora in un allevamento bovino o bufalino ufficialmente indenne da tubercolosi un solo animale risulti positivo ad una prova diagnostica o qualora nello stesso allevamento sia diagnosticato un caso di tubercolosi nel corso dell'ispezione *post-mortem*, la qualifica deve essere sospesa fintanto che, eliminato entro otto giorni il capo infetto, tutti i rimanenti animali di età superiore alle sei settimane non abbiano reagito negativamente ad almeno due prove diagnostiche, la prima delle quali effettuata almeno due mesi dopo l'eliminazione dell'animale in questione, e la seconda ad almeno sei settimane di distanza.

2. Qualora in un allevamento bovino o bufalino ufficialmente indenne, più capi risultino positivi alle prove diagnostiche o all'ispezione *post-mortem*, la qualifica di ufficialmente indenne è revocata fintanto che tutti i rimanenti animali abbiano reagito negativamente ad almeno due prove diagnostiche, la prima delle quali effettuata sei mesi dopo la fine delle operazioni di ricambio di cui all'art. 11, la seconda sei mesi dopo la prima.

#### Capitolo V

##### DISPOSIZIONI PARTICOLARI

#### Art. 16.

##### *Prove cliniche relativi all'infestazione in animali di altre specie*

1. Nei casi in cui l'unità sanitaria locale competente per territorio ritiene che l'eventuale presenza di animali infetti di una specie può compromettere l'esito dei programmi

di eradicazione della tubercolosi, deve adottare nei confronti di ciascuna specie le misure previste dalle specifiche norme vigenti.

2. Allorché, nel corso dei controlli periodici, si sospetti che le persone, alle quali è affidata la custodia degli animali o che hanno contatti diretti o indiretti con essi, rappresentino un pericolo di diffusione del contagio, il servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio deve darne comunicazione al servizio di igiene pubblica.

#### Art. 17.

##### *Misure per le stalle dei commercianti*

1. I commercianti di bovini e bufalini da riproduzione sono tenuti ad attivare apposite stalle nettamente separate da quelle adibite agli animali da macello. Tali stalle, completamente isolate, igienicamente idonee e dotate di personale, automezzi ed attrezzature destinati esclusivamente ad animali provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi, indenni o ufficialmente indenni da brucellosi ed indenni da leucosi e scortati dalle certificazioni nazionali od internazionali previste per gli scambi di animali da allevamento, sono sottoposte a controlli veterinari almeno mensili da parte della unità sanitaria locale competente per territorio; in tali stalle deve essere altresì prevista un'adeguata separazione tra animali indenni e ufficialmente indenni da brucellosi; esse devono essere dotate inoltre delle attrezzature necessarie per la regolare pulizia e disinfezione dei locali di ricovero del bestiame.

2. I commercianti di cui al comma 1 sono altresì obbligati ad annotare su idoneo registro di carico e scarico, da tenere a disposizione per almeno un anno del servizio veterinario, la data di ingresso e di uscita degli animali nonché i relativi contrassegni di identificazione, gli estremi del modello 4 (decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320) e copia del relativo certificato sanitario.

3. I certificati sanitari di cui all'art. 13 possono essere rinnovati per ulteriori quindici giorni da parte del veterinario ufficiale se sono rispettate le misure previste dal presente articolo.

#### Art. 18.

##### *Conferma qualifiche precedenti*

1. Per l'applicazione delle disposizioni della legge 9 giugno 1964, n. 615, e successive modificazioni, nonché delle norme del presente regolamento, restano valide le qualifiche sanitarie acquisite nel corso di operazioni di bonifica e profilassi già effettuate per conto dello Stato.

#### Art. 19.

##### *Indennità di abbattimento*

1. Ai proprietari di animali abbattuti o macellati è corrisposta una indennità ai sensi della legge 23 gennaio 1960, n. 33, da corrispondersi secondo norme e criteri previsti dal decreto ministeriale 14 giugno 1963, e successive modificazioni, e del presente regolamento.



2. Per ottenere l'indennità di abbattimento gli interessati devono far macellare o abbattere tutti gli animali infetti al più presto e non oltre i termini stabiliti dal comma 1 dell'art. 8 del presente regolamento, e consegnare i relativi certificati di abbattimento (modello 9/33) alla unità sanitaria locale competente per territorio non oltre sessanta giorni dalla data dell'ultimo abbattimento unitamente alla richiesta di indennizzo.

3. Il servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio, su parere conforme dell'assessorato regionale alla sanità e dell'istituto zooprofilattico sperimentale competente per territorio, può disporre l'eliminazione di animali negativi alle prove ufficiali qualora la situazione epidemiologica, all'interno dell'allevamento, sia tale da farli ritenere infetti. Di tale operazione la regione dà comunicazione alla Direzione generale dei servizi veterinari del Ministero della sanità.

4. Le indennità di cui al presente articolo devono essere corrisposte entro novanta giorni dalla data di presentazione della domanda di indennizzo. Agli allevatori a cui non vengono corrisposte, senza giustificato motivo, le indennità, sono dovuti gli interessi legali maturati dopo il novantesimo giorno dalla presentazione della domanda stessa.

#### Art. 20.

##### *Introduzione di animali in allevamenti sprovvisti di qualifica*

1. Negli allevamenti sottoposti ad operazioni di risanamento che non abbiano ancora raggiunto la qualifica sanitaria di «ufficialmente indenne» ai sensi del presente regolamento, è vietata l'introduzione di bovini o bufalini non scortati da certificazione comprovante che provengono da allevamento riconosciuto ufficialmente indenne da tubercolosi e che non sono stati sottoposti, con esito negativo, ad un esame ufficiale per la tubercolosi secondo quanto previsto all'art. 12, comma 1, lettera c), del presente regolamento.

2. All'atto dell'introduzione tali animali perdono comunque la qualifica posseduta.

3. Gli allevamenti di nuova costituzione devono essere formati esclusivamente con capi ufficialmente indenni e pertanto acquisiscono la qualifica propria degli animali introdotti.

#### Art. 21.

##### *Adempimenti*

1. L'allevatore o il detentore è tenuto ad offrire la massima collaborazione per l'esecuzione delle operazioni di risanamento ed in particolare deve provvedere al contenimento degli animali e rispettare tutti gli obblighi previsti dal presente regolamento.

2. Gli allevatori che non sottopongono i propri animali alle operazioni di eradicazione nei confronti della tubercolosi e della brucellosi, non possono:

a) accedere a qualsiasi forma di contribuzione e/o prestiti agevolati erogati da una pubblica amministrazione, ivi compresi quelli di natura comunitaria;

b) commercializzare i prodotti lattiero caseari per l'alimentazione umana.

3. In caso di inadempienza le operazioni di risanamento sono eseguite d'ufficio, con addebito delle spese a carico del trasgressore.

4. Ne gli allevamenti bovini e bufalini nonché nello stallo del contadino è vietato:

a) l'uso di vaccini e di prodotti terapeutici e/o profilattici antitubercolari, nonché di qualsiasi altro prodotto o farmaco capace di alterare il risultato della prova allergica;

b) l'esecuzione di prove tubercoliniche, se non previamente autorizzate dal servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio;

c) l'impiego di personale di stalla affetto da tubercolosi.

#### Art. 22.

##### *Disposizioni finanziarie*

1. Le regioni e le province autonome sostengono con i fondi loro assegnati dal Fondo sanitario nazionale le spese relative all'esecuzione delle operazioni di cui al presente regolamento, e cioè:

a) le spese per la gestione di stazioni mobili di disinfezione;

b) le spese per i corsi di addestramento e formazione riservati ai medici veterinari destinati ad operare per l'applicazione delle norme del presente regolamento;

c) la gestione del sistema informativo e la sorveglianza epidemiologica;

d) tutte le altre spese ritenute necessarie per l'eradicazione della tubercolosi dagli allevamenti, nonché il pagamento delle prestazioni dei medici veterinari liberi professionisti autorizzati ad operare nell'ambito dei piani di profilassi e delle indennità di abbattimento dei capi riscontrati infetti ai sensi del presente regolamento.

2. Qualora le operazioni di profilassi e di risanamento dalla tubercolosi vengano effettuate contestualmente ai controlli per la brucellosi bovina e per la leucosi enzootica viene corrisposto ai veterinari ufficiali un unico compenso per allevamento controllato come previsto dalla normativa vigente.

#### Art. 23.

##### *Pianificazione nazionale e regionale*

1. Il Ministero della sanità, sentite le regioni, identifica le risorse disponibili, gli obiettivi da raggiungere, adotta un piano triennale per l'eradicazione della tubercolosi bovina e individua la sorveglianza epidemiologica come attività essenziale per la programmazione e la verifica delle attività svolte. Nel piano vengono altresì stabilite le caratteristiche del sistema informativo specifico per la tubercolosi e gli indicatori da utilizzare per la verifica dei



risultati e la riprogrammazione delle attività. Il piano è oggetto di aggiornamento annuale sulla base dei risultati raggiunti nell'anno, determinati dall'analisi degli indicatori di cui sopra. Per la definizione e la gestione del sistema nazionale di sorveglianza e del sistema informativo il Ministero della sanità si avvale del Centro nazionale di referenza per lo studio e la ricerca in epidemiologia, programmazione e informazione veterinaria di cui al decreto del Ministro della sanità 2 novembre 1991.

2. Le regioni, sulla base delle indicazioni del piano nazionale, preparano i piani triennali di eradicazione e li aggiornano annualmente sulla base delle eventuali modifiche del piano nazionale, nonché dei risultati raggiunti nell'anno, determinati dall'analisi di specifici indicatori.

#### Art. 24.

##### Abrogazioni

1. Il presente regolamento sostituisce ed abroga il decreto ministeriale 1° giugno 1968, e successive modificazioni, concernente «Piano nazionale per la profilassi della tubercolosi bovina».

Il presente decreto, munito del sigillo dello Stato, sarà inserito nella Raccolta ufficiale degli atti normativi della Repubblica italiana. È fatto obbligo a chiunque spetti di osservarlo e di farlo osservare.

Roma, 15 dicembre 1995

Il Ministro della sanità  
GUZZANTI

Il Ministro delle risorse  
agricole, alimentari e forestali  
LUCETTI

Visto, il Guardasigilli: CAIANIELLO  
Registrato alla Corte dei conti il 21 maggio 1996  
Registro n. 1 Sanità, foglio n. 108

ALLEGATO I

#### ESECUZIONE ED INTERPRETAZIONE DELLE PROVE DIAGNOSTICHE UFFICIALI

##### Operazioni preliminari:

Il veterinario ufficiale provvede alle seguenti operazioni:

1) verifica della registrazione ufficiale dell'allevamento e controllo degli esiti delle prove diagnostiche precedentemente effettuate e del rispetto degli eventuali provvedimenti emanati;

2) raccolta e registrazione sulla scheda ufficiale delle seguenti informazioni relative all'allevamento e di ogni altro dato utile alla formazione dei rilievi diagnostici ed epidemiologici:

- tipologia produttiva dell'allevamento;
- consistenza totale dell'effettivo e numero degli animali di età superiore a sei settimane;
- qualifica sanitaria attribuita all'allevamento;
- movimenti di capi in entrata ed uscita dopo l'ultimo controllo di stalla;

3) esame clinico (semiologia della collettività) ed identificazione dei singoli soggetti.

L'identificazione va estesa a tutti i soggetti presenti, compresi quelli sotto età diagnostica che devono comunque essere registrati sulla scheda ufficiale.

L'identificazione va praticata con tatuaggio o marca auricolare o altro metodo apposito, approvati dalla competente regione o provincia autonoma, secondo codici ufficiali di identificazione che contengano anche l'indicazione dell'U.S.L. e della provincia in cui ha sede l'allevamento.

L'identificazione deve essere individuale e deve consentire di risalire all'allevamento di origine.

##### Tecnica ed interpretazione delle prove ufficiali.

Sono riconosciute ufficialmente le seguenti prove per la diagnosi in vita di tubercolosi:

a) intradermotubercolinizzazione unica: inoculazione singola di tubercolina PPD bovina (5000 UTC in 0,1 ml);

b) intradermotubercolinizzazione comparativa: inoculazione contemporanea, in punti diversi distanti fra loro circa 12 cm disposti uno sotto l'altro, delle due tubercoline, aviare e bovina (5000 UTC di tubercolina bovina in 0,1 e 5000 U.I. di tubercolina aviare in 0,2 ml).

Negli animali giovani, sul cui collo non vi è abbastanza spazio per effettuare l'inoculazione delle due tubercoline a distanza sufficiente sullo stesso lato, potrà risultare conveniente praticare le inoculazioni ai due lati del collo in due punti corrispondenti;

c) la tubercolinizzazione deve essere effettuata nella cute del collo al limite fra il terzo anteriore e il terzo mediano.

##### Tecnica ed interpretazione delle reazioni di tubercolinizzazione.

Tecnica: tosare e pulire i punti di inoculazione, prendere fra il pollice e l'indice una piega della pelle in ciascuna delle zone depilate, misurare lo spessore con un cutimetro a molla ed annotarne il risultato. Introdurre obliquamente negli strati più profondi della pelle un ago corto montato su siringa graduata in 0,1 ml ed iniettare la dose di tubercolina. Non è autorizzata l'inoculazione della tubercolina con tecniche o strumenti diversi da quelli indicati. L'inoculazione è avvenuta in modo corretto se la palpazione rivela un piccolo gonfiore, delle dimensioni di un pisello, nel punto di inoculazione. A distanza di 72 ore misurare nuovamente lo spessore della piega cutanea in ciascuna punto e annotare il risultato. Tra una prova tubercolinica e la successiva deve intercorrere un periodo di tempo non inferiore alle sei settimane.

Interpretazione delle reazioni: l'interpretazione delle reazioni deve essere fondata su osservazioni cliniche e sulla registrazione mediante cutimetro a molla dell'aumento di spessore della piega cutanea nei punti di inoculazione, 72 ore dopo la prova:

a) 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 locale diffuso, essudazione, necrosi, dolore o infiammazione dei dotti linfatici regionali o dei linfonodi;

b) reazione dubbia: non si osservano segni clinici come quelli descritti al punto a) e l'aumento di spessore della piega cutanea è compresa fra 2 e 4 mm;

c) reazione positiva: si osservano segni clinici, come quelli descritti al punto a) o si riscontra un aumento di 4 mm o più dello spessore della piega cutanea nel punto d'inoculazione.

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

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

In casi particolari, per approfondimento diagnostico, il servizio veterinario dell'U.S.L. valuta l'opportunità di ricorrere alla intradermotubercolinizzazione comparativa, secondo i seguenti criteri interpretativi.

Reazione bovina negativa, ovvero reazione bovina positiva o dubbia ma di intensità pari o inferiore alla reazione aviare ed assenza di segni clinici in entrambi i casi = negativa.

Reazione bovina positiva o dubbia superiore da 2 a 4 mm alla reazione aviare ed assenza di segni clinici in entrambi i casi = dubbia.

Reazione bovina positiva, superiore di oltre 4 mm alla reazione aviare, ovvero presenza di segni clinici nel primo caso = positiva.

## ALLEGATO 2

**UTILIZZO DI TECNICHE ISTOPATOLOGICHE, IMMUNOISTOCHEMICHE E MOLECOLARI PER L'EVIDENZIAMENTO DI LESIONI E DI MICOBATTERI TUBERCOLARI SU MATERIALE FRESCO E TESSUTI FISSATI DI ANIMALI INFETTI MACELLATI O MORTI: DA EFFETTUARSI OVE RICHIESTO.**

**A. Esame anatomico-istopatologico.**

Il medico veterinario deve eseguire una accurata e meticolosa necropsia del bovino o bufalino abbattuto dopo la reazione tubercolinica positiva.

La sua attenzione deve essere volta in particolare agli organi di entrata del micobatterio e cioè polmone, intestino e fegato e soprattutto sui relativi linfonodi regionali. Su di essi devono essere eseguiti più tagli paralleli al fine di evidenziare l'eventuale presenza di tubercoli milari o submilari che altrimenti potrebbero sfuggire all'esaminatore.

Una volta riscontrata la o le lesioni sospette e una parte di esse deve essere fissata in formalina tamponata al 10% per gli esami istopatologici al fine di accertare la diagnosi o, eventualmente, di eseguire una diagnosi differenziale da lesioni simili, da parte del laboratorio autorizzato. Il laboratorio dovrà eseguire sulla sezione istopatologica la ricerca dei micobatteri mediante colorazione di Ziehl-Neelsen.

**B. Tecniche immunocitochimiche.**

Mediante l'utilizzo di anticorpi policlonali e monoclonali è possibile evidenziare la presenza di antigeni di micobatteri tubercolari in sezioni di tessuto opportunamente fissate in formalina tamponata al 10% e incluse in paraffina; il prelievo va eseguito subito dopo la macellazione dell'animale, su tessuti con lesioni possibilmente non calcificate.

La tecnica consiste in una colorazione immunocitochimica del tipo immunoperossidasi indiretta, in cui l'anticorpo policlonale (diretto contro antigeni comuni ai vari tipi di micobatteri) o monoclonale (diretto contro antigeni specifici dei vari micobatteri) si lega ai rispettivi antigeni presenti nel tessuto. I tessuti infetti presentano pertanto una positività finemente granulare nel citoplasma delle cellule giganti, dei macrofagi e nelle aree necrotiche.

Il metodo immunocitochimico presenta numerosi vantaggi. Infatti consente innanzitutto di diagnosticare un'infezione tubercolare molto più rapidamente rispetto all'isolamento. In secondo luogo presenta una maggiore specificità e sensibilità rispetto ai metodi di colorazione istochimica quali la Ziehl-Neelsen, in quanto rileva antigeni di micobatteri, frammenti di microrganismi morti o micobatteri con pareti «difettive» (a differenza della colorazione Ziehl-Neelsen che evidenzia solo micobatteri intatti) e con un notevole vantaggio sull'isolamento, che richiede comunque microrganismi vivi.

**C. Tecniche di patologia molecolare.**

**C1. Ibridazione in situ.**

Il metodo dell'ibridazione in situ si basa sull'osservazione che una catena singola di un frammento di DNA o RNA contenente una sequenza complementare si lega al DNA o RNA cellulare se esistono appropriate condizioni di temperatura, forza ionica e pH. Se poi il frammento di DNA o RNA viene preventivamente marcato con sostanze che segnalano l'avvenuta reazione (inarcanti radioattivi oppure biotina e sistema ABC) avremo la possibilità di una localizzazione morfologica precisa.

Tale tecnica effettuata su materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina è in grado di abbinare l'elevata specificità dell'evidenziazione della presenza di DNA o RNA di micobatteri alla localizzazione nella reazione in cellule specifiche.

**C2. Reazione a catena della polimerasi (PCR).**

Questa tecnica è una metodica di amplificazione di un segmento di DNA. Essa si basa sull'osservazione che per la sintesi di una nuova catena nucleotidica, una sequenza di DNA complementare, chiamato «primer», deve legarsi agli estremi 3' e 5' terminali del segmento di DNA da amplificare (DNA stampo). In questo modo la sintesi della nuova doppia catena di DNA avverrà ad opera di una DNA-polimerasi termostabile, attraverso l'aggiunta di nucleotidi complementari alla

catena-stampo, nella regione di DNA posta tra i due «primers». Dal momento che la nuova catena di DNA complementare è in grado di legare i «primers», in ogni ciclo replicativo la quantità di DNA sintetizzato doppia rispetto al ciclo precedente, con conseguente incremento logaritmico della sequenza di DNA da studiare. I vantaggi di questa tecnica sono rappresentati dalla purezza del DNA prodotto, dalla elevatissima specificità, dalla rapidità con cui possono essere ottenuti risultati altamente attendibili e dalla possibilità di amplificare sequenze piccolissime di DNA (fino a 1 ng). Quest'ultima caratteristica può essere utilizzata per tipizzare i diversi micobatteri patogeni e non presenti in un determinato campione sulla base di minime differenze specie-specifiche della sequenza nucleotidica del DNA.

Per l'effettuazione della reazione deve essere disponibile, almeno nelle fasi iniziali dello studio, materiale fresco o congelato (-20°/-80 °C) entro un'ora dalla morte dell'animale.

**TECNICHE DI ISOLAMENTO E DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI**

**1. Raccolta e trasporto dei campioni.**

La diagnosi definitiva di tubercolosi, o di altre micobatteriosi, richiede che i micobatteri siano isolati dal materiale inviato al laboratorio per la coltura.

L'efficacia diagnostica non dipende solo dai metodi usati per la coltura dei micobatteri ma anche dal modo con cui i campioni sono stati raccolti e trasportati.

**1.1. Raccolta.**

Tessuti, linfonodi, organi: pezzi di tessuto sospetti di contenere micobatteri vengono raccolti asetticamente e messi in contenitori sterili senza conservanti o fissativi.

**1.2. Trasporto.**

Il campione da esaminare deve arrivare il prima possibile e nelle condizioni migliori al laboratorio.

Per i tessuti, qualora l'invio al laboratorio non sia immediato, sarà necessario conservare il materiale a  $4 \pm 2$  °C per un massimo di quattro giorni.

Diversamente il campione va congelato.

**2. Tecniche di colorazione.**

La presenza dei micobatteri nei materiali clinici può essere dimostrata con l'esame microscopico di strisci colorati utilizzando la tecnica di Ziehl-Neelsen.

**3. Operazioni preliminari alla semina: metodi di decontaminazione.**

Il materiale clinico sospetto di contenere micobatteri, è spesso contaminato anche da altre specie microbiche. Pertanto prima di procedere alla semina, i campioni dovranno essere decontaminati con tecniche a diverso grado di lesività per micobatteri, rispettando strettamente i tempi di contatto con i rispettivi decontaminanti.

Le tecniche sotto descritte possono essere impiegate in alternativa.

**3.1. Idrossido di sodio 4%.**

- Trattare l'omogeneato con ugual volume di NaOH al 4%
- Mantenere in termostato a 37 °C per 30'
- Neutralizzare il sedimento con acido solforico al 10% goccia a goccia utilizzando il rosso fenolo come indicatore di pH
- Centrifugare per 15' a 3.000 g a 20 °C o per 20' a 2.000 g
- Eliminare il surnatante
- Riospendere il sedimento con 2 ml di tampone fosfato pH 6,8 e inoculare i terreni di coltura con 1 ml; destinare l'altro millilitro, diluito 1/10 in tampone fosfato pH 6,8 alla inoculazione degli animali da esperimento, qualora si voglia ricorrere alla prova biologica.

**3.2. Sodiiodododecilsolfato di sodio (Laurilsolfato di sodio) (SDS) 3,16% + NaOH 1%**

- Trattare l'omogeneato con ugual volume di decontaminante (SDS 3,16% + NaOH 1%)
- Mantenere a temperatura ambiente in agitazione per 40'
- Aggiungere acido fosforico 1,43% e Porpora di bromocresolo 0,005% fino a viraggio dell'indicatore al giallo arancio

- Centrifugare per 15' a 3.000 g a 20°C o per 20' a 2.000 g
- Eliminare il surnatante
- Risospendere il sedimento in 10 ml di soluzione fisiologica sterile
- Centrifugare per 15' a 3.000 g a 20°C o per 20' a 2.000 g
- Risospendere il sedimento in 2 ml di tampone fosfato pH 6,8 e inoculare con 1 ml i terreni di coltura; destinare l'altro millilitro, diluito 1/10 in tampone fosfato pH 6,8 alla inocolazione degli animali da esperimento, qualora si voglia ricorrere alla prova biologica.

### 3.3. Esadecilpiridinocloruro (HPC) (Cetilpiridinocloruro CCP) 1,5%

- Trattare l'omogenato con ugual volume di HPC 1,5%
- Mantenere a temperatura ambiente in agitazione per 30'
- Centrifugare per 15' a 3.000 g a 20°C o per 20' a 2.000 g
- Risospendere il sedimento in 2 ml di tampone fosfato pH 6,8 e inoculare con 1 ml i terreni di coltura; destinare l'altro millilitro, diluito 1/10 in tampone fosfato pH 6,8 alla inocolazione degli animali da esperimento, qualora si voglia ricorrere alla prova biologica.

### 4. Semina e terreni di isolamento.

La semina viene effettuata in ragione di 0,2 ml del preparato utilizzando i seguenti terreni colturali solidi preparati a becco di clarino a diversa selettività:

- 2 provette di Lowenstein-Jensen
- 1 provetta di Lowenstein-Jensen senza glicerina con 0,5% di piruvato di sodio o una provetta ai Stonebrink

### 5. Incubazione delle colture.

I terreni inoculati vanno posti in termostato a 37°C e una delle due provette di Lowenstein-Jensen a 43°C.

È preferibile usare un'atmosfera al 5-10% di CO<sub>2</sub>.

Le colture vanno esaminate in prima lettura dopo 2-5 giorni ed in seguito settimanalmente per 6-12 settimane.

### 6. Inoculazione di animali da esperimento.

Generalmente l'inoculazione in animali viene poco usata, esistendo numerose tecniche in vitro per l'isolamento e l'identificazione più specifiche.

Alla prova biologica si può ricorrere in parallelo all'esame colturale, nel caso in cui si sospetti la presenza di micobatteri in scarso numero nel campione o una forte contaminazione di questo.

Può essere utilizzata anche a fini identificativi (vedi tabella).

La prova biologica classica si effettua inoculando contemporaneamente 1 ml di omogenato decontaminato nel muscolo della coscia di 2 cavia, 1 ml per via intraperitoneale in due conigli e 1 ml per via endovenosa in due polli adulti.

PATOGENICITÀ DEI MICOBATTERI  
NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

	Cavia	Pollo	Coniglio
M. bovis	+	-	+
MAI complex	-	+	+
M. tuberculosis	+	-	-

\* M. avium-intracellulare complex

### 7. Identificazione.

Per identificare i micobatteri è necessario basarsi su diversi caratteri:

- l'acido resistenza
- tempo, temperatura e aspetto di crescita
- assenza di pigmento nei principali micobatteri di interesse veterinario
- tests biochimici

#### 7.1. Tab. 2.

IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA

Micobatteri	Crescita		Ureasi	Riduzione tellurito	Riduzione nitriti	Niacina
	37°	43°				
M. bovis	L	—	±	±	—	—
MAI complex	L	L	—	+	—	—
M. tuberculosis	L	—	±	±	+	+
Micobatteri rapida crescita	R	—	+	+	±	±

L = Crescita lenta > 7 gg

R = Crescita rapida < 7 gg

Tutte le prove devono essere eseguite a partire da colture abbondanti in attiva fase di crescita e vanno sempre accompagnate da controllo positivo e negativo.

#### 7.2. Ureasi.

- Inoculare 1 o 2 ansate di coltura in 4 ml di brodo contenente urea (2%), glucosio (0,1%) e rosso fenolo (0,0012%) (colorazione rosso-arancio) e incubare a 37°C per 3 giorni

- La reazione è positiva per viraggio del colore del terreno verso il rosso porpora

#### 7.3. Riduzione del tellurito.

- Inoculare 1 o 2 ansate di coltura in 5 ml di brodo Middlebrook 7H9 e incubare a 37°C per 7 o più giorni, fino a crescita visibile

- Aggiungere 0,1 ml di una soluzione acquosa di potassio tellurito allo 0,2% e reincubare per 4 giorni

- La reazione è positiva quando compare un precipitato nero

#### 7.4. Riduzione dei nitriti.

- Inoculare 1 o 2 ansate di coltura in 1 ml di substrato (Nitrato di sodio 0,01 M in tampone fosfato 1/45 M pH 7) e incubare per 2 ore per 37°C

- Aggiungere 0,1 ml di una soluzione acquosa di acido sulfanilico allo 0,8% e acido acetico al 28,5% e 0,1 ml di una soluzione acquosa di N,N-Dimetil-1-naftilammuna allo 0,6% e acido acetico al 28,5%

- La reazione è positiva per comparsa di colore rosso

- La reazione è negativa se il colore rosso compare solo dopo aggiunta di polvere di zinco

#### 7.5. Niacina.

- Aggiungere 1 ml di acqua distillata sterile ad una coltura in Lowenstein-Jensen, lasciare per 2 ore a temperatura ambiente affinché avvenga l'estrazione dal terreno

- Trasferire 0,5 ml dell'estratto in una provetta, aggiungere un ugual volume di soluzione alcolica di anilina al 4% e quindi aggiungere 0,5 ml di bromuro di cianogeno al 10% (da non inalare o mettere a contatto con la cute ed eliminare solo dopo alcalinizzazione con NaOH)

- Un immediato sviluppo di colore giallo indica la positività della reazione

Un'alternativa al metodo sopra descritto è l'utilizzo di strisce per il test Niacina reperibili in commercio.

## ALLEGATO 3

## NOTE

## TUBERCOLOSI

*Resistenza dei micobatteri nell'ambiente.*

- Locali: fino a 2 anni.
- Acqua: fino ad 1 anno.
- Terreno: fino a 2 anni.
- Pascoli: fino a 2 anni.
- Letame fino a 2 anni.
- Resistono a pH fortemente acido (pH 1) e fortemente alcaline.
- Sono rapidamente inattivati dalla luce solare.

Fra i microorganismi non sporigeni sono i più resistenti ai disinfettanti chimici.

*Disinfettanti efficaci.*

## Fenoli:

- fenoli sintetici (ortofenilfenolo);
- cresoli (cresoli saponati = lisolo).

## Aldeidi:

- formaldeide;
- giutaraldeide (az + lentix).

## Cloro:

- ipocloriti;
- cloraminc.

## Iodio: iodofori.

Tensioattivi anfoteri: azione parziale.

Peracidi: acido peracetico.

Ossido di etilene.

*Disinfettanti non efficaci.*

## Acidi:

- minerali;
- organici.

Alcali: idrato sodico ecc.

Biguanidi: clorexidina.

Tensioattivi cationici: ammoni quaternari.

*Disinfezioni nella pratica.*

Il trattamento deve interessare tutte le superfici con particolare riguardo a:

- mangiatoie;
- tazze d'abbeverata e abbeveratoi;
- centraline per distribuzione automatica di mangime.

1° trattamento con soluzione al 3% di fenoli sintetici in idropulitrice con acqua a 70/80 °C; tempo di contatto = 1 h.

2° con pompa irroratrice soluzione 6/8% di formalina (formaldeide 1,3-2,4%); tempo di contatto 3-4 h; oppure giutaraldeide soluzione 2%: tempo di contatto = 5 h.

In ambienti sigillabili auspicabile trattamento aggiuntivo con formaldeide gas oppure con terraonebulizzatore.

Lasciare agire per una notte ed arieggiare per 24 h.

Stalle di montagna raggiungibili a piedi.

Trattamento con fenoli (pompe a spalla) seguito subito dopo da fumigazioni con terraonebulizzatore (formaldeide + paracloroicenuolo).

*Stalle con presenza di animali.*

Ripetuti interventi con soluzioni di acido peracetico allo 0.3%; T.C. = pochi minuti; ipotizzabile anche l'impiego di alcool etilico 70% in acqua.

*Paddock in terra.*

Asportare deiezioni ed un sottile strato di terreno; spargere uno strato uniforme di calcio cloruro in polvere, quindi arare e rullare.

Consigliati anche trattamenti con formalina 10%, acido peracetico 1-2%.

*Sale di mangitura.*

- Ipoclorito di sodio 3% - T.C. = 1/2 ora.
- Iodofori 3% - T.C. 1/2 ora.
- Cioramina T1% - T.C. = 1 ora.

## AVVERTENZA:

Il testo delle note qui pubblicato è stato redatto ai sensi dell'art. 10, comma 3, del testo unico delle disposizioni sulla promulgazione delle leggi, sull'emanazione dei decreti del Presidente della Repubblica e sulle pubblicazioni ufficiali della Repubblica italiana, approvato con D.P.R. 28 dicembre 1985, n. 1092, al solo fine di facilitare la lettura delle disposizioni di legge alle quali è operato il rinvio. Restano invariati il valore e l'efficacia degli atti legislativi qui trascritti.

*Nota all'art. 2:*

— La legge 30 aprile 1976, n. 397, reca norme sanitarie sugli scambi di animali tra l'Italia e gli altri Stati membri della Comunità economica europea.

*Nota all'art. 19:*

— Il D.M. 14 giugno 1968 che reca norme per la corresponsione dell'indennità di abbattimento, è stato pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 237 del 17 settembre 1968.

*Nota all'art. 23:*

— Il D.M. 2 novembre 1991 concernente l'istituzione del Centro nazionale di referenza per lo studio e la ricerca in epidemiologia, programmazione e informazione veterinaria, è stato pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 265 del 12 novembre 1991.

9GG0314