



Ordinanza Reggenziale, n. 4 (pubblicata nell'albo del Palazzo Governativo in data 20 giugno 1972).

Istruzioni relative alla esecuzione della sieroaagglutinazione, della prova dell'anello e della reazione di deviazione del completamento per la diagnosi della brucellosi bovina

LA REGGENZA

Visto l'art. 179 del decreto 21 gennaio 1954 N. 3;

Visto l'art. 4, comma 2, della Legge 26 febbraio 1971, n. 8;

su proposta dell'Ufficio Agrario e dell'Ufficio di Igiene e Sanità;

su conforme parere del Congresso di Stato del 5 giugno 1972;

emette la seguente ordinanza;

Art. unico

Per la attuazione della Legge 26 febbraio 1972 n. 8, concernente il "piano nazionale per la profilassi della brucellosi e per il risanamento degli allevamenti", l'Ufficio Governativo Agrario e Forestale, sezione zooprofilattica, per la diagnosi della brucellosi bovina, si avvale degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali italiani, delle relative Sezioni diagnostiche e di altri laboratori autorizzati dal Ministero della Sanità italiano che provvedono alla esecuzione della sieroaagglutinazione e della prova dell'anello secondo le disposizioni previste nella direttiva della CEE, allegato C, del 26 giugno 1964, riguardante problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali della specie bovina e suina.

L'Ufficio Agrario per quanto concerne la reazione di deviazione del completamento si avvale parimenti dell'opera dei predetti Istituti, Sezione diagnostiche e laboratori, i quali adottano le norme tecniche indicate dalla Commissione scientifica Veterinaria della CEE nella ventisettesima riunione.

Vengono riportati di seguito i testi dell'allegato C - Brucellosi bovina e delle norme tecniche relative alla deviazione del complemento sopra menzionate.

ALLEGATO C - BRUCELLOSI BOVINA

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 (U.I.) agglutinanti 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 U.I. per ml.).
- 4) La lettura della sieroagglutinazione 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 1/1.000; se la lettura è fatta al 75%: tra 1/500 e 1/750.
- 6) Per la preparazione dell'antigene destinato alla sieroagglutinazione in tubi (metodo lento) devono essere utilizzati i ceppi di Weybridge n. 99 e USDA 119 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'agar-patata.
- 8) L'emulsione batterica deve essere effettuata con soluzione fisiologica (NaCl 8,5) fenicata allo 0,5%. Non deve essere usato il formolo.
- 9) Si devono incaricare del controllo ufficiale degli antigeni i seguenti istituti ufficiali:
- a)omissis
 - b) " "
 - c) " "
 - d) " "
 - e) Italia Istituto Superiore di Sanità, Roma
 - f) " "
- 10) Gli antigeni possono essere forniti concentrati purchè il coefficiente di diluizione richiesto sia indicato sulla etichetta del flacone.
- 11) Per effettuare una sieroagglutinazione 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 U.I. agglutinanti per millimetro.

B - PROVA DELL'ANELLO (RING-TEST)

- 12) Il ring-test deve essere effettuato sul contenuto di ogni bidone di latte dell'azienda.
- 13) L'antigene tipo da impiegare deve provenire da uno degli istituti elencati al punto 9, lettera a) - f).

- 14) L'antigene può essere colorato solo con l'ematossilina o il tetrozolo, si dovrà dare la preferenza all'ematossilina.
- 15) La reazione deve essere effettuata in tubi di diametro da 8 a 10 mm.
- 16) La reazione deve essere effettuata con 1 ml. di latte, addizionato a 0,05 ml. di uno degli antigeni colorati.
- 17) La miscela di latte e d'antigene deve essere tenuta in termostato a 37° C per almeno 45 minuti e per 60 minuti al massimo.
- 18) La reazione deve essere effettuata verso la 18.a ora successiva alla mungitura e 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.
- 19) Non si deve aggiungere formolo al campione. L'unico prodotto la cui aggiunta è autorizzata è il cloruro mercurico in soluzione da 0,2 % e in tal caso la proporzione tra la quantità di latte e la soluzione di cloruro mercurio deve essere di 10 a 1.

Norme tecniche relative alla deviazione del complemento applicata alla diagnosi della Brucellosi proposte in occasione della ventisettesima riunione della commissione scientifica veterinaria della Cee.

- 1) E' confermata l'adozione del siero preparato dal Bundesgesundheitsamt di Berlino come campione di referenza da impiegare nella reazione di deviazione del complemento.
- 2) Convenzionalmente si ammette che il siero campione contenga 1.000 unità di sensibilizzatrici per ml. (unità CEE).
- 3) I sieri in esame debbono essere inattivati nel modo seguente:
 - a) i sieri di bovini a 58° C per 30-50 minuti;
 - b) i sieri degli ovini, dei caprini e dei suini a 60° C per 30-50 minuti.
- 4) L'antigene sarà costituito da una sospensione di brucelle dei ceppi 99 Weybridge o 1119 USDA. E' sconsigliato l'impiego del Buck 19 per l'allestimento dell'antigene.
- 5) Come diluente si può usare la soluzione fisiologica NaCl 8,5 %) oppure la soluzione tampone veronal. L'impiego di questa ultima comporta una riduzione della quantità di complemento necessaria per la reazione.
- 6) Nella reazione il complemento sarà usato nella dose di una unità aumentata di un lieve eccesso, oppure di due unità come nella reazione secondo Kolmer.
- 7) Si raccomanda di completare la reazione con l'allestimento dei controlli indispensabili: controllo del potere anticomplementare dell'antigene e del siero, controllo del potere auxilitico del siero, controllo del complesso emolitico. E' indispensabile realizzare una reazione di controllo con un

siero sicuramente positivo impiegandolo a due diverse concentrazioni. La prima sarà messa a punto in modo tale da ottenere l'inibizione totale dell'emolisi (.....). La seconda sarà adeguatamente ridotta per ottenere l'emolisi completa. Questo siero dovrebbe essere liofilizzato, dopo essere stato esattamente titolato, e tenuto a disposizione in quantità sufficiente presso ogni laboratorio.

8) La reazione non può essere considerata negativa quando nei sieri in esame il titolo di sensibilizzatrici raggiunge le 30 unità CEE.

Sulla base delle norme tecniche sopra riportate e tenuto conto, altresì, dell'esperienza finora acquisita nella diagnosi sierologica della brucellosi bovina in campo nazionale, sono stabiliti i criteri di seguito indicati per la valutazione della sieroagglutinazione e della deviazione del complemento ai fini dell'applicazione delle norme previste dal D.M. Italiano 3 giugno 1968.

a) I bovini di qualsiasi età che non sono stati vaccinati debbono essere considerati infetti nei casi in cui il loro siero di sangue contenga 30 o più U.I. agglutinanti per ml. Tale criterio, benché assai severo, dovrà essere scrupolosamente applicato nei confronti dei bovini di allevamento sicuramente infetti. Laddove invece siano osservati tassi di agglutinine superiori al limite prescritto, ma relativamente modesti (30-60 U.I.), saggiando sieri di bovini appartenenti ad allevamenti che si possono ritenere non infetti sulla base dei dati anamnestici, epizootologici e clinici, dovrà essere eseguita sugli stessi sieri la deviazione del complemento. In tali casi saranno considerati indice di infezione brucellare i tassi di 30 o più unità CEE di sensibilizzatrici/ml.

Se è possibile, è raccomandabile eseguire a scopo di controllo, oltre alla deviazione del complemento, anche la prova di Coombs, che, come è noto, consente di evidenziare molto precocemente la infezione brucellare.

I certificati Mod. P. dovranno essere rilasciati solo per gli animali che hanno presentato alla sieroagglutinazione meno di 30 U.I. /ml..

b) I bovini che sono stati vaccinati col Buck 19 in età compresa tra i 5 e gli 8 mesi, debbono essere considerati infetti se presentano, da 12 mesi dopo il trattamento immunizzante a 30 mesi di età, 80 o più U.I. agglutinanti/ml. del proprio siero di sangue, così come se presentano 30 o più U.I. agglutinanti/ml., in età superiore a 30 mesi.

Per gli animali che appartengano ad allevamenti presumibilmente non infetti da brucellosi e che presentino tassi di agglutinine superiori al limite prescritto si farà ricorso alla deviazione del complemento come prova di appello.

Per quanto concerne la valutazione della deviazione del complemento, gli animali vaccinati nella età sopra indicata debbono essere considerati infetti se presentano, quando sono trascorsi almeno 12 mesi dal trattamento immunizzante, 30 o più U. CEE di sensibilizzatrici/ml.

c) I bovini vaccinati una o più volte col Buck 19 in età superiore agli otto mesi si considerano infetti se presentano, quando sono trascorsi almeno dodici mesi dal trattamento immunizzante, 30 o più unità CEE di sensibilizzatrici/ml. Tali animali presentano, di regola, 30 o più U.I. agglutinanti /ml. per lunghi periodi di tempo in conseguenza del trattamento immunizzante. Per tale motivo non deve essere tenuto in considerazione l'esito della sieroagglutinazione per stabilire se gli animali siano o meno infetti.

In merito all'impiego delle tre prove diagnostiche di cui trattasi, per la attuazione del D.M. It. 3 giugno 1968, si fa osservare che, in particolare, la prova dell'anello può essere adottata per il

controllo iniziale degli allevamenti e per il controllo periodico di quelli riconosciuti "ufficialmente indenni" o "indenni" da brucellosi, con le modalità indicate negli art. 5 e 9 del citato provvedimento.

Si deve invece far ricorso alla sieroaagglutinazione per conseguire il riconoscimento di allevamento "ufficialmente indenne" o "indenne" da brucellosi, con l'osservanza delle norme fissate al riguardo degli artt. 9 e 12 - La sieroaagglutinazione può essere altresì impiegata per il controllo periodico degli allevamenti già risanati, come previsto dall'art. 9.

La deviazione del complemento deve essere applicata, in base a quanto stabilito dall'art. 14, nei confronti dei bovini di età inferiore a 30 mesi che appartengono agli allevamenti "indenni", prima del rilascio del certificato Mod. L. Tale prova non è tuttavia richiesta se gli animali di cui trattasi presentano meno di 30 U.I. agglutinanti/ml.

Il ricorso alla deviazione del complemento è da ritenere peraltro necessario per saggiare, nella fase iniziale del risanamento, gli animali indicati in precedenza alla lettera c) nonché quelli che appartengono ad allevamenti infetti da lungo tempo e che presentano reazione negativa alla sieroaagglutinazione.

Si riafferma infine la inderogabile necessità che i competenti laboratori, nel comunicare agli Uffici Veterinari Provinciali l'esito delle prove di sieroaagglutinazione e di deviazione del complemento, provvedano a indicare i rispettivi titoli in U.I. agglutinanti/ml. e in U. CEE di sensibilizzatrici/ml.

Data dalla Nostra Residenza, addì 14 giugno 1972-1671 d.F.R.

I CAPITANI REGGENTI

Marino Benedetto Belluzzi - Giuseppe Micheloni

IL SEGRETARIO DI STATO

PER GLI AFFARI INTERNI

E. Della Balda