

VETERINARIA ITALIANA

Collana di Monografie

**PLEUROPOLMONITE CONTAGIOSA
DEL BOVINO (PPCB)**

Edito da
S. Prosperi e A. Pini



Veterinaria Italiana - Collana di Monografie
Aut. Trib. Teramo n. 299 del 16.5.1990

Progetto editoriale e stampa: Pégaso Edizioni s.r.l.
Fotocomposizione: Interlinea - Teramo

Ricevuto per la pubblicazione il 30 aprile 1991

*Alcune delle fotografie pubblicate sono state gentilmente fornite
dal Laboratorio Nacional de Investigaçào Veterinaria, Lisbõna, Portogallo*

LA PLEUROPOLMONITE CONTAGIOSA DEL BOVINO: RASSEGNA

Prosperi S.¹ - A. Pini²

Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria dell'Università di Bologna¹
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo. CESME²

Introduzione

La pleuropolmonite contagiosa dei bovini (PPCB) è una malattia infettiva specifica dei bovini, causata dal *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (piccole colonie) caratterizzata da una polmonite interstiziale fibrinosa e da pleurite che può decorrere in forma iperacuta, acuta, subacuta e cronica.

Fino al XVI secolo la malattia si mantenne in forma endemica nelle Regioni delle Alpi Orientali. Nel XVIII secolo si estese a macchia d'olio in tutta Europa. Nella metà del XIX secolo si diffuse negli USA, in Africa, Australia ed Asia.

La PPCB è anche nota con il nome di Polmonera che le fu dato da un medico italiano della Scuola Padovana nel 1550; la descrizione clinica fu fatta da Bourgelat nel 1765; la contagiosità fu sospettata da Chabert nel 1792 scatenando le avversioni della scienza ufficiale che sosteneva l'autogerminalizzazione delle malattie infettive.

Un testo sanitario pubblicato a Berna nel 1773 raccomandava l'abbattimento di massa degli animali malati per controllarne la diffusione. Nel 1850, ancor prima delle ricerche di Pasteur, per intuizione del veterinario francese Delafont e per i lavori di una commissione diretta da Bouley, fu messa in discussione la generazione spontanea della PPCB e fu avanzata l'ipotesi della contagiosità e dell'immunità post-infezione.

Nel 1898 Nocard e Roux ne isolarono e coltivarono l'agente eziologico. La malattia venne eradicata dagli USA agli inizi di questo secolo, dal Sud Africa nel 1924 ed in Australia la campagna di eradicazione iniziata nel 1959 fu portata a termine nel 1973.

Oggi essa è ancora presente in alcuni paesi dell'Asia ed in Africa, in una fascia compresa tra il tropico del Cancro ed il tropico del Capricorno.

In Europa la PPCB venne eradicata circa un secolo fa, tuttavia essa fu reintrodotta nella penisola Iberica in una data non ben precisata, probabilmente intorno agli anni cinquanta.

Nel 1984, nuovi focolai furono segnalati in Spagna a seguito di quelli denunciati in Francia nel 1983 in animali rientrati dal pascolo estivo sui Pirenei; nel 1989-90 la malattia è stata notificata nelle province di Madrid, Segovia, Contabria e Zamora.

In Portogallo la malattia è diffusa nel Nord e nel Centro del Paese. In Italia, da dove essa era stata eradicata nel 1899, la pleuropolmonite è riapparsa nel 1990.

Eziologia

M. mycoides subsp. *mycoides* tipo SC è l'agente eziologico della PPCB. Ceppi di *M. mycoides* tipo LC (grandi colonie) si isolano prevalentemente dalle capre, raramente dal bovino, nelle quali possono causare polmoniti, mastiti, poliartriti, congiuntiviti ed aborti.

La maggior parte dei ceppi produce filamenti ramificati, lunghi fino a 150 nm. *M. mycoides* è dotato di una capsula polisaccaridica costituita da gatlattano.

Il tipo LC si differenzia dal tipo SC per una spiccata attività proteolitica, mentre una differenziazione mediante i metodi sierologici convenzionali non è possibile.

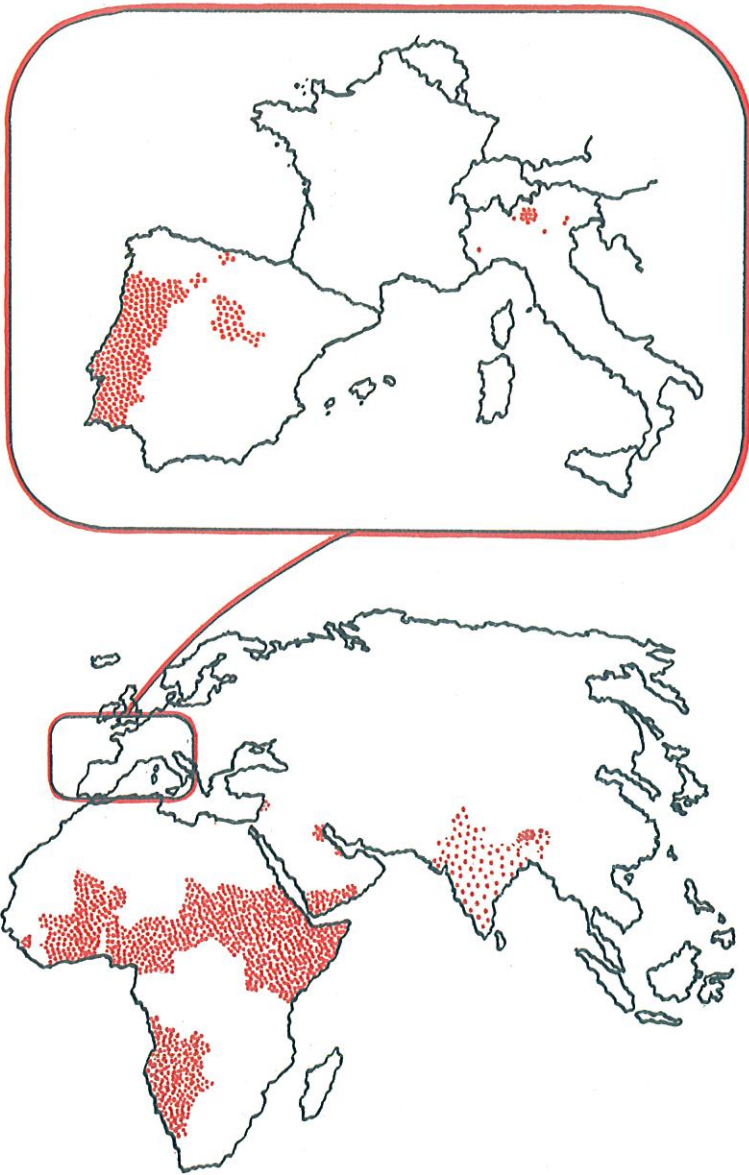
La resistenza del *M. mycoides* subsp. *mycoides* nell'ambiente esterno è scarsa: 2-3 giorni in climi tropicali e 1-2 settimane nei climi temperati. La resistenza al calore è modesta, 2 ore a 45°C. Nel parenchima polmonare sopravvive per alcune settimane ed a temperatura di congelamento per circa 12 mesi. Nel fieno contaminato sopravvive per una settimana.

È sensibile ai disinfettanti di comune impiego quali la formalina, il fenolo, il creosoto ed il latte di calce. In vitro, il micoplasma è sensibile all'ossitetraciclina, alla tetraciclina, al cloramfenicolo, alla streptomycinina ed alla tylosina.

Epidemiologia

Distribuzione

La distribuzione geografica della PPCB è illustrata nella Mappa 1.



Mappa 1.

Secondo l'annuario della FAO/WHO/OIE (1989) la malattia era presente nei seguenti paesi:

AFRICA			ASIA		
Angola	++	V	Buthan	?	V
Benin	+++	V	Burma	+	V
Burundi	+		India	+	
Burkina Faso	+	V	Kampuchea Rep.	+	
Cameroon	+	V	Kuwait	++	
Chad	-(1988)	V	Laos	?	
Costa d'Avorio	+	V	Libano	+	
Ethiopia	++		Qatar	+	
Gambia	-	V	Yemen	+	
Ghana	+	V			
Guinea	()	V	EUROPA		
Kenya	+	V	Spagna	+	
Liberia	-(1979)	V	Portogallo	+	
Mali	++	V			
Namibia	+	V			
Nigeria	++	V			
Senegal	+	V			
Sierra Leone	+	V			
Somalia	+	V			
Sudan	++	V			
Uganda	++	V			

Legenda:
 +++ frequenza elevata; ++ endemica; + bassa, sporadica;
 (+) casi eccezionali; () limitata a certe regioni; ? sospettata
 ma non confermata; - non diagnosticata; V vaccinazione

Recettività

Specie

Le due specie recettive più importanti sono il bovino (*Bos taurus*) e lo zebù (*Bos indicus*) (Figura 1).

La recettività delle due specie è analoga anche se in alcuni paesi africani ed in certe condizioni epidemiologiche la malattia, nello zebù, può decorrere in forma più grave che nel bovino.

Vengono segnalati come casi eccezionali quelli descritti nel bisonte (*Bison bonassus*), nello yack (*Pophagus grunies*) e nel bufalo domestico (*Bubalus bubalis*). Il bufalo selvatico (*Syncerus caffer*) non è recettivo.

La malattia è stata segnalata una sola volta nell'antilope alcina (*Hippotragus equinus*) e sono stati ritrovati anticorpi nello gnù (*Gorgon taurinus*) che tuttavia non è da considerarsi recettivo.

Razze

In Africa, sono state osservate variazioni di recettività legate alle razze. Alcune razze derivate dallo zebù quali la Dawara e la Borana in Somalia, la Masai in Tanzania, la Somba in Africa Occidentale sono resistenti ed i danni causati dalla malattia limitati; mentre altre, quali la Barotse e la Mashulumbive in Zambia, se colpite subiscono perdite gravi.

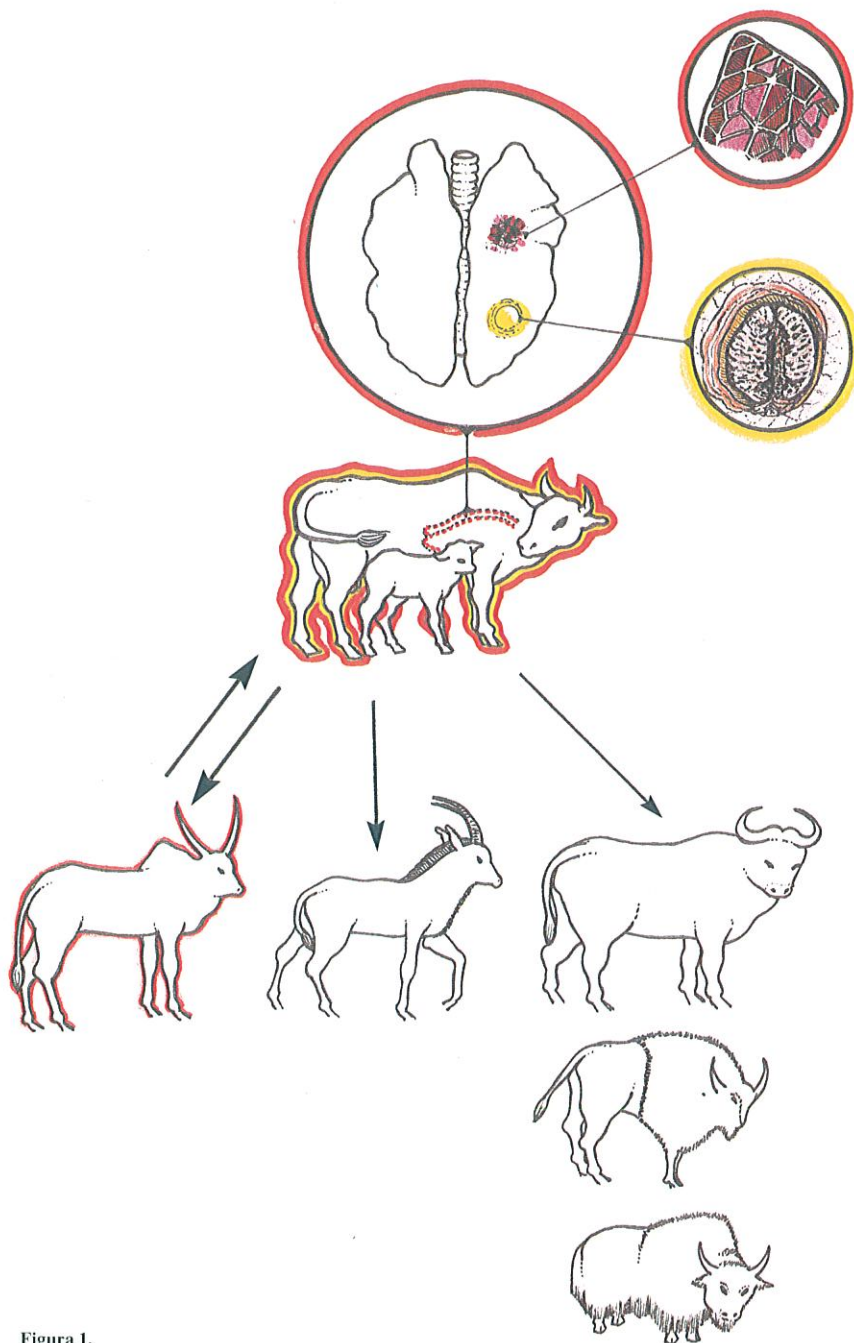


Figura 1.

Variazioni di sensibilità alla malattia esistono anche per le razze europee con la Jersey e la Frisona, probabilmente tra le più sensibili.

Età

In condizioni di infezione naturale la recettività è influenzata dall'età ed appare inversamente proporzionale ad essa: i vitelli, che si possono infettare da madri malate, hanno una debole recettività e presentano quasi esclusivamente lesioni a livello articolare e tendineo; le manze e i vitelloni tra i 12 ed i 16 mesi presentano una recettività intermedia, mentre la piena recettività viene raggiunta negli animali di oltre 2 anni di età.

Fattori individuali

Nei gruppi di bovini recettivi l'incidenza dell'infezione può arrivare fino al 90%. Nelle condizioni di campo, tuttavia, varia moltissimo anche in animali di specie, razza ed età omogenee, a causa di fattori di gruppo non bene identificabili e variabili nel tempo, ed a seconda della regione geografica e delle modalità di allevamento.

Modalità di trasmissione

In condizioni naturali la malattia si trasmette esclusivamente per contatto diretto mediante aerosol, cioè con la disseminazione di "microgoccioline di Flugge" emesse con colpi di tosse dall'animale infetto.

Una distanza anche di soli 6-12 metri che separi un allevamento infetto da uno sano, in funzione della temperatura, dell'umidità relativa e dei raggi UV, può essere sufficiente ad interrompere la catena epidemiologica. Tuttavia, con vento favorevole ad una velocità superiore ai 2 metri al secondo, le goccioline infette possono arrivare fino ad una distanza di 50-60 m.

Ricerche effettuate in Kenya hanno evidenziato, in condizioni sperimentali, la possibilità di trasmissione mediante urina infetta e per via traspacentare; tali vie sono da ritenersi non rilevanti ai fini della diffusione naturale dell'infezione.

Sperimentalmente la malattia può essere riprodotta con successo per intubazione endobronchiale profonda o mediante produzione di aerosol sempre che le particelle abbiano un diametro inferiore ad 1μ . L'inoculazione sottocutanea o intramuscolare provoca un edema sottocutaneo più o meno diffuso associato a volte a batteriemia e poliartrite.

Pertanto il rischio di introduzione di questa malattia in un paese indenne è strettamente legato all'importazione di bovini infetti e, in particolare, di portatori cronici oppure di portatori preclinici; è stato infatti dimostrato che

nei primi il micoplasma può sopravvivere per più di 12 mesi; nei secondi può rimanere nella mucosa delle cavità nasali fino a 40 giorni prima di provocare una reazione clinica e sierologica.

Patogenesi

In condizioni naturali *M. mycoides* subsp. *mycoides* penetra per via respiratoria, raggiunge i bronchi e successivamente i bronchioli dove determina una bronchiolite.

In seguito la lesione si estende al parenchima polmonare provocando focolai di broncopolmonite ed una contemporanea trombosi dei vasi polmonari. Molto probabilmente le lesioni primarie dei lobuli avvengono per via discendente, con interessamento degli alveoli periferici ed un processo essudativo a livello del connettivo interlobulare che a sua volta provoca linfoangiectasia e linfotrombosi.

Il processo trombotico dei vasi linfatici, se imponente, ostacola il processo di riassorbimento e di organizzazione della lesione, provocando una obliterazione delle vene e delle arterie con gravi fenomeni vasculitici e trombotici. Il processo flogistico comporta la presenza di elementi cellulari, intasamento eritrocitario dei capillari ed edema interlobulare, dando origine ad un essudato fibrinoso ed emorragico. Tale processo rappresenta la prima fase della polmonite fibrinosa corrispondente allo stadio di epatizzazione rossa.

Successivamente, all'essudato fibrinoso si sovrappone un afflusso di granulociti neutrofili che fluidifica la lesione; l'essudato fibrinoso ricco di leucociti provoca, a livello alveolare, una ischemia con zone di necrosi che corrispondono al quadro di epatizzazione grigia.

Se la diapedesi dei granulociti è tale da provocare una organizzazione e fluidificazione della lesione, questa evolve verso l'epatizzazione gialla, altrimenti non si ha la risoluzione ed i processi trombotici delle arterie danno origine a quei processi necrotici che determinano l'incapsulamento della lesione con la formazione dei tipici sequestri necrotici. In seguito il processo morboso si diffonde, con la stessa patogenesi, agli altri lobuli polmonari.

La localizzazione a livello pleurico ha una origine linfogenica, con essudazione fibrinosa e con evoluzione simile a quella polmonare. È stato constatato che le lesioni dovute a *M. mycoides* subsp. *mycoides*, nel 95% dei casi sono monolaterali e nel 94% sono localizzate nei lobi diaframmatici.

Inoltre, cercando di interpretare i meccanismi patogenetici che presiedono al linfotropismo, all'ipertrofia del tessuto connettivo e linfatico e alle lesioni a livello dei vasi linfatici e sanguigni, si è avanzata l'ipotesi che il

micoplasma, raggiunti gli alveoli, passi allo spazio linfatico, quindi ai capillari linfatici intralobulari ed infine ai rami extralobulari.

In seguito, attraverso il circolo linfatico, il micoplasma arriva ai linfonodi bronchiali ed al circolo sanguigno. Pertanto le lesioni al sistema linfatico sono le prime ad instaurarsi dando origine ad alterazioni di tipo circolatorio del linfatico regionale, fino all'ostruzione.

L'aumento della pressione linfatica porta ad una distensione delle trabecole interlobulari, dello spazio subpleurico e dei linfatici peribronchiali che, per il tipo di struttura, vanno facilmente incontro a collasso con invasione di tessuto connettivo. In seguito si avrà infiltrazione cellulare dovuta all'azione tossica del micoplasma. La coagulazione della linfa porta alla formazione di trombi, specialmente nella zona interlobulare.

Sintomatologia

Il periodo di incubazione della pleuropolmonite oscilla tra i 15 ed i 40 giorni, con un minimo di 5 ed un massimo di 207 giorni. Nei focolai francesi del 1983 gli animali che si erano infettati durante il pascolo estivo manifestarono la malattia in inverno.

Forma iperacuta

La forma iperacuta è estremamente rara. La morte dell'animale per asfissia subentra in una settimana. Questa forma si può osservare quando la malattia appare in un'area geografica precedentemente indenne, oppure nelle zone endemiche quando vengono introdotti animali recettivi.

Forma acuta

Il primo sintomo è rappresentato da rialzo febbrile tra i 40°C e i 41°C; in seguito compaiono segni di malessere generale quali depressione del sensorio, atteggiamento svogliato ed inappetenza, cessazione della ruminazione, caduta della produzione latte e congestione delle mucose.

Successivamente il quadro clinico si orienta verso l'apparato respiratorio con:

- tosse secca, che poi diventa profonda e grassa, facilmente provocabile;
- respiro discordante e frequente: 30-50 atti al minuto;
- narici dilatate, bocca aperta con lingua protudente, testa estesa sul collo;
- scolo nasale di tipo mucoso ed ipersalivazione;
- pleurodinia marcata;
- ottusità e subottusità dei lobi polmonari interessati;

ottusità monolaterale della parte inferiore del torace, con una linea di demarcazione che indica la presenza di un versamento;

soffio tubario nelle aree di ottusità e murmure vescicolare rinforzato nelle aree circostanti la lesione.

Nello stadio terminale le condizioni generali peggiorano (Foto 1), con anoressia, temperatura fino a 41°C-42°C, che in fase preagonica diventa subfebbrile; la morte sopravviene nel giro di 7-14 giorni ed è causata da asfissia e collasso cardiocircolatorio.

Nelle bovine in stato di avanzata gravidanza si può osservare occasionalmente l'aborto; esso è dovuto allo stato di tossicosi generale e non all'azione specifica del micoplasma.

Nei vitelli di età inferiore ai 6 mesi si possono osservare forme di artrite, con assenza di lesioni polmonari; quando sono interessati carpi e tarsi, si osserva una zoppia persistente, con articolazioni calde e dolenti.

Altre volte si può avere una localizzazione cardiaca con soffi valvolari e polso venoso.

Forma subacuta

È caratterizzata da una reazione termica poco elevata ed intermittente, durante la quale l'animale deperisce gradualmente. Di solito evolve nella forma cronica.

Forma cronica

Il passaggio alla forma cronica si manifesta in una certa percentuale di animali colpiti. Infatti, in condizioni naturali, il 40-50% degli animali colpiti va incontro a morte, il 25-35% guarisce clinicamente e batteriologicamente mentre il 25% cronicizza.

Con la cronicizzazione del processo gli aspetti clinici regrediscono; gli animali si presentano dimagriti con appetito capriccioso e febbre intermittente; successivamente anche questi sintomi possono regredire.

La forma cronica rappresenta, dal punto di vista epidemiologico, uno stadio importante di questa malattia in quanto permette la sopravvivenza del micoplasma nei momenti interepidemici.

Forma silente

Una forma silente di PPCB è stata descritta per la prima volta dai ricercatori australiani che l'hanno osservata in condizioni sperimentali. Essa è caratterizzata da assenza di sintomi e lesioni anatomico-patologiche in presenza di siero-conversione.

Più di recente Autori francesi hanno fatto, sempre in condizioni sperimentali, osservazioni analoghe. Essi descrivono un'infezione con prolungata escrezione dell'agente eziologico, in assenza di sintomi e lesioni e con una reazione anticorpale debole e fugace.

Questa forma silente potrebbe essere riportata alle condizioni ottimali di allevamento o all'uso di ceppi di micoplasma a bassa virulenza.

Lesioni anatomo patologiche

Le lesioni sono caratterizzate da un'inflammatione di tipo essudativo a livello della cavità toracica, che evolve verso differenti quadri di pleuropolmonite fibrinosa.

Anche se possono essere colpiti più lobi, abitualmente vengono interessati i lobi diaframmatici; le lesioni interessano quasi sempre un solo polmone (Foto 2 e 4).

All'apertura della cavità toracica si riscontra un edema pleurico, con accumulo di una grande quantità di liquido giallastro, fino a 30 litri, contenente materiale fibrinoso. A livello della pleura viscerale e parietale si formano bende e brandelli di fibrina, con un notevole ispessimento della pleura (Foto 3).

La pleurite può decorrere in maniera secca senza essudato, con aderenze dei foglietti pleurici e con aree di parenchima polmonare aderenti alla parete toracica; tale quadro si osserva nelle forme croniche.

L'evoluzione del fenomeno patologico a livello polmonare dipende dall'interessamento dei vasi sanguigni, in particolare delle arterie bronchiali dove si organizzano le lesioni iniziali: se l'anossia non è eccessiva e la necrosi non è molto estesa si può avere una risoluzione del processo con sterilizzazione batteriologica.

Tuttavia se le lesioni non vengono completamente riassorbite si possono instaurare dei processi di fibrosi: in tale evenienza i lobi colpiti si presentano atrofizzati, sclerotizzati ed atelettasici. Quando l'anossia si prolunga ed il processo necrotico si estende, le lesioni possono interessare uno o più lobi con un quadro di polmonite fibrinosa ai diversi stadi di epatizzazione (rossa, gialla e grigia) che conferiscono al parenchima il noto aspetto a "scacchiera".

Inoltre il processo flogistico a livello dei setti connettivali interlobulari provoca un edema ed un inspessimento con depositi sierofibrinosi.

Il complesso di queste lesioni evocano quel quadro che i primi Autori definirono "polmone marmorizzato" (Foto 5, 6, 7 e 8).

Quando il processo evolve verso la cronicizzazione, la lesione necrotica

può essere delimitata da una reazione fibroblastica che forma una capsula dello spessore anche di 1 cm. Tale lesione, del diametro di 2-25 cm, è nota come sequestro necrotico (Foto 9 e 10) il cui contenuto va incontro ad un processo a volte colliquativo.

I linfonodi mediastinici possono presentare aumento di volume, edema e piccoli focolai di necrosi (Foto 11).



Foto 1.

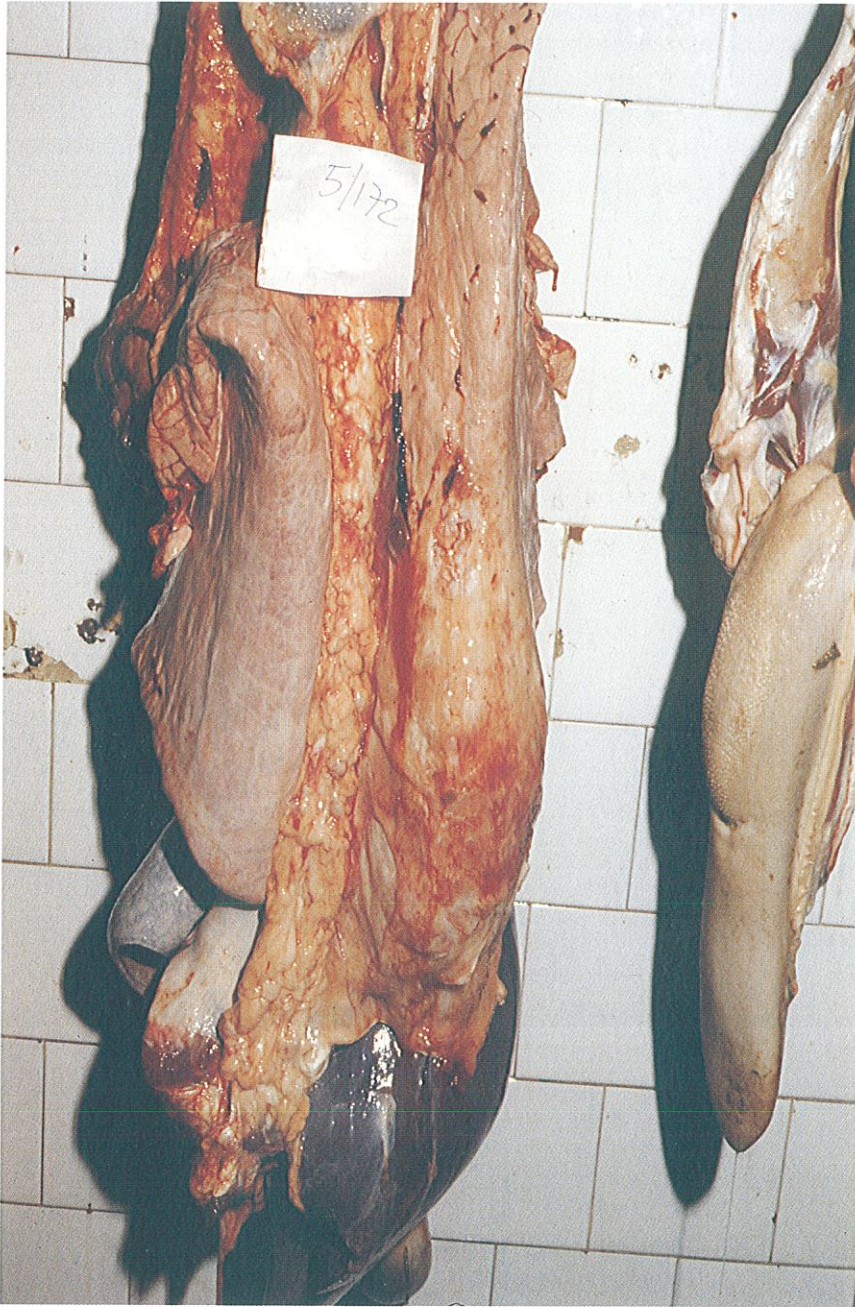


Foto 2.

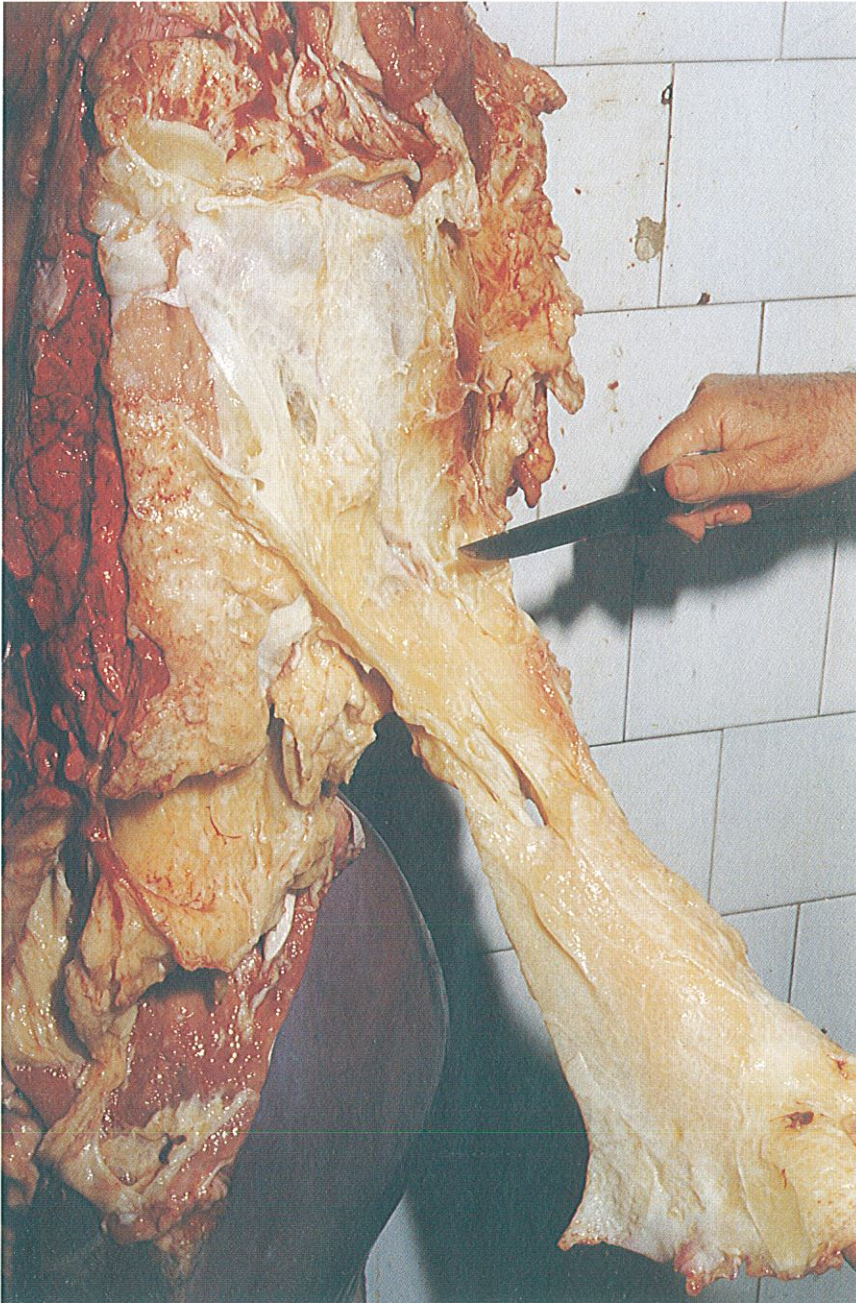


Foto 3.



Foto 4.

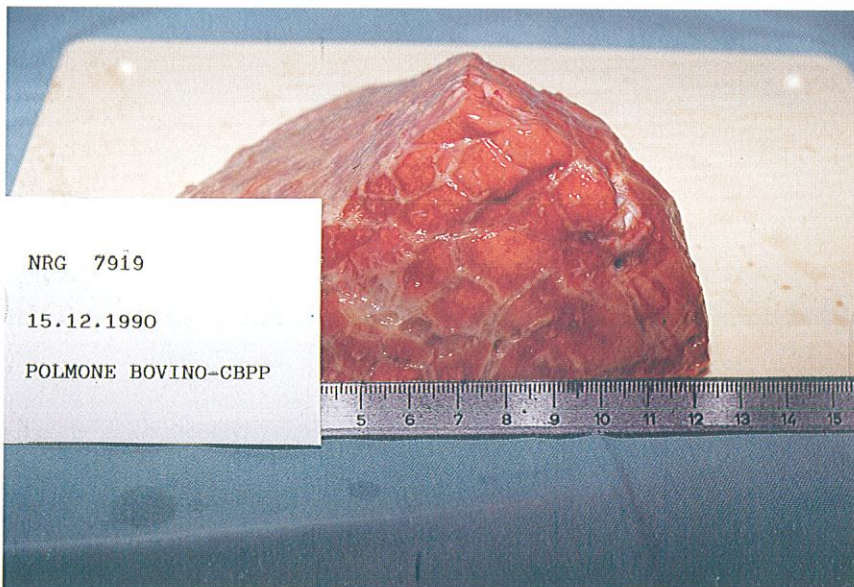


Foto 5.

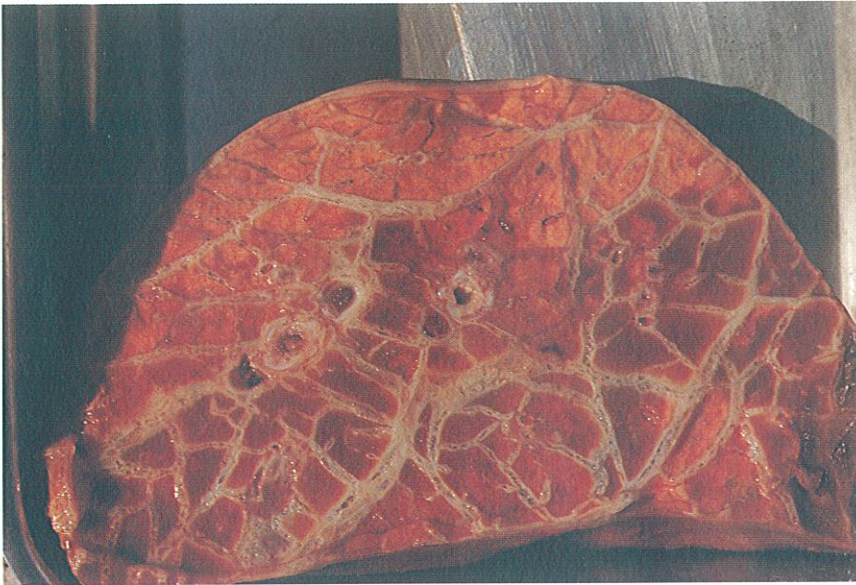


Foto 6.



Foto 7.



Foto 8.



Foto 9.



Foto 10.

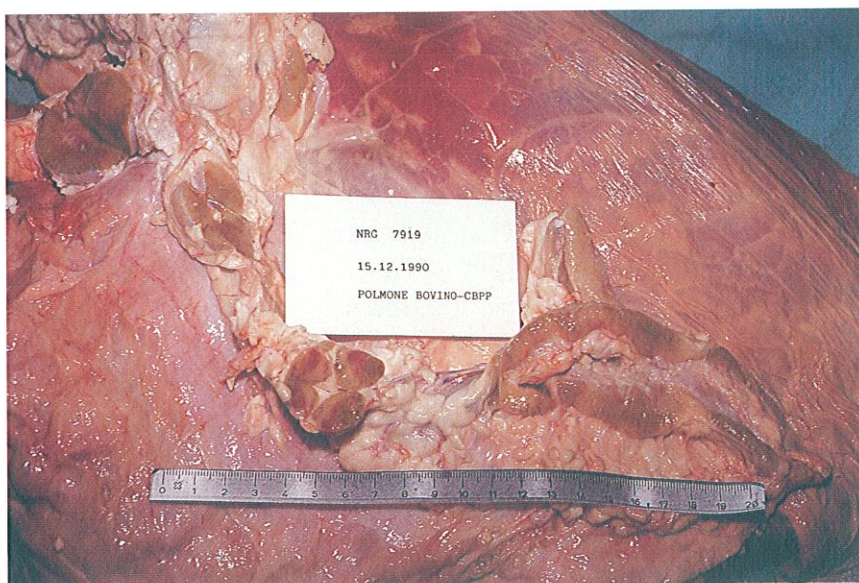


Foto 11.

Diagnosi

Diagnosi differenziale

La forma acuta della malattia è confondibile clinicamente con la pasteurellosi anche se, al tavolo anatomico-patologico, i due quadri non sono sovrapponibili. Innanzitutto nella pleuropneumonia, con l'eccezione dei casi iperacuti, viene sempre interessato un solo polmone e risultano colpiti più frequentemente i lobi diaframmatici. Inoltre il quadro di pleuropneumonia e le alterazioni a scacchiera sono tipiche.

I sequestri necrotici, specialmente quelli del diametro di 10-15 cm, non devono essere confusi con gli ascessi polmonari di varia origine, con i focolai tubercolari e con cisti parassitarie.

Diagnosi di laboratorio

La conferma della diagnosi di pleuropneumonia si ottiene in laboratorio, facendo ricorso a metodi diretti e/o indiretti.

Metodi diretti

L'isolamento di *M. mycoides* subsp. *mycoides* si effettua in terreni liquidi e solidi. Nei terreni solidi le colonie si sviluppano lentamente, hanno un diametro inferiore ad 1 mm con la classica forma di uovo fritto. Essendo le

associazioni di micoplasmi un fenomeno frequente, è possibile che solo la specie con potenzialità di crescita maggiore venga evidenziata.

Secondo Autori portoghesi e francesi tale situazione si può verificare con *Mycoplasma mycoides* subsp. *capriculum* isolato in Europa da bovini; infatti, quest'ultimo cresce rapidamente in 24-48 ore dando origine a colonie con un diametro superiore a 2 mm.

All'isolamento deve seguire l'identificazione mediante prove biochimiche: l'agente eziologico della PPCB fermenta il glucosio, non idrolizza l'arginina e non ha attività fosfatasica. All'identificazione biochimica deve seguire quella sierologica basata sull'inibizione di crescita e sulla determinazione di proteine specifiche mediante prove immunoenzimatiche.

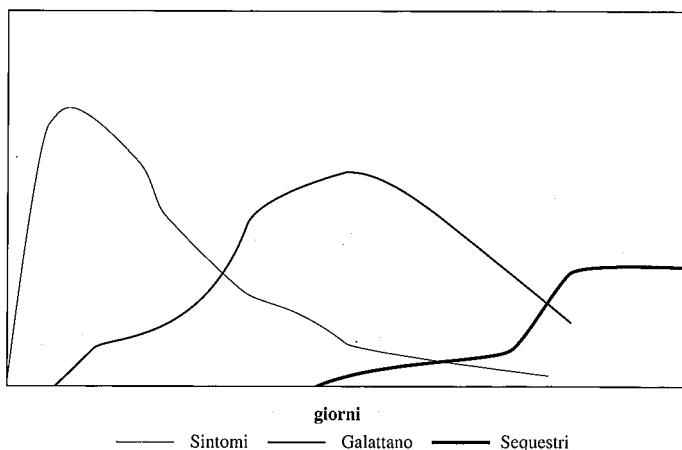
Metodi indiretti

Le prove sierologiche applicabili alla PPCB sono la fissazione del complemento (FDC), l'emoagglutinazione passiva (HAP), la precipitazione in agar gel (AGID) e l'Elisa.

La validità di queste prove ha dei limiti che sono collegati alle seguenti fasi della malattia:

- la fase prodromica;
- la fase terminale della forma acuta quando grandi quantità di antigene circolante (galattano) vanno a bloccare gli anticorpi dando luogo ad immunocomplessi;
- la fase cronica caratterizzata dalla presenza di sequestri (Figura 2).

Figura 2: Cronologia della comparsa di sintomi, galattano e sequestri.



La FDC è considerata prova d'elezione ed è stata scelta come prova ufficiale perché è quella che dà le maggiori possibilità di evidenziare la risposta anticorpale al micoplasma in questione. Le altre hanno una sensibilità più limitata nel tempo; ad esempio l'AGID è utile negli stadi iniziali dell'infezione perché in grado di evidenziare l'antigene circolante (galattano) prodotto dal micoplasma; l'HAP, pur evidenziando gli anticorpi più precocemente della FDC, dà risultati negativi nella fase ultima e nella fase cronica della malattia.

L'Elisa, per quanto non ancora messa completamente a punto, sembra evidenziare gli anticorpi negli stadi finali della malattia.

Le problematiche relative alla diagnosi sierologica mediante la FDC sono soprattutto legate a:

a. False negatività

Nella fase acuta, a causa della produzione di grandi quantità di antigene circolante, si possono formare degli immuno-complessi che mascherano gli anticorpi e quindi fanno risultare il test di FDC negativo.

Nella fase cronica, la FDC può risultare negativa perché la formazione dei sequestri può influenzare negativamente la risposta anticorpale.

b. False positività

Si possono riscontrare in animali apparentemente sani e che, all'esame anatomico-patologico, non presentano lesioni di PPCB. L'80% dei falsi positivi può essere dovuto ad infezioni intercorrenti da altri micoplasmi della specie bovina e che hanno antigeni comuni con *Mycoplasma mycoides* o da infezioni con *Mycoplasma capriculum*. Tali reazioni si evidenziano soprattutto nelle regioni indenni od a bassa incidenza di pleuropolmonite.

La problematica relativa alle false positività e false negatività può essere ovviata ripetendo le prove ad intervalli di 4, 8 e 12 settimane.

In tutti i casi è bene ricordare che la FDC deve essere utilizzata come prova di stalla.

Profilassi indiretta

Nei paesi in cui la malattia è endemica, la vaccinazione sistematica annuale della popolazione bovina a rischio, costituisce il metodo per il controllo della malattia.

La prima procedura immunizzante fu quella utilizzata dai pastori nomadi dell'Africa Orientale, consistente nel legare un pezzo di polmone infetto alla coda degli animali. Nel Tchad era in uso incidere la cute della regione frontale dell'animale per introdurre nel sottocute un pezzo di polmone infetto.

Nel 1850, Willems ispirandosi a queste metodiche, procedé all'immunizzazione dei bovini a rischio, inoculando, nella plica caudale, essudato pleurico ottenuto da animali infetti.

Più tardi si cercò di mettere a punto vaccini inattivati, ma essi furono abbandonati per la loro scarsa efficacia.

Più recentemente si fece uso di vaccini attenuati ottenuti mediante passaggi in embrione di pollo o tessuti di coltura. Alcuni di essi hanno avuto importanza limitata a causa delle reazioni locali e per il livello di patogenicità riscontrato in certe razze bovine o gruppi di individui. Altri sono stati e sono largamente usati in quanto non danno effetti collaterali ed inducono una buona immunità della durata di circa 1 anno.

Se la vaccinazione è, oppure è stata, in certi paesi utile a limitare i danni causati dalla pleuropolmonite, è sicuramente un metodo di profilassi che può essere giustificato solo nelle condizioni socio-economiche ed ambientali che caratterizzano i paesi in via di sviluppo.

Profilassi diretta

Nelle condizioni europee l'unica profilassi concepibile è quella sanitaria già dimostratasi efficace e sufficiente ad eradicare la malattia; il problema è e rimane l'applicazione delle misure di profilassi che non sempre vengono attuate con tempestività.

In un paese indenne bisogna evitare nella maniera più assoluta l'importazione di bovini da zone infette. Nel caso in cui vengano accordate deroghe all'importazione, necessita una certificazione rigorosa sugli animali da importare.

In un paese con focolai di prima insorgenza, la profilassi mediante abbattimento e distruzione degli animali infetti e di quelli che hanno avuto contatti con gli infetti deve essere attuata con rigore, unitamente ad appropriate indagini sierologiche ed ad una attenta sorveglianza nei macelli per evidenziare gli eventuali focolai secondari.

L'eradicazione della pleuropolmonite, come scrive Provost, ha come presupposto tre elementi che caratterizzano l'epidemiologia della PPCB:

il parassitismo stretto dell'agente eziologico unitamente al fatto che solo i bovini sono colpiti;

il contagio, che per verificarsi necessita di un contatto stretto, ripetuto e prolungato;

la continuità dell'infezione perpetuata dagli animali apparentemente guariti.

In Italia la profilassi contro la PPCB è disciplinata, oltre che dal Regolamento di Polizia Veterinaria, 8 febbraio 1954, artt. 76 e 77, dal T.U. delle leggi sanitarie 1265 del 27 luglio 1934, artt. 264 e 265, dalla legge 34 del 23 gennaio 1968 e successive modifiche 98/65 e 218/88 unitamente al decreto 290/89. Tali leggi sanciscono l'obbligo di denuncia dei casi sospetti e di sequestro degli animali presenti nell'allevamento, di abbattimento degli animali infetti e, se necessario, di quelli sospetti di infezione e di contaminazione, regolano gli indennizzi e stabiliscono i provvedimenti di urgenza che devono essere presi dal Sindaco e/o dal Prefetto in merito alla dichiarazione di zona infetta e di protezione. Inoltre l'OM del 9 ottobre 1984 rende obbligatoria la denuncia della malattia alla Commissione della CEE.

In questo ambito la decisione 91/56/CEE del 21 gennaio 1991 regola l'esportazione dei bovini verso gli altri paesi comunitari. I bovini che originano dalle zone infette, comprese in un'area con un diametro di 3 Km. attorno al focolaio, non possono essere esportati fino a quando tutti gli animali residenti nella zona e di età superiore ai 12 mesi non siano risultati negativi a tre prove sierologiche eseguite, mediante la fissazione del complemento, a tre settimane l'una dall'altra. Per le altre zone è ammessa l'esportazione sempre che gli animali di età superiore ai 12 mesi siano stati sottoposti, con esito negativo, a tre prove sierologiche eseguite nei 12 mesi precedenti l'esportazione. L'ultima di queste prove deve essere effettuata a meno di 30 giorni.

Infine, con la decisione 91/57/CEE del 24 gennaio si autorizza l'abbattimento presso macelli designati degli animali provenienti da allevamenti infetti. In tali casi le carni possono essere ammesse al commercio sempre che esse siano adatte al consumo.

Sempre con la stessa decisione la Commissione elenca le condizioni per l'erogazione di un contributo pari al 50% delle spese sostenute per l'indennizzo dei proprietari degli animali abbattuti o distrutti, per le operazioni di disinfezione e disinfestazione delle aziende e delle attrezzature e la distruzione dei mangimi. Attualmente la Direzione Generale dei Servizi Veterinari (DGSV) ha elaborato un piano di controllo ed eradicazione che sarà gestito, per quanto di competenza, dalla DGSV, dai Servizi Veterinari degli Assessorati Regionali alla Sanità, dalle UUSSLL, dal Laboratorio Nazionale di Referenza presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise e dai Laboratori diagnostici degli Istituti Zooprofilattici.

Il piano prevede:

l'identificazione degli animali al fine di poterne rintracciare la provenienza;

una attenta sorveglianza ai macelli e su tutti i bovini morti e macellati d'urgenza a seguito di sindromi respiratorie;

una indagine sierologica conoscitiva condotta sul territorio nazionale;

il controllo sierologico degli animali in compravendita; quelli da ingrasso saranno controllati su base campionaria mentre quelli da riproduzione nella loro totalità.

LE TECNICHE DI LABORATORIO

Sanguinetti V¹. - P. Semprini² - G. Semproni²

Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria dell'Università di Bologna¹
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo. CESME²

Le modalità per l'invio e la conservazione del materiale patologico sono descritte nel capitolo: Prelievo di campioni per la diagnosi di laboratorio.

L'isolamento di *M. mycoides* subsp. *mycoides* non presenta generalmente particolari difficoltà; è bene ricordare però che nel caso di forme croniche questo micoplasma può essere presente nelle lesioni in quantità modesta, che gli animali possono essere trattati con antibiotici e che frequentemente nel polmone di bovino si ritrovano altre specie di micoplasmi, spesso dotate di migliori capacità di crescita. In queste condizioni l'isolamento può essere difficile ed è quindi indispensabile seguire con precisione le tecniche indicate, iniziando dalla scelta corretta del materiale patologico per passare alla diluizione e semina, fino alla clonazione delle colonie e loro identificazione.

Le tecniche impiegate sono quelle usate nel laboratorio di referenza europeo di Lisbona e presso l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux di Maisons Alfort e sono le uniche da considerare come ufficialmente riconosciute in Italia.

DIAGNOSI DIRETTA

Non esiste un terreno polivalente che permetta l'isolamento di tutte le specie di micoplasmi riscontrate nei bovini. La scelta del terreno viene fatta in funzione di specie mirate.

Questi terreni non sono altamente selettivi, per cui è facile che si sviluppino su di essi colonie di specie prive di potere patogeno, senza che sia

possibile differenziarle sulla base dell'aspetto morfologico. L'isolamento di un micoplasma non ha dunque alcun significato patologico fino a che non viene effettuata l'identificazione.

Le associazioni di micoplasmi sono frequenti: *M.bovis* e *M.arginini* sono spesso isolati simultaneamente. Questa possibilità di associazione è un problema costante e l'utilizzo di terreni selettivi, in funzione della morfologia delle colonie, è impossibile. Spesso viene messa in evidenza solo una specie: in casi di presenza simultanea di *M.bovis* e *M.arginini*, il primo ha potenzialità di crescita inferiori al secondo per cui il *M.bovis* può scomparire nel corso dei passaggi con la conseguente messa in evidenza del *M.arginini* apatogeno. Neanche il test di immunofluorescenza indiretta effettuato sulle colonie sviluppatesi in agar, nel corso del primo isolamento, permette la definizione di questa mescolanza.

Tecnica di isolamento

Il materiale prelevato omogeneizzato in brodo triptosio a pH 7,8 o in soluzione fisiologica tamponata è centrifugato a 1500 giri/min. per 10'. Dal surnatante vengono allestite 4 diluizioni in base 10 (0,2 ml omogenato + 1,8 ml di brodo);

ciascuna diluizione è seminata in brodo ed in agar (vedi terreni) e l'incubazione è effettuata a 37°C in camera umida. La prima lettura è eseguita a 72 h. L'incubazione può essere protratta per 8 giorni;

con l'ultima diluizione in cui si ravvisa una crescita visibile (intorbida-mento del brodo) effettuare 3 o 4 diluizioni in base 10 e seminare una piastra di agar (vedi terreni) depositando una goccia sul terreno e lasciandola scivolare lungo lo stesso mantenendo la piastra inclinata;

incubare a 37°C da 48 a 72 h. Se non sono visibili colonie riferibili a micoplasmi, prolungare l'incubazione per 6 giorni con lettura ogni 48 h. Trascorso tale periodo, se non c'è stato sviluppo, la ricerca di micoplasmi è considerata negativa.

Le colonie di *M.mycooides* subsp. *mycooides* appaiono piccole (inferiori a 1 mm) a forma classica di "uovo fritto".

Su tali colonie vengono eseguite le prove necessarie alla identificazione.

È da tenere presente una eventuale distinzione da ceppi di *M.mycooides* di origine caprina (LC) frequenti in Europa, ma che non sembrano essere patogeni per i bovini.

Essi si distinguono dall'agente della PPCB per i seguenti motivi:

hanno grande velocità di crescita, l'opacità del terreno è raggiunta in

24-48 h;

le colonie hanno diametro maggiore di 2 mm e sono visibili su agar già a 24-48 h;

posseggono uno spiccato potere proteolitico;

posseggono una termoresistenza relativa che permette loro di sopravvivere a 45°C per 48 h.

Prove di identificazione

Prova preliminare

Sensibilità alla digitonina: seminare il terreno di isolamento all'agar con l'ultima diluizione che presenta torbidità. Spargere la coltura su tutta la superficie, quindi depositare un disco di digitonina, leggere dopo 48 h d'incubazione: se il diametro di inibizione è >3 mm si è in presenza di un micoplasma, se è <3 mm si è in presenza di un Acholeplasma.

Prove Biochimiche

Fermentazione del Glucosio: il risultato della prova è positivo se il terreno vira al giallo, giallo limone, per l'acidificazione dello stesso. Se il terreno, dopo 8 giorni di incubazione non vira di colore, il risultato è considerato negativo.

Idrolisi dell'Arginina: il risultato è positivo se il terreno vira al viola (alcalizzazione). Se il terreno, dopo 8 giorni di incubazione, non vira di colore, il risultato è negativo.

Ricerca delle Fosfatasi: dopo 4 giorni di incubazione aggiungere 1 goccia di NaOH 10N nel tubo di coltura:

viraggio al rosa: risultato positivo;

assenza del viraggio: risultato negativo.

Nel caso di *M.mycooides* subsp. *mycooides*. i risultati delle prove biochimiche sono: Glucosio positivo; Arginina negativa; Fosfatasi negativa.

Identificazione sierologica

Eseguire le prove biochimiche, occorre procedere a quelle sierologiche:

Inibizione della crescita: la crescita e moltiplicazione dei micoplasmi viene inibita dagli anticorpi specifici dei sieri di referenza;

Immunofluorescenza: utilizza anticorpi marcati alla fluoresceina e viene eseguita sulle colonie;

Dot Immunobinding: consiste nella determinazione, attraverso una prova immunoenzimatica delle proteine specifiche a partire dal campione depositato su una membrana.

Terreni per l'isolamento di *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*

Brodo

A) Brodo PPLO(DIFCO)	21	g
Tryptosio (DIFCO)	10	g
Glucosio	1	g
Estratto di lievito DIFCO	5	g
Acqua distillata	700	ml

Fare sciogliere a bagnomaria e poi aggiungere:

B) Estratto di lievito fresco 25% P/V	100	ml
Siero di cavallo (inattivato)	200	ml
Penicillina	200.000	UI
Acetato di tallio	1,25	ml

Portare il pH a 7,6-7,8 e sterilizzare per filtrazione.

Agar

Il terreno solido si ottiene aggiungendo:

Agar Noble Difco	10 g
------------------	------

alla soluzione A del terreno liquido.

Terreni per prove biochimiche

Terreno base

A) Heart Infusion Broth (DIFCO)	180	ml
DNA (sol. 0,2%)	2,6	ml
Estratto di lievito (25% p/v)	20	ml
Rosso fenolo (0,06% p/v)	7,5	ml

Sterilizzare per Seitz

Aggiungere:

B) Siero inattivato di cavallo	2%
Penicillina	400 UI

Fermentazione glucosio

Aggiungere alla soluzione A del terreno base:

Glucosio (50% p/v) 2 ml
pH terreno 7,8

Idrolisi dell'Arginina

Aggiungere alla soluzione A del terreno base:
Cloridrato di L-arginina (30% p/v) 8,5 ml
pH del terreno 7,3

Attività fosfatasica

Heart Infusion Broth (DIFCO) 148 ml
Estratto di lievito (25% p/v) 10 ml
Fenoftaleina difosfato di sodio (1% p/v) 2 ml
Sterilizzare per filtrazione.
Aggiungere:
Siero di cavallo (inattivato) 20%
Penicillina (conc. finale) 400 UI/ml
pH 7,8

DIAGNOSI INDIRETTA

Prova di fissazione del complemento

Questa tecnica è stata messa a punto in accordo con le decisioni prese nella riunione del 16 e 17 giugno 1983 a Bruxelles tra i Paesi membri della CEE.

Attrezzature

bagnomaria a 56°C
bagnomaria a 37°C
frigorifero a 4°C
piastre da microtitolo con pozzetti con fondo a "U"
materiale per micrometodo
agitatore per piastre
centrifuga

Soluzioni

Tampone veronal (VBS)

NaCl 85 g
5:5 ac. dietilbarbiturico 5,75 g
Na 5:5 dietilbarbiturato 3,75 g

Sciogliere l'acido dietilbarbiturico in 500 ml H₂O distillata bollente.
 Aggiungere il Na dietilbarbiturato e portare a 2 litri con H₂O distillata.
 Autoclavare a 15 p.s.i. per 20' e conservare a 4°C ben chiuso.
 Diluire 1:5 per l'uso e misurare il pH di ciascuna bottiglia, sia prima
 che dopo la diluizione.
 Aggiungere la soluzione di Calcio e Magnesio: 5 ml.

Soluzione di Calcio e Magnesio

Cloruro di Ca anidro (0,3 M)	3,7 g
Cloruro di Mg anidro (1 M)	9,5 g

Portare a 100 ml con H₂O distillata. Filtrare su filtro Millipore.
 Conservare in frigorifero in piccole aliquote.
 Per ogni litro di tampone 5x aggiungere 2,5 ml di soluzione stock.

Soluzione di Alsever

Glucosio	20,5 g
Sodio Citrato · 2H ₂ O	8,0 g
Sodio Cloruro	4,2 g
Acido Citrico	0,55 g

Sciogliere in 900 cc di H₂O e successivamente portare ad un litro.
 Controllare il pH che deve essere 6,1-6,2.
 Se necessario, aggiustare il pH con una soluzione di Acido Citrico al
 10%.
 Filtrare per Millipore e distribuire in bottiglie da 500 cc.
 Le bottiglie dovranno essere ermeticamente chiuse.

Preparazione globuli rossi di montone (GR)

In una siringa o in un matraccio si pone un volume di Alsever pari ad
 1/2 del volume di sangue da raccogliere, dopo di che si procede al salasso.

Il sangue così raccolto viene centrifugato per 10' a 1500 giri.

Si elimina il supernatante.

A questo punto i GR sedimentati sono sospesi in VBS in una proporzione
 di circa 1 volume di GR in 5 volumi VBS e nuovamente centrifugati per 10'
 a 1500 giri. Si scarta il supernatante e con una pipetta Pasteur si eliminano i
 globuli bianchi presenti (i globuli bianchi si presentano come una patina
 grigiastra sulla superficie dei GR).

Ripetere il lavaggio in tampone una seconda volta possibilmente in
 provette coniche, così da avere i GR ben sedimentati.

I GR possono essere usati freschi o conservati in frigorifero per parecchi

giorni previa aggiunta di soluzione di Alsever in proporzione di 1:15.

In quest'ultimo caso, i GR vanno nuovamente centrifugati e lavati con VBS con le modalità già descritte.

Standardizzazione dei globuli rossi di montone

Sospendere 8 ml di GR lavati in 92 ml di VBS;

prendere 9.5 ml di H₂O distillata ed aggiungere 0.5 ml di GR precedentemente diluiti: i GR verranno completamente lisati;

contemporaneamente mescolare 9.5 ml di H₂O e 0.5 ml di VBS: questa soluzione servirà da bianco per lo spettrofotometro;

leggere allo spettrofotometro a D.O. 545 nm: in base alla densità ottica ricavare, dalla curva di taratura, la percentuale desiderata di GR;

aggiustare infine la sospensione madre dei GR alla percentuale voluta.

Titolazione dell'emolisina (H)

Viene titolata in provetta.

Effettuare, in provetta, diluizioni scalari dell'emolisina: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, ecc. secondo lo schema seguente:

Diluizione	Emolisina (ml)	VBS (ml)
1:100	0.1	9.9
1:500	2 di 1:100	8
1:1000	5 di 1:500	5
1:2000	1 di 1:1000	1
1:3000	1 di 1:1000	2
1:4000	1 di 1:1000	3
1:5000	1 di 1:1000	4
1:6000	1 di 1:1000	5
1:7000	1 di 1:1000	6
1:8000	1 di 1:1000	7
1:9000	1 di 1:1000	8
1:10000	1 di 1:1000	9

Diluire il complemento 1:10, qualunque sia il suo titolo. Il complemento e le sue diluizioni vanno fatte tenendo provette e diluenti in bagno di ghiaccio;

preparare una serie di 13 provette e porre, in 11 di esse, 0.5 ml di VBS. Nelle ultime due porre 0.8 ml di VBS.

Tali due provette serviranno da controllo dei GR.

In ognuna delle 11 provette porre 0.2 ml di emolisina alla diluizione corrispondente partendo dalla diluizione 1:500, 0.1 ml di complemento prediluito 1:10 e 0.2 ml di globuli rossi al 6%.

Porre in bagnomaria a 37°C per 30 minuti, agitando ogni 10 minuti; centrifugare per 10 minuti a 1500 rpm.

Si considera 1 Unità emolitica (UH) la massima diluizione di emolisina che dà il 50% di lisi.

Nella prova si usano 12 UH.

Titolazione del complemento (C')

La titolazione del C' viene eseguita in presenza di antigene (Ag); il C' e il VBS devono essere tenuti in bagno di ghiaccio.

Diluire il C' 1:100 con VBS, qualunque sia il suo titolo.

Porre, nei pozzetti di una piastra da microtitolo con fondo ad u i seguenti volumi in ml:

C'	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040	0.045	0.050
VBS	0.040	0.035	0.030	0.025	0.020	0.015	0.010	0.005	0.000
Ag 2U	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

Porre in bagnomaria a 37°C per 30 minuti.

Aggiungere:

0.025 ml di sistema emolitico (SE) costituito da una miscela in parti uguali di emolisina diluita a 12 UH e GR di montone al 6%, sensibilizzati per 15 minuti a 37°C;

porre in bagnomaria a 37°C per 30 minuti;

centrifugare, leggere e calcolare la diluizione d'uso del C' utilizzando la formula:

$$\frac{1}{x} = \frac{2,5}{0,025} \cdot \frac{1}{100}$$

a

dove "a" è la più piccola quantità di C' che ha provocato il 100% o almeno il 90% di emolisi.

Titolazione dell'antigene (Ag)

Il titolo dell'antigene si effettua nella maniera seguente:

porre in una piastrina da microtitolo 0.025 ml di siero positivo standard a varie diluizioni, dopo averlo diluito 1:10 ed inattivato a 56°C per 30 minuti;

aggiungere 0.025 ml di antigene alle varie diluizioni (una diluizione per fila);

aggiungere 0.025 ml di C' diluito in modo da avere 2.5 UC' in 0.025 ml;
porre a bagnomaria a 37°C per 30 minuti;

aggiungere 0.025 ml di SE costituito da una miscela di GR al 6% ed H diluita in modo da avere 12 UH in 0.025 ml;

porre a 37°C per 30 minuti.

Letture: si apprezza 0, +, ++, +++, +++++ come dall'esempio che segue:

Siero +vo	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
1/10	++++	++++	++++	++++	+++	+	0
1/20	++++	++++	++++	++++	++++	++	0
1/40	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+
1/80	++++	++++	++++	++++	++++	++	0
1/160	+++	++++	++++	++++	+++	+	0
1/320	+	++	++	++	+	0	0
1/640	0	0	0	0	0	0	0

Si può vedere, in questo esempio, che le reazioni +++++ sono circoscritte da un rettangolo irregolare che ha per limiti la colonna verticale della diluizione del siero a 1/160 e quella orizzontale della diluizione dell'antigene 1/160; la diluizione 1/160 in un volume 0.025 ml corrisponde ad 1 unità antigene, quella 1/80 a 2 unità antigene.

Nella prova si usano 2 U antigene.

Prova principale

Porre, in una piastrina da microtitolo, 0.025 ml di siero in esame diluito 1:10 in VBS ed inattivato a 37°C per 30 minuti;

aggiungere 0.025 ml di antigene diluito a 2 U antigene;

aggiungere 0.025 ml di C' diluito in modo da avere 2.5 U in 0.025 ml;

porre a bagnomaria a 37°C per 30 minuti;

aggiungere 0.025 ml di SE costituito da una miscela di GR al 6% ed H diluita in modo da avere 12 UH in 0,025 ml;

porre a 37°C per 30 minuti.

La lettura della prova si esegue secondo lo schema riportato:

Tipo	Diluzione siero			AC* *	Classificazione
	1/10	1/20	1/40		
1	++++	++++	++++	-	Fortemente +va
2	++++	++++	+++	-	Fortemente +va
3	++++	+++	++	-	Positiva
4	++++	++	+	-	Positiva
5	+++	++	+	-	Debolmente positiva
6	++	+	+0-	-	Sospetta
7	+	+0-	-	-	Sospetta
8	-	-	-	-	Negativa
9	+++	+	-	+++	Anticomplementare

* Controllo di anticomplementarietà.

Interpretazione dei risultati

L'interpretazione dei risultati delle prove di fissazione del complemento per la PPCB deve essere fatta alla luce di due regole fondamentali di carattere generale:

le prove di laboratorio, soprattutto quelle di tipo indiretto, devono essere considerate come elemento di conferma di un sospetto diagnostico che si sostanzia attraverso la lettura comparata di elementi di carattere epidemiologico, clinico ed anatomico-patologico;

un animale il cui siero reagisca nei confronti di un antigene non è *necessariamente* infetto con l'agente usato per preparare lo stesso antigene (la positività sierologica non è sinonimo di infezione); al contrario un animale il cui siero *non* reagisca nei confronti di un antigene non è *necessariamente* indenne da infezione da parte dell'agente usato per preparare lo stesso antigene (la negatività sierologica non è sinonimo di indennità da infezione).

Tali assunti di carattere generale assumono, nel caso delle prove sierologiche per PPCB un valore particolare in considerazione del fatto che, come è noto, si possono avere sia false negatività che false positività dovute ai fattori già descritti.

Nel caso di questa infezione non esiste un titolo che possa essere assunto come *soglia di certezza* dello stato di infezione di un bovino.

In linea generale si può affermare:

Zone/Allevamenti indenni

Il risultato alla prova di FDC che ci si può attendere con maggiore frequenza è 0 (zero);

i risultati diversi da 0 (zero) che ci si può attendere con maggiore frequenza

sono uguali/inferiori 1:10. Tuttavia si possono avere anche titoli superiori che solo *molto raramente* possono superare 1:80;

in tutti i casi in cui si abbia un risultato diverso da 0 (zero) si deve procedere ad una accurata indagine che prenda in considerazione gli elementi di carattere epidemiologico, clinico e anatomico-patologico al fine di dare una corretta interpretazione al risultato sierologico. In particolare si deve procedere a:

- i. accertare la provenienza degli animali presenti in allevamento;
- ii. esaminare tutti gli effettivi dell'allevamento e considerare sospetti tutti gli animali che abbiano forme respiratorie in atto;
- iii. esaminare tutti gli effettivi dell'allevamento mediante prova di FDC per tre volte a intervalli di 21 giorni;
- iv. procedere ad un *accurato* controllo anatomico-patologico degli animali che dovessero essere avviati al macello *indipendentemente* dai risultati dei riscontri sierologici e clinici.

In attesa dei riscontri sopra citati gli allevamenti/animali vanno considerati indenni.

Zone infette

Nelle zone considerate infette o in quelle di protezione negli allevamenti in cui non si sia ancora confermata la presenza dell'infezione il comportamento sarà identico a quello descritto per le Zone/Allevamenti indenni ma in attesa dei riscontri sopra citati gli Allevamenti/Animali vanno considerati *sospetti di infezione*.

Nelle zone/allevamenti infetti titoli sierologici maggiori di 0 vanno considerati sospetti e titoli $\geq 1:10$, positivi.

Laboratori di referenza per la PPCB

Nazionale: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"
Via Campo Boario - 64100 Teramo
Tel. (0861) 3321 - Fax (0861) 332251

Comunitario: Laboratorio Nacional de Investigaç o Veterinaria
Estrada de Benfica 701 - 1500 Lisboa - Portogallo
Tel. (00351) 1 7162075 - Fax (00351) 1 7160039



PRELIEVO DEI CAMPIONI PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI PPCB

Scacchia M. - G. Semproni - F.G. Santini

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo. CESME

Raccolta campioni

Qualora si sospetti una malattia esotica, è indispensabile ottenere la conferma di laboratorio nel più breve tempo possibile.

La capacità di un laboratorio di confermare una diagnosi è direttamente correlata con il tipo, la quantità e soprattutto la qualità dei campioni inviati.

Il veterinario di campo deve sapere quanto e quale materiale inviare, a quale stadio della malattia effettuare il prelievo e come effettuarlo, in modo da aumentare le possibilità, da parte del laboratorio, di pervenire ad una conferma o meno del sospetto.

Imballaggio del materiale patologico

È molto importante la metodologia da osservare per la spedizione dei campioni patologici.

I campioni devono essere posti in contenitori impermeabili, accuratamente chiusi (con tappo a vite o sigillati con nastro adesivo).

Assicurarsi che la superficie esterna del contenitore sia accuratamente disinfettata (Cloramina sodica 2%). Ogni contenitore deve essere avvolto con materiale in grado di assorbire eventuali fuoriuscite di liquido.

Il tutto viene poi posto in buste di plastica anch'esse disinfettate all'esterno e contenenti disinfettante nel loro interno (Cloramina Sodica 2%).

Tale confezione viene posta entro un secondo contenitore, anche esso di plastica.

Il contenitore ultimo, quello esterno, deve essere costituito da materiale

isolante (polistirolo) a sua volta confezionato con cartone o altro, sul quale si incolla l'indirizzo esatto e nel cui interno si pone ghiaccio secco o similari. È opportuno scrivere all'esterno del contenitore in maniera leggibile: **“Materiale patologico sospetto PPCB”**.

Prelievi da effettuare in caso di sospetto focolaio di PPCB

Prelievo di sangue per la separazione del siero

Il sangue viene prelevato con le solite modalità del prelievo del sangue intero. Va poi posto in contenitori senza l'aggiunta di anticoagulanti.

In ogni provetta o vacutainer da 10 ml è bene non porre più di 5 ml di sangue: ciò permette di avere una resa in siero di circa il 50%. Prelevare almeno 20 ml di sangue. La provetta viene posta orizzontalmente, a temperatura ambiente, fino a che il sangue non sia coagulato. Viene poi posta verticalmente per alcune ore (1-2) a 37 °C o a temperatura ambiente qualora non si disponesse di un termostato. Quindi si centrifuga in centrifuga refrigerata a 500 g e si raccoglie il siero.

Nel caso non si disponga di una centrifuga, la provetta viene refrigerata ed inviata al Laboratorio nel più breve tempo possibile. Non congelare.

Ogni provetta deve avere il suo numero di identificazione.

Non aggiungere mai conservanti od antibatterici perché potrebbero interferire con il test di Fissazione del Complemento od altri tests sierologici.

Prelievo organi

I materiali da prelevare per l'isolamento del micoplasma sono:

- parti di polmone epatizzato;
- liquido pleurico ed essudato bronchiale;
- i linfonodi bronchiali e mediastinici;
- tamponi nasali.

Nei lobi polmonari colpiti, bisogna scegliere aree con lesioni allo stadio di epatizzazione rossa.

Nei bovini colpiti da forme croniche, l'isolamento del micoplasma è possibile utilizzando i linfonodi bronchiali e mediastinici ipertrofici, il muco prelevato nei bronchi che drenano le zone colpite da lesioni ed il raschiato della superficie interna della capsula fibrosa del sequestro.

Tutti i campioni debbono essere refrigerati immediatamente dopo il prelievo e durante il trasporto. Devono possibilmente prevenire al laboratorio entro 24 ore tenendo conto che: a +4 °C il micoplasma può sopravvivere per 2-3 giorni e a -20 °C alcune settimane.

Allevamenti da controllare

Gli allevamenti da controllare sono quelli in cui vi siano:

bovini aventi sintomatologia respiratoria con particolare riguardo per i soggetti presenti nelle stalle di sosta;

bovini che al macello presentano lesioni polmonari riferibili a Pleuropolmonite contagiosa dei bovini;

bovini oggetto di compravendita.

Nel caso indicato al punto 2 è necessario:

prelevare ed inviare il materiale patologico sospetto al laboratorio seguendo le modalità descritte nel paragrafo "Prelievo organi";

risalire quindi all'allevamento per prelevare campioni di sangue per l'esame sierologico di tutti gli animali presenti.

Nei restanti casi inviare campioni di sangue per l'esame sierologico.

OSSERVAZIONI E SUGGERIMENTI PER UNA INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

Giovannini A. - M. Scacchia - G. Semproni

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo. CESME

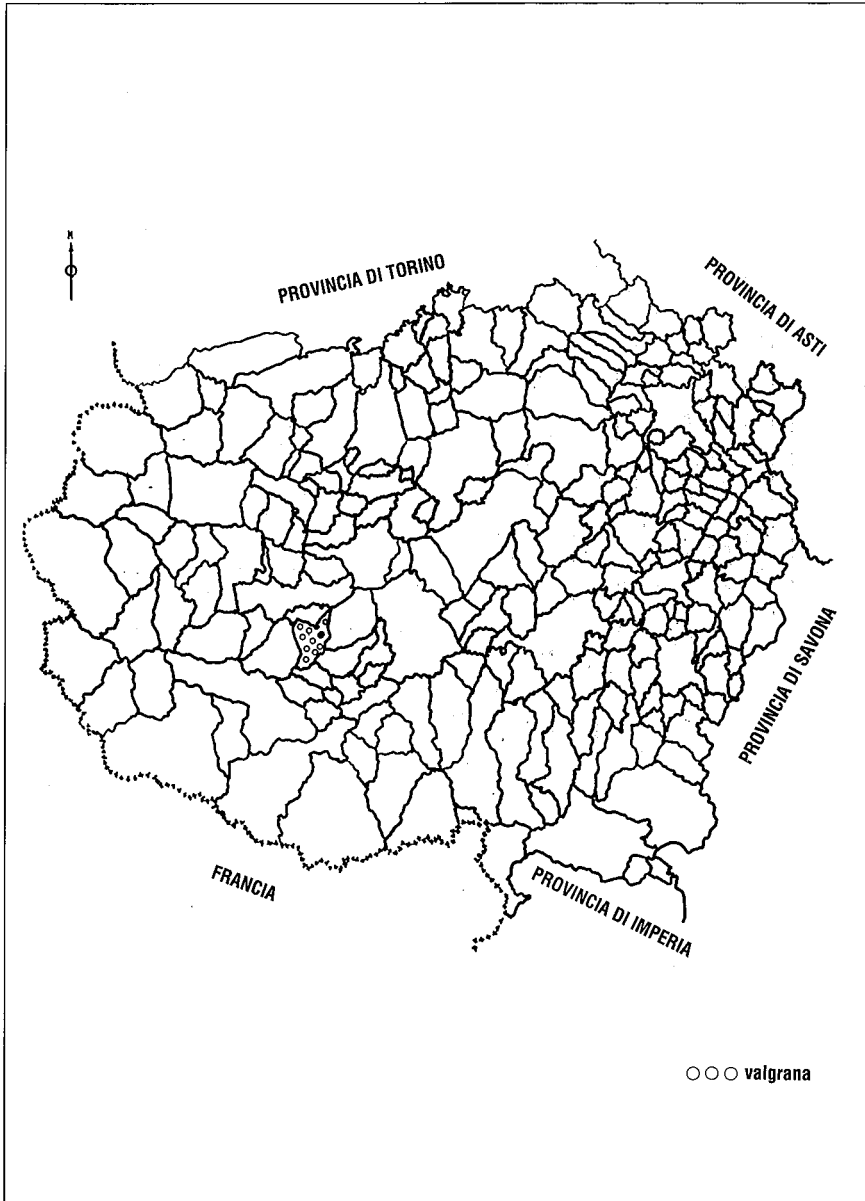
Diffusione della PPCB in Italia

Finora in Italia si sono verificati 18 focolai di pleuropolmonite contagiosa bovina (PPCB), secondo la cronologia riportata nella Tabella 1. Dall'esame della Tabella 1 e delle Mappe 2-7 emerge che i focolai sono tutti concentrati in alcune zone molto ristrette dell'Italia settentrionale, in particolare la gran parte dei focolai è concentrata nella provincia di Bergamo.



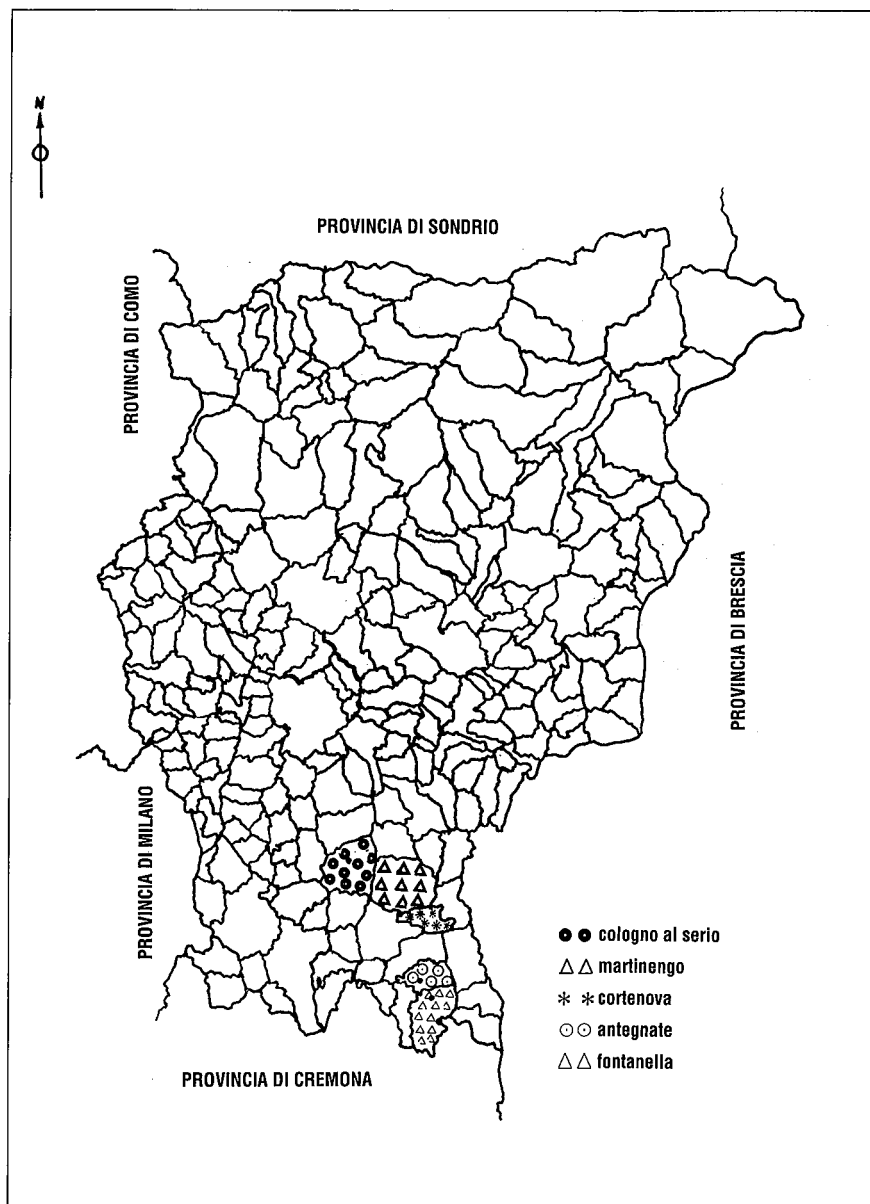
Mappa 2.

PROVINCIA DI CUNEO



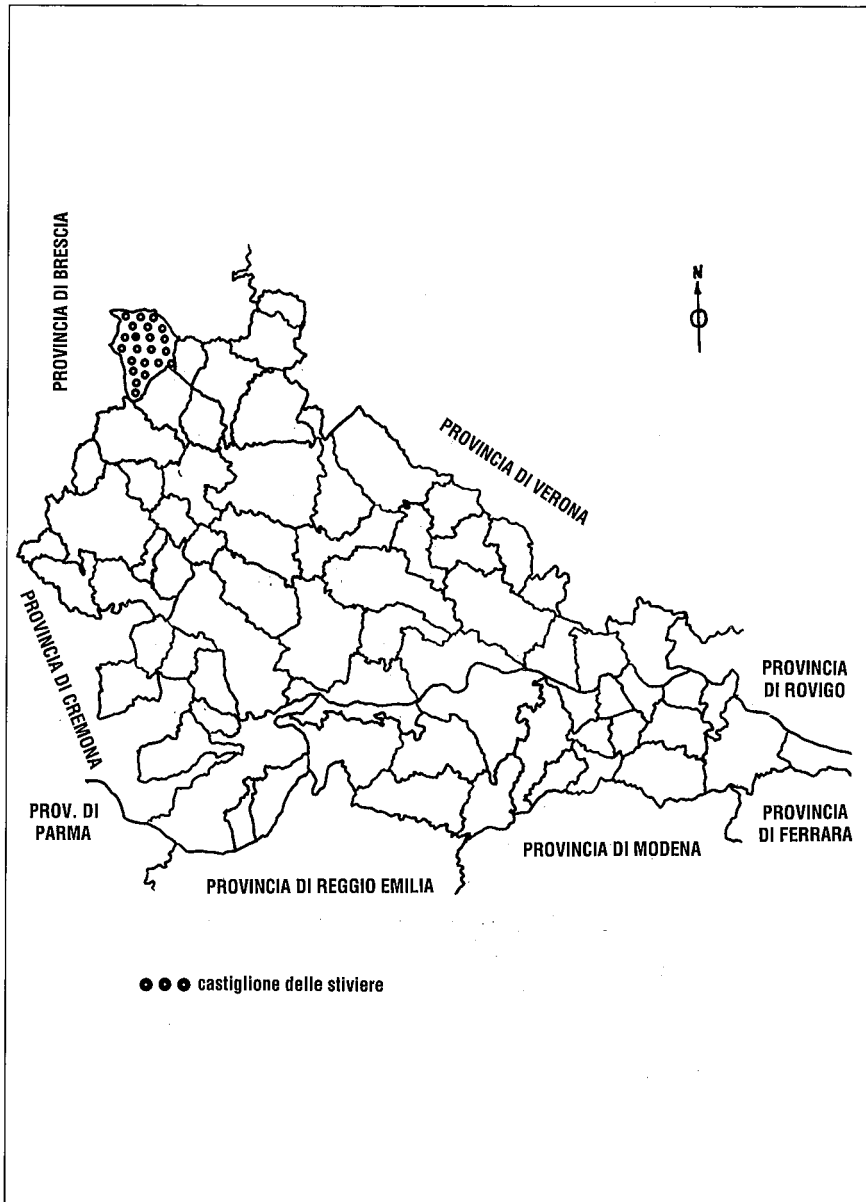
Mappa 3.

PROVINCIA DI BERGAMO



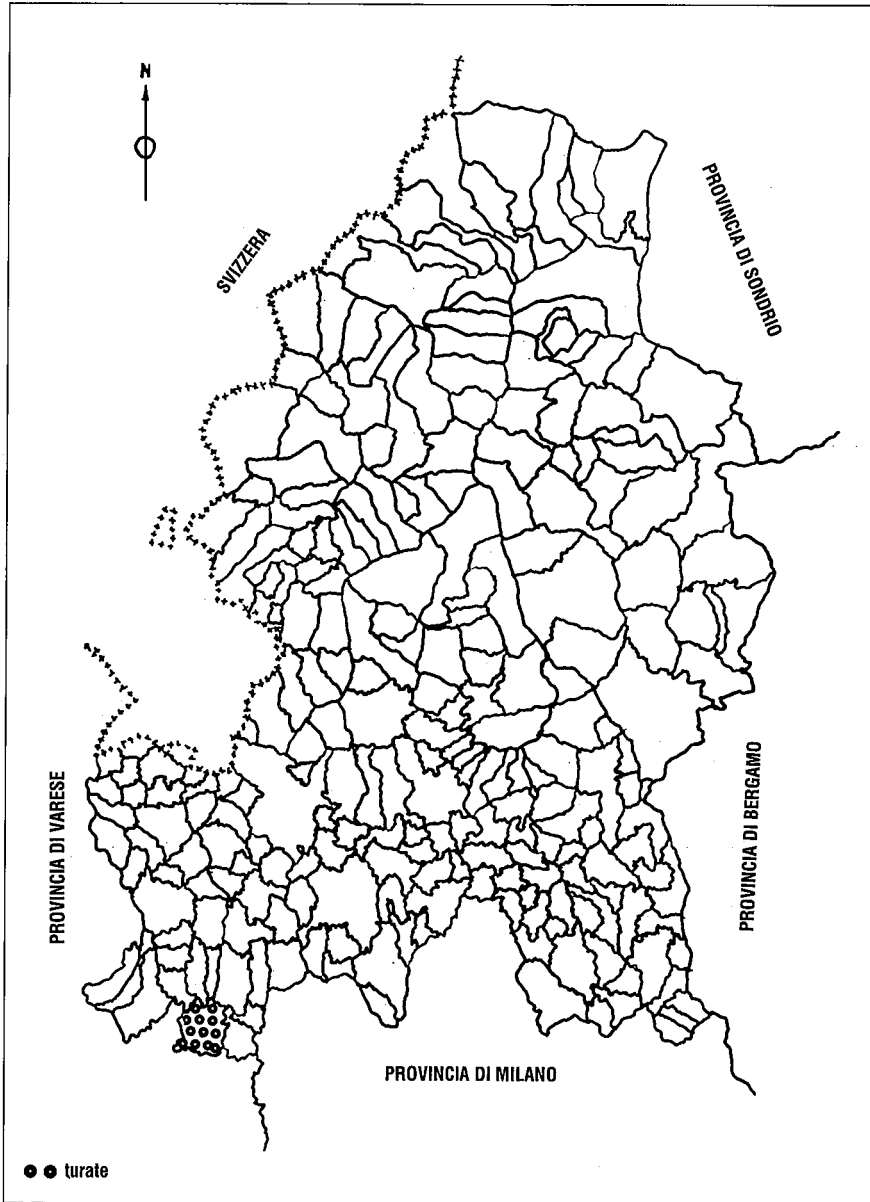
Mappa 4.

PROVINCIA DI MANTOVA



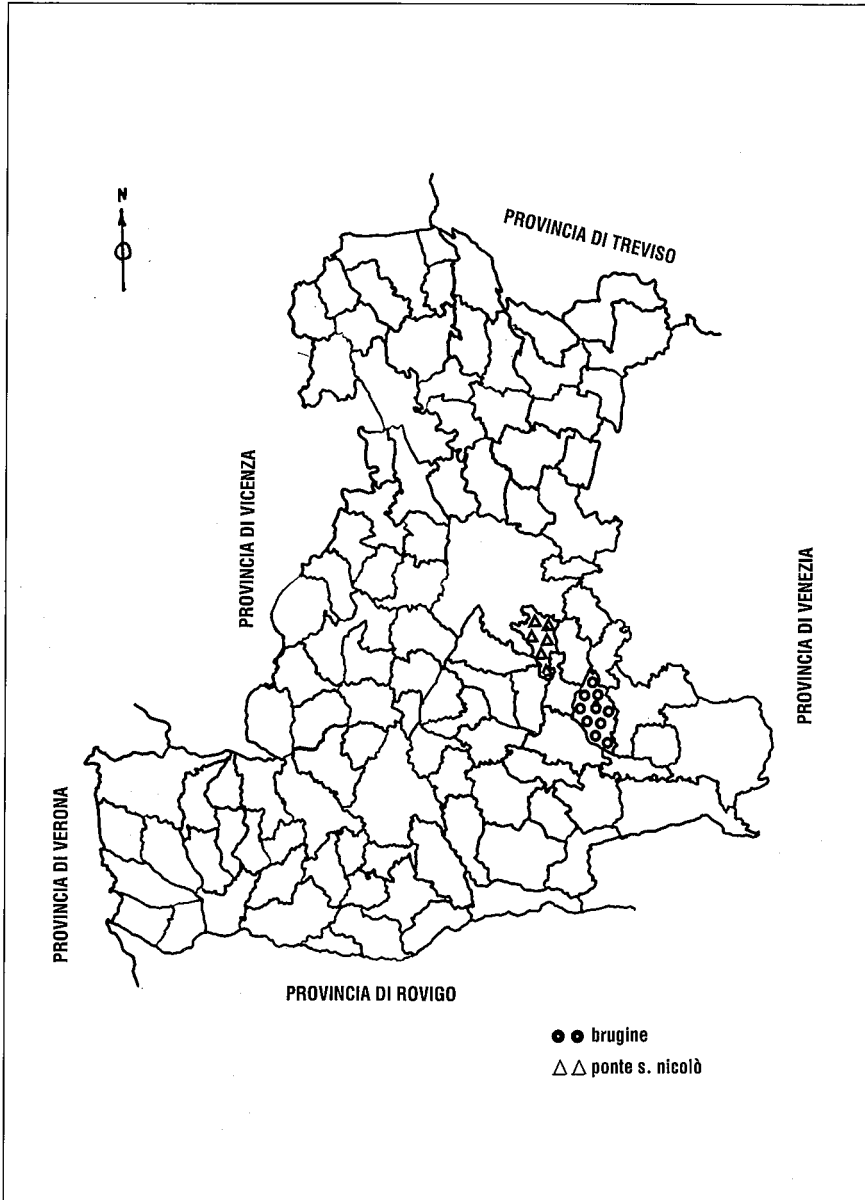
Mappa 5.

PROVINCIA DI COMO



Mappa 6.

PROVINCIA DI PADOVA



Mappa 7.

Da un esame della Tabella 1 emerge che gli allevamenti colpiti sono di dimensioni comprese tra 44 e 1054 capi. Non risultano colpiti allevamenti delle prime 4 classi di dimensioni considerate dall'Istat (1-2, 3-5, 6-9 e 10-19 capi), che comprendono il 77.53% delle aziende italiane ed il 25.48% dei capi (Allegato 1).

Inoltre, alcuni degli allevamenti colpiti sono allevamenti da carne, che comprendono, quindi, solo soggetti di età inferiore a quella di massima recettività per PPCB.

Tabella 1: Focolai di PPCB al 30.3.1991.

Focolaio	Prov.	Comune	USL	Capi	Cat.	Sospetto	Conferma	Estinzione
90/01	BG	Martinengo	33	564	L	18/10/90	30/10/90	02/11/90
90/02	BG	Antegnate	33	428	C	19/11/90	04/12/90	29/01/91
90/03	BG	Antegnate	33	112	C	19/11/90	06/12/90	29/01/91
90/04	MN	Castiglione Stiv.	46	446	C	20/11/90	06/12/90	29/01/91
90/05	CO	Turate	9	911	C	29/11/90	14/12/90	
90/06	CN	Valgrana	59	79	C	10/12/90	19/12/90	19/12/90
90/07	BG	Martinengo	33	79	L	30/11/90	20/12/90	26/02/91
91/01	PD	Brugine	23	44		28/12/90	11/01/91	23/01/91
91/02	BG	Antegnate	33	740	L	03/12/90	11/01/91	14/02/91
91/03	BG	Antegnate	33	595	L	06/12/90	11/01/91	04/03/91
91/04	BG	Fontanella	33	240	L	17/12/90	11/01/91	11/03/91
91/05	BG	Fontanella	33	61	L	17/12/90	11/01/91	18/02/91
91/06	BG	Fontanella	33	162	L	21/12/90	11/01/91	07/03/91
91/07	BG	Colognio al Serio	33	540	C	25/01/91	25/01/91	21/03/91
91/08	PD	Ponte S. Nicolò	21	63		05/01/91	07/02/91	27/02/91
91/09	BG	Cortenuova	33	91	L	30/01/91	13/02/91	14/03/91
91/10	BG	Fontanella	33	1054	C	30/01/91	31/01/91	14/03/91
91/11	BG	Martinengo	33	143	L	14/03/91	23/03/91	27/03/91

I titoli dei sierii analizzati con la fissazione del complemento per la presenza di anticorpi a *M. mycoides* subsp. *mycoides* e prelevati da animali in aziende con sospetto di focolaio di PPCB sono riportati nella Tabella 2. Da un esame della distribuzione geografica dei sierii che presentano alti titoli anticorpali (Tabella 3) si osserva come questi provengano tutti dagli Istituti Zooprofilattici che hanno la competenza territoriale per le zone dove sono insorti i focolai di PPCB. In particolare, la quasi totalità dei sierii con titoli superiori a 1:160 proviene dalle aziende dove è insorto il focolaio, mentre della restante parte non è stata fornita al CESME indicazione sulla provenienza dei campioni.

Tabella 2: Titoli sierologici rilevati negli allevamenti sospetti di PPCB.

Titolo		N° Sieri
+	1:10	27
++	1:10	
+++	1:10	
++++	1:10	= 21
	1:20	= 39
	1:40	= 45
	1:80	= 49
	1:160	= 31
	1:320	= 27
	1:640	= 20
	1:1280	= 9
	1:2560	= 5
	1:5120	= 2
	1:10240	= 1

Numero totale di sieri analizzati dal CESME = 904

Negativi = 628

Reattivi = 276 di cui:

Prevalenza sieri reattivi = 30.53%

Tabella 3: Distribuzione dei risultati sierologici negli allevamenti sospetti di PPCB divisi per Istituto Zooprofilattico Sperimentale di competenza.

Titoli	Istituti Zooprofilattici								
	TO	BS	PD	PG	Roma	TE	NA	FG	PA
Esaminati	326	147	158	35	74	47	26	38	53
Negativi	279	44	72	35	37	46	26	36	53
Sospetti									
+ 1:10									
Positivi									
++ 1:10	5	10	6	0	4	0	0	2	0
+++ 1:10									
++++ 1:10	3	11	3	0	4	0	0	0	0
1:20	5	13	4	0	17	0	0	0	0
1:40	7	19	12	0	6	1	0	0	0
1:80	16	9	20	0	4	0	0	0	0
1:160	2	18	9	0	2	0	0	0	0
1:320	4	7	16	0	0	0	0	0	0
1:640	3	7	10	0	0	0	0	0	0
1:1280	0	7	2	0	0	0	0	0	0
1:2560	2	0	3	0	0	0	0	0	0
1:5120	0	2	0	0	0	0	0	0	0
1:10240	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Per verificare se l'infezione fosse localizzata nelle aree dove si erano manifestati i focolai, è stata effettuata un'indagine sierologica utilizzando campioni di siero già prelevati per il controllo di efficacia della campagna di vaccinazione antiaftosa. Per tale controllo era stato effettuato un campionamento sulla base della distribuzione binomiale (Allegato 2), di una prevalenza soglia di sieri non reattivi per afta epizootica dell'1% ed un livello di confidenza del 95%. Ciò aveva comportato il prelievo di 300 campioni di sangue in maniera rigorosamente casuale da bovini allevati nel territorio regionale. In presenza di sieri reattivi a *M. mycoides* subsp. *mycoides*, è stato effettuato un controllo sierologico di tutto l'allevamento di origine. I risultati di tale indagine sono riportati nella Tabella 4.

Dall'esame dei risultati riportati sembra potersi concludere che la diffusione della PPCB è limitata alle Regioni ove si sono verificati focolai di malattia.

Tabella 4: Risultati sierologici per PPCB su sieri prelevati per il controllo della campagna vaccinale antiaftosa.

Istituto	N° allevamenti esaminati	N° capi esaminati dal CESME	N° allevamenti reattivi	N° capi reattivi	Riesame
I.Z.S. Torino	461	1835	2	2	in corso
I.Z.S. Brescia	NP*	NP	NP	14	NP
I.Z.S. Padova	476	574	14	14	260 capi tutti negativi
I.Z.S. Perugia	NP	1504	NP	73	NP
I.Z.S. Roma	NP	32	17	17	NP
I.Z.S. Teramo	252	252	31	31	128 capi di cui 2 reatt.: +++1:10; 1:10
I.Z.S. Foggia	47	505	1	1	42 capi tutti negativi
I.Z.S. Portici	320	320	46	46	392 capi tutti negativi
I.Z.S. Palermo	176	821	65	103	34 capi tutti negativi
I.Z.S. Sassari	NP	266	0	0	

* Non pervenuti.

Piano di sorveglianza nei confronti della PPCB

La sorveglianza della PPCB si deve basare in primo luogo sulla vigilanza veterinaria all'interno degli allevamenti e a livello dei macelli, i cui risultati possono essere confermati mediante indagini su base campionaria.

In questo contesto, una particolare importanza la riveste la rigorosa attuazione di tutte le norme previste dal vigente Regolamento di Polizia Veterinaria, in particolare per quanto riguarda le attività di vigilanza sugli spostamenti da vita degli animali. Per questo motivo ogni bovino da riproduzione destinato ad essere introdotto in un allevamento dovrà essere sottoposto ad esame sierologico mediante fissazione del complemento per anticorpi per *M. mycoides* subsp. *mycoides*, mentre i bovini da ingrasso destinati ad essere introdotti in allevamento verranno sottoposti a controlli sierologici su base campionaria. Tali controlli verranno estesi anche agli animali presenti negli allevamenti di destinazione.

Accanto a ciò, gli ingressi in stalla che si verificano annualmente per le campagne di risanamento nei confronti della brucellosi, tubercolosi, leucosi enzootica e per la vaccinazione antiaftosa possono rappresentare dei momenti di cruciale importanza per la raccolta di informazioni anamnestiche che possano permettere di evidenziare precocemente focolai di malattia, e per lo svolgimento di una capillare opera di informazione e sensibilizzazione degli allevatori sul problema. Qualora insorga il sospetto di focolaio di PPCB è indispensabile che i campioni da analizzare siano accompagnati da un insieme di informazioni indispensabili per una analisi epidemiologica del focolaio stesso.

Infine, anche in considerazione del rilevamento di focolai in allevamenti da carne, in animali di età inferiore a quella di massima recettività riportata in letteratura, un ruolo fondamentale di osservatorio sulla sanità animale in generale e sulla diffusione della malattia in particolare può essere svolto al macello.

A questo scopo è necessaria la predisposizione di un'attività di formazione ed aggiornamento sulla PPCB.

Un tale approccio permette di effettuare un campionamento mirato principalmente a quegli allevamenti per i quali esistono fondati sospetti di infezione, permettendo quindi di ridurre notevolmente la richiesta di esami sierologici randomizzati per il monitoraggio della diffusione dell'infezione.

Piano di campionamento per il monitoraggio della diffusione della PPCB

La sorveglianza epidemiologica della PPCB nel nostro Paese, ed in particolare la verifica che non si sia avuta una endemizzazione della malattia nelle Regioni dove si sono verificati i focolai né una diffusione ad altre Regioni italiane, può far ricorso, oltre che alla rigorosa applicazione di tutte

le misure di polizia veterinaria previste dalle vigenti leggi, anche ad indagini su base campionaria. Tali indagini possono partire da due assunti di base fra loro differenti:

a. si suppone una distribuzione casuale delle positività all'interno della popolazione bovina italiana. È l'assunto su cui si è basato il controllo della efficacia della vaccinazione antiataftosa. È un assunto corretto in prima approssimazione, ma nel caso della PPCB è più opportuno partire da una ipotesi differente, e precisamente

b. esistono tre Regioni dove il rischio di infezione è maggiore (Lombardia, Piemonte e Veneto), a differenza delle restanti 17 Regioni italiane dove si ha motivo di ritenere che l'infezione sia assente. Inoltre, la diffusione della malattia non è perfettamente casuale all'interno della popolazione, ma occorre tenere conto anche della presenza di una elevata morbilità all'interno degli allevamenti infetti.

Si suppone, per Regioni omogenee dal punto di vista epidemiologico, una distribuzione casuale degli allevamenti positivi, con morbilità variabili dal 10% al 40% all'interno degli allevamenti positivi

Si effettuano campionamenti non su base territoriale nazionale, ma per zone omogenee dal punto di vista epidemiologico ed il campionamento deve tener conto del fatto che la prevalenza della infezione all'interno dei focolai è maggiore rispetto alla prevalenza media rilevabile nella popolazione bovina italiana nel suo complesso e che si hanno degli addensamenti (clusters) di animali positivi in alcuni allevamenti rispetto al resto della popolazione.

L'obiettivo del campionamento è, quindi, quello di rilevare gli allevamenti infetti anziché i capi infetti.

Si tratta, pertanto, di stabilire due valori soglia di prevalenza, uno per l'infezione nella popolazione generale ed uno per la morbilità nei focolai.

Il tasso di morbilità all'interno dei focolai di PPCB è generalmente elevato, raggiungendo valori variabili dal 10 fino al 90% (2, 1). In Italia tale valore è intorno al 60-70% (3).

In generale, la prevalenza di positività sierologica nella popolazione bovina varia dallo 0.3 al 2.17% (6) nelle zone del Portogallo dove la PPCB è endemica e dallo 0.16% allo 0.49% in tutto il territorio portoghese (1, 5).

Pertanto, si sono ritenuti accettabili valori soglia di prevalenza di 0.1% per quanto riguarda la infezione nella popolazione generale e valori di morbilità variabili dal 10% al 40% all'interno dei focolai.

Si ritiene superfluo scendere sotto il valore di prevalenza del 10% all'interno dei focolai sia perché i dati riportati in letteratura suggeriscono

valori superiori, sia perché il numero medio dei capi presenti negli allevamenti delle Regioni dell'Italia centrale e meridionale (escludendo quindi le Regioni dove si sono manifestati i focolai) è di circa 10 capi.

Pertanto, sulla base di questi valori soglia e di un livello di confidenza del 95%, i campioni necessari per escludere la presenza della infezione su base nazionale sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5: Dimensioni del campionamento per rilevare la presenza della PPCB con una prevalenza nella popolazione = 0,1% e valori di morbilità nei focolai variabili da 10% a 40%.

	Valori di morbilità			
	10%	20%	30%	40%
prevalenza allev. inf.	1%	0.5%	0.33%	0.25%
allevamenti da esaminare	298	598	897	1197
capi da esaminare negli allevamenti campione di grosse dimensioni *	28-29	13-14	8-9	5-6
sample size totale	8475	8024	7536	7019

* Per gli allevamenti di dimensioni medio-piccole il campionamento può essere effettuato sulla base della distribuzione ipergeometrica.

Con questo tipo di campionamento, che tiene in particolare considerazione il fatto che gli animali infetti possono essere maggiormente presenti in una parte soltanto degli allevamenti, la dimensione del campione richiesta per escludere la presenza della infezione con valori di prevalenza superiori a 0.1% a livello nazionale, varia da circa 7000 a circa 8500 capi, prelevati da un numero di allevamenti variabile da 300 a 1200.

La metodologia descritta è probabilmente la più corretta dal punto di vista statistico perché permette, rispetto a quella illustrata in precedenza, di ovviare alla necessità di postulare una distribuzione assolutamente casuale della infezione nella popolazione bovina. Per una sua corretta esecuzione, però, è necessario stabilire con notevole precisione i valori della soglia di prevalenza dell'infezione nella popolazione bovina in generale e di morbilità all'interno dei focolai.

È inoltre necessario effettuare una stratificazione su base regionale degli allevamenti da sottoporre a campionamento.

Modalità operative di campionamento suggerite

Si propone di suddividere l'Italia in tre zone:

Zona 1: Lombardia

Zona 2: Piemonte e Veneto

Zona 3: Resto d'Italia.

Zona 1: Lombardia

Si propone l'esecuzione di un controllo sierologico a campione della popolazione bovina regionale, sulla base di un livello di confidenza del 95%, di una prevalenza di infezione della popolazione dello 0.1%, con prevalenza di infezione nei focolai del 10% e di una prevalenza di allevamenti infetti pari a 1%.

A tal fine dovranno essere sottoposti a campionamento 298 allevamenti in Regione Lombardia, all'interno dei quali verrà prelevato il sangue ad un numero di capi individuato sulla base della distribuzione ipergeometrica (indicativamente 28-29 capi negli allevamenti di grosse dimensioni), per un totale di circa 8000 capi.

Poiché la distribuzione del numero di capi per allevamento nel territorio regionale è fortemente aggregata, cioè il 79.2% dei capi presenti in Lombardia è concentrato nel 25.5% degli allevamenti (quelli con 50 capi ed oltre), si ritiene opportuna una stratificazione degli allevamenti oggetto del campionamento sulla base delle classi di dimensioni dell'allevamento (secondo la suddivisione seguita dall'Istat).

In tal modo, il numero di capi controllati provenienti dagli allevamenti di grosse dimensioni risulterà proporzionale al numero di capi presenti in questi allevamenti (79%) e non al numero di allevamenti di grosse dimensioni (25%). Il numero di allevamenti da esaminare per classe di dimensioni è riportato nella Tabella 6.

Zona 2: Piemonte e Veneto

Per queste due regioni, si propone la verifica della non avvenuta endemizzazione della PPCB sulla base di un campionamento analogo a quello proposto per la Regione Lombardia.

Poiché la distribuzione del numero di capi per allevamento nel territorio delle due regioni è fortemente aggregata, si ritiene opportuna una stratificazione degli allevamenti oggetto del campionamento sulla base delle classi di dimensioni dell'allevamento (secondo la suddivisione seguita dall'Istat). I numeri di allevamenti da esaminare per classi di dimensioni sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6: N. di allevamenti da esaminare suddivisi per classe di dimensioni.

	N. di capi per allevamento								Totale
	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	>499	
LOMBARDIA									
Allevamenti da esaminare	1	4	6	14	37	47	154	35	298
Capi da esaminare negli allevamenti campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	7616
PIEMONTE									
Allevamenti da esaminare	3	10	11	33	76	66	79	22	300
Capi da esaminare negli allevamenti campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	6855
VENETO									
Allevamenti da esaminare	4	11	17	31	68	47	62	57	297
Capi da esaminare negli allevamenti campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	6772

Zona 3: Resto d'Italia

Poiché per il resto d'Italia non si ha alcuna ragione di ritenere vi sia presenza di PPCB, si propone la verifica di tale ipotesi sulla base di un campionamento analogo a quello proposto per la Regione Lombardia, ma effettuato sull'intero territorio delle 17 restanti Regioni.

Pertanto, si rende necessaria una stratificazione del campionamento sulla base sia delle dimensioni dell'allevamento, sia del patrimonio bovino delle singole regioni (Tabella 7).

Tabella 7: N. di allevamenti da esaminare suddivisi per classe di dimensioni.

Regione	N. di capi per allevamento								Totale
	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	500 e oltre	
Valle d'Aosta	0	0	1	0	1	0	1	0	3
Trentino Alto Adige	1	1	2	5	5	1	1	0	16
Friuli V. Giulia	0	1	2	2	3	4	1	1	14
Liguria	0	1	0	1	0	0	0	0	2
Emilia Romagna	0	1	3	8	17	16	18	4	67
Toscana	0	1	2	2	4	1	6	2	18
Umbria	0	1	1	1	2	1	2	0	8
Marche	0	1	2	3	2	4	1	0	13
Lazio	1	2	3	6	6	4	4	1	27
Abruzzo	0	1	2	3	3	1	1	0	11
Molise	0	1	1	2	1	0	0	0	5
Campania	1	4	5	7	4	3	2	1	27
Puglia	0	1	1	2	5	2	1	1	13
Basilicata	0	1	1	2	2	0	1	0	7
Calabria	1	2	3	3	3	2	1	0	15
Sicilia	0	1	1	6	13	5	3	2	31
Sardegna	0	1	2	4	7	4	2	1	21
Totale	4	21	32	57	78	48	45	13	298
Capi da esaminare negli allevamenti campione									
Capi/allev.	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	
Totale	8	105	288	912	1716	1200	1260	377	5866

Nota: Nell'allegato 3 si riporta la situazione dei focolai aggiornata al 30.11.1991.

Allegato 1: Popolazione bovina Italiana.

	Capi	Aziende	Capi/Aziende
Nord	6109741	224878	27,17
Centro	907123	71310	12,72
Sud	1057915	110556	9,57
Isole	713826	37675	18,95
Italia	8788605	444419	19,78

La distribuzione dei capi e delle aziende per classi di dimensioni non è uniforme, ma il 52.18% dei capi è concentrato nel 7.89% delle aziende, quelle con oltre 50 capi (Allegati 1a e 1b).

Queste differenze nella distribuzione dei capi sono più marcate nelle Regioni settentrionali del Paese, dove gli allevamenti di grosse dimensioni sono maggiormente presenti e quindi il numero medio di capi/allevamento è maggiore (Allegato 1c).

Questa distribuzione della frequenza di aziende con numeri differenti di capi deve essere tenuta in considerazione quando si effettuano campionamenti sulla popolazione bovina, in modo particolare nelle Regioni settentrionali e, seppure in minor misura, anche in quelle meridionali.

Allegato 1a: N. di allevamenti bovini per Regione.

Regione	N. capi per allevamento								Totali
	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	>499	
Piemonte	6229	10223	6106	10128	9991	3949	1991	87	48704
Valle d'Aosta	375	859	1192	325	486	64	45	0	3346
Lombardia	3617	6757	6171	6899	7965	4685	5820	243	42157
Bolzano	1356	2800	2912	3843	1976	64	23	0	12974
Trento	1956	2317	1097	787	513	121	46	1	6838
Veneto	10280	13033	10427	10553	10357	3316	1618	308	59892
Friuli V. Giulia	2294	3751	2951	2490	1487	713	142	5	13833
Liguria	2664	1606	619	581	20	3	0	1	5494
Emilia R.	2334	4451	5525	7712	7192	3105	1265	56	31640
Toscana	4758	2616	2526	2421	2017	235	285	9	14867
Umbria	963	2348	1737	1287	1076	101	124	9	7645
Marche	1894	3920	2638	3339	787	908	110	3	13599
Lazio	11441	7391	6499	5875	2914	742	322	15	35199
Abruzzo	3926	3840	3155	3044	1493	150	65	2	15675
Molise	888	3508	1882	1515	584	53	19	0	8449
Campania	11656	14563	8873	6852	2145	546	143	23	44801
Puglia	2506	1707	1605	2324	2175	405	130	4	10856
Basilicata	2144	2820	2736	1757	632	78	85	0	10252
Calabria	4341	6027	4896	3341	1442	344	126	6	20523
Sicilia	2407	4355	2265	5732	6217	1027	259	15	22277
Sardegna	1964	1600	3511	3941	3334	798	238	12	15398
Nord	31105	45797	37000	43318	39987	16020	10950	701	224878
Centro	19056	16275	13400	12922	6794	1986	841	36	71310
Sud	25461	32465	23147	18833	8471	1576	568	35	110556
Isole	4371	5955	5776	9673	9551	1825	497	27	37675
Italia	79993	100492	79323	84746	64803	21407	12856	799	444419
						----	7,89%	----	

Allegato 1b: N. capi bovini per Regione.

Regione	N. capi per allevamento								Totali
	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	>499	
Piemonte	10958	38987	43790	135364	309569	267563	321837	88190	1216258
V. d' Aosta	561	3384	8149	4362	14671	4203	6180	0	41510
Lombardia	6267	28486	44882	98664	263383	336525	1099200	249511	2126918
Bolzano	1909	11326	22256	54440	54128	4349	3111	0	151519
Trento	3194	8954	8324	11466	16342	8184	5671	700	62835
Veneto	18397	51488	77121	145478	316410	218829	289486	265971	1383180
Friuli V.G.	4157	14128	20902	33406	44131	46328	19968	8958	191978
Liguria	4445	6020	4392	6841	570	195	0	585	23048
Emilia R.	4132	17613	40743	103582	225173	212799	252072	56381	912495
Toscana	5897	9480	19350	30146	57471	17147	85649	21850	246990
Umbria	1752	9608	12972	18407	31376	6590	23316	5144	109165
Marche	3345	14934	19480	42421	21810	57304	17939	2476	179709
Lazio	55606	26745	45997	78200	85759	51022	58140	9790	371259
Abruzzo	7129	15677	21899	39727	38949	10140	11254	1220	145995
Molise	1601	13880	13647	19595	16293	3196	3210	0	71422
Campania	17432	56634	63341	89708	60415	37987	26635	15775	367927
Puglia	3627	6767	11284	33441	64322	25232	20237	11243	176153
Basilicata	3343	11346	19758	23308	19900	5339	13929	0	96923
Calabria	7287	21741	35055	43967	41526	22229	21156	6534	199495
Sicilia	3807	17664	16291	76058	180367	69018	39238	19329	421772
Sardegna	3353	6912	25882	55204	100803	54058	36454	9388	292054
Nord	54020	180386	270559	593603	1244377	1098975	1997525	670296	6109741
Centro	26600	60767	97799	169174	196416	132063	185044	39260	907123
Sud	40419	126045	164984	249746	241405	104123	96421	34772	1057915
Isole	7160	24576	42173	131262	281170	123076	75692	28717	713826
Italia	128199	391774	575515	1143785	1963368	1458237	2354682	773045	8788605
						----	52,18%	—	

Allegato 1c: N. medio di capi per allevamento.

Regione	Capi/Allevamento	Regione	Capi/Allevamento
Piemonte	24,97	Abruzzo	9,31
Valle d' Aosta	12,41	Molise	8,45
Lombardia	50,45	Campania	8,21
Bolzano	11,68	Puglia	16,23
Trento	9,19	Basilicata	9,45
Veneto	23,09	Calabria	9,72
Friuli V. Giulia	13,88	Sicilia	18,93
Liguria	4,20	Sardegna	18,97
Emilia Romagna	28,84	Nord	27,17
Toscana	16,61	Centro	12,72
Umbria	14,28	Sud	9,57
Marche	13,21	Isole	18,95
Lazio	10,55	Italia	19,78

Allegato 2: Dimensioni del campione necessarie per rilevare la presenza di una malattia per diversi valori di prevalenza sulla base delle distribuzioni ipergeometrica e binomiale. Livello di confidenza = 95%.

Grandezza popol.	Prevalenza della malattia											
	50%	40%	30%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0,5%	0,1%	
10	4	5	6	8	10	10	10	10	10	10	10	
20		6	7	10	12	16	19	20	20	20	20	
30	4		8	11	14	19	26	30	30	30	30	
40	5			12	15	21	31	40	40	40	40	
50					16	22	35	48	50	50	50	
60				12	16	23	38	55	60	60	60	
70				13	17	24	40	62	70	70	70	
80						24	42	68	79	80	80	
90			8			25	43	73	87	90	90	
100			9		17	25	45	78	96	100	100	
120					18	26	47	86	111	120	120	
140						26	48	92	124	139	140	
160							27	49	97	136	160	
180								50	101	146	180	
200				13				51	105	155	200	
250				14		27	53	112	175	228	250	
300						28	54	117	189	260	300	
350					18			54	121	201	350	
400					19			55	124	211	400	
450								55	127	218	450	
500								56	129	225	500	
600								56	132	235	600	
700								57	134	243	700	
800									136	249	800	
900						28			137	254	900	
1000						29			138	258	1000	
1200							57	140	264	471	1102	
1400							58	141	269	487	1236	
1600								142	272	499	1354	
1800								143	275	509	1459	
2000								143	277	517	1553	
3000								145	284	542	1895	
4000							58	146	288	556	2108	
5000							59	147	290	564	2253	
6000									291	569	2358	
7000									292	573	2437	
8000								147	293	576	2498	
9000									148	294	579	2548
10000									148	294	581	2536
Infinita	5	6	9	14	19	29	59	149	299	599	2994	

Allegato 3a: Focolai in Italia nel 1990.

N.	Conferma sosp.	Chiusura	Regione	Prov./USL	Comune	Tipo	Capi	Mal.	Distrutti morti	Abbattuti
1	30/10/90	03/11/90	Lombardia	BG/33	Martinengo	Latte	548	0	0	548
2	04/12/90	29/01/91	Lombardia	BG/33	Antegnate	Carne	427	4	15	408
3	06/12/90	29/01/91	Lombardia	BG/33	Antegnate	Carne	112	1	11	100
4	06/12/90	25/01/91	Lombardia	MN/46	Castiglione	Carne	446	17	0	429
5	14/12/90	28/03/91	Lombardia	CO/9	Turate	Carne	911	14	84	813
6	19/12/90	24/12/90	Piemonte	CN/59	Valgrana	Carne	79	2	0	77
7	20/12/90	26/02/91	Lombardia	BG/33	Martinengo	Latte	79	0	21	58

Allegato 3b: Focolai in Italia al 30.11.1991.

N.	Sospetto	Conferma	Chiusura	Regione	Provincia	Comune	USL	Tipo all.	Capi	Mal/morti	Distrutti	Macellati
1	20/12/90	11/01/91	23/01/91	Veneto	Padova	Brugine	23	Latte	44	0	0	44
2	03/12/90	11/01/91	14/02/91	Lombardia	Bergamo	Antegnate	33	Latte	740	7	20	713
3	06/12/90	11/01/91	04/03/91	Lombardia	Bergamo	Antegnate	33	Latte	595	13	21	561
4	17/12/90	11/01/91	11/03/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Mista	240	22	11	207
5	17/12/90	11/01/91	18/02/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Latte	61	3	5	53
6	21/12/90	11/01/91	07/03/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Latte	162	8	5	149
7	30/01/91	30/01/91	21/03/91	Lombardia	Bergamo	Cologno S.	33	Carne	540	2	32	506
8	05/01/91	07/02/91	27/02/91	Veneto	Padova	Ponte S. Nic.	21	Carne	63	0	0	63
9	30/01/91	13/02/91	14/03/91	Lombardia	Bergamo	Cortenova	33	Latte	91	2	11	78
10	30/01/91	31/01/91	14/03/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Carne	1054	12	88	954
11	14/03/91	23/03/91	27/03/91	Lombardia	Bergamo	Martignano	33	Latte	143	0	11	132
12	11/04/91	14/04/91	14/06/91	Piemonte	Torino	Pinerolo	44	Latte	529	0	0	529
13	12/04/91	24/04/91	01/06/91	Friuli	Udine	Codroipo	7	Latte	128	0	0	128
14	24/04/91	03/05/91	14/05/91	Lombardia	Bergamo	Caravaggio	32	Latte	190	0	24	166
15	03/05/91	09/05/91	20/05/91	Lombardia	Bergamo	Martignano	33	Latte	420	2	39	379
16	03/05/91	19/04/91	16/05/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Latte	115	0	8	107
17	03/06/91	12/06/91	17/06/91	Lombardia	Brescia	Bedizzole	40	Latte	105	1	5	99
18	04/06/91	12/06/91	17/06/91	Lombardia	Bergamo	Caravaggio	32	Latte	6	0	1	5
19	30/05/91	05/06/91	21/06/91	Veneto	Treviso	Riese Pio X	13	Latte	14	0	0	14
20	08/06/91	19/06/91	29/06/91	Friuli	Pordenone	Maniago	10	Latte	95	0	0	95
21	19/06/91	19/06/91	28/06/91	Lombardia	Bergamo	Martignano	33	Latte	90	0	6	84
22	04/07/91	12/07/91	19/10/91	Friuli	Pordenone	Maniago	10	Latte	54	0	6	48
23	16/07/91	23/07/91	29/07/91	Lombardia	Bergamo	Antegnate	33	Latte	165	0	22	143
24	01/08/91	16/08/91	04/10/91	Marche	Ascoli P.	M. Sappolo	22	Latte	349	2	2	6
25	07/08/91	07/08/91	12/08/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Latte	244	0	15	229
26	16/08/91	30/08/91	16/08/91	Marche	Pesaro	Petriano	05	Commercio	1	0	0	1
27	20/08/91	26/08/91	29/08/91	Lombardia	Mantova	Castiglione	46	Latte	31	0	0	31
28	19/08/91	20/08/91	29/08/91	Lombardia	Mantova	Castiglione	46	Latte	170	1	0	169
29	23/08/91	23/08/91	04/09/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Latte	151	3	0	148
30	23/08/91	23/08/91	11/09/91	Lombardia	Brescia	Calvisano	44	Latte	203	0	40	163
31	02/09/91	19/09/91	04/09/91	Lombardia	Brescia	Calvisano	44	Carne	137	0	0	137
32	09/09/91	30/09/91	02/10/91	Lombardia	Bergamo	Fontanella	33	Latte	151	3	0	148
33	09/09/91	26/09/91	—	Marche	Ascoli	M. Sappolo	22	Carne	134	—	—	—
34	30/09/91	02/10/91	07/10/91	Lombardia	Cremona	Izano	53	Latte	23	1	6	22
35	23/08/91	11/10/91	16/10/91	Lombardia	Bergamo	Caravaggio	32	Latte	249	0	15	234

Bibliografia consultata

- 1) Documents techniques. 1985. *Mycoplasmes et Mycoplasmoses des ruminants*. Documents techniques, Institut d'Élevage et Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, Maisons Alfort.
- 2) 1990b. *Pleuropolmonite essudativa contagiosa dei bovini (PPCB) in Portogallo*. Relazione e raccomandazioni di una delegazione comunitaria recatasi in Portogallo, 11-15 giugno 1990. Commissione delle Comunità Europee. Direzione Generale dell'Agricoltura. VI/4068/90-IT-Rev. 4.
- 3) Balbo, S.M. 1970. *La pleuropolmonite essudativa dei bovini*. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina, **7**, 105-120.
- 4) Barale, G., G. Moda e M. Valpreda. 1991. *Descrizione di un episodio di Pleuropolmonite essudativa contagiosa bovina*. Il nuovo Progresso Veterinario, **XLVI**, (3), 91-95.
- 5) Freundt, E.A. et al. 1984. *The Mycoplasmas*, p. 740-775. In Krieg, N.R., Holt, J.G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Vol. **1**. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- 6) Guarda, F. e G. Mandelli. 1989. *Trattato di anatomia patologica veterinaria*. p. 330-332, Utet, Torino.
- 7) Hall, S.A. 1983. *The diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia and other infections with Mycoplasma mycoides subspecies mycoides*. CEC Seminar, in the CEC Programme of Coordination of Research on Animal Pathology. Brussels 16-17 June 1983.
- 8) Hudson, J.R. 1971. *Contagious bovine pleuropneumonia*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- 9) Marcato, P.S. 1988. *Patologia respiratoria animale*. p. 132-133, Edagricole, Bologna.
- 10) Poumarat, F. 1990. *Taxonomic relationship within (Mycoplasma mycoides) cluster indicated by Dot immunobinding on membrane filtration (MFDot)*. IOM Congress, Istanbul.
- 11) Provost, A., P. Perreau, A. Brèard, C. Le Goff, J.L. Martel, et G.S. Cottew. 1987. *Péripneumonie contagieuse bovine*. Rev. Sci. Tech. O.I.E., **6**, 565-624.

- 12) Regalla, J. 1990. *Contagious bovine pleuropneumonia* Seminar in the Community Programme for the Coordination of Agricultural Research, Lisbon, 7-8 december 1988. Luxembourg. Commission of the European Communities (Agriculture, EUR 12065 En).
- 13) Scanziani, E., S. Paltrinieri, e D. Gelmetti . 1991. *Identificazione immunoistochimica di Mycoplasma mycoides subsp. mycoides. Osservazioni preliminari*. Selezione Veterinaria, **32**, 33-40.
- 14) Tully, J.G. 1983. *Tests for digitonin sensitivity and sterol requirement*. Methods in Mycoplasmaology, vol. **1**.
- 15) Van Goidsenhoven, Ch. et F. Schoenaers *Maladies infectieuses des animaux domestiques*. p. 509-525, Vigot Frères, Parigi.

Bibliografia citata

- 1) Anonimo. 1990a. *Informe sobre el programa de erradicacion de la peripneumonia bovina contagiosa en España*.
- 2) Blood, D.C. and O.M. Radostits. 1989. *Contagious Bovine Pleuropneumonia*, p. 778-781. In *Veterinary Medicine*, 7th ed., Baillière Tindall, London, U.K.
- 3) Guadagnini, P.F., F. De Simone, G.F. Panina, D. Gaffuri, M. Bugnetti, M. Finazzi, G. Mandelli, G. Sironi e A. Belloli. 1991. *La pleuropolmonite contagiosa dei bovini (PPCB)*. Una sintesi con osservazioni di campo. Selezione Veterinaria **32**, 3-31.
- 4) Martel, J.L. et P. Belli. 1982. *Péripneumonie contagieuse des bovidés quand doit-on la suspecter?* Le Point Vétérinaire, **68**.
- 5) Office Internationale des Epizooties. 1989. *Santé Animale Mondiale 1988 Vol. IV. Situation zoo-sanitaire et méthodes de prophylaxie des maladies animales*, N. 2, (Deuxième partie: Tableaux), p. 496.
- 6) Regalla, J. 1984. *Epidemiological aspects of the contagious bovine pleuropneumonia in Portugal*. Rep. Trab. L.N.I.V., **16**, 13-18.

APPENDICE

DECRETO Min. Sanità 27 giugno 1991, n. 248, in *G.U.* del 9-8-1991

ORDINANZA Min. Sanità 4 ottobre 1991, in *G.U.* del 14-11-1991



MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO 27 giugno 1991, n. 248

Disposizioni urgenti di polizia veterinaria per l'eradicazione della pleuropolmonite essudativa contagiosa bovina.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

Visto il testo unico delle leggi sanitarie, approvato con regio decreto 27 luglio 1934, n. 1265, e successive modifiche;

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

Vista la legge 23 gennaio 1968, n. 34 (*Gazzetta Ufficiale* n. 37 del 12 febbraio 1968);

Vista la legge 23 dicembre 1978, n. 833 (supplemento ordinario alla *Gazzetta Ufficiale* n. 360 del 28 dicembre 1978);

Vista la legge 2 giugno 1988, n. 218 (*Gazzetta Ufficiale* n. 144 del 21 giugno 1988);

Visto il parere espresso dal Consiglio superiore di sanità nella seduta del 12 dicembre 1990;

Vista la decisione della Commissione delle Comunità europee n. 91/57/CEE del 24 gennaio 1991, relativa alla proroga della partecipazione finanziaria della Comunità al proseguimento dell'eradicazione della pleuropolmonite contagiosa dei bovini in Italia;

Visto l'art. 17, comma 3, della legge 23 agosto 1988, n. 400;

Considerata l'urgenza di svolgere le opportune azioni di eradicazione della pleuropolmonite contagiosa bovina in Italia;

Considerato che, a seguito dei sopralluoghi disposti in Italia, la Commissione delle Comunità europee ritiene necessario un triplice controllo sierologico con esito negativo su tutti i bovini di età superiore a dodici mesi prima che si possa dichiarare il territorio delle singole regioni indenne da pleuropolmonite contagiosa bovina in relazione ad un piano nazionale;

Udito il parere n. 793/91 del Consiglio di Stato reso nell'adunanza generale del 4 aprile 1991;

Vista la comunicazione della Presidenza del Consiglio dei Ministri eseguita in data 27 aprile 1991;

A D O T T A

il seguente regolamento

Art. 1

1. Sull'intero territorio nazionale dovrà essere effettuata un'azione di polizia veterinaria volta all'eradicazione della pleuropolmonite contagiosa bovina mediante la rapida estinzione dei focolai di malattia da un lato e un'indagine sierologica estesa a tutti i bovini di età superiore a dodici mesi presenti sul territorio nazionale dall'altro.

2. Ai fini del presente decreto si deve intendere per:

a) azienda: il complesso agricolo o la stalla dove sono detenuti dei bovini da riproduzione, da produzione o da macello controllati ufficialmente; per quanto riguarda le stalle dei commercianti devono intendersi come ufficialmente controllate quelle autorizzate ai sensi dell'art. 17 del decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320 e dell'art. 20 del

decreto ministeriale 1° giugno 1968, rispettivamente, pubblicati nella *Gazzetta Ufficiale* n. 233 del 13 settembre 1968 e n. 234 del 14 settembre 1968;

b) zona infetta: una zona delimitata per un diametro di almeno 3 km, attorno un'azienda nella quale sia stato constatato ufficialmente un focolaio di pleuropolmonite contagiosa bovina come pure attorno ad un'azienda collegata epizootologicamente con un focolaio di malattia;

c) prova sierologica: prova di fissazione del complemento modificata secondo il metodo di Campbell e Turner;

d) caso di malattia: ogni animale che abbia fornito reazione sierologica confermata dal laboratorio di referenza nazionale per la pleuropolmonite contagiosa bovina e/o che presenti all'ispezione *post-mortem* le lesioni patognomiche della suddetta malattia e/o dal quale sia stato isolato *Mycoplasma mycoides* sottospecie *mycoides* (biotipo a piccole colonie);

e) focolaio: un'azienda nella quale vengono constatati uno o più casi di pleuropolmonite contagiosa bovina;

f) reattivi: animali che reagiscono ad una prova sierologica.

Art. 2

1. Ai fini dell'eliminazione dei focolai di pleuropolmonite contagiosa bovina, l'unità sanitaria locale competente per territorio, ai sensi del regolamento di polizia veterinaria approvato con decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320 e della ordinanza ministeriale 6 ottobre 1984, deve provvedere a:

a) notificare al Ministero della sanità, i focolai sospetti e/o accertati di pleuropolmonite contagiosa dei bovini;

b) predisporre specifiche indagini epizootologiche per la individuazione delle aziende infette e, in particolare, per lo svolgimento di un esame sierologico

completo;

c) adottare il provvedimento di zona infetta e di zona di protezione;

d) vietare gli spostamenti dei bovini presenti nelle aziende in cui sono stati riscontrati animali reattivi, fatta eccezione per quelli che devono essere immediatamente abbattuti sotto controllo veterinario ufficiale. Tale divieto dovrà essere mantenuto finché tutti i bovini di età superiore a dodici mesi, presenti nella zona interessata, non abbiano reagito negativamente a tre prove consecutive eseguite ad intervalli di almeno tre settimane. Nel caso in cui in un'azienda si verificano reazioni positive in numero ridotto può essere previsto l'abbattimento di uno o più bovini nei quali si sia verificata la reazione sierologica; la diagnosi definitiva potrà essere effettuata mediante ispezione *post-mortem* e/o indagini di laboratorio;

e) vietare gli spostamenti dei bovini presenti nelle zone infette, fatta eccezione per quelli che devono essere abbattuti sotto controllo veterinario ufficiale, finché tutti i bovini di età superiore a dodici mesi, presenti in tali zone, non abbiano reagito negativamente a tre prove consecutive eseguite ad intervalli di almeno tre settimane;

f) disporre l'abbattimento di tutti i bovini presenti nelle aziende in cui si siano manifestati numerosi casi;

g) disporre che siano sottoposti a prova sierologica tutti i bovini presenti nella zona infetta;

h) autorizzare l'abbattimento di bovini sotto controllo veterinario ufficiale, conformemente al disposto delle lettere d) e f), presso stabilimenti di macellazione riconosciuti dal Ministero della sanità, su proposta del Servizio veterinario regionale. Tali abbattimenti dovranno essere eseguiti immediatamente dopo la notifica ufficiale al proprietario e ad altra persona responsa-

bile, dei risultati delle prove o indagini. Fatto salvo quanto disposto dalla legge 29 novembre 1971, n. 1073, e successive modifiche, le carni dei suddetti animali possono essere immesse in commercio a condizione che le ispezioni sanitarie *ante-mortem* e *post-mortem* non abbiano rivelato alterazioni tali da rendere le carcasse inadatte al consumo umano. In ogni caso, dovrà essere disposta la distruzione della testa e dei visceri, ivi compresi i reni, non trascurando, inoltre, il controllo a campione per la ricerca di eventuali residui di farmaci presenti nelle carni;

i) determinare, ai sensi dell'art. 4, secondo comma, della legge 2 giugno 1988, n. 218, l'ammontare complessivo dell'indennità da corrispondere ai proprietari dei bovini abbattuti in forza della lettera d) e della lettera f); inviare immediata comunicazione alla regione competente che, ai sensi dell'art. 3, terzo comma, della citata legge n. 218/88, provvede direttamente, entro sessanta giorni dall'abbattimento, a liquidare agli allevatori le indennità ad essi spettanti;

l) disporre la pulizia e la disinfezione delle aziende dopo l'abbattimento dei bovini;

m) assicurare l'adozione delle seguenti misure:

1) il divieto dei trattamenti terapeutici e della somministrazione di vaccini contro la pleuropolmonite essudativa contagiosa dei bovini;

2) l'istituzione di un sistema di identificazione di tutti i bovini presenti sul territorio, che consenta di rintracciare in qualsiasi momento l'unità sanitaria locale e l'azienda di provenienza;

3) la registrazione delle aziende in cui viene praticato l'allevamento dei bovini;

4) il controllo degli spostamenti dei bovini;

5) l'informazione e la sensibilizzazio-

ne dei veterinari in merito alle modalità di attuazione dei provvedimenti: in particolare, i materiali che presentano lesioni sospette devono essere fatti analizzare presso il laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale competente per il territorio.

Art. 3

1. Il servizio veterinario regionale deve inviare con ogni sollecitudine, al Ministero della sanità una relazione sulle risultanze delle indagini epizootologiche, contenente, altresì, le seguenti notizie:

a) il numero dei bovini reattivi, dei casi di infezione dei focolai riscontrati, nonché il numero delle aziende in cui sono stati individuati animali reattivi;

b) l'ammontare dell'indennizzo corrisposto ai proprietari per l'abbattimento e la distruzione e/o per la macellazione degli animali presenti nei focolai, nonché la distruzione dei prodotti;

c) l'entità delle spese sostenute per la pulizia, la disinfezione e la disinfestazione dell'azienda.

Art. 4

1. Le autorità regionali richiameranno l'attenzione dei veterinari ispettori presso i macelli, affinché, nella fase dell'ispezione i polmoni dei bovini siano sottoposti ad accurato esame comprendente sistematicamente la palpazione dell'organo; nei casi sospetti, i polmoni dovranno essere inviati al laboratorio della sezione diagnostica zooprofilattica competente per territorio e, se del caso, al laboratorio di referenza nazionale operante presso l'istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise.

Art. 5

1. Il presente decreto entra in vigore il giorno successivo a quello della sua pubblicazione nella *Gazzetta Ufficiale*.

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, 27 giugno 1991

Il Ministro: DE LORENZO

NOTE

AVVERTENZA:

Il testo delle note qui pubblicato è stato redatto ai sensi dell'art. 10, comma 3, del testo unico approvato con decreto del Presidente della Repubblica 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.

Note all'art. 1:

— Il testo dell'art. 17 del D.P.R. n. 320/1954 è il seguente:

«Art. 17 — L'esercizio delle stalle di sosta ed in genere dei locali da adibirsi al temporaneo ricovero di equini, bovini, ovini, caprini, suini e di animali da cortile da parte dei negozianti, dei gestori di alberghi, mascalcie, mulini e pubblici esercizi è subordinato ad autorizzazione del sindaco, al quale gli interessati devono rivolgere domanda.

Il sindaco, in base al risultato del sopralluogo del veterinario comunale, rilascia l'autorizzazione quando risulta che i locali sono situati in idonea località e che sono provvisti dei necessari requisiti igienici anche per quanto si riferisce allo smaltimento delle deiezioni degli animali.

Qualora i locali non rispondano alle esigenze dell'igiene il sindaco ordina i lavori necessari ed assegna il termine entro il quale devono essere eseguiti.

Le stalle di sosta e gli altri locali anzidetti sottostanno alla vigilanza del veterinario co-

munale. Se tra gli animali ricoverati si manifestano malattie infettive non comprese tra quelle indicate all'art. 1, l'autorità comunale adotta le misure atte ad impedirne la propagazione.

Ai negozianti di animali è fatto obbligo di tenere costantemente aggiornato un registro di carico e scarico conforme al modello 3 allegato al presente regolamento.

Per la mancata esecuzione dei lavori ordinati o per altre infrazioni alle precedenti norme il sindaco dispone la chiusura temporanea dei locali indicati nei precedenti commi o, nei casi più gravi, la revoca dell'autorizzazione all'esercizio».

— Il testo dell'art. 20 del D.M. 1° giugno 1968 è il seguente:

«Art. 20 — I commercianti di bestiame che intendano fornire bovini agli allevamenti posti sotto il controllo dello Stato ai fini del risanamento dalla tubercolosi, oltre ad essere muniti di regolare licenza, devono a tale scopo attivare una apposita stalla, completamente isolata, nella quale fare affluire soltanto animali che abbiano i requisiti indicati all'art. 18, punto 6, e successivo comma.

L'attivazione di tali stalle deve essere espressamente richiesta con le modalità dell'art. 17 del regolamento di polizia veterinaria approvato con decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320.

Il parere del veterinario comunale, previsto dal citato art. 17 circa l'idoneità delle stalle di sosta, deve essere sottoposto, in tali casi, al preventivo visto del veterinario provinciale che può dettare particolari disposizioni in relazione alle finalità dei programmi di profilassi e di risanamento.

I commercianti sono tenuti ad annotare nell'apposito registro di carico e scarico i contrassegni di identificazione apposti agli animali e ritenuti validi ai sensi del presente decreto».

— Il testo dell'art. 23 del D.M. 3 giugno 1968 è il seguente:

«Art. 23 — I commercianti di bestiame

che intendono fornire bovini agli allevamenti posti sotto il controllo dello Stato ai fini del risanamento dalla brucellosi, oltre ad essere muniti di regolare licenza, devono a tale scopo, attivare una apposita stalla, completamente isolata, nella quale fare affluire soltanto animali che abbiano i requisiti indicati al punto 3 del precedente art. 22.

L'attivazione di tali stalle deve essere espressamente richiesta con le modalità dell'art. 17 del regolamento di polizia veterinaria approvato con decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320.

Il parere del veterinario comunale, previsto dal citato art. 17 circa l'idoneità delle stalle di sosta, deve essere sottoposto, in tali casi, al visto del veterinario provinciale, che può dettare particolari disposizioni in relazione alle finalità dei programmi di risanamento.

I commercianti sono tenuti ad annotare, nell'apposito registro di carico e scarico, i contrassegni di identificazione apposti agli animali e ritenuti validi ai sensi del presente decreto.

Per lo scopo di cui al primo comma del presente articolo possono essere utilizzate le stalle già attivate ai sensi dell'art. 20 del decreto ministeriale 1° giugno 1968 per il ricovero di animali destinati ad essere introdotti negli allevamenti posti sotto il controllo dello Stato ai fini del risanamento dalla tubercolosi".

Note all'art. 2:

— L'O.M. 6 ottobre 1984 reca: «Norme relative alla denuncia di alcune malattie infettive degli animali nella Comunità europea» ed è pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* n. 279 del 10 Ottobre 1984.

— La legge n. 1073/1971 reca: «Norme sanitarie sugli scambi di carni fresche tra l'Italia e gli altri Stati membri della Comunità economica europea».

— Il testo degli articoli 3 e 4 della legge n. 218/1988 è il seguente:

«Art. 3 — 1. Le indennità di cui all'articolo 2 gravano sulla quota a destinazione vincolata del Fondo sanitario nazionale, per la parte afferente alla profilassi delle malattie infettive e diffusive degli animali.

2. Per tali indennità il Ministro del tesoro, in deroga alle procedure previste dalla legge 23 dicembre 1978, n. 833, assegna direttamente alle regioni, su proposta del Ministro della sanità, le somme destinate al pagamento delle indennità di abbattimento in relazione agli abbattimenti effettuati o preventivati dalle regioni interessate.

3. Le regioni provvedono direttamente, entro sessanta giorni dall'abbattimento, a liquidare agli allevatori le indennità ad essi spettanti. A decorrere dalla scadenza del predetto termine sono dovuti gli interessi legali.

Art. 4 — 1. AI fini dell'applicazione delle norme di cui all'articolo 2, comma 2, la regione stabilisce tempestivamente le modalità ed i tempi di abbattimento, tenuto conto della consistenza numerica degli allevamenti, del sistema di allevamento e della situazione epizootica, in conformità alle direttive impartite dal Ministro della sanità.

2. Il sindaco adotta l'ordinanza di abbattimento e, se del caso, di distruzione degli animali nelle ipotesi di cui all'articolo 2, commi 1, 2 e 3, ed informa in ogni caso il Ministero della sanità e la regione. Con separato provvedimento stabilisce l'ammontare complessivo delle indennità da corrispondere al proprietario interessato in ragione del numero degli animali abbattuti e della misura dell'indennità calcolata per ciascun animale, detraendo eventualmente il ricavo della vendita delle carni, dei prodotti e degli avanzi, in conformità all'articolo 2, comma 3. I provvedimenti del sindaco sono definitivi e sono trasmessi alla regione».

MINISTERO DELLA SANITÀ

ORDINANZA 4 ottobre 1991

Piano di eradicazione della pleuropolmonite essudativa contagiosa dei bovini dal territorio nazionale.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

Visto il testo unico delle leggi sanitarie, approvato con regio decreto 27 luglio 1934, n. 1265, e successive modifiche;

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

Vista la legge 23 gennaio 1968, n. 34;

Vista la legge 23 dicembre 1978, n. 833;

Vista la legge 2 giugno 1988, n. 218;

Visto il decreto 20 luglio 1989, n. 298;

Visto il decreto 8 agosto 1988, n. 476: pagamento delle prestazioni veterinarie per l'attuazione delle profilassi vaccinali obbligatorie contro le malattie infettive e diffuse degli animali e per l'esecuzione della bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi, dalla brucellosi e dalla leucosi;

Visto il decreto ministeriale 27 giugno 1991, n. 248, recante disposizioni urgenti di polizia veterinaria per l'eradicazione della pleuropolmonite essudativa contagiosa bovina, in attuazione della decisione della Commissione CEE n. 91/57/CEE del 24 gennaio 1991;

Vista la decisione del Consiglio CEE del 26 giugno 1990 (n. 90/424/CEE) relativa a talune spese nel settore veterinario, in particolare l'art. 24, modificata dalla decisione del Consiglio CEE del 4

marzo 1991 (n. 91/133/CEE);

Vista la decisione n. 91/46/CEE del 24 gennaio 1991 della Commissione CEE riguardante la partecipazione finanziaria della Comunità alle misure d'emergenza adottate dall'Italia per la presenza della pleuropolmonite contagiosa dei bovini;

Vista la decisione n. 90/638/CEE del Consiglio CEE del 27 novembre 1990 che fissa i criteri comunitari applicabili alle azioni di eradicazione e di sorveglianza di talune malattie animali;

Visto il decreto ministeriale 2 maggio 1991 che istituisce il Centro di referenza per le malattie esotiche (CESME) presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, con sede in Teramo;

Visto il parere espresso dal Consiglio superiore di sanità nella seduta del 12 dicembre 1990;

Vista la decisione del 17 giugno 1991 (n. 91/348/CEE) con cui la Commissione CEE ha approvato il piano di eradicazione della malattia presentato dall'Italia il 26 marzo 1991;

Ritenuto necessario dare attuazione alla predetta decisione comunitaria del 17 giugno 1991 allo scopo di pervenire mediante interventi di controllo alla eradicazione della malattia dal territorio nazionale;

Ordina:

Art. 1

1. È resa obbligatoria l'esecuzione del piano di eradicazione della pleuropolmonite essudativa contagiosa bovina da attuarsi in tutto il territorio nazionale, approvato dalla Commissione CEE con propria decisione citata nelle premesse, secondo le modalità indicate al

successivo art. 2.

2. A tale scopo sono sottoposti ai controlli sanitari da parte delle unità sanitarie locali i bovini da allevamento, di età superiore a dodici mesi, e da ingrasso, di età non inferiore a sei mesi.

Art. 2

1. Le regioni e province autonome di

Trento e Bolzano, ai fini attuativi del programma di cui al precedente art. 1 della presente ordinanza, dispongono il prelievo di campioni di sangue dei bovini degli allevamenti del proprio territorio, scelti secondo il sistema randomizzato, in correlazione alla tipologia di allevamento regionale, come di seguito riportato:

I.1. *Regione Lombardia*, accertamenti sierologici da almeno 298 allevamenti di cui 200 da riproduzione e 98 da ingrasso:

Allevamenti con numero capi (classe ISTAT)	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	500 e oltre	Tot.
Allevamenti da esaminare	1	4	6	14	37	47	154	35	298
N. minimo dei capi da esaminare nelle aziende campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	7616

I.2. *Regione Piemonte*, accertamenti sierologici da almeno 300 allevamenti di cui 200 da riproduzione e 100 da ingrasso:

Allevamenti con numero capi (classe ISTAT)	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	500 e oltre	Tot.
Allevamenti da esaminare	3	10	11	33	76	66	79	22	300
N. minimo dei capi da esaminare nelle aziende campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	6855

I.3. *Regione Veneto*, accertamenti sierologici da almeno 297 allevamenti di cui 200 da riproduzione e 97 da ingrasso:

Allevamenti con numero capi (classe ISTAT)	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	500 e oltre	Tot.
Allevamenti da esaminare	4	11	17	31	68	47	62	57	297
N. minimo dei capi da esaminare nelle aziende campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	6772

I.4. *Regione Marche*, accertamenti sierologici da almeno 298 allevamenti di cui 200 da riproduzione e 98 da ingrasso:

Allevamenti con numero capi (classe ISTAT)	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	500 e oltre	Tot.
Allevamenti da esaminare	6	25	32	70	36	95	30	4	298
N. minimo dei capi da esaminare nelle aziende campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	5674

1.5. Regione Friuli-Venezia Giulia, accertamenti sierologici da almeno 298 allevamenti di cui 200 da riproduzione e 98 da ingrasso:

Allevamenti con numero capi (classe ISTAT)	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	500 e oltre	Tot.
Allevamenti da esaminare	6	22	32	52	69	72	31	14	298
N. minimo dei capi da esaminare nelle aziende campione	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	5834

1.6. Per le restanti regioni e province autonome, il campionamento deve essere eseguito secondo la riportata tabella, in correlazione alla tipologia di allevamento regionale:

Allevamenti con numero capi (classe ISTAT)	1-2	3-5	6-9	10-19	20-49	50-99	100-499	500 e oltre	Tot.
Valle d' Aosta	0	0	1	0	1	0	0	0	2
Trentino-Alto Adige	0	2	2	5	6	1	1	0	17
Liguria	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Emilia-Romagna	0	1	3	8	18	17	20	5	72
Toscana	0	1	2	2	5	1	7	2	20
Umbria	0	1	1	1	3	1	2	0	9
Lazio	1	2	4	6	7	4	5	1	30
Abruzzo	1	1	2	3	3	1	1	0	12
Molise	0	1	1	2	1	0	0	0	5
Campania	1	5	5	7	5	3	2	1	29
Puglia	0	1	1	3	5	2	2	1	15
Basilicata	0	1	2	2	2	0	1	0	8
Calabria	1	2	3	4	3	2	2	1	18
Sicilia	0	1	1	6	15	6	3	2	34
Sardegna	0	1	2	4	8	4	3	1	23
Totale	4	20	30	54	82	42	49	14	295

Capi da esaminare negli allevamenti campione

Capi/allev.	tutti	tutti	tutti	16	22	25	28	29	—
Totale	8	100	270	864	1804	1050	1372	406	5874

2. I bovini degli allevamenti sottoposti al controllo del piano debbono essere identificabili ed i relativi contrassegni individuali devono essere riportati nella scheda allegata n. 1 che deve accompagnare i campioni di sangue inviati all'istituto zooprofilattico competente per territorio.

3. Gli animali degli allevamenti controllati non possono essere spostati prima degli esiti degli esami sierologici ad esclusione degli animali che devono essere avviati direttamente alla macellazione, senza passare per i mercati o le fiere.

4. Negli allevamenti in cui vengono rilevate sieropositività si applicano le disposizioni contenute nel decreto ministeriale 27 giugno 1991, recante disposizioni urgenti di polizia veterinaria per l'eradicazione della pleuropolmonite essudativa contagiosa bovina.

Art. 3

1. Fermo restando quanto disposto all'art. 2 della presente ordinanza, tutti i bovini degli allevamenti da riproduzione destinati ad essere spostati, devono essere

sottoposti agli accertamenti sierologici per la pleuropolmonite essudativa contagiosa nei trenta giorni precedenti la data di spedizione da un'azienda all'altra.

2. Parimenti sono soggetti a controlli sierologici su base campionaria a livelli statisticamente significativi, i bovini da ingrasso che vengono introdotti in allevamenti, stalle di sosta.

3. I controlli sanitari per la pleuropolmonite contagiosa bovina sono eseguiti anche sugli animali della specie bovina importati negli allevamenti di destinazione.

4. I sieri degli animali di cui ai precedenti commi devono essere esaminati con carattere di priorità dagli istituti zooprofilattici sperimentali competenti per territorio.

Art. 4

1. In attuazione dell'art. 1 del presente decreto, i prelevamenti dei campioni di sangue devono essere eseguiti dai veterinari dipendenti delle unità sanitarie locali.

2. Tuttavia le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano, per comprovate esigenze zooprofilattiche, sentito il Ministero della sanità, possono avvalersi di veterinari liberi professionisti appositamente autorizzati per il prelievo di campioni di sangue. Per i compensi spettanti ai veterinari liberi professionisti e per i rimborsi dovuti ai veterinari delle unità sanitarie locali, si richiamano, in quanto applicabili, per analogia, le norme previste dal decreto del Ministro della sanità 8 agosto 1988, n. 476, citato nelle premesse.

3. I campioni di sangue opportunamente identificati dovranno essere inviati al più presto possibile all'istituto zooprofilattico competente per territorio, che in caso di esito non favorevole deve recapitarli tempestivamente all'Istituto zoopro-

filattico di Teramo, per la conferma.

4. Gli esiti di positività sierologica devono essere comunicati, tempestivamente e simultaneamente, dagli istituti zooprofilattici all'unità sanitaria locale interessata, al servizio veterinario regionale e al Ministero della sanità.

5. I predetti enti tengono a disposizione della Commissione CEE, per un periodo di tre anni dalla realizzazione del piano, i documenti comprovanti gli esami per un eventuale controllo da parte dell'esecutivo comunitario.

6. Ogni siero deve essere accompagnato dalla scheda conforme al modello allegato A.

7. Per il perseguimento degli obiettivi fissati dal piano di risanamento dalla pleuropolmonite dei bovini viene istituita una commissione presso il Ministero della sanità incaricata del controllo, della sorveglianza e del coordinamento dei servizi veterinari per una uniforme attuazione del programma sanitario in tutto il territorio nazionale.

8. Il Ministero della sanità, d'intesa con il centro di referenza nazionale per le malattie esotiche, istituito con decreto ministeriale 2 maggio 1991 presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale di Teramo, promuove la raccolta in modo uniforme, e l'elaborazione da parte del centro stesso dei dati epidemiologici sul programma di cui trattasi, inviati dagli istituti zooprofilattici e dalle regioni e province autonome di Trento e Bolzano.

Art. 5

1. Le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano devono trasmettere copia dei provvedimenti adottati dalla competente autorità sanitaria in seguito a casi di pleuropolmonite contagiosa bovina al Ministero e alle regioni e province autonome suddette.

SOMMARIO

La pleuropolmonite contagiosa del bovino: rassegna	Pag. 5
<i>di Prosperi S. - A. Pini</i>	
Le tecniche di laboratorio	Pag. 29
<i>di Sanguinetti V. - P. Semprini - G. Semproni</i>	
Prelievo dei campioni per la diagnosi di laboratorio di PPCB	Pag. 41
<i>di Scacchia M. - G. Semproni - F.G. Santini</i>	
Osservazioni e suggerimenti per una indagine epidemiologica	Pag. 45
<i>di Giovannini A. - M. Scacchia - G. Semproni</i>	
Allegati	Pag. 60
Bibliografia	Pag. 67
Appendice	Pag. 69

