

## **ALLEGATO 1.a.**

### **Metodi diagnostici per la concessione e il mantenimento dello status di indenne da brucellosi**

#### **RIFERIMENTI**

- \* Regolamento Reg. 689/2020 Allegato III Sez. 1.
- \* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual) of the World Organisation for Animal Health CHAPTER 3.1.4. BRUCELLOSIS (INFECTION WITH BRUCELLA ABORTUS, B. MELITENSIS AND B. SUIS) - Ed. 2023
- \* Standard Operating Procedure of European Union Reference Laboratory for Brucellosis “Brucella culture and genus identification” Rev.04 June 2021
- \* Standard Operating Procedure of European Union Reference Laboratory for Brucellosis “Brucellosis Complement Fixation Test (EU RL cold and warm incubation)”. Rev. 11 October 2021
- \* Standard Operating Procedure of European Union Reference Laboratory for Brucellosis “Brucellosis Rose Bengal Test” Rev.01 July 2021
- \* Standard Operating Procedure of European Union Reference Laboratory for Brucellosis “Brucella typing”. Rev 1. June 2021

#### **PROVE SIEROLOGICHE UFFICIALI.**

Le prove sierologiche ufficiali indicate nell'allegato III Sez. 1 del Regolamento 689/2020 sono:

- a) prove per campioni di sangue:
  - i. prove con antigene brucella tamponato;
  - ii. prova di fissazione del complemento (CFT);
  - iii. ELISA indiretto (I-ELISA);
  - iv. ELISA competitivo (C-ELISA);
- b) prove per campioni di latte:
  - i. ring test (MRT);
  - ii. I-ELISA.

#### 2. Prova di intradermoreazione alla brucellina (BST).

Sul territorio nazionale sono in uso, tra i metodi indicato nel citato Regolamento, la prova con antigene brucella tamponato (SAR), come test di screening su tutte le specie sottoposte al piano di eradicazione, e la prova di fissazione del complemento come test complementare e di titolazione dei sieri risultati positivi al test di screening.

- i. **Prova con antigene brucella tamponato (SAR).**
  - a. Campo di applicazione.

La prova di sieroagglutinazione rapida è da eseguirsi su tutti i campioni ematici prelevati, per la diagnosi sierologica della brucellosi bovina, bufalina ed ovi-caprina. Per la sua elevata sensibilità,

può trovare impiego in ogni situazione epidemiologica come test di screening. Tutti i sieri positivi alla SAR devono essere saggiati mediante la prova FDC per la conferma.

b. Test di agglutinazione rapida al Rosa bengala (SAR).

Per l'esecuzione della prova deve essere utilizzato l'antigene brucellare tamponato al Rosa Bengala prodotto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (Teramo - ITALY) e il Siero Nazionale Standard come controllo positivo (o siero equivalente) e la prova deve essere eseguita secondo le procedure fornite dal laboratorio nazionale di riferimento, che a sua volta, ha adottato le procedure del laboratorio di riferimento EU (EU-RL). Le risposte delle analisi devono essere fornite dai laboratori degli IZZSS entro 7 giorni dal ricevimento dei campioni.

I controlli ufficiali dell'antigene per SAR e del siero nazionale standard sono effettuati dal laboratorio nazionale di riferimento per le Brucellosi, su ogni serie prodotta, seguendo le procedure fornite del Laboratorio di referenza comunitario (EU-RL) e il capitolo 3.1.4 del Manuale degli standard WOA. H.

ii. **Prova di fissazione del complemento (FDC).**

a. Campo di applicazione.

La prova di fissazione del complemento (FDC) è dotata di ottima sensibilità e specificità, e, pertanto, può essere considerata il saggio di base e di riferimento. La prova FDC deve essere eseguita su tutti i campioni positivi alla SAR e su tutti gli animali dell'allevamento nel caso di allevamenti sospetti, anche se negativi alla SAR. La prova FDC è un metodo di tipo quantitativo; il risultato è espresso in UI/ml fissanti il complemento, ottenuti utilizzando la tabella di conversione del titolo in valori numerici riferiti alle unità internazionali (UI/ml). La tabella è allegata alla procedura operativa fornita dal laboratorio nazionale di riferimento e la procedura redatta dal LNR è conforme alla procedura del EU-RL. La prova della FdC è considerata positiva se il siero in esame presenta un titolo uguale o maggiore a 20 UIFC/ml.

b. Test di fissazione del complemento (FDC).

La prova deve essere eseguita con l'antigene brucellare per FDC prodotto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna (sede di Brescia) e il Siero Nazionale Standard come controllo positivo (o siero equivalente), seguendo le procedure del Laboratorio di referenza comunitario (EU-RL) e il capitolo 3.1.4 del Manuale degli standard WOA. H. Le risposte delle analisi devono essere fornite entro 7 giorni dal ricevimento dei campioni.

I controlli ufficiali dell'antigene per FDC e del siero nazionale standard sono effettuati dal laboratorio nazionale di riferimento per le Brucellosi, su ogni serie prodotta, seguendo le procedure fornite del Laboratorio di referenza comunitario (EU-RL) e il capitolo 3.1.4 del Manuale degli standard WOA. H.

iii. **ELISA indiretto (I-ELISA)**

La metodica ELISA può essere utilizzata mediante l'uso di un kit che contenga i reagenti necessari per la prova. Le performance del kit utilizzato e, di conseguenza, l'interpretazione dei risultati devono essere state convalidate dal produttore conformemente ai principi stabiliti nel capitolo 1.1.6 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri del WOA. H. (edizione 2023) e devono comprendere studi diagnostici e di laboratorio. Inoltre, ogni lotto del kit in uso deve essere controllato da un laboratorio nazionale di riferimento (LNR) dell'Unione Europea, seguendo le procedure del Laboratorio di referenza comunitario (EU-RL).

a. Campo di applicazione

La metodica ELISA siero può essere utilizzata come test complementare in aggiunta ai test SAR e FDC, o quando richiesto per esportazione/importazione. Il test ELISA latte può essere utilizzato in allevamenti indenni di province indenni, mediante l'esame di campioni di latte di massa provenienti da aziende in cui almeno il 30 % delle vacche da latte sia in lattazione. Se si utilizza il test ELISA latte, è necessario garantire che si possa risalire univocamente ai singoli animali che hanno composto il bulk del latte esaminato.

Le prove di conferma, in caso di positività, devono essere effettuate su campioni di siero prelevato dai singoli animali che hanno composto il pool di latte di massa.

Il milk-ELISA può essere utilizzato anche per esaminare il latte di bovini appartenenti ad allevamenti indenni senza vaccinazione, presenti in province indenni o anche non indenni, per eseguire controlli aggiuntivi tra un prelievo di siero e il successivo per evidenziare precocemente le infezioni.

Il test può essere richiesto anche in autocontrollo e il prelievo di latte deve essere eseguito dal veterinario aziendale e il campione deve essere conferito presso l'IZS territorialmente competente per essere esaminato.

Il test ELISA indiretto sul siero può essere utilizzato come esame indiretto complementare agli altri test sierologici, quando la conferma non può essere fatta tramite test diretti o connessioni epidemiologiche.

b. Test ELISA indiretto.

Il test deve essere eseguito in maniera conforme alle indicazioni fornite dal produttore del kit mediante il foglietto illustrativo.

Le risposte delle analisi devono essere fornite dai laboratori degli IIZZSS entro 7 giorni dal ricevimento dei campioni.

**iv. ELISA competitiva (c-ELISA)**

La metodica c-ELISA può essere eseguita mediante l'uso di un kit che contenga i reagenti necessari per la prova. Le performance del kit utilizzato e, di conseguenza, l'interpretazione dei risultati devono essere state convalidate dal produttore conformemente ai principi stabiliti nel capitolo 1.1.6 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri del WOA (edizione 2023) e devono comprendere studi diagnostici e di laboratorio. Inoltre, ogni lotto del kit in uso deve essere controllato da un laboratorio nazionale di riferimento (LNR), seguendo le procedure del Laboratorio di referenza comunitario (EU-RL).

a. Campo di applicazione

La metodica c-ELISA può essere utilizzata per esaminare il siero di bovini, bufalini, ovini e caprini, come test complementare in aggiunta ai test SAR e FDC, quando gli esiti delle altre prove sierologiche sono non conclusive o quando la conferma non può essere fatta tramite test diretti o connessioni epidemiologiche.

b. Test c-ELISA.

Il test deve essere eseguito in maniera conforme alle indicazioni fornite dal produttore del kit mediante il foglietto illustrativo.

Le risposte delle analisi devono essere fornite dai laboratori degli IIZZSS entro 7 giorni dal ricevimento dei campioni.

## **PROVE BATTERIOLOGICHE E MOLECOLARI**

### **i) Isolamento batterico**

#### **a. Campo di applicazione**

L'isolamento microbiologico di *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* deve essere effettuato sugli organi e/o matrici di animali risultati positivi alle prove sierologiche per confermare i casi sospetti di brucellosi o in presenza di manifestazioni cliniche riferibili a brucellosi. Nonostante l'isolamento colturale sia lento, costoso e indaginoso, può essere considerato il metodo di elezione ogni qualvolta ci sia il sospetto di infezione, per confermare il caso e determinare la specie di *Brucella* responsabile (Reg. 689/2020 articolo 9).

L'esame colturale per la ricerca di *Brucella* spp. è da eseguire in un laboratorio BSL3.

#### **b. Procedura**

Nell'animale in vita le matrici target da prelevare per l'isolamento colturale sono: latte, scoli vaginali (tamponi vaginali e cervicali), seme, liquido sinoviale e, in caso di aborto, feto, liquido amniotico e invogli fetali.

Negli esami *post-mortem* gli organi target da prelevare per l'isolamento microbiologico sono: tessuti del sistema reticolo-endoteliale (milza, linfonodi sopramammari, linfonodi iliaci, linfonodi retrofaringei), mammella, testicoli, utero gravido o post gravidico.

L'isolamento colturale permette l'identificazione di microrganismi presumibilmente appartenenti al genere *Brucella* spp, che devono essere successivamente confermati e caratterizzati mediante test biochimici e/o di biologia molecolare.

Per l'isolamento di batteri appartenenti al genere *Brucella* è preferibile utilizzare in parallelo terreni colturali solidi e liquidi. Tale combinazione consente di migliorare le performance del test. Quando la ricerca è condotta su materiale presumibilmente contaminato da altri micro-organismi, i terreni di coltura devono essere resi selettivi aggiungendo antibiotici e/o antimicotici. L'uso dei terreni liquidi è raccomandato nel caso di campioni voluminosi o presumibilmente contenenti un basso numero di *Brucelle*. Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per Brucellosi fornisce a richiesta le procedure in uso e i relativi report di validazione.

Il laboratorio EU-RL ha reso disponibili sul suo sito web le procedure relative all'isolamento di *Brucella* spp da campioni biologici, che sono presenti anche nel capitolo 3.1.4 del Manuale degli standard WOA. H.

Il laboratorio territorialmente competente che esegue le prove di isolamento deve fornire gli esiti degli esami entro 42 giorni (6 settimane) dal ricevimento da parte dell'IZS del campione.

In caso di positività la comunicazione avverrà entro le 24 ore successive alla identificazione del ceppo.

### **ii) Rilevamento dell'acido nucleico di *Brucella* spp. (PCR)**

#### **a. Campo di applicazione**

La PCR e la Real time PCR costituiscono un ulteriore metodo diretto per evidenziare la presenza di *Brucella* spp. ed hanno lo stesso campo di applicazione dell'isolamento batterico (conferma dell'infezione). Nonostante l'elevato grado di omologia del DNA all'interno del genere *Brucella*,

esistono diversi metodi molecolari che permettono la differenziazione delle diverse specie e di alcune biovar.

b. Procedura

Nel capitolo 3.1.4 del Manuale dei test of Diagnostici e dei Vaccini (Terrestrial Manual) dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità Animale sono attualmente descritti diversi metodi e linee guida relative ai metodi molecolari disponibili. Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per Brucellosi ha sviluppato un metodo PCR e un RT-PCR, per i quali fornisce le procedure in uso e i relativi report di validazione, ai laboratori che ne faranno richiesta.

Il laboratorio territorialmente competente che esegue le prove mediante i metodi molecolari deve fornire gli esiti degli esami entro 3 settimane (15 giorni lavorativi) dal ricevimento del campione.

**iii) Tipizzazione**

La tipizzazione di brucella rappresenta uno strumento essenziale per l'indagine epidemiologica negli animali e nell'uomo in seguito all'insorgenza dei focolai di brucellosi, essendo uno strumento essenziale per l'individuazione dell'origine dei focolai stessi.

I metodi utilizzati per tipizzare i ceppi di brucella spp. sono la fenotipizzazione e la genotipizzazione: il primo si basa sull'analisi dei caratteri fenotipici, il secondo, invece, sull'analisi del corredo genomico.

**Tipizzazione fenotipica tradizionale**

a. Campo di applicazione

La tipizzazione tradizionale dei ceppi di *Brucella*, eseguita secondo la tecnica standard, è in grado di definire la specie e i biovar di una coltura di *Brucella*. Tale tipizzazione si esegue attraverso una combinazione di test fenotipici e/o genetici che non possono prescindere dell'utilizzo del ceppo vitale.

Tutte le attività legate alla manipolazione dei ceppi di *Brucella* devono essere eseguite in locali BSL3, adeguatamente attrezzati per il contenimento di patogeni di classe 3.

b. Tipizzazione fenotipica

I test da eseguire per la tipizzazione fenotipica sono i seguenti: lisi fagica, agglutinazione con sieri monospecifici anti-A, -M o -R, crescita differenziale su terreni con fucsina e tionina, produzione di H<sub>2</sub>S, esigenza di CO<sub>2</sub>, e le prove sono eseguite presso il Laboratorio nazionale di riferimento per le Brucellosi.

La procedura utilizzata è conforme a quella emessa dal Laboratorio Europeo di riferimento (EURL-SOP "*Brucella typing*" - Revision 01 June 2021).

**Tipizzazione molecolare**

a. Campo di applicazione

La tipizzazione molecolare viene eseguita utilizzando una serie di test PCR che possono identificare le specie di *Brucella* a livello genetico, anche se il test non consente di identificare a livello di biovar tutte le specie di Brucelle. Questi test, sono inoltre in grado di identificare i ceppi vaccinali e in modo rapido.

#### b. Tipizzazione molecolare

Per la tipizzazione molecolare di *Brucella*, ci si può avvalere di una serie di test da applicare a DNA estratto da colonie fresche di *Brucella spp.* In particolare:

- Il test AMOS-PCR utilizza il polimorfismo di specie della sequenza di inserzione IS711 nel genoma di *Brucella*. Questo test può identificare diverse specie di *Brucella*, inclusi alcuni ceppi vaccinali, senza differenziare le biovar. Per poter identificare in maniera appropriata le varie biovar bisogna integrare il metodo con la tipizzazione tradizionale.
- PCR-RFLP è un test molecolare che permette l'identificazione delle biovar di *B. suis* bv 2,3,4 e 5 e di *B. melitensis*; si avvale di 3 test di PCR simplex, ciascuno con target una specifica purina di membrana e la successiva digestione con enzimi di restrizione (RFLP) dell'amplificato ottenuto. La tecnica PCR-RFLP è descritta nel dettaglio nel manuale degli standard WOH (Capitolo 3.1.4. – Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*.). Tuttavia, per poter identificare in maniera appropriata le biovar della specie *B. abortus*, bisogna integrare il metodo con la tipizzazione tradizionale.
- Il test Bruce-ladder PCR non è in grado di identificare la maggior parte delle specie di *Brucella*, inclusi i ceppi vaccinali. Anche in questo caso, per definire la definizione delle biovar è necessario eseguire test biochimici e/o molecolari aggiuntivi alla procedura. Il metodo è descritto nella Standard Operating Procedure of European Union Reference Laboratory for Brucellosis “Bruce-ladder” Revision 1, May 2020”.

#### iv) Sequenziamento (WGS)

##### **Genotipizzazione - Tipizzazione con metodi basati sul Sequenziamento Genomico Completo (WGS)**

Il sequenziamento WGS (Whole Genome Sequencing) è una tecnica di nuova generazione che permette di ottenere il sequenziamento completo del genoma di *Brucella*. Questa tecnica fornisce dati dettagliati che possono essere utilizzati per studiare le caratteristiche dei singoli ceppi e definire il loro fingerprint genomico completo. La tecnica richiede DNA genomico di alta qualità con specifici parametri di purezza e concentrazione che si ottengono eseguendo l'estrazione da colture fresche. Questa tecnica, sebbene fornisca informazioni con un livello di dettaglio superiore a quelle precedentemente descritte non può assegnare con certezza le biovar per tutte le specie di *Brucella*, secondo gli standard dell'attuale nomenclatura.

##### a. Campo di applicazione

Per tale tecnica è importante usare DNA di alta qualità che sia in linea con i parametri di accettabilità in conformità con le linee guida ISO 23418:2022 Microbiology of the food chain —Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of bacteria — General requirements and guidance.

L'estrazione è eseguita, manualmente o con strumenti automatici, utilizzando kit che prevedano l'uso di colonnine filtranti in grado di garantire i livelli di purezza richiesti. In tabella 1 sono riportati i parametri di qualità da valutare prima di procedere al sequenziamento WGS.

Tabella 1: parametri di qualità del DNA richiesti per il sequenziamento WGS.

Concentrazione DNA ng/μl *	Assorbanza OD 260/280	Assorbanza OD 260/230
≥ 10	1,75-2,05	2,0-2,2

\*il volume minimo per procedere al sequenziamento è di 30 μl; la misurazione deve essere effettuata con strumenti ad elevata sensibilità (fluorimetro)

I dati ottenuti dal sequenziamento WGS devono essere analizzati utilizzando metodi validati per la classificazione di *Brucella* e l'analisi dei cluster, utili per le indagini epidemiologiche.

I metodi di tipizzazione con dati WGS sono:

- a. MLST
- b. cgMLST
- c. Analisi degli SNPs

I metodi di tipizzazione con dati WGS sono altamente discriminanti e al contempo riproducibili e ripetibili; tuttavia, considerando il diverso approccio e la tipologia di risultato ottenuto, non si possono sostituire completamente alle tipologie di tipizzazione sopra citate che determinano l'identificazione di specie e biovar di *Brucella* secondo la classificazione tradizionale. Nessuno dei metodi di tipizzazione con dati WGS è infatti, in grado di poter determinare tutte le biovar di *Brucella*. La mancanza di una nomenclatura di riferimento, basata sui risultati WGS e ufficialmente accettata, rende più difficile l'interpretazione del risultato dagli addetti ai lavori con possibili confusioni decisionali.

Si rimarca che per la determinazione della classificazione fenotipica tradizionale non si può fare a meno dei ceppi vivi, quindi rimane importante trasferire il ceppo isolato al Centro di Referenza Nazionale per le Brucellosi. Tale tecnica è l'unica in grado di classificare *Brucella* spp. secondo la nomenclatura ufficiale di specie e biovar. Viceversa l'uso del DNA al fine di una tipizzazione WGS rimane una valida alternativa se si vuole fare uso di un sistema di classificazione alternativo e migliorativo, ferma restando la necessità di avere un DNA con buoni parametri di qualità.

## **INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DELLE PROVE DIAGNOSTICHE.**

### **TERRITORI NON INDENNI DA INFEZIONE da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* con o senza vaccinazione**

#### ***Prove sierologiche.***

Le prove sierologiche utilizzate per lo screening della popolazione sono:

- a. la prova con antigene tamponato al Rosa Bengala (SAR) da eseguirsi su tutti i campioni ematici prelevati;
- b. la prova della fissazione del complemento (FDC) da eseguirsi su tutti i campioni positivi alla SAR e su tutti gli animali dello stabilimento nel caso di allevamenti non indenni e sottoposti a controllo per l'acquisizione della qualifica. Negli allevamenti ovi-caprini la FDC è anche effettuata su tutti gli animali dello stabilimento nel caso in cui uno o più animali abbiano reagito positivamente alla SAR. La prova della FDC è considerata positiva ad un titolo uguale o maggiore a 20 UIFC/ml.
- c. Nel caso in cui il siero di un animale esaminato fornisca esito negativo alla SAR ed alla FDC, l'animale è da considerare negativo e non sospetto.

#### ***Caso sospetto e caso confermato.***

In tutti i casi (sospetto d'infezione o esito dubbio) la qualifica sanitaria dello stabilimento è sospesa sino alla conferma e risoluzione del sospetto e del dubbio diagnostico.

Negli stabilimenti con qualifica sanitaria sospesa per la presenza di uno o più sospetti d'infezione, il servizio veterinario avvia l'indagine epidemiologica, e:

- a) vieta i movimenti di animali delle specie recettive alla brucellosi in entrata ed in uscita dallo stabilimento, se non per macellazione immediata in un macello designato;
- b) dispone l'isolamento dei casi sospetti nello stabilimento. Qualora tale misura non sia possibile o non sia possibile garantirla per l'intero periodo necessario alla risoluzione del sospetto, il servizio veterinario può disporre la macellazione dei capi dichiarati sospetti d'infezione al fine di proteggere la salute pubblica.

1. Stabilimenti indenni da infezione:

- a. Nel caso il siero di un animale esaminato fornisca esito positivo alla FDC (maggiore o uguale a 20 UIFC/ml) e negativo o positivo alla SAR l'animale è da considerarsi **sospetto d'infezione**. Il servizio veterinario può in ogni caso considerare uno o più capi sospetti d'infezione anche sulla base di esami e sintomi clinici, esami post-mortem o in caso sia stabilita una connessione epidemiologica con un caso confermato.
- b. Il caso sospetto è da considerarsi **confermato** qualora si verificano le condizioni indicate all'articolo 5.3 del Programma parte B.
- c. Nel caso in cui il siero di un animale esaminato fornisca esito positivo alla SAR e negativo alla FDC, l'esito è da considerarsi **dubbio** e il controllo sull'animale dovrà essere ripetuto. Per gli stabilimenti nei quali si ripetono esiti dubbi durante i controlli successivi, la Regione può richiedere l'intervento dell'I.Z.S. competente per territorio e del Centro di referenza nazionale per le brucellosi per eventuali approfondimenti diagnostici, valutati in base alle evidenze emerse nel corso dell'indagine epidemiologica.

2. Stabilimenti non indenni da infezione:

- d. Nel caso il siero di un animale esaminato fornisca esito positivo alla FDC e alla SAR, l'animale è da considerarsi **infetto**, senza necessità di ulteriori conferme, in quanto presente una connessione epidemiologica con un caso confermato.

**TERRITORI INDENNI DA INFEZIONE da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* senza vaccinazione**

Il test milk-ELISA può essere utilizzata come test di screening in stabilimenti bovini indenni senza vaccinazione, presenti in province indenni senza vaccinazione, su un campione di latte di massa proveniente da aziende in cui almeno il 30 % delle vacche da latte sia in lattazione. Se si ricorre a tale metodica, ci si deve assicurare che i campioni prelevati per l'analisi permettano di risalire univocamente ai singoli animali da cui proviene il latte esaminato. In caso di esito positivo al milk-ELISA è necessario prelevare il sangue a tutti gli animali che hanno composto il pool ed eseguire esami sierologici individuali.

Nel caso risultino positivi alle prove sierologiche pochi animali (2-3% dei capi) e si suppone una falsa positività dovuta a reazione crociata, occorre isolare gli animali positivi, procedere alla pastorizzazione del latte, bloccare le movimentazioni e ripetere il prelievo di sangue dopo 6 settimane. Se trascorse 6 settimane, eseguendo un secondo campionamento, gli animali risulteranno ancora positivi alle prove di sieroagglutinazione rapida e di fissazione del complemento e con titoli

più elevati rispetto al primo campionamento, gli animali sono da considerare positivi e devono essere abbattuti per eseguire esami batteriologici e molecolari sugli organi e tessuti prelevati al macello.

In caso di aborto, eseguire gli esami sierologici su tutti gli animali dello stabilimento. Inoltre, prelevare il latte individuale dalle bovine in lattazione ed eseguire tamponi vaginali alle bovine che hanno partorito da meno di 30 giorni.

### **RIPRISTINO DELLO STATUS DI STABILIMENTO INDENNE DA INFEZIONE**

Lo status di indenne allo stabilimento può essere ripristinato a tutti i bovini interi di età superiore a 12 mesi e gli ovini o i caprini interi di età superiore a sei mesi, se tutti gli animali presenti nello stabilimento al momento del campionamento sono risultati negativi a prove sierologiche effettuate in due occasioni come segue:

- i) la prima prova deve essere effettuata su campioni prelevati non prima di tre mesi dopo l'allontanamento dell'ultimo caso confermato e dell'ultimo animale risultato positivo a una prova immunologica;
- ii) la seconda prova deve essere effettuata su campioni prelevati non prima di sei mesi ed entro 12 mesi dalla data del campionamento di cui al punto i).