

Viste le osservazioni dell'Ufficio formulate dal segretario generale ai sensi dell'art. 15 del regolamento del Garante n. 1/2000;

Relatore il prof. Giuseppe Santaniello;

Delibera:

1. La regolarizzazione dei ricorsi presentati al Garante ai sensi degli articoli 145 e seguenti del codice è possibile:

a) quando il ricorso è sottoscritto da persona fisica o giuridica diversa dal ricorrente o dal procuratore speciale, oppure è trasmesso al Garante con corrispondenza diversa dal plico raccomandato o in modo difforme dalle altre modalità indicate nell'art. 147, comma 5;

b) qualora il ricorso difetti di uno o più dei dati identificativi di cui all'art. 147, comma 1, lettera a);

c) qualora manchi l'indicazione della data della richiesta presentata al titolare o al responsabile ai sensi dell'art. 8, comma 1, del codice o l'indicazione del pregiudizio imminente e irreparabile che permette di prescindere dalla richiesta medesima (art. 147, comma 1, lettera b);

d) quando il ricorso sia privo di una sottoscrizione autenticata secondo il disposto dell'art. 147, comma 4;

e) quando manchi l'indicazione degli elementi posti a fondamento della domanda (art. 147, comma 1, lettera c);

f) quando il ricorso non rechi l'indicazione del provvedimento richiesto al Garante (art. 147, comma 1, lettera d);

g) quando manchi l'indicazione del domicilio eletto ai fini del procedimento (art. 147, comma 1, lettera e);

h) qualora al ricorso non risultino allegate l'eventuale procura o la copia della richiesta rivolta al titolare o al responsabile ai sensi dell'art. 8, comma 1, del codice;

i) qualora difetti la prova del versamento dei diritti di segreteria (art. 147, comma 2, lettera c) o risulti imprecisa o incompleta la documentazione attestante che l'interessato si trova nelle condizioni previste dalla legge per l'ammissione al patrocinio a spese dello Stato.

2. La presente deliberazione sarà pubblicata nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 23 dicembre 2004

Il presidente: RODOTÀ

Il relatore: SANTANIELLO

Il segretario generale: BUTTARELLI

05A02583

## ESTRATTI, SUNTI E COMUNICATI

### MINISTERO DELLA SALUTE

**Comunicato relativo alle metodologie diagnostiche per le malattie degli equidi riproduttori maschi ai fini della disciplina della riproduzione animale.**

*Agli Assessorati alla Sanità delle regioni e province autonome*

*Agli Istituti zooprofilattici sperimentali, e p.c.*

*Al Centro di referenza nazionale per le malattie degli equidi presso Istituto zooprofilattico sperimentale del Lazio e della Toscana*

L'attuale normativa vigente, costituita dall'O.M. 13 gennaio 1994, relativa al piano nazionale di controllo dell'arterite equina, dal decreto 4 dicembre 1976, relativo alla profilassi dell'anemia infettiva degli equini e il decreto 19 luglio 2000, n. 403, recante: «Approvazione del nuovo regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991, n. 30, concernente disciplina della riproduzione animale», stabilisce i requisiti sanitari che gli equidi destinati alla riproduzione naturale o artificiale devono rispettare per essere autorizzati allo svolgimento di tali attività.

Con tali provvedimenti si è inteso garantire, attraverso il controllo delle malattie della sfera riproduttiva, lo sviluppo e la tutela del patrimonio nazionale dei riproduttori.

Al fine di uniformare e di rendere più facilmente gestibili tecnicamente le operazioni volte al controllo sanitario degli stalloni, si ritiene necessario fornire precise indicazioni circa le metodologie diagnostiche e i protocolli d'intervento delle seguenti malattie nei produttori equini maschi.

Si confida nella massima diffusione e si rappresenta l'urgenza, stante l'imminente inizio della stagione di monta equina.

Roma, 14 marzo 2005

*Il direttore generale  
della sanità veterinaria e alimenti  
NARABELLI*

**METODI DIAGNOSTICI PER L'ACCERTAMENTO SIEROLOGICO DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELLA RINOPOLMONITE EQUINA NEGLI EQUIDI RIPRODUTTORI MASCHI**

Con il termine rinopolmonite vengono comprese le infezioni sostenute dagli herpesvirus equini tipo 1 (EHV-1) e tipo 4 (EHV-4); entrambi responsabili di forme di malattia a carico dell'apparato respiratorio, solo il primo di aborti e forme neurologiche.

Il riscontro di anticorpi specifici per i due virus è frequente sia per la diffusione dell'infezione (con maggiori prevalenze nei confronti dell'EHV 4), sia per l'impiego di vaccini.

Pertanto, ai fini del rilascio dell'autorizzazione alla monta, risulta prioritario effettuare la verifica documentale, relativa alle eventuali profilassi immunizzanti, e condurre un'accurata visita clinica contestualmente sia sugli stalloni, sia sui soggetti sensibili presenti presso le stazioni di monta/aziende dove questi siano mantenuti.

Per la definizione dello stato sanitario dei riproduttori si applicano i seguenti protocolli e linee direttrici:

#### 1. Visita clinica, verifica delle vaccinazioni e prelievo dei campioni.

Effettuare in via preliminare la visita clinica dei riproduttori maschi e di eventuali altri soggetti presenti.

Controllare i passaporti degli stalloni e verificare se presente l'attestazione di avvenuta vaccinazione relativa all'anno in corso.

In assenza di sintomatologia clinica, da almeno quindici giorni, riconducibile a malattie respiratorie, di aborti e/o di forme neurologiche, anche negli altri animali eventualmente presenti presso la stazione di monta/allevamento, può essere rilasciata l'autorizzazione alla monta ai fini della presente infezione. In caso vi siano soggetti con sintomatologia clinica, effettuare un prelievo di sangue agli stalloni ed a tutti gli animali presenti presso la stazione di monta/allevamento. Indicare nella scheda di accompagnamento dei campioni eventuali interventi vaccinali effettuati nell'anno in corso. Ripetere i prelievi fra il quindicesimo ed il trentesimo giorno dal primo controllo per verificare l'eventuale presenza di sieroconversioni.

Al fine di poter effettuare una comparazione oggettiva dei risultati, inviare i campioni di sangue dei due prelievi allo stesso laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico, specificando il motivo del prelievo sulla scheda di accompagnamento.

In ogni caso i prelievi di sangue devono essere effettuati sterilmente.

#### Riferimenti.

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE 2004, Parte seconda, Sezione 2.5, Capitolo 2.5.7.

#### 2. Prova di sieroneutralizzazione (SN).

Fra i diversi metodi diagnostici che possono essere impiegati per gli accertamenti sierologici della rinopolmonite equina, solo la prova di sieroneutralizzazione, eseguita contestualmente nei confronti dell'EHV-1 e dell'EHV-4, è in grado di differenziare le infezioni sostenute dai due virus e di rilevare la presenza di anticorpi anche a distanza di lunghi periodi dall'infezione e, trattandosi di una determinazione quantitativa, di evidenziare sieroconversioni in caso di infezioni recenti.

#### Principio.

La prova di sieroneutralizzazione è impiegata per individuare la presenza in sieri di anticorpi capaci di neutralizzare l'infettività virale. La neutralizzazione dell'attività infettante del virus dell'arterite virale equina si evidenzia attraverso l'assenza di effetto citopatico sul substrato cellulare sensibile impiegato.

#### Reagenti, terreni e materiali.

Terreno di crescita per il substrato cellulare.  
Soluzione antibiotata per terreno culturale.  
Siero fetale bovino.  
Micropiastre sterili a 96 pozzetti a fondo piatto per colture cellulari con coperchio.

#### Materiali di riferimento.

Antigeni preparati con gli stipiti di riferimento EHV-1 ed EHV-4. Si raccomanda di mantenere le aliquote del virus titolato in condizioni che ne consentano il mantenimento del titolo.

Siero Positivo di Lavoro.  
Siero Negativo di Lavoro.

#### Substrati biologici.

Sospensioni di cellule RK 13 per l'EHV-1 e di derma equino (ED) per l'EHV-4 in concentrazione tale da assicurare la presenza di un monostrato confluyente entro il giorno successivo all'utilizzo (indicativamente  $10^5$  cellule/ml).

#### Procedura.

Al fine di evitare contaminazioni crociate nel corso delle prove si raccomanda di eseguire le SN per EHV-1 ed EHV-4 separatamente.

Inattivare i sieri in esame ed i Sieri Positivi e Negativi di Lavoro in bagnomaria a 56° per 30 minuti.

Preparare il terreno di coltura aggiungendo l'1% di soluzione antibiotata per la diluizione dei sieri e dell'antigene.

La prova si effettua in 2 repliche: per ogni siero eseguire diluizioni scalari in base 2 partendo dalla diluizione 1/2 (dopo l'aggiunta del virus diluizione finale 1/4). Si opera impiegando volumi di 25  $\mu$ l dei sieri e del diluente.

Per ogni siero effettuare un controllo della tossicità alla diluizione minima saggiata, omettendo l'aggiunta del virus e portando a volume con 25  $\mu$ l del diluente.

#### Aggiunta dell'antigene e delle cellule.

Preparare le sospensioni dei due diversi virus, impiegando come diluente il terreno per colture cellulari antibiotato, contenente 100 dosi infettanti tessuto coltura /25  $\mu$ l (TCID<sub>50</sub>).

Distribuire 25  $\mu$ l delle sospensioni virali in ogni pozzetto ad eccezione di quelli utilizzati per il controllo della tossicità dei sieri.

Le dosi infettanti del virus sono verificate mediante titolazione inversa in base 10, fino a 0 TCID<sub>50</sub>/25  $\mu$ l, partendo dalla concentrazione d'uso dell'antigene, effettuando almeno quattro repliche per diluizione.

Rigoprire le piastre ed agitare delicatamente per facilitare la miscelazione del siero e del virus.

Incubare le micropiastre per un'ora a 37 °C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>.

Terminata l'incubazione, distribuire 50  $\mu$ l delle sospensioni di cellule contenente siero fetale bovino in tutti i pozzetti, compresi quelli della piastra dei controlli. Agitare delicatamente ed incubare in termostato a 37 °C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>.

La lettura dei controlli e dei sieri in esame si effettua dopo la quarta o la quinta giornata.

#### Validità dei risultati.

Il test è valido se:

il controllo del virus presenta un titolo da 30 a 300 dosi infettanti/25  $\mu$ l;

il titolo del Siero Positivo di Lavoro ricade nell'intervallo atteso rispetto al suo titolo noto.

#### Letture dei risultati.

È considerata positiva la diluizione del siero in cui sia presente una riduzione dell'effetto citopatico del 100% confrontandola con quella dei pozzetti della più bassa diluizione del controllo delle dosi infettanti del virus. Il titolo dei Sieri Positivi di Lavoro e dei sieri in esame corrisponde alla diluizione più alta in cui si ha ancora assenza totale dell'effetto citopatico in entrambe le repliche.

#### Interpretazione dei risultati.

Si è in presenza di sieroconversione negli stalloni quando si ha un aumento del titolo di almeno log. 10<sub>10</sub> 1,2 tra i campioni del primo e del secondo prelievo ovvero anche solo in alcuni dei soggetti mantenuti presso gli stessi allevamenti o stazioni di monta, controllati in caso di riscontro di sintomatologia clinica riferibile a rinopolmonite.

#### METODI DIAGNOSTICI PER L'ACCERTAMENTO SIEROLOGICO DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUINI

L'immunodiffusione in gel di agar (AGID) ed i test immunoenzimatici (ELISA) sono i metodi di attuale impiego per la diagnosi sierologica dell'anemia infettiva degli equidi.

Tuttavia questi metodi non sono in grado di rilevare anticorpi nelle prime settimane dell'infezione, o, più raramente, nel corso di malattia in forma acuta quando il virus in circolazione è in grado di neutralizzare gli anticorpi presenti nel sangue.

Sebbene i test ELISA siano in grado di mettere in evidenza anticorpi più precocemente ed a concentrazioni più basse, sono state talvolta osservate delle false positività. Pertanto le positività sierologiche in ELISA devono essere confermate per mezzo dell'AGID. Quest'ultimo metodo, che rileva principalmente anticorpi nei confronti della proteina virale p26, ha il vantaggio di distinguere fra le linee di precipitazione quelle specifiche (reazione di identità).

Le positività sierologiche possono anche essere confermate mediante tecnica di immunoblotting.

Per la diagnosi sierologica si applicano le linee direttrici ed i metodi di seguito riportati:

#### 1. *Prelievo dei campioni.*

Quando fra gli equidi mantenuti fossero presenti soggetti con febbre o sintomatologia clinica riconducibile a malattie infettive, il prelievo di sangue dovrà essere ripetuto trascorsi almeno 20 giorni dal primo prelievo.

#### 2. *Prova di immunodiffusione in gel di agar.*

##### *Principio del metodo.*

L'AGID è basata sulla diffusione contemporanea dell'antigene e degli anticorpi del siero in esame, uno verso l'altro nel substrato impiegato. In presenza di anticorpi si forma una linea di precipitazione tra i pozzetti dell'antigene e del siero. La linea è ritenuta specifica ed è definita come linea di identità quando si presenta continua con la linea di precipitazione che si forma tra l'antigene ed il siero positivo di controllo.

I campioni di sangue prelevati nelle prime 2-3 settimane dall'infezione possono risultare negativi al test.

##### *Riferimenti.*

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE 2004, Parte seconda, Sezione 2.5, Capitolo 2.5.4.

##### *Reagenti, terreni e materiali.*

Piastre petri di diametro da 100 mm.

Tampone fosfato (PBS) pH 7,2.

Agar Noble disciolto in tampone borato\* pH 8,6 alla concentrazione dell'1%.

Acqua distillata.

\* Formula Tampone borato:

NaOH 2 gr;

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 9 gr;

H<sub>2</sub>O distillata portare a volume di 1000 ml.

Stampo punzone con una rosetta da 7 pozzetti di cui uno centrale e 6 periferici del diametro di 5,3 mm. La distanza tra i pozzetti è di 2,4 mm.

##### *Materiali di riferimento.*

Antigene preparato con virus ceppo Wyoming (American Type Culture Collection VR - 778).

L'antigene può essere prodotto a partire da un'estratto di milza di equidi con infezione acuta o da colture di tessuto. Allo scopo possono essere impiegate cellule di rene fetale equino, di derma equino e di timo canino.

Possono essere inoltre impiegate proteine ricombinanti, espresse in batteri o baculovirus, di antigeni del capside.

Siero positivo di lavoro.

I materiali di riferimento, prima del loro utilizzo, devono essere approvati dal Centro di Riferenza per l'Anemia Infettiva degli Equini.

##### *Procedura.*

Distribuire 15 ml di terreno agar Noble in piastre petri poste su un piano livellato.

Dopo solidificazione punzonare tramite stampo l'agar per avere una serie di rosette di pozzetti per piastra. Aspirare l'agar da ciascun pozzetto.

Distribuire, fino a riempimento dei pozzetti:

a) l'antigene nel pozzetto centrale;

b) il siero positivo di lavoro in tre pozzetti periferici alternati;

c) i sieri in esame nei rimanenti pozzetti.

Incubare per 24 - 48 ore a temperatura ambiente in camera umida.

##### *Letture della reazione.*

La lettura si effettua successivamente alla quarantottesima ora d'incubazione impiegando una lampada a luce incidente. Verificare la formazione delle linee di precipitazione tra i pozzetti del siero positivo di lavoro e dell'antigene.

Il siero in esame è considerato positivo quando forma una linea di precipitazione che presenta identità con la linea di precipitazione tra l'Antigene ed il Siero Positivo di Lavoro o quando ne determina l'incurvamento.

I sieri con alti titoli di anticorpi precipitanti possono formare linee di precipitazione più spesse che tendono a far dissolvere la linea formata fra i pozzetti contenenti i materiali di riferimento, anche fino a circa la metà della posizione normale, e tendono a scomparire con il tempo. Per confermare la positività di tali sieri, gli stessi devono essere nuovamente esaminati, previa diluizione di 1/2 e 1/4 in soluzione di Tampone fosfato. In caso di formazione di una linea d'identità si devono considerare come positivi.

Un siero è considerato negativo quando non forma una linea d'identità con l'Antigene e non induce l'incurvamento o l'interruzione della linea di precipitazione tra l'Antigene ed il Siero Positivo di Lavoro.

Gli equidi che abbiano contratto recentemente l'infezione possono non fornire una reazione positiva al test di AGID. È pertanto necessario effettuare un nuovo controllo a distanza di 2 settimane.

#### 3. *Prove immunoenzimatiche.*

Fra i diversi test ELISA messi a punto, è raccomandabile l'uso di metodi che prevedano l'impiego della proteina capsidica p26 per l'elevato grado di conservazione antigenica della stessa nei virus circolanti.

Gli esiti positivi in ELISA devono essere controllati mediante AGID o immunoblotting.

I sieri che abbiano fornito risultati di difficile interpretazione, nonché tutti quelli risultati positivi alle prove d'immunodiffusione ed immunoenzimatica devono essere inviati al Centro di Riferimento per l'Anemia Infettiva degli Equini per la conferma diagnostica.

#### METODI DIAGNOSTICI PER L'ACCERTAMENTO DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'ARTERITE VIRALE NEGLI EQUIDI RIPRODUTTORI MASCHI

Per gli accertamenti sierologici e virologici si applicano le linee direttrici ed i metodi di seguito riportati:

##### A. ACCERTAMENTI SIEROLOGICI.

###### 1. *Prelievo dei campioni.*

Effettuare il prelievo di sangue sterilmente.

Qualora fra i riproduttori o fra gli equidi mantenuti assieme fossero presenti soggetti con febbre o sintomatologia clinica riconducibile a malattie infettive, il prelievo di sangue dovrà essere effettuato trascorsi 15 giorni dall'ultimo caso di malattia.

#### Riferimenti.

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE 2004, Parte seconda, Sezione 2.5, Capitolo 2.5.10.

#### 2. Prova di sieroneutralizzazione.

##### Principio.

La prova di sieroneutralizzazione è impiegata per individuare la presenza in sieri di anticorpi capaci di neutralizzare l'infettività virale. La neutralizzazione dell'attività infettante del virus dell'arterite virale equina si evidenzia attraverso l'assenza di effetto citopatico sul substrato cellulare sensibile impiegato.

##### Reagenti, terreni e materiali.

Terreno di crescita per il substrato cellulare.

Complemento di cavia.

Soluzione antibiotata per terreno culturale.

Siero fetale bovino.

Micropiastre sterili a 96 pozzetti a fondo piatto per colture cellulari con coperchio.

##### Materiali di riferimento.

Antigene preparato con lo stipite di referenza CVL-Bucyrus (Weybridge). Si raccomanda di mantenere le aliquote del virus titolato in condizioni che ne consentano il mantenimento del titolo.

Siero Positivo di Lavoro.

Siero Positivo di Lavoro a basso titolo.

Siero Negativo di Lavoro.

##### Substrati biologici.

Sospensione di cellule RK 13 in concentrazione (indicativamente  $10^5$  cellule/ml) tale da assicurare la presenza di un monostrato confluyente entro il giorno successivo al loro utilizzo.

##### Procedura.

Inattivare i sieri in esame ed i Sieri di Lavoro in bagnomaria a  $56^\circ$  per 30 minuti.

Preparare il terreno di coltura aggiungendo l'1% di soluzione antibiotata per la diluizione dei sieri e dell'antigene.

La prova si effettua in 2 repliche: per ogni siero eseguire diluizioni scalari in base 2 partendo dalla diluizione 1/2 (dopo l'aggiunta del virus diluizione finale 1/4). Si opera impiegando volumi di 25  $\mu$ l dei sieri e del diluente.

Per ogni siero effettuare un controllo della tossicità alla diluizione minima saggiata, omettendo l'aggiunta del virus e portando a volume con 25  $\mu$ l del diluente.

##### Aggiunta dell'antigene e delle cellule.

Preparare la sospensione del virus contenente da 100 a 300/25  $\mu$ l dosi infettanti tessutocoltura (TCID<sub>50</sub>) impiegando come diluente il terreno per colture cellulari antibiotato contenente complemento di cavia alla concentrazione finale del 10%.

Distribuire 25  $\mu$ l della soluzione contenente la sospensione virale in ogni pozzetto ad eccezione di quelli utilizzati per il controllo della tossicità dei sieri.

Le dosi infettanti del virus sono verificate mediante titolazione inversa in base 10, fino a 0 TCID<sub>50</sub>/25  $\mu$ l, partendo dalla concentrazione d'uso dell'antigene, effettuando almeno quattro repliche per diluizione. Ricoprire le piastre ed agitare delicatamente per facilitare la miscelazione del siero e del virus.

Incubare le micropiastre per un'ora a  $37^\circ\text{C}$  in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>.

Verificare, dopo una notte d'incubazione, il controllo delle cellule e di citotossicità dei sieri in esame.

Terminata l'incubazione, distribuire 100  $\mu$ l della sospensione di cellule contenente siero fetale bovino in tutti i pozzetti, compresi quelli della piastra dei controlli. Agitare delicatamente ed incubare in termostato, a  $37^\circ\text{C}$  in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>.

La lettura dei controlli e dei sieri in esame è effettuata dopo la seconda o la terza giornata.

##### Validità dei risultati.

Il test è valido se:

il controllo del virus presenta un titolo da 30 a 300 dosi infettanti/25  $\mu$ l;

i titoli dei Sieri Positivi di Lavoro ricadono nell'intervallo di 0,3 log<sub>10</sub> rispetto ai titoli noti.

##### Lettura dei risultati.

È considerata positiva la diluizione del siero in cui sia presente una riduzione dell'effetto citopatico del 100% confrontandola con quella dei pozzetti della più bassa diluizione del controllo delle dosi infettanti del virus. Il titolo finale del siero è calcolato con il metodo di Spearman/Karber.

Quando a causa di neutralizzazione parziale o in presenza di tossicità del siero si renda difficile stabilire se un campione sia negativo alle diluizioni più basse, il problema può essere superato riesaminando il campione risultando tossico effettuando la sieroneutralizzazione su monostrato confluyente di RK-13 allestito il giorno precedente. In alternativa, l'effetto tossico può essere ridotto o eliminato adsorbendo per un ora a  $37^\circ\text{C}$  il siero da esaminare con un numero di cellule in numero almeno doppio rispetto a quello previsto per la prova di sieroneutralizzazione. Al termine dell'incubazione far precipitare le cellule mediante centrifugazione e riesaminare il campione come da procedura. Nel caso persistesse l'effetto citotossico successivamente ai trattamenti descritti, richiedere la ripetizione del prelievo del campione ed inviarlo per la conferma diagnostica, unitamente al primo, al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Equine.

##### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.

Uno stallone è considerato positivo se al test di sieroneutralizzazione viene riscontrato un titolo uguale o superiore a 1/4. Gli stalloni siero positivi devono essere sottoposti al prelievo di sperma per poter escludere l'eliminazione del virus.

#### B. ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'ARTERITE VIRALE EQUINA IN TESSUTOCOLTURA E RICERCA DEL GENOMA VIRALE MEDIANTE PCR.

##### 1. Prelievo dei campioni di sperma.

Il prelievo di sperma deve essere effettuato mediante vagine artificiali a fondo cieco ed impiegando materiali monouso per la raccolta.

Al fine di poter escludere lo stato di eliminatore del virus negli stalloni sieropositivi devono essere effettuati tre prelievi di sperma ad intervalli di almeno 10 giorni. In caso di negatività, i controlli dovranno comunque essere ripetuti anche l'anno successivo.

Per evitare l'inattivazione del virus eventualmente presente, controllare che la temperatura della camera interna della vagina artificiale non sia superiore a  $40^\circ\text{C}$  ed assicurarsi che non siano stati impiegati antisettici o disinfettanti per la cura o la pulizia dei genitali esterni prima dell'effettuazione del prelievo.

Ai fini dell'isolamento virale i campioni devono contenere la frazione ricca di sperma cui il virus è associato negli animali portatori ed eliminatori.

I campioni di sperma devono essere mantenuti refrigerati immediatamente dopo il prelievo e devono essere consegnati al più presto al laboratorio. Quando non fosse possibile effettuare tempestivamente la consegna, conservare i campioni a temperatura  $\leq -20^\circ\text{C}$ .

## 2. Verifica dell'idoneità del campione in laboratorio.

Prima di procedere alla preparazione del campione verificare al microscopio la presenza/assenza di spermatozoi. Quando all'osservazione gli spermatozoi siano assenti o rari il campione è da ritenersi non idoneo; richiedere quindi al Veterinario Ufficiale la ripetizione del prelievo.

In attesa dell'esecuzione delle prove i campioni devono essere mantenuti congelati a temperatura  $\leq -20^\circ\text{C}$ .

## 3. Isolamento del virus in tessutocoltura.

L'isolamento in tessutocoltura è il metodo ufficiale per la definizione dello stato di eliminatore di virus degli stalloni sieropositivi.

### Substrati biologici.

Cellule renali di coniglio in linea continua RK-13 (clone ATCC CCL-37). Si raccomanda l'uso di cellule a basso numero di passaggi poiché l'età della linea cellulare risulta essere critica rispetto alla sensibilità della stessa all'infezione.

### Reagenti, terreni e materiali.

Terreno per colture cellulari a diversa composizione in relazione al tipo di sistema di coltivazione impiegato (sistema chiuso in fiasche o in piastre in atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$ ).

Soluzione di antibiotici per colture cellulari.

Siero fetale bovino.

Carbossimetilcellulosa a media densità.

Fiasche per colture cellulari o piastre a fondo piatto a pozzetti multipli.

### Preparazione del campione.

Prima di procedere all'inoculazione su colture cellulari, sottoporre il campione di sperma a tre cicli di trattamento con ultrasuoni di 15 secondi, procedendo quindi a centrifugare a  $4^\circ\text{C}$  a 1000 g per 10 minuti per precipitare la frazione cellulare.

### Procedura.

Per l'isolamento impiegare un monostrato di cellule confluenti di età compresa fra 3 e 5 giorni. Indipendentemente dal supporto di crescita impiegato, il rapporto tra superficie del monostrato da infettare e volume di materiale da inoculare deve essere di  $2,5\text{cm}^2/0,1\text{ ml}$ .

Effettuare diluizioni logaritmiche in base 10 del soprannatante del campione di sperma da  $10^1$  a  $10^3$  in terreno di coltura di mantenimento contenente antibiotici e siero fetale bovino al 2%.

Inoculare, in almeno 2 repliche, le tessutocolture con le diluizioni del campione effettuate in precedenza.

Allestire contemporaneamente controlli della prova, seguendo lo stesso procedimento, utilizzando campioni di sperma positivi o un ceppo virale di controllo a titolo noto.

Chiudere le fiasche o coprire le piastre a pozzetti multipli e, con movimento circolare, distribuire l'inoculum omogeneamente su tutta la superficie.

Incubare a  $37^\circ\text{C}$  per un'ora in sistema chiuso od in atmosfera umida al 5% di  $\text{CO}_2$  rispettivamente le fiasche o le piastre a pozzetti multipli.

Dopo l'incubazione coprire la superficie dei supporti di crescita con una soluzione di carbossimetilcellulosa allo 0,75% in terreno di coltura contenente la soluzione antibiotata, senza rimuovere l'inoculo.

Porre le colture ad incubare a  $37^\circ\text{C}$ . Osservare al microscopio per la presenza di effetto citopatico che di norma, in presenza di virus, compare tra la seconda e la sesta giornata.

Al 5° - 7° giorno, in assenza di evidente effetto citopatico, inoculare nuovi monostrati cellulari con il soprannatante delle colture senza danneggiare.

Aggiungere le diluizioni del campione (da  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) con polietilene glicole in modo da ottenere una concentrazione finale di quest'ultimo al 10%, lasciando per una notte a  $+4^\circ\text{C}$  e sottoponendo a leggera agitazione.

Centrifugare a 2000 g per 30 minuti ed eliminare il soprannatante.

Risospendere il precipitato in un volume pari ad un decimo di i monostrati.

Dopo aver asportato il soprannatante colorare i monostrati con una soluzione di cristalvioletto contenente formalina tamponata alla concentrazione dello 0,1% per mettere in evidenza la presenza di eventuali placche.

I campioni che comportano delle difficoltà diagnostiche sono inviati al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini.

Alcuni campioni di sperma possono risultare tossici per il substrato cellulare specie alle diluizioni più basse saggiate. In tali casi procedere al trattamento dei campioni di sperma con polietilene glicole con peso molecolare 6000, prima di inoculare il substrato cellulare, secondo le modalità di seguito riportate: quello delle diluizioni originarie in terreno culturale di mantenimento, ed omogeneizzare.

Sottoporre a centrifugazione l'omogeneizzato a 2000 g per 30 minuti, ed impiegare il soprannatante per l'esecuzione della prova secondo le modalità sopra descritte.

Qualora i campioni dovessero risultare citotossici anche successivamente al trattamento, richiedere la ripetizione del prelievo.

### Identificazione e caratterizzazione del virus.

Considerato che nei campioni di sperma possono essere presenti anche altri agenti virali, qualsiasi isolato deve essere sottoposto ad identificazione.

L'identificazione dei virus isolati deve essere effettuata mediante test di neutralizzazione, o mediante immunofluorescenza impiegando sieri monospecifici o anticorpi monoclonali.

In ogni caso, ogni virus isolato deve essere inviato al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini per la conferma dell'identificazione e per l'esecuzione di ulteriori prove per di caratterizzazione.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.

Uno stallone riproduttore sieropositivo è considerato eliminatore quando il virus, isolato da almeno uno dei tre prelievi, è identificato come virus dell'arterite virale equina.

### C. RICERCA DEL GENOMA VIRALE MEDIANTE TRASCRIZIONE INVERSA-NESTEDPCR (RT-NPCR).

L'isolamento del virus è ancora oggi l'unico test riconosciuto a livello internazionale per gli scambi di equidi; pertanto altri test, quali quelli che prevedono la ricerca dell'acido nucleico virale da campioni di sperma, possono essere unicamente impiegati come eventuali prove di supporto o collaterali per lo svolgimento di indagini o ricerche. È opportuno sottolineare che il rilevamento dell'acido nucleico virale mediante RT-PCR, non essendo in grado di distinguere virus infettante da virus non infettante e particelle virali incomplete, non può dare indicazioni relativamente all'effettiva capacità di diffondere l'infezione da parte di uno stallone o di un campione di sperma, fattore considerato di estrema importanza ai fini degli scambi degli equidi e/o del seme. Tuttavia occorre anche considerare che la PCR, a diffe-

renza dell'isolamento su colture cellulari, permette di rilevare un'eventuale positività anche in campioni non prelevati o conservati correttamente, dove l'infettività del virus può essere compromessa.

La sensibilità della RT-nPCR può essere notevolmente influenzata dalla selezione degli oligonucleotidi da impiegare nella prova. Pertanto la scelta dovrà essere rivolta a quelli in grado di riconoscere le regioni del genoma virale per le quali è stata accertato il maggior grado di conservazione. Fra queste sono state individuate quelle codificanti la proteina nucleocapsidica N e una delle proteine (M) dell'*envelope* virale.

#### Procedura.

##### Protocollo per l'esecuzione della RT-nPCR.

Vengono di seguito riportati i protocolli consigliati per l'estrazione dell'RNA virale e le sequenze degli oligonucleotidi da impiegare.

La metodica deve essere eseguita adottando opportune misure e buone pratiche di laboratorio finalizzate alla riduzione dei rischi di contaminazione tra campioni e da prodotti di PCR.

##### Estrazione dell'RNA da campioni di sperma:

In due tubi trasferire rispettivamente 150 µl di supernatante tal quale, ottenuto dalla sonicazione e centrifugazione del seme ai fini dell'isolamento virale su colture cellulari, e i 150 µl di una diluizione 1/10 in acqua a grado reagente sterile trattata con dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O -DEPC);

Aggiungere 400 µl di tiocianato di guanidinio (GuSCN) 6M;

Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti;

Aggiungere 225 µl di NaCl 5M sterile, 400 µl di cloroformio (CHCl<sub>3</sub>) saturo con H<sub>2</sub>O -DEPC ed agitare vigorosamente;

Incubare in ghiaccio per 10 minuti;

Centrifugare a 13000g a 4 °C per 10 minuti;

Ripetere, se necessario, l'estrazione con CHCl<sub>3</sub> saturo con H<sub>2</sub>O-DEPC fino ad ottenere un'interfase pulita;

Trasferire la fase acquosa (circa 600 µl) in un nuovo tubo e aggiungere 1 µl di glicogeno 20 µg/µl;

Aggiungere 360 µl di etanolo al 95%, conservato a - 20 °C. Incubare a -20° C;

fino al giorno successivo;

Centrifugare a 13000g a 4 °C per 30 minuti;

Eliminare il supernatante e aggiungere 1 ml di etanolo al 70%, conservato a - 20 °C;

Centrifugare a 13000g a 4 °C per 15 minuti;

Eliminare il supernatante e lasciare asciugare il precipitato;

Risospingere il precipitato in 50 µl di H<sub>2</sub>O-DEPC;

Impiegare l'RNA estratto per la reazione di trascrizione inversa.

Possono essere in alternativa utilizzati altri metodi di estrazione purché ne sia stata preliminarmente verificata l'efficienza in comparazione al metodo descritto.

Oligonucleotidi impiegati per l'esecuzione della RT-nPCR

Fase	nome dello oligonucleotide	Sequenza nucleotidica 5'→3'	Posizione nel genoma virale*	Dimensioni del prodotto di amplificazione (bp)
Trascrizione Inversa	OEVA-15	GGT TCC TGG GTG GCT AAT AAC TAC TTC AAC	3'-12675	-
PCR-1	OEVA-14A	TCG ATG GCG TCA AGA CGA TCA C	5'-12310	395
	OEVA-15	GGT TCC TGG GTG GCT AAT AAC TAC TTC AAC	3'-12675	
PCR-2	OEVA-17A	CGC CTC TTT TCG AAA CGG ACG	5'-12342	262
	OEVA18	GGT AGG AAC CCA ACT GAC GGT G	3'-12582	

\*GenBank, Accession Number X53459

**Temperature di annealing:**

PCR-1: 57 °C per i primi 5 cicli di amplificazione; 52 °C per i successivi;

PCR-2: 55 °C per i primi 5 cicli di amplificazione; 50 °C per i successivi.

Nel caso in cui un campione dovesse risultare positivo al test della RT-nPCR e negativo all'isolamento su colture cellulari, richiedere al Veterinario Ufficiale la ripetizione del prelievo ed inviare al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini i campioni per la conferma diagnostica.

**METODO DIAGNOSTICO PER LA RICERCA DI TAYLORELLA EQUIGENITALIS NEGLI EQUIDI RIPRODUTTORI MASCHI**

Il metodo ufficiale di prova per la ricerca di *T. equigenitalis*, agente eziologico della Metrite Contagiosa Equina (CEM), riconosciuto ai fini degli scambi internazionali è l'esame colturale, non essendo stati descritti metodi sierologici validi in grado di definire lo status di positività nei soggetti infetti/portatori.

Il microrganismo, al di fuori dell'apparato genitale degli Equidi, è particolarmente sensibile alle condizioni ambientali e risulta inoltre di difficile coltivazione. È necessaria quindi l'adozione di particolari precauzioni nelle fasi di prelievo e di trasporto dei campioni da sottoporre ad accertamenti.

**Riferimenti.**

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE 2004, Parte Seconda, Sezione 2.5, Capitolo 2.5.1

Per il prelievo dei campioni e gli accertamenti microbiologici si applicano le seguenti linee direttrici ed il metodo di seguito riportati:

**1. Prelievo dei campioni.**

All'inizio della stagione di monta, tutti gli stalloni devono essere sottoposti a ricerca di *T. equigenitalis*, attraverso prelievo di singoli tamponi con terreno di trasporto tipo Amies con carbone attivo (necessario per l'adsorbimento di prodotti del metabolismo batterico), da: uretra, fossa uretrale, prepuzio. Tale prelievo va ripetuto a distanza di non meno di 7 giorni;

i tamponi debbono essere conservati in condizione di refrigerazione e debbono essere inviati agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali entro le 24-48 ore dal momento prelievo;

i tamponi pervenuti in laboratorio senza terreno di trasporto, o con terreno privo di carbone attivo, o dopo le 48 ore dal prelievo, non sono idonei per l'esame colturale per *T. equigenitalis*.

Al momento del prelievo, il Veterinario Ufficiale deve accertarsi che non siano stati effettuati trattamenti locali dell'apparato genitale con disinfettanti o chemioantibiotici, o che siano trascorsi almeno 21 giorni dall'ultimo trattamento. È necessario sospendere terapie con chemioantibiotici di qualsiasi genere, per via generale, almeno 7 giorni prima di iniziare i prelievi genitali per CEM.

**2. Ricerca di Taylorella equigenitalis.****Terreno di Coltura.**

È necessario utilizzare per l'esame colturale chocolate agar, costituito da una base nutritiva con controllo di Qualità che garantisca la crescita di *T. equigenitalis*: CEMO Agar.

**Composizione:**

- Peptone di soia g 5;
- Idrolisato enzimatico di caseina g 15;
- Sodio cloruro g 5;
- L-cistina g 0,3;
- Sodio solfito g 0,2;
- Agar A g 12
- pH 7,3 ± 0,2 a 25 °C;

<sup>1</sup> Ad esempio C.E.M.O. Agar, Mast Diagnostics, UK.

**Preparazione.**

Pesare 37,5 g di base nutritiva e versare in una beuta e sospendere in 1 litro di acqua distillata.

Riscaldare fino a completo scioglimento.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Raffreddare a 50 °C.

Aggiungere sterilmente sangue equino per avere una concentrazione finale del 5%.

Mescolare accuratamente e riscaldare il terreno ad 80 °C per 10 minuti agitando occasionalmente fino a quando non raggiunge un colore bruno cioccolato.

Raffreddare a 50 °C ed aggiungere sterilmente trimethoprim 0,001 g/l, clindamicina 0,005 g/l ed amfotericina B 0,005 g/l.

Distribuire il terreno in piastre sterili.

**Controlli di Qualità.**

Controllo positivo: si effettua utilizzando *Taylorella equigenitalis* (ATCC 35865) esito: crescita.

Controllo negativo: assenza di crescita di microorganismi su terreno non inoculato.

**Procedura.**

Seminare il tampone per strisciamento su CEMO agar.

Incubare la piastra di CEMO agar in termostato a 37 °C con atmosfera al 5-10% CO<sub>2</sub>. In alternativa, incubare in giara con apposito CO<sub>2</sub> generating kit in analoghe condizioni di percentuale di CO<sub>2</sub> e di temperatura. In tal caso, per verificare le condizioni di microaerofilia, è necessario incubare in giara anche una piastra di CEMO con il controllo positivo.

Lasciare in incubazione almeno 48 h prima di procedere giornalmente ad una lettura preliminare fino al decimo giorno di incubazione in cui si effettua una lettura definitiva.

**Letture.**

Valutare la presenza su CEMO agar di colonie riferibili a *T. equigenitalis*.

Le colonie di *T. equigenitalis* si rendono visibili su CEMO agar solo dopo 48 h, sono puntiformi, di diametro fino a 2-3 mm, lisce con margini arrotondati, acquose, opache e di colore giallo-grigiastro.

**Identificazione.****Esame microscopico.**

*T. equigenitalis* si presenta come un batterio Gram negativo di piccole dimensioni, di forma bacillare o coccobacillare, spesso pleomorfo (talvolta fino a 6 µm di lunghezza) e può esibire colorazione bipolare.

**Test biochimici.**

Sottoporre le colonie sospette per le suddette caratteristiche colturali e di crescita ai test di catalasi, ossidasi, fosfatasi.

Test della catalasi: *T. equigenitalis* è catalasi positivo.

Test dell'ossidasi: *T. equigenitalis* è ossidasi positivo.

Test della fosfatasi alcalina: *T. equigenitalis* è fosfatasi positivo.

**Test della fosfatasi alcalina:**

prelevare 0,5 ml di soluzione tampone Tris (pH 8) con una pipetta Pasteur sterile e versare in una provetta sterile con tappo a vite. Prelevare con un'ansa sterile una o più colonie sospette e sospendere nella soluzione tampone Tris. Prelevare 0,5 ml di soluzione di p-nitrofenilfosfato disodico 1 mg/ml con una pipetta Pasteur sterile e versarla nella sospensione. Incubare a 37 °C per 2 ore.

**Lettura e conferma dei risultati.**

La formazione di colore giallo indica la positività della prova. *T. equigenitalis* è fosfatasi positivo.

Se il profilo (condizioni di crescita, morfologia macroscopica e microscopica, test biochimici) è compatibile con *T. equigenitalis*, è necessario confermare l'identificazione presuntiva attraverso identificazione sierologica con anticorpi policlonali specifici.

Il microorganismo isolato sarà inviato per conferma e per un'ulteriore caratterizzazione al Centro di Referenza delle Malattie degli Equini.

**Interpretazione dei risultati.**

L'esito dell'esame colturale deve essere espresso in termini di presenza/assenza oppure di risultato inconclusivo (per presenza di flora contaminante a livello tale da impedire il rilevamento di *T. equigenitalis* nel campione esaminato). In tal caso, è necessario effettuare un nuovo prelievo.

Ai fini dell'autorizzazione alla riproduzione, ogni stallone risultato positivo al controllo ufficiale per CEM deve essere trattato con chemioantibiotici per via generale e con disinfettanti locali e deve risultare negativo ad un successivo prelievo da effettuarsi non prima di 21 giorni dall'ultimo trattamento.

05A02618

## CAMERA DI COMMERCIO, INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI FIRENZE

### Provvedimenti concernenti i marchi di identificazione dei metalli preziosi

Ai sensi dell'art. 29 del Regolamento recante norme per l'applicazione del decreto legislativo 22 maggio 1999, n. 251 sulla disciplina dei titoli e dei marchi di identificazione dei metalli preziosi, approvato con decreto del Presidente della Repubblica 30 maggio 2002, n. 150, si rende noto che le sotto indicate ditte assegnatarie di marchio di identificazione per oggetti in metalli preziosi, non hanno adempiuto sino ad oggi all'obbligo (rinnovo annuale) previsto dall'art. 7, comma 2 decreto legislativo n. 251/1999, o quanto meno, se hanno cessato la loro attività non hanno restituito i punzoni per marchio, a suo tempo ricevuti da questo ufficio, per la determinazione di annullo con le forme di pubblicità prescritte.

Si rende inoltre noto che, secondo le procedure regolamentari, l'Ufficio attività ispettive ha provveduto, tramite pubblicazione nell'Albo pretorio dei comuni ove le imprese hanno la sede legale, alla comunicazione dell'avviso di inizio procedura amministrativa per la cancellazione delle stesse dal Registro degli assegnatari. Visto che, decorsi i termini di pubblicazione del citato avviso, le ditte di cui trattasi non hanno provveduto alla riconsegna dei punzoni in loro dotazione e che ogni ulteriore tentativo di ritiro dei punzoni per marchio di identificazione non è andato a buon fine a causa della irreperibilità degli interessati, il dirigente del settore ha disposto, con determinazione n. 166 del 14 febbraio 2005, l'annullo dei seguenti marchi di identificazione e la cancellazione delle relative ditte dal Registro degli assegnatari.

Marchio	Denominazione	Sede	Punzoni non restituiti
483 FI	A.P.I. S.p.a.	Sesto Fiorentino	5
509 FI	Tacchi Leonardo e C. S.a.s.	Firenze	2
878 FI	Batazzi Franco	Firenze	2
1023 FI	Tre Biemme di Benedetti Maurizio	Firenze	4
1112 FI	Melissari Rosamaria	Vicchio	2
1264 FI	Celli Umberto	Firenze	7
1347 FI	Progetto Oro di Prosperi Valerio	Empoli	2
1349 FI	Desiree Rohrmeier	Impruneta	2
1356 FI	Jems S.n.c.	Firenze	4
1387 FI	Rosari Marta	Firenze	4
1434 FI	Argenterie Albachiana S.r.l.	Figline Valdarno	2
1438 FI	Argenteria L'Intreccio	Firenze	2
1439 FI	Fallaci Antonfrancesco	Firenze	5
1470 FI	Bijoux Donna di De Patrizio Monica	Firenze	2
1474 FI	R.G. Argenti di Gabelli Renato	Bagno a Ripoli	1
1497 FI	Enzo Leone	Borgo San Lorenzo	2
1499 FI	Zazzeri Marco	Firenze	2
1543 FI	Orozco Antonio	Firenze	2
1554 FI	L'Angolo di Firenze di Hsu Chen Fong	Firenze	2
1624 FI	Bolimowski Pawel	Firenze	2

Si diffidano gli eventuali detentori dei punzoni indicati come «non restituiti», qualunque sia il titolo del loro possesso, da ogni loro ulteriore utilizzo ingiungendone la restituzione alla C.C.I.A.A. di Firenze.

05A02521

AUGUSTA IANNINI, direttore

FRANCESCO NOCITA, redattore

(G501066/1) Roma, 2005 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato S.p.A. - S.



\* 4 5 - 4 1 0 1 0 0 0 5 0 3 2 1 \*

€ 1,00