

O.M. 13 gennaio 1994, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale del 17 gennaio 1994, n. 12.

Piano nazionale di controllo dell'arterite virale equina

## **IL MINISTRO DELLA SANITÀ**

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

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

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

Vista l'*ordinanza ministeriale 12 agosto 1970* concernente la profilassi delle malattie virali respiratorie degli equini;

Visto il parere del Consiglio superiore di sanità del 22 dicembre 1993;

Considerato che i risultati delle indagini siero-epidemiologiche effettuate nei confronti dell'arterite virale equina hanno evidenziato la diffusione dell'infezione nel patrimonio equino nazionale;

Ravvisata la necessità e l'urgenza di controllare l'infezione al fine di addivenire ad un programma di eradicazione della malattia;

Ordina:

### **Art. 1.**

1. I servizi veterinari delle unità sanitarie locali provvedono annualmente, entro il 31 agosto, al censimento degli equidi maschi interi di età superiore a ventiquattro mesi presenti sul territorio.
2. Tutti i riproduttori equini e asinini maschi sono sottoposti nel periodo compreso tra il 1° settembre ed il 31 dicembre di ogni anno, prima dell'inizio della stagione di monta, all'accertamento sierologico nei confronti dell'arterite virale equina. Nel periodo intercorrente fra il prelievo del campione di sangue e l'esito dell'esame i suddetti equidi non possono essere adibiti alla monta né il loro sperma impiegato per l'inseminazione artificiale.
3. È vietato detenere nelle stazioni di monta maschi interi non autorizzati alla riproduzione.

### **Art. 2**

1. Gli animali che, a seguito dell'accertamento di cui all'art. 1, comma 2, sono risultati negativi possono essere destinati all'accoppiamento ed il loro sperma utilizzato per l'inseminazione artificiale, sempreché siano rispettati tutti gli altri requisiti previsti dalla normativa vigente in materia di riproduzione animale.

### Art. 3

1. Gli animali risultati positivi all'accertamento sierologico restano esclusi dalla monta ed il loro sperma non può essere impiegato fino alla conclusione degli ulteriori accertamenti per la ricerca del virus dell'arterite equina nello sperma. L'autorità sanitaria locale competente per territorio provvede affinché tali animali vengano sottoposti nel frattempo ad idoneo isolamento <sup>(1)</sup>.
2. Gli stalloni sieropositivi che, a conclusione degli accertamenti di cui al comma precedente, non risultano essere eliminatori di virus possono essere destinati alla riproduzione nel rispetto delle altre disposizioni vigenti in materia di riproduzione animale. L'accertamento virologico in tali soggetti dovrà essere comunque ripetuto anche l'anno successivo al riscontro della sieropositività.
3. Gli stalloni sieropositivi eliminatori di virus sono esclusi dalla monta ed il loro sperma non può essere impiegato per l'inseminazione artificiale.
4. Gli animali risultati eliminatori di virus sono tenuti in isolamento, disposto ai sensi dell'art. 10, lettera b), del regolamento di polizia veterinaria, sottoposti a vigilanza veterinaria in sedi o ricoveri situati a conveniente distanza dagli animali recettivi. Le misure anzidette sono revocate qualora il proprietario proceda a sua scelta alla macellazione od alla castrazione degli animali.
5. Il proprietario o detentore dello stallone accertato eliminatore di virus può richiedere la ripetizione dell'accertamento virologico prima della successiva stagione di monta e se l'esito di tale esame consente di escludere la persistenza dello stato di eliminatore, è revocato l'isolamento e si applica quanto disposto nel comma 2. Nel periodo intercorrente tra il prelievo del campione di sperma e l'esito del nuovo accertamento virologico vige comunque il divieto di monta e la raccolta e l'impiego dello sperma, di cui all'art. 3, comma 3.

---

<sup>(1)</sup> Successivamente il D.M. 16 febbraio 1994 (Gazz. Uff. 19 febbraio 1994, n. 41) ha così disposto:

#### Art. 1.

1. In temporanea deroga a quanto disposto dall'art. 3, comma 1, dell'O.M. 13 gennaio 1994, per la stagione di monta 1994 gli accertamenti previsti sono limitati al controllo sierologico.

#### Art. 2.

1. Fatte salve tutte le altre disposizioni contenute nell'O.M. 13 gennaio 1994 e fermo restando la necessità di effettuare gli accertamenti sierologici, è consentito per la stagione di monta 1994 l'impiego nella monta degli stalloni che, sottoposti all'accertamento sierologico, sono in attesa dell'esito degli esami o sono risultati sieropositivi.

2. Lo spostamento degli stalloni di cui al comma 1 può avvenire esclusivamente per il trasferimento alla stazione di monta cui sono destinati e viceversa o per manifestazioni ippico-sportive, previa autorizzazione, rilasciata su richiesta dell'interessato, del servizio veterinario dell'unità sanitaria locale competente per territorio che ne dà comunicazione a quello dell'unità sanitaria di destinazione. La sieropositività per arterite virale equina viene riportata sul certificato sanitario di scorta con l'indicazione che non è stato eseguito l'accertamento virologico.

3. Le fattrici accoppiate con gli stalloni di cui al comma 1 non possono essere accoppiate con altri stalloni. Nel periodo successivo all'accoppiamento tali animali sono sottoposti a idoneo isolamento ed a controllo clinico periodico da parte del servizio veterinario dell'unità sanitaria locale per trenta giorni, in caso di esito favorevole continuano ad applicarsi inoltre le misure di cui all'art. 7, comma 2, dell'O.M. 13 gennaio 1994.

4. Le misure di cui al comma 2 e 3 s'intendono revocate quando sia riconosciuto lo stato di sieronegatività dello stallone ovvero quando sia accertato che la sieropositività non è accompagnata da eliminazione di virus con lo sperma.

#### Art. 3.

1. La presente ordinanza entra in vigore il giorno stesso della sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana

**Art. 4.**

1. Il sindaco, con apposito provvedimento, può consentire, su domanda del proprietario o detentore, lo spostamento degli animali sieropositivi eliminatori di virus, informandone l'autorità sanitaria regionale o della provincia autonoma competente per territorio e previo assenso dell'autorità sanitaria locale nonché regionale o della provincia autonoma di destinazione, con l'indicazione del giorno di arrivo al fine di consentire l'idoneo isolamento dell'animale e la relativa vigilanza veterinaria, secondo quanto disposto nell'art. 3, comma 4.

**Art 5.**

1. Degli stalloni sieropositivi eliminatori di virus nonché di quelli sieropositivi non eliminatori di virus deve essere data tempestiva segnalazione, assieme a tutti i dati identificativi, ai competenti organi veterinari regionali o delle province autonome.  
Le regioni, assessorati alla sanità, e le province autonome provvedono ad istituire un elenco aggiornato degli stalloni sieronegativi, sieropositivi non eliminatori ed eliminatori di virus e lo trasmettono al Ministero della sanità - Direzione generale dei servizi veterinari, agli assessorati all'agricoltura regionali e delle province autonome nonché all'UNIRE.

**Art 6.**

1. A parziale deroga del divieto di cui all'art. 3, comma 3, per gli stalloni sieropositivi eliminatori di virus riconosciuti di particolare pregio zootecnico, previa acquisizione del parere motivato dell'UNIRE, il Ministero della sanità - Direzione generale dei servizi veterinari può autorizzarne, su richiesta del proprietario l'impiego nella riproduzione a particolari e specifiche condizioni volte ad impedire la diffusione del virus.
2. Resta in ogni caso escluso l'impiego del loro sperma congelato per l'inseminazione artificiale. L'impiego dello sperma fresco e/o refrigerato può essere consentito invece alle condizioni stabilite nell'autorizzazione di cui al comma 1.
3. Il servizio veterinario della unità sanitaria locale controlla il rispetto delle condizioni stabilite nelle singole autorizzazioni concesse.

**Art 7.**

1. Le fattrici inseminate da stalloni eliminatori di virus, in applicazione del disposto dell'art. 6, commi 1 e 2, non possono essere accoppiate con altri stalloni sieronegativi o sieropositivi non eliminatori di virus nel corso della stessa stagione di monta. Le prescrizioni sanitarie che devono essere osservate nell'inseminazione delle fattrici e nel periodo successivo, sono riportate nella stessa autorizzazione prevista all'art. 6, comma 1, e sono fatte osservare dall'autorità sanitaria locale competente.
2. Tali animali continuano ad essere sottoposti nel corso dello stesso anno dell'inseminazione a vigilanza veterinaria ed il loro spostamento avviene, durante tale periodo, previo parere favorevole del servizio veterinario della unità sanitaria locale competente per territorio, che ne informa l'autorità sanitaria locale e regionale o della provincia autonoma di destinazione.

**Art 8.**

1. Un allevamento di equidi, stazione di monta pubblica o privata, un centro di inseminazione artificiale

o di produzione di sperma di equidi è riconosciuto indenne da arterite virale quando:

- a) nessun soggetto ha manifestato sintomi clinici riferibili ad arterite virale equina negli ultimi 6 mesi;
- b) tutti gli equidi di età superiore a 6 mesi sono risultati negativi a 2 prove sierologiche nei confronti dell'arterite virale equina eseguite con un intervallo di 40 giorni e successivamente una volta l'anno;
- c) nell'allevamento o altro impianto vengono introdotti solo animali provenienti da:
  - allevamenti o altri impianti indenni;
  - allevamenti o altri impianti non sottoposti a provvedimenti di polizia veterinaria per l'arterite virale equina; in tale caso gli animali da introdurre devono essere stati sottoposti da non oltre 15 giorni ad una prova sierologica con esito negativo nei confronti dell'arterite virale equina e ad un'ulteriore prova sierologica con esito negativo a 40 giorni di distanza dalla introduzione.

2. Per gli allevamenti o impianti riconosciuti indenni da arterite virale equina viene rilasciata annualmente apposita attestazione da parte dell'autorità sanitaria locale competente da trasmettersi alla rispettiva autorità sanitaria regionale o della provincia autonoma ed al Ministero della sanità - Direzione generale dei servizi veterinari.

#### **Art 9.**

1. Allo scopo di verificare l'evoluzione dell'infezione ed in vista di un programma di eradicazione, vengono predisposti dalle regioni e province autonome appositi piani di controllo sierologico nei confronti dell'arterite virale equina sulla restante popolazione di equidi, con il coordinamento del Ministero della sanità.

#### **Art 10.**

1. L'autorità sanitaria regionale o della provincia autonoma coordina le attività previste dalla presente ordinanza.
2. Il prelievo dei campioni è effettuato dai veterinari delle unità sanitarie locali o da veterinari autorizzati appositamente istruiti, sotto il controllo del servizio veterinario territorialmente competente.
3. I campioni vengono inviati per gli accertamenti agli istituti zooprofilattici sperimentali competenti per territorio che provvedono preliminarmente all'istruzione tecnica per i prelievi nonché a concordare con i servizi veterinari delle unità sanitarie locali l'afflusso temporale e numerico dei campioni.
4. I compensi dovuti per il prelievo dei campioni e per gli accertamenti diagnostici sierologici e virologici sono a carico dei privati in base alle tariffe stabilite dai tariffari unici regionali per il personale del Servizio sanitario nazionale ed a quelle che verranno stabilite con decreto del Ministro della sanità ai sensi dell'art. 5, comma 1, del *decreto legislativo 30 giugno 1993, n. 270*.

#### **Art 11.**

1. Gli esami sierologici e l'accertamento dello stato di eliminatore di virus sono eseguiti secondo i protocolli e le metodiche riportate nell'allegato.

**Art. 12.**

1. I risultati dei controlli effettuati secondo le modalità stabilite nella presente ordinanza sono sottoposti annualmente alla valutazione del Ministero della sanità - Direzione generale dei servizi veterinari.

**Art. 13.**

1. Per l'anno 1993 il censimento di cui all'art. 1, comma 1, è limitato agli equidi maschi destinati alla riproduzione ed è basato sugli elenchi degli stalloni approvati.
2. Per la stagione di monta 1994 gli accertamenti di cui all'art. 1, comma 2, sono eseguiti entro il 15 febbraio 1994.

**Art. 14.**

1. Le disposizioni concernenti l'arterite virale equina contenute nella *ordinanza ministeriale 12 agosto 1970* non si applicano agli animali riscontrati sieropositivi a seguito dei controlli effettuati sulla base del piano previsto dalla presente ordinanza né agli altri animali presenti nello stesso allevamento o impianto quando la sieropositività non sia attribuibile ad infezione in atto.
2. È abrogato l'art. 3, comma 2, dell'*ordinanza ministeriale 12 agosto 1970*.

**Art. 15.**

1. La presente ordinanza entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

## Allegato

### **METODI DIAGNOSTICI PER L'ACCERTAMENTO DELLA ARTERITE VIRALE NEGLI EQUIDI RIPRODUTTORI MASCHI**

Per gli accertamenti sierologici e virologici si applicano le linee direttrici ed i criteri minimi di seguito riportati.

A) Identificazione degli anticorpi nei confronti del virus dell'arterite virale equina in campioni di sangue

1. *Raccolta dei campioni di sangue.*

Per la diagnosi sierologica il prelievo di sangue deve essere effettuato da riproduttori in buono stato di salute utilizzando provette sterili.

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

2. *Prova di sieroneutralizzazione.*

Si utilizzano cellule renali di coniglio in linea continua (RK 13) e come terreno di crescita Eagle Minimum Essential Medium (MEM) addizionato di antibiotici e siero fetale bovino al 5%.

La prova viene eseguita su piastre microtiter a 96 pozzetti a fondo piatto.

I sieri, inattivati a 56 °C per 30 minuti, vengono diluiti in base 2 da 1:2 a 1:256 in Eagle MEM, effettuando 4 repliche per ogni campione.

Ad ogni diluizione viene aggiunto un eguale volume di sospensione virale contenente 100 TCID<sub>50</sub> dello stivite di riferimento Bucyrus. Il virus viene diluito in MEM antibiotato addizionato di complemento ad una concentrazione pari al 10% della soluzione.

Dopo un contatto di 60 minuti a 37 °C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>, ad ogni pozzetto contenente la miscela siero-virus ed ai relativi controlli viene aggiunto un volume di sospensione cellulare contenente 2 x 10<sup>5</sup> cellule/ml, pari a quello della miscela siero-virus.

La lettura viene eseguita dopo 48-72 ore.

3. *Interpretazione dei risultati (con metodo statistico).*

Una diluizione del siero è positiva quando è presente una riduzione dell'effetto citopatico  $\geq$  al 75%, comparata a quella evidenziabile nei pozzetti della più bassa diluizione del controllo del virus.

Uno stallone è considerato sieropositivo se al test di sieroneutralizzazione viene riscontrato un titolo anticorpale  $\geq$  4.

B) Isolamento e identificazione del virus dell'arterite virale equina in colture cellulari

1. *Raccolta dei campioni di sperma.*

Per l'isolamento del virus è essenziale disporre dello sperma degli stalloni.

Lo sperma deve essere raccolto mediante vagina artificiale a fondo cieco (tipo Colorado o Missouri).

Per il lavaggio dei genitali dello stallone prima del prelievo non devono essere impiegate soluzioni disinfettanti e la temperatura interna della vagina artificiale non deve essere superiore a 40 °C. Ai fini dell'isolamento virale è necessario raccogliere campioni di sperma contenenti sia la parte liquida sia la frazione cellulare dell'eiaculato.

Il campione deve essere quindi conservato in ghiaccio secco e comunque trasportato immediatamente al laboratorio in regime di refrigerazione.

2. *Isolamento del virus.*

L'isolamento del virus dai campioni di sperma, raccolti secondo le indicazioni di cui al punto 1,

viene effettuato su colture di cellule renali di coniglio in linea continua sensibili (RK13, ATCC, CCL37).

Il campione di sperma deve essere sottoposto ad esame non appena pervenuto al laboratorio oppure immediatamente congelato.

Dopo trattamento con ultrasuoni (3 cicli di 15 secondi a distanza di 2 minuti) e centrifugazione (1000 RPM x 10 minuti), si effettuano diluizioni logaritmiche in base 10 del plasma seminale con terreno Eagle MEM addizionato di antibiotici e fungizone e si pongono ad incubare a + 4 °C per 2 ore.

Come controllo del sistema, si allestiscono diluizioni di un campione positivo a titolo noto.

Le diluizioni da  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  del plasma seminale si inoculano su monostrati cellulari confluenti della linea RK13, precedentemente lavati con soluzione salina antibiotata, effettuando almeno 4 repliche per diluizione.

Dopo un'ora di contatto in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub> a 37 °C aggiungere terreno Eagle MEM antibiotato contenente carbossimetilcellulosa allo 0,75% (a media viscosità) e siero fetale bovino all'1%, senza asportare l'inoculo.

Le colture inoculate vengono esaminate per 6-7 giorni al fine di evidenziare l'effetto citopatico del virus.

In caso di negatività si inoculano colture cellulari fresche con il sopranatante del 1° passaggio.

In caso di positività si procede all'identificazione del virus isolato mediante test di neutralizzazione o test di immunofluorescenza diretta.

### 3. *Interpretazione dei risultati.*

Uno stallone sieropositivo viene considerato eliminatore quando il virus, isolato da almeno uno dei 3 campioni di sperma prelevati a distanza di 10-15 giorni, viene identificato come virus dell'arterite equina.

Uno stallone sieropositivo non è da considerare eliminatore se dai 3 campioni di sperma, di cui al precedente paragrafo, non viene isolato il virus dell'arterite equina.

## C) Prova dell'accoppiamento (Breeding Test)

### 1. *Modalità della prova.*

In alternativa alla ricerca diretta del virus dell'arterite equina nei campioni di sperma degli stalloni risultati sieropositivi, lo stato di eliminatore può essere accertato mediante la prova di accoppiamento (breeding test).

Lo stallone risultato sieropositivo deve montare 2 cavalle sieronegative almeno 2 volte al giorno per 2-4 giorni consecutivi.

Le cavalle devono essere mantenute in isolamento e controllate sia clinicamente che sierologicamente, secondo la metodica descritta al capo B), al 14° e 28° giorno dall'ultimo accoppiamento.

### 2. *Interpretazione dei risultati.*

Qualora nessuna delle cavalle manifesti alcun sintomo riferibile ad arterite equina e risulti negativa al test sierologico del 28° giorno, lo stallone può essere considerato non eliminatore di virus.

Se vengono riscontrati sintomi di malattia e/o sieroconversione nelle cavalle accoppiate con lo stallone sieropositivo, lo stallone deve essere considerato eliminatore di virus.