

ALLEGATI TECNICI

La diagnosi di laboratorio della leucosi bovina enzootica è effettuata mediante un esame di immunodiffusione su gel di agar (AGID) come riportato alla lettera A o mediante la prova immunoenzimatica (ELISA) come riportato alla lettera B. La diagnosi di linfosarcoma è effettuata mediante esame istologico come riportato alla lettera C.

A. Prova di immunodiffusione in gel di agar.

1. L'antigene da impiegare nella prova deve contenere la glicoproteina dell'*envelope* del virus della leucosi bovina enzootica, gp 51. Esso è prodotto dal Centro di referenza nazionale che ha sede presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia. La produzione di antigene da parte di altri laboratori deve essere autorizzata dal Ministero della sanità ed i singoli lotti dovranno essere standardizzati presso il Centro di referenza nazionale.

2. I reagenti da impiegare sono i seguenti:

a) antigene. Esso dovrà essere standardizzato rispetto al siero di referenza E4;

b) siero in esame;

c) siero positivo di controllo;

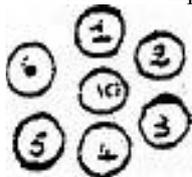
d) gel di agar:
0,8% di agar,
8,5% di NaCl;
tampone Tris 0,05 M a pH 7,2.

In una scatola Petri del diametro di 85 mm vanno versati 15 ml di questo terreno in modo da ottenere uno strato dello spessore di 2,6 mm.

3. Nell'agar solidificato si eseguono sette pozzetti, distribuiti come segue: un pozzetto centrale e sei pozzetti disposti in cerchio ad esso:

di diametro del pozzetto centrale: 4 mm;
di diametro dei pozzetti periferici: 6 mm;
distanza fra pozzetto centrale e i pozzetti periferici: 3 mm.

4. Si distribuisce nel pozzetto centrale l'antigene, nei pozzetti periferici 1 e 4 (vedi lo schema) il siero positivo di controllo e nei pozzetti 2, 3, 5 e 6 i sieri in esame. Il riempimento va effettuato fino a scomparsa del menisco.



5. Le quantità dei reagenti da impiegare sono dunque le seguenti:

Antigene: 32 µl;
siero di controllo: 73 µl;
sieri in esame: 73 µl.

6. Incubare per 72 ore a temperatura ambiente (20-27 °C), in atmosfera umida.

7. La lettura va effettuata dopo 24, 48 e 78 ore:

a) il siero in esame è positivo se forma una linea specifica di precipitazione con l'antigene del virus della leucosi bovina enzootica e una linea completa di identità con il siero di riferimento;

b) il siero in esame è negativo se non forma una linea specifica di precipitazione con l'antigene della leucosi bovina enzootica e se non provoca l'incurvamento della linea del siero di riferimento;

c) la reazione è considerata non conclusiva:

i) se la linea del siero di riferimento si incurva verso l'antigene della leucosi bovina enzootica senza formare con l'antigene una linea di precipitazione visibile, ovvero

ii) se non può essere interpretata come negativa o positiva.

Quando la reazione non è conclusiva, la prova deve essere ripetuta impiegando siero concentrato.

B. Prova di immunoenzimatica (ELISA).

1. Per l'esecuzione della prova ELISA occorrono le attrezzature e i relativi qui indicati:

a) micropiastre, cuvette o qualsiasi altro recipiente per la fase solida;

b) l'antigene è fissato sulla fase solida con o senza ausilio di anticorpi leganti policlonali o monoclonali. Se l'antigene è assorbito direttamente alla fase solida, tutti i campioni in esame che presentano reazione positiva devono essere riesaminati nei confronti di un antigene di controllo negativo (falso antigene). Il falso antigene deve essere allestito seguendo le stesse procedure usate per l'antigene. Se gli anticorpi leganti sono adsorbiti alla fase solida, questi non devono reagire nei confronti di antigeni diversi da quelli del virus della leucosi bovina;

c) siero di sangue o latte;

d) campioni di siero o latte di controllo positivi e negativi;

e) anticorpi coniugati;

f) un substrato adatto all'enzima impiegato;

g) una soluzione di arresto, se necessario;

h) soluzioni per la diluizione dei campioni, per la preparazione dei reattivi e per il lavaggio;

i) un sistema di lettura adatto al substrato impiegato.

2. Standardizzazione e sensibilità della prova:

a) *Standardizzazione della prova utilizzata per campioni singoli.* La sensibilità della prova impiegata deve essere di livello tale che il siero E4, diluito 10 volte (campioni di siero) o 250 volte (campioni di latte), risulti ancora positivo.

b) *Standardizzazione della prova utilizzata per mescolanze di campioni.* La sensibilità della prova impiegata deve essere tale che il siero di referenza E4 sia ancora positivo se diluito 10 volte (campioni di siero) o 250 volte (campioni di latte) oltre la diluizione applicata ai singoli campioni per effetto della mescolanza. Per mescolanza si intende un insieme di parti uguali di diversi campioni di siero o di latte. Il Centro di referenza nazionale è responsabile del controllo di qualità del kit ELISA impiegato ed, in particolare, della definizione, per ciascun lotto di produzione, del numero di campioni che possono costituire, in base al titolo ottenuto con il siero E4, la mescolanza da esaminare.

Il siero E4 è fornito dal Laboratorio veterinario nazionale di Copenaghen.

C. Esame istologico.

Campioni prelevati da linfonodi ed organi che presentano alterazioni macroscopiche riferibili a linfosarcoma, devono essere mantenuti a temperatura di refrigerazione ed inviati al laboratorio entro il più breve tempo possibile. In alternativa possono essere prelevati frammenti degli organi lesi (1-2 cm³) da mettere in formalina tamponata al 10% facendo attenzione che la quantità del fissativo sia almeno 10 volte superiore al volume del tessuto da fissare. Il materiale può essere conservato in queste condizioni, a temperatura ambiente, fino all'invio al laboratorio.

In nessun caso il materiale da sottoporre all'esame istologico deve essere congelato prima dell'invio al laboratorio.

I campioni accuratamente identificati, devono essere accompagnati da notizie relative alla razza, età, sesso dell'animale a cui appartengono ed ai quadri anatomopatologici riscontrati.