



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

**Corso di dottorato XXXVI ciclo**

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Francesco Fazio**

**Curriculum Scienze Cliniche Veterinarie**

**Anno accademico 2022/2023**

**La Normativa sulla Riproduzione Animale per la  
Conservazione del Germoplasma delle Razze  
Autoctone Siciliane**

**Tesi di Dottorato di: Salvatore MONTI**

**Settore scientifico disciplinare: SSD VET/10**

**Tutor: Chiar.mo Prof.: Gabriele MARINO**

**Co-Tutor:**

**Chiar.ma Prof.ssa: Annamaria PASSANTINO**

## Indice

Indice .....	2
Abstract.....	5
Premessa .....	6
Quadro normativo in riproduzione animale.....	7
Animal Health Law .....	7
Regolamento UE 2016/429 .....	7
Regolamento Delegato UE 2018/1629 .....	15
Regolamento di Esecuzione UE 2018/1882 .....	16
Regolamento Delegato UE 2020/686 .....	18
Regolamento Delegato UE 2020/687 .....	70
Regolamento Delegato UE 2020/688 .....	71
Regolamento Delegato UE 2020/689 .....	87
Regolamento di esecuzione UE 2020/690.....	87
Regolamento Delegato UE 2020/692 .....	87
Regolamento di Esecuzione 2020/999 .....	88
Regolamento di Esecuzione UE 2020/2002 .....	93
Regolamento di Esecuzione UE 2021/404 .....	94
Regolamento di Esecuzione UE 2022/1345 .....	94

Regolamento Delegato UE 2023/647 .....	95
Regolamento UE 2016/1012 .....	96
Fonti del diritto nazionale.....	99
Normativa siciliana.....	136
Sostegno alle razze autoctone.....	141
Conservazione del germoplasma siciliano in razze a rischio di erosione genetica .	150
Gli equidi .....	150
Sanfratellano, Purosangue Orientale Siciliano, Ragusano, Pantesco .....	152
Esp 1. Prelievo e congelamento del materiale seminale in equidi siciliani .....	161
Introduzione.....	161
Materiali e Metodi .....	165
Risultati e Discussioni .....	171
I ruminanti .....	195
I bovini: la Cinisara, la Modicana e la Siciliana.....	196
Ovini e Caprini: la Barbaresca, la Messinese e la Girgentana.....	201
Esp 2. Prelievo e congelamento del materiale seminale nei ruminanti .....	207
Introduzione.....	207
Materiali e Metodi .....	210
Risultati e Discussioni .....	215

Esp 3. Raccolta embrioni nella bovina Modicana .....	250
Introduzione.....	250
Materiali e Metodi .....	257
Risultati e Discussioni .....	266
I suini .....	269
Il suino Nero Siciliano .....	269
Esp 4. Prelievo e congelamento del materiale seminale.....	273
Introduzione.....	273
Materiali e Metodi .....	277
Risultati e Discussioni .....	282
I Cani .....	309
Il Cirneco dell'Etna .....	309
Esp. 5 raccolta e congelamento del materiale seminale nel Cirneco dell'Etna. ....	312
Introduzione.....	312
Materiali e Metodi .....	315
Risultati e Discussioni .....	318
Ringraziamenti.....	331
Bibliografia.....	331

## **Abstract**

The necessity to update the regional regulation of animal reproduction, to ensure uniform application of the legislation in the sector across the regional territory, the regional legislator must adapt the implementation methods regarding the current legislation. Recently, National and European animal reproduction legislation has been important updates, introducing new health requirements regarding the authorization and operation criteria of structures that produce, store, distribute and move sperm, oocytes, and embryos from zootechnic and non-zootechnic animals. This thesis provides a detailed analytical framework regarding the current legislation on animal reproduction through an excursus that starts from European regulatory framework to arrive at regional legislation and soft laws, highlighting its weaknesses and strengths. The second part, however, sees the protection of native Sicilian breeds at risk of extinction through ex situ conservation as the main actor. Thanks to the collaboration with the Sicilgermobank Project (PSR Sicilia 2014–2020, Measure 10, Submeasure 10.2 b), we had the possibility to collect and preserve in Sicilgermobank germplasm bank Modicana's embryos and the semen of: Pantesco and Ragusano donkeys'; Cinisara and Modicana cows; Cirnecodell'Etna dog's; Girgentana and Messinese goats'; Sicilian Oriental Thoroughbred horse's; Barbaresca sheep's; Sicilian Black swine.

## **Premessa**

Dal 1992, anno in cui è stata adottata la Convenzione sulla Biodiversità (CED, 1992), si sono susseguiti una serie di importanti eventi internazionali che hanno posto al centro del dibattito la tutela e la salvaguardia delle risorse genetiche per l'alimentazione e l'agricoltura. Sono stati tre gli accordi internazionali più significativi direttamente collegati alla CED che, a partire dal 2000 ad oggi, hanno permesso di focalizzare l'attenzione su temi di rilevanza planetaria, quali la biosicurezza e l'accesso alle risorse genetiche. Si tratta del Protocollo di Cartagena (CPB, 2000), del Trattato internazionale sulle risorse genetiche vegetali per l'alimentazione e l'agricoltura (TIT, 2009) e del recente protocollo di Nagoya (NP, 2010) sull'accesso e condivisione dei benefici derivanti dall'uso della biodiversità. Tali strumenti, sebbene differenti tra loro, sono indirizzati verso un comune obiettivo: la ripartizione giusta ed equa dei benefici derivanti dall'uso delle risorse genetiche. Aumenta così, a livello globale, la consapevolezza che la perdita delle risorse genetiche non rappresenta solo la scomparsa di materiale genetico, ma anche e soprattutto la lenta estinzione di un immenso patrimonio di informazioni legate alle colture tipiche e tradizionali, associate ai saperi ed ai sapori locali.

La Sicilia possiede un patrimonio zootecnico tra i più interessanti del Mediterraneo, stante la presenza di razze che rappresentano vere nicchie ecologiche. Infatti, il tessuto produttivo delle aree interne dell'isola è costituito dagli allevamenti di diverse razze autoctone (bovine, ovi-caprine, suine ed equine) a carattere prevalentemente estensivo. In Europa, nel quadro delle rispettive politiche nazionali dell'allevamento, la maggior parte degli Stati Membri ha cercato, sino ad oggi, di incoraggiare la produzione di animali appartenenti a determinate razze e rispondenti a norme zootecniche specifiche. Del resto, il miglioramento delle razze è una necessità degli allevamenti moderni che viene attuata mediante l'impiego delle tecniche artificiali di riproduzione animale.

## **Quadro normativo in riproduzione animale**

### **Animal Health Law**

#### **Regolamento UE 2016/429**

Nel marzo 2016 il Parlamento e il Consiglio Europeo hanno approvato il **Regolamento 2016/429** (Reg UE 2016/429) sulle malattie animali trasmissibili (*Animal Health Law*), entrato in vigore il 21 aprile 2021. Lo scopo principale di questo regolamento è quello di limitare la diffusione di malattie trasmissibili all'uomo o ad altri animali, andando a racchiudere in un unico regolamento la gran parte della normativa riguardante la salute animale e il settore degli allevamenti, semplificando il ruolo delle autorità competenti.

Il legislatore europeo raggruppa in un unico regolamento le prescrizioni in ambito di sanità animale, consentendo alle autorità competenti di focalizzarsi principalmente sulla prevenzione ed eradicazione delle più importanti malattie infettive. La normativa si applica a tutte le specie animali, da reddito e da compagnia, domestiche e selvatiche, secondo le classificazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale. Essa chiarisce le responsabilità di allevatori, veterinari e di tutti coloro che si occupano di animali, definiti nel regolamento come "operatori". L'approccio *One Health* mira a rafforzare il sistema di prevenzione e di controllo delle principali malattie infettive degli animali ed offre una solida base giuridica alle azioni di monitoraggio, anche in ottica di antibiotico resistenza e farmacovigilanza. L'*Animal Health Law* intende ridurre il rischio d'insorgenza di epidemie animali e zoonotiche, in relazione anche ai costanti cambiamenti climatici e sanitari, così come all'insorgenza di nuove malattie, come nel caso della recente pandemia causata da coronavirus (SARS-CoV-2), COVID-19. Nel complesso, la norma rende il mercato europeo più competitivo grazie a superiori garanzie di sicurezza sanitaria degli animali e dei prodotti da essi derivati, favorendo la crescita e l'occupazione in questi settori. Altro scopo, inoltre, è rafforzare l'attenzione sanitaria assicurando controlli regolari agli animali allevati, cercando

dunque di prevenire l'impatto che tali malattie potrebbero avere sulla biodiversità, e il rischio fornito dal materiale germinale per la diffusione di queste malattie.

Già nelle premesse il Regolamento parte dalla consapevolezza che le malattie animali trasmissibili dei domestici e dei selvatici possono impattare la biodiversità soprattutto alla luce dei cambiamenti climatici (punto 3, 18, 19). “Le malattie degli animali non sono trasmesse solo per contatto diretto tra gli animali o tra gli animali e l'uomo. Sono anche trasportate più lontano attraverso i sistemi idrico e aereo, vettori quali gli insetti, o lo sperma, gli ovociti e gli embrioni utilizzati per l'inseminazione artificiale, la donazione di ovociti o il trasferimento di embrioni” (punto 20). “Le malattie degli animali possono avere ripercussioni negative sulla distribuzione delle specie animali selvatiche e quindi influire sulla biodiversità.” (punto 21). Tuttavia, “Alcune malattie animali trasmissibili non si trasmettono facilmente ad altri animali o all'uomo e quindi non provocano danni economici o alla biodiversità su vasta scala. Pertanto, esse non costituiscono una minaccia grave per la sanità animale o pubblica nell'Unione e possono dunque essere oggetto, se del caso, di norme nazionali” (punto 29).

Per il controllo delle malattie è necessaria la registrazione degli stabilimenti che manipolano o trasportano materiale germinale per consentire all'autorità competente di effettuare una sorveglianza adeguata e di prevenire, combattere ed eradicare le malattie animali trasmissibili (punto 98). È inoltre necessario “elaborare prescrizioni specifiche per l'identificazione e la registrazione delle diverse specie di animali terrestri e di materiale germinale detenuti al fine di facilitare l'attuazione efficace delle norme di prevenzione e controllo delle malattie” (punto 107).

La notifica delle movimentazioni animali e di materiale germinale tra Stati membri e in alcuni casi entro i territori nazionali degli Stati membri è essenziale per garantire la tracciabilità degli animali e del materiale germinale laddove tali movimenti possono essere associati ad un rischio di diffusione delle malattie animali trasmissibili. Tali movimenti dovrebbero pertanto essere notificati e registrati mediante un sistema informatico veterinario integrato (*Traces*) (punto 129).

Il materiale germinale analogamente potrebbe costituire un rischio per la diffusione delle malattie animali trasmissibili agli animali vivi. Inoltre, alcune specificità della sua produzione, connesse a requisiti sanitari elevati per gli animali da riproduzione, richiedono prescrizioni in materia di sanità animale più rigorose o particolari riguardo agli animali donatori. Al fine di garantire movimenti sicuri del materiale germinale, di mantenere il suo previsto elevato standard sanitario e di tener conto di taluni usi specifici di detto materiale, dovrebbe essere delegato alla Commissione il potere di adottare atti riguardo alle prescrizioni dettagliate sui movimenti del materiale germinale di determinate specie animali, alle prescrizioni speciali applicabili, ad esempio al loro movimento per fini scientifici, e alle deroghe all'obbligo di certificazione sanitaria (punto 133).

Passando al corpo del regolamento, l'articolo 1 (oggetto) recita: "il Regolamento stabilisce le norme per la prevenzione e il controllo delle malattie degli animali che sono trasmissibili agli animali o all'uomo". Tali norme includono: la registrazione e il riconoscimento degli stabilimenti e dei trasportatori, i movimenti e la tracciabilità del materiale germinale nell'Unione Europea; l'ingresso di materiale germinale nell'Unione e le esportazioni di tali partite dall'Unione. Il Regolamento si applica al materiale germinale (art. 2).

All'art. 4 del Regolamento viene data la definizione di **materiale germinale**: "sperma, ovociti ed embrioni destinati alla riproduzione artificiale; uova da cova". Il materiale germinale è inquadrato come prodotto di origine animale e non come sottoprodotto. Definisce, inoltre, lo stabilimento di materiale germinale: "in relazione allo sperma, uno stabilimento in cui lo sperma è raccolto, prodotto, trasformato o immagazzinato; in relazione agli ovociti e agli embrioni, un gruppo di professionisti o una struttura sottoposti al controllo di un veterinario del gruppo, competente per la raccolta, la produzione, il trattamento e lo stoccaggio degli ovociti e degli embrioni; in relazione alle uova da cova, un incubatoio".

L'articolo 5 elenca le 5 **malattie trasmissibili prioritarie** su cui si applicano le norme di prevenzione e controllo previste dal regolamento nello specifico afta epizootica, peste suina classica, peste suina africana, influenza aviaria ad alta patogenicità, peste

9

equina a cui si aggiunge l'elenco di malattie riportate nell'allegato II (tra cui ricordiamo peste bovina, peste dei piccoli ruminanti, malattia vescicolare dei suini, febbre catarrale degli ovini, malattia di Teschen, vaiolo degli ovi-caprini, febbre della Valle del Rift, dermatite nodulare contagiosa, stomatite vescicolosa, encefalite equina virale venezuelana, malattia emorragica epizootica dei cervi, pleuropolmonite contagiosa dei bovini, tubercolosi bovina, brucellosi bovina da *B. abortus*, brucellosi ovina e caprina da *B. melitensis*, carbonchio ematico, rabbia, echinococcosi, encefalopatie spongiformi trasmissibili, campilobatteriosi, listeriosi, salmonellosi zoonotica, trichinellosi, *E. coli* produttori di verocitotossine). Queste malattie devono soddisfare tutti i seguenti criteri: essere trasmissibile; le specie sensibili alla malattia o i vettori e i serbatoi della malattia sono presenti nell'Unione; la malattia ha effetti negativi sulla salute degli animali, o presenta un rischio per la salute pubblica a causa del suo carattere zoonotico; sono disponibili strumenti diagnostici per la malattia; le misure di riduzione dei rischi e, se del caso, di sorveglianza della malattia sono efficaci e proporzionate ai rischi presentati dalla malattia nell'Unione. Ma devono soddisfare almeno uno dei seguenti criteri: “la malattia ha o può avere effetti negativi rilevanti sulla salute degli animali nell'Unione, o presenta o potrebbe presentare un rischio significativo per la salute pubblica a causa del suo carattere zoonotico; l'agente patogeno ha sviluppato resistenza ai trattamenti, il che rappresenta un rischio notevole per la salute pubblica e/o animale nell'Unione; la malattia ha o può avere rilevanti ripercussioni economiche negative sulla produzione agricola o acquicola dell'Unione; la malattia può generare una crisi o l'agente patogeno potrebbero essere utilizzato a fini di bioterrorismo; la malattia ha o potrebbe avere ripercussioni negative rilevanti sull'ambiente, compreso sulla biodiversità, dell'Unione.” Quindi gli effetti sulla biodiversità o protezione delle specie o delle razze minacciate, compresi la possibile scomparsa di tali specie o razze o i possibili danni a lungo termine ad esse arrecati, sono già contemplati nell'elenco delle malattie e vengono tenuti in considerazione nell'aggiornamento di tale elenco (art. 7) e per la scelta della strategia di prevenzione (allegato IV).

L'art 84 ribadisce l'obbligo di **registrazione degli stabilimenti**: “Gli operatori degli stabilimenti che raccolgono, producono, trasformano o stoccano materiale germinale,

affinché i loro stabilimenti siano registrati in conformità all'articolo 93, prima di iniziare tali attività: informano l'autorità competente in merito ad ogni stabilimento sotto la loro responsabilità; forniscono all'autorità competente informazioni riguardanti: il nome e l'indirizzo dell'operatore interessato; l'ubicazione dello stabilimento e una descrizione delle strutture; le categorie, le specie e il numero o le quantità di materiale germinale che intendono detenere nello stabilimento e la capacità dello stabilimento; il tipo di stabilimento; e ogni altro aspetto dello stabilimento utili per determinare il rischio che esso presenta.” Inoltre, gli operatori “informano l'autorità competente in merito: eventuali cambiamenti nello stabilimento in questione in relazione agli elementi di cui sopra; all'eventuale cessazione delle attività dell'operatore o dello stabilimento interessato”.

L'art 93 stabilisce che “l'autorità competente registra gli stabilimenti nel registro di cui all'articolo 101, paragrafo 1, se l'operatore interessato ha trasmesso le informazioni richieste conformemente all'articolo 84”. Inoltre, l'autorità competente assegna a ogni stabilimento un **numero di registrazione unico**.

L'articolo 103 stabilisce gli obblighi della **conservazione dei documenti** negli stabilimenti di materiale germinale. “Gli operatori degli stabilimenti di materiale germinale conservano e aggiornano la documentazione recante almeno le seguenti informazioni: a) la razza, l'età, l'identificazione e lo status sanitario degli animali donatori utilizzati per la produzione di materiale germinale; b) la data e il luogo di raccolta, di trasformazione e di stoccaggio del materiale germinale raccolto, prodotto o trasformato; c) gli estremi per l'identificazione del materiale germinale e i particolari relativi al luogo di destinazione, se conosciuti; d) i documenti che devono accompagnare il materiale germinale in arrivo o in partenza dallo stabilimento in questione conformemente all'articolo 162 e all'articolo 164, paragrafo 2, alle norme adottate ai sensi dell'articolo 162, paragrafi 3 e 4; e) se del caso, i risultati degli esami clinici e di laboratorio; f) le tecniche di laboratorio utilizzate. Gli stabilimenti che presentano un rischio ridotto di diffusione delle malattie elencate o emergenti possono essere esonerati dallo Stato membro interessato dall'obbligo di conservare la documentazione recante tutte o parte delle informazioni di cui al paragrafo 1. Gli

operatori degli stabilimenti di materiale germinale conservano la documentazione di cui ai paragrafi 1 e 2 nel loro stabilimento e: a) la mettono immediatamente a disposizione dell'autorità competente su richiesta; b) la conservano per un periodo di tempo minimo che deve essere stabilito dall'autorità competente, che non può essere inferiore a 3 anni.”

La sezione 2 del capo 2 si occupa esclusivamente di materiale germinale. L'art 121 prescrive quanto segue : “Gli operatori che producono, trasformano o immagazzinano materiale germinale appongono sul materiale germinale di animali detenuti delle specie bovina, caprina, ovina, suina ed equina un **marchio** che consenta di determinare chiaramente: gli animali donatori; la data della raccolta; e gli stabilimenti di materiale germinale in cui tale materiale è stato raccolto, prodotto, trasformato e immagazzinato.” Tale marcatura è concepita in modo da assicurare “l'applicazione efficace delle misure di prevenzione e controllo delle malattie” stabilite dal regolamento e “la tracciabilità del materiale germinale, dei suoi movimenti all'interno e tra gli Stati membri e del suo ingresso nell'Unione”.

Il capo 5 si occupa esclusivamente di **movimenti** di materiale germinale all'interno dell'Unione. L'articolo 157 prescrive quanto segue: “1. Gli operatori adottano misure preventive appropriate per garantire che i movimenti di materiale germinale non compromettano lo stato sanitario degli animali terrestri detenuti nel luogo di destinazione per quanto riguarda: a) le malattie elencate di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera d); b) le malattie emergenti. 2. Gli operatori spostano dai loro stabilimenti e vi ricevono materiale germinale solo se il materiale in questione soddisfa le seguenti condizioni: proviene da stabilimenti che sono stati: inseriti dall'autorità competente nel registro degli stabilimenti conformemente all'articolo 93, primo comma, lettera a), e per i quali non sono state concesse deroghe dallo Stato membro di origine a norma dell'articolo 85 o riconosciuti dall'autorità competente conformemente all'articolo 97, paragrafo 1, se un tale riconoscimento è prescritto dall'articolo 94, paragrafo 1, o dall'articolo 95; oppure soddisfa le prescrizioni in materia di tracciabilità previste all'articolo 121, paragrafo 1, e nelle norme adottate ai sensi dell'articolo 122, paragrafo 1. 3. Gli operatori ottemperano alle prescrizioni di cui all'articolo 125 per il

trasporto di materiale germinale di animali.<sup>4</sup> In caso di materiale germinale che deve essere distrutto a fini di eradicazione delle malattie nel quadro di un programma di eradicazione di cui all'articolo 31, paragrafi 1 o 2, gli operatori spostano tale materiale da uno stabilimento in uno Stato membro a uno stabilimento in un altro Stato membro solo se l'autorità competente dello Stato membro di destinazione autorizza esplicitamente il movimento in questione.”

L'articolo 158 prescrive gli obblighi per chi riceve materiale germinale, che deve verificare i marchi e le certificazioni sanitarie e deve informare l'autorità competente di tutto ciò.

L'articolo 159 in riferimento al **materiale germinale** delle specie bovina, ovina, caprina, suina ed equina e di materiale germinale di pollame prescrive quanto segue:

1. Gli operatori spostano in un altro Stato membro materiale germinale solo se tale materiale germinale soddisfa le seguenti condizioni: “a) è stato raccolto, prodotto, trasformato e immagazzinato in stabilimenti di materiale germinale riconosciuti a tal fine conformemente all'articolo 97, paragrafo 1, e all'articolo 99; b) è stato raccolto da animali donatori che soddisfano le necessarie prescrizioni in materia di sanità animale in modo da assicurare che il materiale germinale non diffonda malattie elencate; c) è stato raccolto, prodotto, trasformato, immagazzinato e trasportato in modo tale da garantire che non diffonda malattie elencate di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera d).” Il materiale germinale non è spostato se insorgono focolai che comportano delle restrizioni al movimento, tranne se la raccolta del materiale è avvenuta prima della comparsa del focolaio.

L'articolo 161 si sofferma sull'obbligo del **certificato sanitario** dell'autorità competente che deve accompagnare il materiale germinale. Tuttavia, “L'autorità competente può decidere che tale certificato non deve essere rilasciato per i movimenti del materiale germinale all'interno dello Stato membro interessato qualora tale autorità competente ritenga che sia dotato di un sistema alternativo che assicuri la tracciabilità di tale partita di tale materiale germinale e quel materiale germinale sia conforme ai requisiti in materia di salute animale per tale movimento.”

Il **certificato** deve contenere (articolo 162) le seguenti informazioni: “lo stabilimento di materiale germinale di origine e lo stabilimento o il luogo di destinazione; il tipo di materiale germinale e le specie di animali detenuti donatori; il volume o la quantità di materiale germinale; la marcatura del materiale germinale, se richiesta dall'articolo 121, paragrafo 1, e dalle norme adottate ai sensi dell'articolo 122, paragrafo 1; le informazioni necessarie per dimostrare che il materiale germinale della partita è conforme alle prescrizioni in materia di movimenti per le specie interessate di cui agli articoli 157 e 159 e alle norme adottate ai sensi dell'articolo 160.”

L'articolo 163 si sofferma sull'obbligo di **notifica** all'autorità competente sugli spostamenti di materiale germinale. Gli operatori informano in anticipo l'autorità competente fornendo tutte le informazioni necessarie. “L'autorità competente dello Stato membro di origine notifica all'autorità competente dello Stato membro di destinazione, prima del movimento in questione e, ove possibile, mediante il sistema *Traces*, qualsiasi movimento di materiale germinale di animali detenuti delle specie bovina, ovina, caprina, suina ed equina e di materiale germinale di pollame conformemente alle norme adottate ai sensi dei paragrafi 5 e 6.”

L'articolo 164 contempla anche la possibilità di spostare materiale germinale di specie diverse (esempio i cani), purché siano rispettati i principi di precauzione rimandando ad atti delegati le norme specifiche.

L'articolo 165 stabilisce il principio della deroga per **motivi scientifici** per movimenti non conformi all'articolo 159 e 164. La deroga viene concessa solo alle seguenti condizioni: “a) le autorità competenti del luogo di destinazione e del luogo di origine: i) hanno convenuto le condizioni per i movimenti proposti; ii) provvedono affinché siano predisposte le necessarie misure di riduzione dei rischi affinché i movimenti in questione non compromettano lo stato sanitario nei luoghi situati lungo il tragitto e nel luogo di destinazione per quanto riguarda le malattie elencate di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera d); iii) hanno notificato all'autorità competente degli Stati membri di passaggio, se del caso, la deroga concessa e le relative condizioni; b) i movimenti avvengono sotto la supervisione delle autorità competenti dei luoghi di origine e di

destinazione e, se del caso, dell'autorità competente degli eventuali Stati membri di passaggio.”

L'articolo 170 stabilisce che gli stati membri hanno libertà di stabilire misure nazionali, ma “tali misure nazionali: a) tengono conto delle norme sui movimenti di animali e di materiale germinale di cui ai capi 3 (articoli da 124 a 154), 4 (articoli 155 e 156) e 5 (articoli da 157 a 165) e non sono in contrasto con tali norme; b) non ostacolano i movimenti di animali e prodotti tra Stati membri; c) non vanno oltre quanto è appropriato e necessario per prevenire l'introduzione e la diffusione delle malattie elencate di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettere d) ed e).”

Ad integrazione di questo regolamento, la Commissione Europea ha emanato una serie di atti delegati.

## **Regolamento Delegato UE 2018/1629**

Il Regolamento Delegato (EU) 2018/1629 (Reg Del UE 2018/1629) che modifica l'**elenco delle malattie** figuranti all'allegato II del Reg UE 2016/429 relativo alle malattie animali trasmissibili. Le malattie elencate in allegato sono meglio definite e aggiornate. Quelle di maggior interesse a questa trattazione sono: infezione da virus della peste bovina, infezione da virus della febbre della Valle del Rift, infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*), infezione da virus della rabbia, infezione da virus della febbre catarrale (*bluetongue*) (sierotipi 1-24), infestazione da *Echinococcus multilocularis*, infezione da virus della malattia emorragica epizootica, carbonchio ematico, surra (*Trypanosoma evansi*), malattia da virus Ebola, paratubercolosi, encefalite giapponese, febbre del Nilo occidentale, febbre Q, infezione da virus della dermatite nodulare contagiosa, infezione da *Mycoplasma mycoides* sottospecie *mycoides* SC (pleuropolmonite contagiosa dei bovini), rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva, diarrea virale bovina, campilobatteriosi genitale bovina, tricomoniasi, leucosi bovina enzootica, vaiolo

degli ovini e dei caprini, infezione da virus della peste dei piccoli ruminanti, pleuropolmonite contagiosa caprina, epididimite ovina (*Brucella ovis*), morva (infezione da *Burkholderia mallei*), infezione da virus dell'arterite equina, anemia infettiva equina, durina, encefalomielite equina venezuelana, metrite contagiosa equina, encefalomielite equina (orientale e occidentale), infezione da virus della malattia di Aujeszky, infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini.

## **Regolamento di Esecuzione UE 2018/1882**

Il Regolamento di Esecuzione (UE) 2018/1882 (Reg Ese UE 2018/1882) è relativo all'applicazione di determinate norme di prevenzione e per le **categorie di malattie elencate** e che stabilisce un elenco di specie e gruppi di specie che comportano un notevole rischio di diffusione di tali malattie elencate.

All'articolo 1 dà le seguenti definizioni: “«malattia di categoria A»: malattia elencata che non si manifesta normalmente nell'Unione e che, non appena individuata, richiede l'adozione immediata di misure di eradicazione, di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera a), del Reg UE 2016/429; «malattia di categoria B»: malattia elencata che deve essere oggetto di controllo in tutti gli Stati membri allo scopo di eradicarla in tutta l'Unione, di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera b), del Reg UE 2016/429; «malattia di categoria C»: malattia elencata rilevante per alcuni Stati membri e rispetto alla quale sono necessarie misure per evitarne la diffusione in parti dell'Unione che ne sono ufficialmente indenni o che hanno programmi di eradicazione per la malattia elencata interessata, di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c), del Reg UE 2016/429; «malattia di categoria D»: malattia elencata per la quale sono necessarie misure per evitarne la diffusione a causa del suo ingresso nell'Unione o dei movimenti tra Stati membri, di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera d), del Reg UE 2016/429; «malattia di categoria E» : malattia elencata per la quale vi è la necessità di sorveglianza all'interno dell'Unione, di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera e), del Reg UE 2016/429”.

Le norme di prevenzione e controllo delle malattie per le malattie elencate di cui all'articolo 9, paragrafo 1, del Reg UE 2016/429 si applicano alle categorie di malattie elencate per le specie elencate e i gruppi di specie elencate figuranti nella tabella (tab. 1) riportata nell'allegato del presente regolamento e qui di seguito semplificata per i fini della trattazione, includendo solo le malattie di interesse nella specie bovina, ovina, caprina, suina, equina, asinina e canina:

Nome della malattia elencata	Categoria della malattia elencata	Specie elencate	
		Gruppi di specie	Specie vettrici
Afta epizootica	A+D+E	Suini, bovini, caprini, ovini	
Infezione da virus della peste bovina	A+D+E	Suini, bovini, caprini, ovini	
Infezione da virus della febbre della Rift Valley	A+D+E	Equini, asinini, bovini, caprini, ovini	Culicidae
Infezione da <i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i> e <i>B. suis</i>	B+D+E	Bovini, caprini, ovini	
	E	Suini, cani	
Infezione da complesso <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. tuberculosis</i> )	B+D+E	Bovini	
	D+E	Suini, caprini, ovini	
	E	Equini, asinini, cani	
Infezione da virus della rabbia	B+D+E	Bovini, caprini, ovini, suini, equini, asinini, cani	
Infestazione da <i>Echinococcus multilocularis</i>	C+D+E	Cani	
Infezione virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24)	C+D+E	Bovini, caprini, ovini	<i>Culicoides</i> spp.
Infezione da virus della malattia emorragica epizootica	D+E	Bovini, caprini, ovini	<i>Culicoides</i> spp.
Carbonchio ematico	D+E	Bovini, caprini, ovini, suini, equini, asinini	
Surra ( <i>Tripanosoma evansi</i> )	D+E	Bovini, caprini, ovini, suini, equini, asinini	Tabanidae
Paratubercolosi	E	Bovini, caprini, ovini	
Encefalite giapponese	E	Equini, asinini	Culicidae
Febbre del Nilo occidentale	E	Equini, asinini	Culicidae
Febbre Q	E	Bovini, caprini, ovini	
Infezione da virus della dermatite nodulare contagiosa	A+D+E	Bovini	Artropodi ematofagi
Infezione da <i>Mycoplasma mycoides</i> sottospecie <i>mycoides</i> SC (pleuropolmonite contagiosa dei bovini)	A+D+E	Bovini	
Rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva	C+D+E	Bovini	
Diarrea virale bovina	C+D+E	Bovini	
Campilobatteriosi genitale bovina	D+E	Bovini	
Tricomoniasi	D+E	Bovini	
Leucosi bovina enzootica	C+D+E	Bovini	

Vaiolo degli ovini e dei caprini	A+D+E	Caprini, ovini	
Infezione da virus della peste dei piccoli ruminanti	A+D+E	Caprini, ovini	
Pleuropolmonite contagiosa caprina	A+D+E	Caprini, ovini	
Epididimite ovina ( <i>Brucella ovis</i> )	D+E	Caprini, ovini	
Peste equina	A+D+E	Equini, asinini	<i>Culicoides</i> spp.
Morva (infezione da <i>Burkholderia mallei</i> )	A+D+E	Equini, asinini, caprini	
Infezione da virus dell'arterite equina	D+E	Equini, asinini	
Anemia infettiva equina	D+E	Equini, asinini	Tabanidae
Durina	D+E	Equini, asinini	
Encefalomielite equina venezuelana	D+E	Equini, asinini	Culicidae
Metrite contagiosa equina	D+E	Equini, asinini	
Encefalomielite equina (orientale e occidentale)	E	Equini, asinini	Culicidae
Peste suina classica	A+D+E	Suini	
Peste suina africana	A+D+E	Suini	Ornithodoros
Infezione da virus della malattia di Aujeszky	C+D+E	Suini	
Infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini	D+E	Suini	

Tabella 1. Elenco semplificato della categorizzazione delle malattie in accordo al Reg Ese UE 2018/1882.

## Regolamento Delegato UE 2020/686

Il Regolamento Delegato (UE) 686 del 2020 (Reg Del UE 2020/686) integra il Reg UE 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda il riconoscimento degli stabilimenti di materiale germinale e le prescrizioni in materia di tracciabilità e di sanità animale per i movimenti all'interno dell'Unione di materiale germinale di determinati animali terrestri. Questo regolamento integra e sostituisce le direttive e le norme per specie classiche come i bovini, ovini, caprini, suini ed equini, ma si occupa anche di specie fin ora non citate nei regolamenti come cani, gatti e camelidi (Pugliese et al., 2022; Zema et al., 2022), anche se alcune norme sono state recentemente abrogate dal Reg Del Ue 2023/647.

All'art. 2 sono riportate le **definizioni** relative al regolamento tra cui: banca genetica, "un deposito di materiale genetico animale per la conservazione *ex situ* e l'uso sostenibile delle risorse genetiche di animali terrestri detenuti, gestita da un istituto ospitante autorizzato o riconosciuto dall'autorità competente per lo svolgimento di

tali compiti”; centro di raccolta dello sperma, “uno stabilimento di materiale germinale riconosciuto dall’autorità competente, secondo quanto previsto all’articolo 4, per la raccolta, la trasformazione, lo stoccaggio e il trasporto di sperma di bovini, suini, ovini, caprini o equini destinato a essere spostato in un altro Stato membro”; gruppo di raccolta di embrioni, “uno stabilimento di materiale germinale costituito da un gruppo di professionisti o da una struttura riconosciuti dall’autorità competente, secondo quanto previsto all’articolo 4, per la raccolta, la trasformazione, lo stoccaggio e il trasporto di ovociti (ovociti aggiunti dal Reg Del Ue 2023/647) e embrioni concepiti *in vivo* di bovini, suini, ovini, caprini o equini destinati a essere spostati in un altro Stato membro”; gruppo di produzione di embrioni, “uno stabilimento di materiale germinale costituito da un gruppo di professionisti o da una struttura riconosciuti dall’autorità competente, secondo quanto previsto all’articolo 4, per la raccolta, la trasformazione, lo stoccaggio e il trasporto di ovociti e la produzione *in vitro*, se del caso con seme immagazzinato, la trasformazione, lo stoccaggio e il trasporto di embrioni di bovini, suini, ovini, caprini o equini, destinati entrambi a essere spostati in un altro Stato membro”; sperma, “l’iaculato di uno o più animali, tal quale, preparato o diluito”; ovociti, “le fasi aploidi dell’ootidogenesi comprendenti gli ovociti secondari e gli ovuli”; embrione, “lo stadio iniziale dello sviluppo di un animale in grado di essere trasferito in una madre ricevente”; partita di materiale germinale, “la quantità di sperma, ovociti, embrioni concepiti in vivo o embrioni prodotti *in vitro* spedita da un unico stabilimento riconosciuto di materiale germinale e accompagnata da un unico certificato sanitario”; stabilimento di trasformazione di materiale germinale, “uno stabilimento di materiale germinale riconosciuto dall’autorità competente, secondo quanto previsto all’articolo 4, per la trasformazione, compreso, se del caso, il sessaggio dello sperma, e lo stoccaggio di sperma, ovociti o embrioni di bovini, suini, ovini, caprini o equini di una o più specie, o di qualsiasi combinazione di tipi di materiale germinale o di specie, destinati a essere spostati in un altro Stato membro”; centro di stoccaggio di materiale germinale, “uno stabilimento di materiale germinale riconosciuto dall’autorità competente, secondo quanto previsto all’articolo 4, per lo stoccaggio di sperma, ovociti o embrioni di bovini, suini, ovini, caprini o equini di una o più specie, o di qualsiasi combinazione di tipi di materiale germinale o di specie, destinati a essere spostati in un altro Stato

membro”; veterinario del centro, “il veterinario responsabile delle attività svolte presso il centro di raccolta dello sperma, lo stabilimento di trasformazione di materiale germinale o il centro di stoccaggio di materiale germinale, come stabilito dal presente regolamento”; veterinario del gruppo, “il veterinario responsabile delle attività svolte da un gruppo di raccolta di embrioni o da un gruppo di produzione di embrioni, come stabilito dal presente regolamento”; impianto di quarantena, “una struttura autorizzata dall’autorità competente ai fini dell’isolamento di bovini, suini, ovini o caprini per un periodo almeno pari ai 28 giorni precedenti la loro ammissione in un centro di raccolta dello sperma”; laboratorio ufficiale, “un laboratorio situato in uno Stato membro, un paese terzo o un territorio, designato dall’autorità competente conformemente all’articolo 37 del Reg UE 2017/625 per effettuare le prove di cui agli articoli 24 e 25 del presente regolamento”; razza a rischio di estinzione, “una razza locale che uno Stato membro riconosce come a rischio di estinzione, geneticamente adattata a uno o più sistemi di produzione o ambienti tradizionali in tale Stato membro, e la cui condizione a rischio è scientificamente riconosciuta da un organismo in possesso delle competenze e delle conoscenze necessarie in materia di razze a rischio di estinzione, secondo quanto previsto all’articolo 2, punto 24, del Reg UE 2016/1012”.

Il capo 1 si occupa del **riconoscimento degli stabilimenti** di materiale germinale. L’articolo 3 si occupa delle prescrizioni per il riconoscimento degli stabilimenti di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini, indicando quali sono gli stabilimenti che richiedono il riconoscimento: “a) lo stabilimento in cui lo sperma di bovini, suini, ovini, caprini o equini è raccolto, trasformato e immagazzinato, ai fini del riconoscimento come centro di raccolta dello sperma; b) il gruppo di professionisti o la struttura sottoposti al controllo di un veterinario del gruppo, competente per la raccolta, la trasformazione e lo stoccaggio di ovociti (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) e embrioni di bovini, suini, ovini, caprini o equini, ai fini del riconoscimento come gruppo di raccolta di embrioni; c) il gruppo di professionisti o la struttura sottoposti al controllo di un veterinario del gruppo, competente per la raccolta, la trasformazione e lo stoccaggio di ovociti e la produzione, la trasformazione e lo stoccaggio di embrioni di bovini, suini, ovini, caprini o equini, ai fini del riconoscimento come gruppo di produzione di embrioni; d) lo stabilimento in

cui lo sperma, gli ovociti o gli embrioni freschi, refrigerati o congelati di bovini, suini, ovini, caprini o equini sono trasformati e immagazzinati, ai fini del riconoscimento come stabilimento di trasformazione di materiale germinale; e) lo stabilimento in cui lo sperma, gli ovociti o gli embrioni freschi, refrigerati o congelati di bovini, suini, ovini, caprini o equini sono immagazzinati, ai fini del riconoscimento come centro di stoccaggio di materiale germinale”.

L'articolo 4 ricorda che ai fini del riconoscimento l'autorità competente deve accertare che l'operatore abbia nominato le figure richieste (veterinario) e possedere le attrezzature richieste, rimandando all'allegato I la definizione. Nel rilasciare il riconoscimento, “secondo quanto previsto agli articoli 97 e 99 del Reg UE 2016/429, l'autorità competente assegna a tale stabilimento un numero di riconoscimento unico, che comprende il codice ISO 3166-1 alpha-2 del paese in cui è rilasciato il riconoscimento.”

L'articolo 5 fornisce le norme speciali per la cessazione delle attività di stabilimenti riconosciuti di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Prima della cessazione uno stabilimento deve spostare il materiale germinale in un nuovo stabilimento riconosciuto o distruggerlo ai sensi della norma vigente (Reg CE 2009/1069).

L'articolo 6 e 7 si occupano delle informazioni minime che devono avere i registri dell'autorità competente relativi agli stabilimenti registrati e riconosciuti di materiale germinale.

Il capo 3 si occupa della conservazione della documentazione e della **tracciabilità**. L'articolo 8 stabilisce le modalità degli obblighi di conservazione della documentazione per gli operatori di stabilimenti riconosciuti di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Per quanto riguarda un centro di raccolta dello sperma le informazioni da conservare sono: “i) la specie, la razza, la data di nascita e l'identificazione di ciascun animale donatore presente nel centro di raccolta dello sperma; ii) le date di qualsiasi movimento di animali donatori verso il centro di raccolta dello sperma e a partire dallo stesso e, se tali animali sono accompagnati da

documenti, il riferimento a tali documenti; iii) lo stato sanitario, i risultati delle prove cliniche e diagnostiche e le tecniche di laboratorio utilizzate, come pure i trattamenti e le vaccinazioni effettuati sugli animali donatori; iv) la data di raccolta e, se del caso, la data e il luogo di trasformazione dello sperma; v) l'identificazione dello sperma e informazioni dettagliate relative alla sua destinazione". Per quanto riguarda un gruppo di raccolta di embrioni, un gruppo di produzione di embrioni o un gruppo di raccolta e di produzione di embrioni: "i) la specie, la razza, la data di nascita e l'identificazione di ciascun animale donatore da cui sono stati raccolti gli ovociti o gli embrioni; ii) lo stato sanitario, i risultati delle prove cliniche e diagnostiche nonché le tecniche di laboratorio utilizzate, come pure i trattamenti e le vaccinazioni effettuati sugli animali donatori di ovociti o embrioni; iii) la data e il luogo di raccolta, esame e trasformazione degli ovociti o degli embrioni; iv) l'identificazione degli ovociti o degli embrioni e informazioni dettagliate relative alla loro destinazione; v) se si effettua una micromanipolazione degli embrioni, informazioni dettagliate relative alle tecniche di micromanipolazione applicate che comportano la penetrazione della zona pellucida o, in caso di embrioni di equini, della capsula embrionale; vi) l'origine dello sperma utilizzato per l'inseminazione artificiale degli animali donatori o per fecondare gli ovociti per la produzione *in vitro* di embrioni.". Per quanto riguarda uno stabilimento di trasformazione di materiale germinale o un centro di stoccaggio di materiale germinale: "i) il tipo di materiale germinale trasformato e immagazzinato o solo immagazzinato nello stabilimento riconosciuto di materiale germinale, con il riferimento alla specie dell'animale donatore; ii) le date dei movimenti del materiale germinale verso lo stabilimento riconosciuto di materiale germinale e a partire dallo stesso, con il riferimento ai documenti che hanno accompagnato tale materiale; iii) i documenti, compresi un certificato sanitario e un'autodichiarazione, attestanti che lo stato sanitario degli animali donatori il cui materiale germinale è trasformato e immagazzinato o solo immagazzinato nello stabilimento riconosciuto di materiale germinale è conforme alle prescrizioni del presente regolamento; iv) l'identificazione del materiale germinale che è trasformato e immagazzinato o solo immagazzinato nello stabilimento riconosciuto di materiale germinale." Inoltre, se uno stabilimento è riconosciuto per "la trasformazione e lo stoccaggio o per il solo stoccaggio di materiale germinale di più tipi o raccolto da più specie animali, l'operatore conserva

e tiene aggiornata una documentazione separata per ciascun tipo di materiale germinale e per il materiale germinale di ciascuna specie animale che sono trasformati e immagazzinati o solo immagazzinati.”

L’articolo 9 stabilisce che la documentazione di cui sopra (in originale o in copia) segue il destino del materiale germinale al caso della cessazione.

L’articolo 10 si occupa della tracciabilità specificando meglio quanto già prescritto dal Reg UE 2016/429. “Gli operatori che raccolgono, producono, trasformano o immagazzinano materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini o equini appongono un marchio su ciascuna paillette o su ciascun altro contenitore in cui lo sperma, gli ovociti o gli embrioni, separati o meno in singole dosi, sono collocati, immagazzinati e trasportati, in modo da poter prontamente determinare le seguenti informazioni: a) la data di raccolta o di produzione di tale materiale germinale; b) la specie e l’identificazione degli animali donatori; c) il numero unico di riconoscimento dello stabilimento di materiale germinale di raccolta o di produzione, trasformazione e stoccaggio di tale materiale germinale; d) ogni altra informazione pertinente.” Il comma 2, riguardante il seme sessato, viene reso più generico dal Reg Del Ue 2023/647: “In caso di materiale germinale trasformato in uno stabilimento di materiale germinale diverso dallo stabilimento di materiale germinale di raccolta”, l’operatore integra le informazioni di cui sopra con “informazioni che consentano di identificare il numero di riconoscimento unico dello stabilimento di trasformazione di tale materiale germinale”. Tornando al Reg Del UE 2020/686, il comma 3 viene prescritto che: “Se un’unica paillette o un unico altro contenitore contiene sperma di più di un animale donatore, l’operatore provvede affinché le informazioni consentano di identificare tutti gli animali donatori”. In deroga, se lo sperma di ovini o di caprini è congelato sotto forma di pellet, l’operatore può apporre un marchio sul gobelet contenente i pellet di sperma di un unico donatore, anziché farlo su ciascun pellet contenuto in tale gobelet; se il seme è fresco o refrigerato, l’operatore può apporre un marchio sul gobelet contenente le provette o le paillette di sperma di un unico donatore, anziché farlo su ciascuna provetta o paillette contenuta in tale gobelet. “In deroga al paragrafo 1, lettera c), l’operatore provvede affinché la marcatura di

ciascuna paillette o di ciascun altro contenitore in cui lo sperma, gli ovociti o gli embrioni sono collocati, immagazzinati e trasportati, sia effettuata in modo tale da consentire l'identificazione: a) nel caso di sperma di ovini e caprini raccolto presso lo stabilimento in cui gli animali donatori sono detenuti, secondo quanto previsto all'articolo 13, il numero di registrazione unico di tale stabilimento; o b) nel caso di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini o equini, raccolto o prodotto in uno stabilimento confinato, secondo quanto previsto all'articolo 14, il numero di riconoscimento unico di tale stabilimento confinato.”

L'articolo 11 si occupa di animali diversi e per lo scopo di questa trattazione si applica ai **cani**. Poiché non è fatto obbligo di un numero di riconoscimento per gli stabilimenti, tra le informazioni, in assenza del numero, è possibile inserire l'indirizzo dello stabilimento di raccolta o di produzione, trasformazione e stoccaggio di tale materiale germinale. Per questi animali vale anche la deroga che secondo cui lo sperma degli animali di cui al medesimo paragrafo è congelato sotto forma di pellet, l'operatore può apporre un marchio sul gobelet contenente i pellet di sperma di un unico donatore, anziché farlo su ciascun pellet contenuto in tale gobelet. La necessità di marciare in maniera indelebile i contenitori del germoplasma è una novità di questo regolamento, che contrasta la pratica presente soprattutto nella specie equina e canina di non marcare le paillette o di scriverle a penna (Pugliese et al., 2020). Sebbene le informazioni possano essere rilevate dai certificati, la legge richiede che, anche in assenza di certificati, le informazioni minime dell'animale donatore e dello stabilimento debbano essere tracciabili e leggibili. Molti stabilimenti non accettano prodotti germinali in paillette scritte a penna. Si raccomanda quindi di contrassegnare le informazioni con una speciale stampante a inchiostro indelebile. Esistono diversi modelli sul mercato e, generalmente, le aziende possono fornire cannuce premarcate su richiesta.

La parte III si occupa della **movimentazione** tra gli Stati membri. L'articolo 12 vieta il movimento di germoplasma proveniente da stabilimenti non riconosciuti. Fanno eccezione gli ovini e i caprini (articolo 13) dove è possibile spostare partite di sperma raccolto, trasformato e immagazzinato nello stabilimento in cui sono detenuti gli

animali donatori, purché tali operatori: “a) ottengano il consenso preliminare dell’ autorità competente dello Stato membro di destinazione ad accettare la partita; b) garantiscano che gli animali donatori siano stati sottoposti a esame clinico da parte di un veterinario prima della raccolta dello sperma senza presentare sintomi indicativi della presenza di nessuna delle malattie di categoria D né di malattie emergenti pertinenti per gli ovini e i caprini, né segni clinici di tali malattie di categoria D o malattie emergenti il giorno della raccolta dello sperma; c) garantiscano che gli animali donatori provengano da stabilimenti conformi alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui all’ articolo 15, paragrafi 1, 2, 3 e 4, del Reg Del UE 2020/688; d) garantiscano che gli animali donatori siano stati sottoposti, con esito negativo, alle seguenti prove effettuate su campioni prelevati durante il periodo di isolamento, che deve iniziare almeno 30 giorni prima della data di raccolta dello sperma: i) una prova sierologica di cui all’ allegato I, parte 1, punto 1, del Reg Del UE 2020/688 per la ricerca dell’ infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*; ii) nel caso di ovini, una prova sierologica per la ricerca dell’ epididimite ovina (*B. ovis*); iii) nel caso di caprini detenuti insieme ad ovini, una prova sierologica per la ricerca dell’ epididimite ovina (*B. ovis*); e) garantiscano che gli animali donatori siano identificati conformemente all’ articolo 45, paragrafo 2 o 4, o all’ articolo 46, paragrafo 1, 2 o 3, del Reg Del UE 2019/2035; f) garantiscano che la marcatura dello sperma sia stata effettuata conformemente alle prescrizioni di cui all’ articolo 10; g) conservino presso lo stabilimento una documentazione che deve contenere almeno le informazioni di cui all’ articolo 8, paragrafo 1, lettera a); h) garantiscano che la partita di sperma sia trasportata conformemente agli articoli 28 e 29”.

Una deroga è prevista anche per gli stabilimenti confinati (articolo 14) che include eventuali stabilimenti permanenti dove gli animali sono detenuti o allevati ai fini di conservazione della specie o di ricerca, ma che per definizione devono essere confinati e separati dall’ ambiente circostante.

L’ articolo 15 riporta le **responsabilità degli operatori** per quanto riguarda la conformità alle prescrizioni in materia di sanità animale per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini e gli equini donatori da cui è stato raccolto il materiale germinale. Nello

specifico le prescrizioni sono essenzialmente due: a) il materiale germinale è stato raccolto da animali che non presentavano sintomi né segni clinici di malattie animali trasmissibili il giorno della raccolta; b) il movimento è stato autorizzato rispettivamente dal veterinario del centro o del gruppo.

L'articolo 16 riporta le **responsabilità dei veterinari** dei centri o dei gruppi per quanto riguarda la conformità alle prescrizioni in materia di sanità animale per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini e gli equini donatori da cui è stato raccolto il materiale germinale. I veterinari dei centri provvedono affinché i donatori soddisfino le seguenti prescrizioni: “a) sono nati e sono rimasti sin dalla nascita nell’Unione o sono entrati nell’Unione conformemente alle prescrizioni per l’ingresso nell’Unione; b) provengono da stabilimenti situati in uno Stato membro, o in una zona dello stesso, o da stabilimenti soggetti al controllo ufficiale dell’autorità competente in un paese terzo o territorio, o in una zona dell’uno o dell’altro, conformi in ciascun caso alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui al Reg Del UE 2020/688, stabilite: i) per i bovini, all’articolo 10, paragrafo 1, all’articolo 11, paragrafi 1, 2 e 3, e all’articolo 12, paragrafi 1, 2 e 3; ii) per i suini, all’articolo 19, paragrafo 1, e all’articolo 20, paragrafi 1 e 2; iii) per gli ovini e i caprini, all’articolo 15, paragrafi 1, 2, 3 e 4; iv) per gli equini, all’articolo 22, paragrafi 1 e 2; c) sono stati identificati conformemente alle prescrizioni di cui al Reg Del UE 2019/2035, stabilite: i) per i bovini, all’articolo 38; ii) per i suini, all’articolo 52, paragrafo 1, o all’articolo 54, paragrafo 2; iii) per gli ovini e i caprini, all’articolo 45, paragrafo 2 o 4, o all’articolo 46, paragrafo 1, 2 o 3; iv) per gli equini, all’articolo 58, paragrafo 1, all’articolo 59, paragrafo 1, o all’articolo 62, paragrafo 1; per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la data della prima raccolta del materiale germinale e durante il periodo di raccolta: i) sono stati detenuti in stabilimenti che non sono situati in una zona soggetta a restrizioni istituita in seguito all’insorgere nei bovini, nei suini, negli ovini, nei caprini o negli equini di una malattia di categoria A o di una malattia emergente pertinente per tali animali; ii) sono stati detenuti in stabilimenti in cui non sono state segnalate malattie di categoria D pertinenti per tali animali; iii) non sono stati a contatto con animali provenienti da stabilimenti situati in una zona soggetta a restrizioni di cui al punto i), o da stabilimenti che non soddisfano le condizioni di cui al punto ii); iv) non sono

stati utilizzati per la riproduzione naturale; il giorno della raccolta dello sperma, degli ovociti o degli embrioni non presentavano sintomi né segni clinici di nessuna delle malattie di categoria D di cui alla lettera d), punto ii), né di nessuna delle malattie emergenti; soddisfano le ulteriori prescrizioni in materia di sanità animale stabilite: i) per i bovini, all'articolo 20 e all'allegato II, parte 1 e parte 5, capitoli I, II e III; ii) per i suini, all'articolo 21 e all'allegato II, parte 2 e parte 5, capitoli I e IV; iii) per gli ovini e i caprini, all'articolo 22 e all'allegato II, parte 3 e parte 5, capitoli I, II e III; iv) per gli equini, all'articolo 23 e all'allegato II, parte 4”.

L'articolo 17 stabilisce che in caso di **restrizioni dei movimenti** per motivi di sanità animale in relazione alle malattie di cui all'articolo 16, lettera b), o all'articolo 20, 21, 22 o 23, “i veterinari dei centri, per quanto riguarda gli animali donatori di sperma, o i veterinari dei gruppi, per quanto riguarda gli animali donatori di ovociti ed embrioni, provvedono affinché lo sperma, gli ovociti e gli embrioni raccolti in un centro di raccolta dello sperma o in uno stabilimento soddisfino le seguenti prescrizioni: a) devono essere immagazzinati separatamente; b) non devono essere spostati tra Stati membri fino a quando le autorità competenti non abbiano revocato le restrizioni dei movimenti applicate al centro di raccolta dello sperma o allo stabilimento in cui lo sperma è stato raccolto; c) lo sperma, gli ovociti e gli embrioni immagazzinati devono essere stati sottoposti a indagini ufficiali appropriate per escludere la presenza nello sperma, negli ovociti e negli embrioni di patogeni per gli animali che causano le malattie per le quali sono state stabilite le restrizioni dei movimenti.”

Infine, l'articolo 18 dispone **ulteriori prescrizioni** per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini e gli equini **donatori**. “a) il giorno della loro ammissione in un centro di raccolta dello sperma non presentavano sintomi né segni clinici di nessuna delle malattie di categoria D di cui all'articolo 16, lettera d), punto ii); b) in caso di bovini, suini, ovini e caprini donatori, prima del giorno della loro ammissione in un centro di raccolta dello sperma erano detenuti in un impianto di quarantena che, in tale giorno, rispettava le seguenti condizioni: i) per un periodo pari almeno ai 30 giorni precedenti non vi è stata segnalata nessuna delle malattie di categoria D pertinenti per i bovini, i suini, gli ovini o i caprini; ii) non era situato in una zona soggetta a restrizioni istituita

in seguito all'insorgere nei bovini, nei suini, negli ovini o nei caprini di una malattia di categoria A o di una malattia emergente pertinente per tali animali; c) sono detenuti nel centro di raccolta dello sperma: i) nel quale, per un periodo pari almeno ai 30 giorni precedenti la data della raccolta e almeno ai 30 giorni successivi alla data della raccolta dello sperma o, nel caso di sperma fresco, fino alla data di spedizione della partita di sperma, non è stata segnalata nessuna delle malattie di categoria D pertinenti per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini o gli equini; ii) che non è situato in una zona soggetta a restrizioni istituita in seguito all'insorgere nei bovini, nei suini, negli ovini, nei caprini o negli equini di una malattia di categoria A o di una malattia emergente pertinente per tali animali.”

L'articolo 19 (integrato dal Reg Del UE 2023/647) elenca alcune deroghe alle prescrizioni in materia di sanità animale per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini e gli equini donatori spostati tra centri di raccolta dello sperma, in quanto il rischio di trasmissione di malattie è per definizione abbassato.

All'articolo 20 vengono date **ulteriori disposizioni in materia di sanità animale per i bovini donatori** da cui sono stati raccolti sperma, ovociti ed embrioni. Viene indicato come il veterinario del centro di raccolta di materiale seminale o del gruppo di raccolta embrioni, deve provvedere affinché i bovini donatori soddisfino le seguenti prescrizioni: “nel caso di animali donatori di sperma, prima della loro ammissione in un impianto di quarantena provenivano da uno stabilimento indenne dalle malattie indicate in appresso e, in precedenza, non sono mai stati detenuti in uno stabilimento di stato sanitario inferiore: infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*); infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*; leucosi bovina enzootica; rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva; sono conformi alle ulteriori prescrizioni in materia di sanità animale di cui all'allegato II, parte 1 e parte 5, capitoli I, II e III”. In deroga a quanto detto, il veterinario del centro può accettare un animale proveniente da uno stabilimento non indenne da leucosi bovina enzootica. Tale animale, nel caso in cui abbia un'età inferiore a 2 anni, deve essere nato da una madre che, successivamente all'allontanamento del vitello, è stata sottoposta a una prova sierologica per la ricerca

della leucosi bovina con esito negativo. Nel caso in cui abbia raggiunto l'età di due anni, la prova sierologica effettuata per la ricerca della leucosi bovina enzootica deve avere esito negativo. Oppure può accettare una donatrice di ovociti o embrioni se di età inferiore a 2 anni e proveniente da uno stabilimento non indenne da leucosi bovina enzootica, purché il veterinario ufficiale responsabile dello stabilimento di origine abbia certificato che non si siano verificati casi clinici di leucosi bovina enzootica per un periodo almeno pari ai 3 anni precedenti. In deroga all'indennità per la rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva, l'animale deve essere stato sottoposto alla prova sierologica (virus intero) effettuata su un campione di sangue con esito negativo, oppure il veterinario del gruppo, per quanto riguarda gli animali donatori di ovociti ed embrioni, può accettare un animale donatore proveniente da uno stabilimento non indenne purché il veterinario ufficiale responsabile dello stabilimento di origine abbia certificato che non si sono verificati casi clinici per un periodo almeno pari ai 12 mesi precedenti.

L'articolo 21 dà **ulteriori disposizioni in materia di sanità animale per i suini donatori** da cui sono stati raccolti sperma, ovociti ed embrioni. Viene indicato come il veterinario del centro di raccolta di materiale seminale o del gruppo di raccolta embrioni, deve provvedere affinché i suini donatori soddisfino le seguenti prescrizioni: "Nel caso di animali donatori di sperma, prima della loro ammissione in un impianto di quarantena provenivano da uno stabilimento in cui, per un periodo almeno pari ai 12 mesi precedenti, non sono state constatate evidenze cliniche, sierologiche, virologiche o patologiche di infezione da virus della malattia di Aujeszky; sono conformi alle ulteriori prescrizioni in materia di sanità animale di cui all'allegato II, parte 2 e parte 5, capitoli I e IV. Il veterinario del centro provvede affinché i suini donatori di sperma soddisfino le seguenti prescrizioni: prima della loro ammissione in un impianto di quarantena provenivano da uno stabilimento che era indenne da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, conformemente alle prescrizioni di cui all'allegato II, parte 5, capitolo IV; erano detenuti presso un impianto di quarantena che, il giorno dell'ammissione, era indenne da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* da un periodo almeno pari ai 3 mesi precedenti; sono detenuti in un centro di raccolta dello sperma in cui non sono state

segnalate evidenze cliniche, sierologiche, virologiche o patologiche di infezione da virus della malattia di Aujeszky per un periodo pari almeno ai 30 giorni precedenti la data di ammissione e almeno ai 30 giorni immediatamente precedenti la data della raccolta; non sono stati vaccinati contro l'infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini e sono stati detenuti, sin dalla nascita o per un periodo almeno pari ai tre mesi precedenti la data di ingresso nell'impianto di quarantena, in uno stabilimento in cui, durante tale periodo, nessun animale è stato vaccinato contro l'infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini e non sono stati constatati casi di infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini". L'articolo 21 non prevede deroghe.

All'articolo 22 vengono date **ulteriori disposizioni in materia di sanità animale per gli ovini donatori** da cui sono stati raccolti sperma, ovociti ed embrioni. Viene indicato come il veterinario del centro di raccolta di materiale seminale o del gruppo di raccolta embrioni deve provvedere affinché gli ovini donatori soddisfino le seguenti prescrizioni: "In caso di animali donatori di sperma, prima della loro ammissione in un impianto di quarantena non provenivano da uno stabilimento né sono stati a contatto con animali provenienti da uno stabilimento soggetto a restrizioni dei movimenti per quanto riguarda l'infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*. Le restrizioni dei movimenti riguardanti lo stabilimento sono revocate dopo un periodo almeno pari a 42 giorni dalla data di macellazione o abbattimento e di smaltimento dell'ultimo animale infetto o sensibile a tale malattia; nel caso di animali donatori di sperma, prima della loro ammissione in un impianto di quarantena provenivano da uno stabilimento indenne da infezione da *Brucella* e, in precedenza, non sono mai stati detenuti in uno stabilimento di stato sanitario inferiore; sono conformi alle ulteriori prescrizioni in materia di sanità animale di cui all'allegato II, parte 3 e parte 5, capitoli I, II e III". L'articolo 22 non prevede deroghe.

L'articolo 23 elenca **ulteriori disposizioni in materia di sanità animale per gli equidi donatori** da cui sono stati raccolti sperma, ovociti ed embrioni. Viene indicato come il veterinario del centro di raccolta di materiale seminale o del gruppo di raccolta embrioni deve provvedere affinché gli equidi donatori soddisfino le seguenti

prescrizioni: che questi “provengono da uno stabilimento in cui la surra (*Trypanosoma evansi*) non è stata segnalata nei 30 giorni precedenti, o in cui la surra è stata segnalata nei due anni precedenti e dopo l’ultimo focolaio lo stabilimento interessato è rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché gli animali infetti non sono stati allontanati dallo stabilimento, e gli animali rimanenti nello stabilimento non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca della surra, effettuata avvalendosi di uno dei metodi diagnostici di cui all’allegato I, parte 3, del Reg Del UE 2020/688, su campioni prelevati almeno sei mesi dopo che l’ultimo animale infetto è stato allontanato dallo stabilimento”; che “provengono da un’azienda dove la durina (*Trypanosoma equiperdum*) non è stata segnalata nei sei mesi precedenti, o in cui la durina è stata segnalata nei due anni precedenti e dopo l’ultimo focolaio lo stabilimento interessato è rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché gli animali infetti non sono stati abbattuti e distrutti o macellati, o gli equini maschi infetti interi non sono stati sottoposti a castrazione, e gli equini rimanenti nello stabilimento, ad eccezione degli equini maschi castrati di cui sopra tenuti separati dalle femmine, non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca della durina, effettuata avvalendosi di uno dei metodi diagnostici di cui all’allegato I, parte 8, del Reg Del UE 2020/688, su campioni prelevati almeno sei mesi dopo il completamento delle misure di cui al primo trattino”; che questi provengono da un allevamento “in cui l’anemia infettiva equina non è stata segnalata nei 90 giorni precedenti, o in cui l’anemia infettiva equina è stata segnalata nei 12 mesi precedenti e dopo l’ultimo focolaio lo stabilimento interessato è rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché gli animali infetti non sono stati abbattuti e distrutti o macellati, e gli equini rimanenti nello stabilimento non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell’anemia infettiva equina, effettuata avvalendosi di uno dei metodi diagnostici di cui all’allegato I, parte 9, del Reg Del UE 2020/688, su campioni prelevati in due occasioni a un intervallo di almeno tre mesi dopo il completamento delle misure di cui al primo trattino e la pulizia e la disinfezione dello stabilimento”. E inoltre, “in caso di donatori di sperma, sono stati tenuti per un periodo pari ai 30 giorni precedenti la data di raccolta dello sperma in stabilimenti in cui, in tale periodo, nessun equino ha mostrato segni clinici di infezione da virus dell’arterite equina o da metrite contagiosa equina; sono conformi alle

ulteriori prescrizioni in materia di sanità animale di cui all'allegato II, parte 4". Le restrizioni dei movimenti sopra citate devono rimanere in vigore per un periodo di almeno 30 giorni a decorrere dal giorno in cui tutti gli animali nello stabilimento appartenenti alle specie equina, per le malattie indicate, sono stati abbattuti e distrutti o macellati, laddove consentito conformemente alla normativa e lo stabilimento è stato pulito e disinfettato.

La sezione 3 (articoli 24 e 25) dà i riferimenti all'autorità competente sulle prove di laboratorio da effettuare, per lo più presenti nell'allegato II del regolamento.

La sezione 4 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per la raccolta, la produzione, la trasformazione e lo stoccaggio di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini e altre procedure relative a detto materiale, rimandando al rispetto dell'allegato III.

La sezione 5 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per il **trasporto di materiale germinale** di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. L'articolo 27 descrive le responsabilità dei veterinari dei centri e dei veterinari dei gruppi per quanto riguarda il trasporto di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Indica le modalità in cui il materiale germinale deve essere spostato all'interno di uno Stato membro, ovvero che "i recipienti utilizzati per il trasporto siano sigillati e numerati prima della loro spedizione dallo stabilimento riconosciuto di materiale germinale"; "il marchio sulle paillette o sugli altri contenitori, apposto conformemente all'articolo 10, corrisponda al numero indicato nel certificato sanitario o nell'autodichiarazione e sul recipiente utilizzato per il trasporto". Tuttavia, il sigillo di cui sopra, apposto sotto la responsabilità del veterinario del centro o del veterinario del gruppo, può essere sostituito dal veterinario ufficiale.

L'articolo 28, invece, descrive le **responsabilità degli operatori riguardo il trasporto** di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Al punto 1 fornisce le informazioni per gli operatori che spostano materiali germinale. Questi possono spostare tale materiale solo se: nel recipiente utilizzato per il trasporto è stato collocato solo un tipo di materiale germinale di una sola specie; il recipiente utilizzato

è stato pulito e disinfettato o sterilizzato prima dell'uso, o è un recipiente monouso; è stato riempito con un agente criogeno non utilizzato in precedenza per altro materiale. Al punto 2, in deroga a quanto detto in precedenza “gli operatori possono collocare in un unico recipiente utilizzato per il trasporto sperma, ovociti ed embrioni della stessa specie, purché le paillette o gli altri contenitori in cui il materiale germinale viene collocato siano sigillati in modo sicuro ed ermetico; i diversi tipi di materiale germinale siano separati gli uni dagli altri mediante compartimenti fisici o siano collocati in sacchetti protettivi secondari”. Infine, viene concessa la deroga solo per ovini e caprini, il cui materiale germinale può viaggiare in un solo recipiente.

All'articolo 29 vengono date ulteriori disposizioni riguardo le movimentazioni, nei paesi dell'UE, di materiale seminale di bovini, suini, ovini e caprini. In particolare, se all'interno del contenitore è trasportato seme proveniente da più riproduttori, chi spedisce (operatori) deve provvedere affinché questo sia stato raccolto e spedito dallo stesso centro o, nel caso delle deroghe di cui agli articoli 13 e 14, da un unico stabilimento in cui è stato raccolto. Inoltre, gli operatori devono avere delle procedure scritte e standard relativi alla trasformazione del seme, al fine di garantirne la tracciabilità conformemente agli articoli 10 e 19.

L'articolo 30 indica le norme riguardo la **certificazione sanitaria** necessaria per accompagnare il materiale germinale durante i suoi spostamenti tra Stati membri. Il veterinario ufficiale, dopo aver fatto le opportune verifiche sul recipiente utilizzato per il trasporto, ovvero verificare che sia conforme alle prescrizioni all'articolo 28, controlla che sia presente il sigillo apposto dal veterinario del centro o del gruppo di raccolta, o, se è necessario, controlla il materiale all'interno del contenitore, per poi apporre lui stesso un sigillo. Controlla che la documentazione fornita dal veterinario del centro sia conforme alla normativa vigente, che le paillettes o i contenitori siano identificati correttamente e che queste corrispondano a quelle elencate nel documento di accompagnamento. Infine, dopo aver effettuato i controlli, rilascia un certificato sanitario 72 ore prima della spedizione della partita di materiale germinale, che avrà validità di 10 giorni dalla data di rilascio.

L'articolo 31 riguarda le informazioni che devono figurare nel certificato sanitario per il materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini spostato tra Stati membri, rimandando all'applicazione dell'allegato IV.

L'articolo 32 dà le indicazioni relative alla documentazione necessaria qualora il materiale germinale sia trasformato in uno **stabilimento di trasformazione** diverso da quello di produzione. L'operatore deve provvedere ad accompagnare la partita di materiale germinale con un'autodichiarazione. Questa deve contenere almeno le seguenti informazioni: "Il nome e l'indirizzo dello stabilimento riconosciuto di materiale germinale che raccoglie o produce tale materiale germinale; il nome e l'indirizzo dello stabilimento di trasformazione di materiale germinale nel quale il materiale germinale è spostato ai fini della trasformazione; le date del movimento della partita di materiale germinale verso uno stabilimento di trasformazione di materiale germinale e a partire dallo stesso; il tipo e la quantità di materiale germinale; la marcatura del materiale germinale, come prescritto dall'articolo 10".

All'articolo 33, 34 e 35 è definito l'obbligo di notificare in anticipo all'autorità competente art. 34 le movimentazioni di materiale germinale, allegando la documentazione citata negli artt. 31 e 32.

Il capo 3 si occupa delle prescrizioni in materia di sanità animale, certificazione sanitaria e notifica per il materiale germinale di **animali diversi** da bovini, suini, ovini, caprini ed equini. L'articolo 36 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per i movimenti verso altri Stati membri di materiale germinale di cani e gatti. "Gli operatori spostano in altri Stati membri solo lo sperma, gli ovociti e gli embrioni raccolti da cani (*Canis lupus familiaris*) e gatti (*Felis silvestris catus*) che: sono nati e sono rimasti sin dalla nascita nell'Unione o sono entrati nell'Unione conformemente alle prescrizioni per l'ingresso nell'Unione; provengono da uno stabilimento in cui non è stata confermata l'infezione da virus della rabbia per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la data di raccolta dello sperma, degli ovociti o degli embrioni; il giorno della raccolta dello sperma, degli ovociti o degli embrioni non presentavano sintomi di malattie; sono marcati mediante l'impianto di un *trasponder* o l'applicazione di un tatuaggio chiaramente leggibile conformemente all'articolo 17,

34

paragrafo 1, della norma vigente (Reg UE 2013/576) del Parlamento europeo e del Consiglio (17), o sono identificati conformemente all'articolo 70 del Reg Del UE 2019/2035; sono stati sottoposti a vaccinazione antirabbica conforme ai requisiti di validità di cui all'allegato VII, parte 1, del Reg Del UE 2020/688; sono conformi alle misure sanitarie preventive per malattie o infezioni diverse dalla rabbia di cui all'allegato VII, parte 2, del Reg Del UE 2020/688; non sono stati utilizzati per la riproduzione naturale per un periodo pari almeno ai 30 giorni precedenti la data di raccolta dello sperma, degli ovociti o degli embrioni e durante il periodo di raccolta". Questo articolo in pratica impone il controllo della rabbia e dell'echinococcosi nei movimenti di germoplasma di cani e gatti nell'Unione. Se pur condivisibile, questa norma ha causato una certa ribellione delle associazioni scientifiche europee anche perché alcuni paesi extraeuropei non accettano germoplasma di animali vaccinati per la rabbia e perché il rischio di queste due malattie è veramente minimo in allevamenti domestici di razza pura, tipicamente quelli da cui si preleva germoplasma (Pugliese et al., 2020). Recentemente questo articolo è stato soppresso dal Reg Del UE 2023/647.

L'articolo 37 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per i movimenti verso altri Stati membri tra stabilimenti confinati di materiale germinale di animali terrestri detenuti diversi da bovini, suini, ovini, caprini ed equini.

L'articolo 38 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per i movimenti verso altri Stati membri di materiale germinale di animali delle famiglie **Camelidae** e **Cervidae**. Questa è un'altra novità del Regolamento in quanto si riconosce che queste specie, se pur minori, per quanto riguarda volumi di materiale germinale spostato, possano rappresentare un rischio di diffusioni di malattie non presenti o emergenti per gli animali domestici classici presenti nell'Unione (Zema et al., 2020).

All'articolo 39 sono espresse le norme relative alla certificazione sanitaria, in merito agli spostamenti tra Stati membri di materiale germinale di cani e gatti e altri animali diversi da bovini, suini, ovini, caprini, equini, che inizialmente non differivano da quelle citate in precedenza all'articolo 30. Successivamente, il Reg Del UE 2023/647 ha eliminato il paragrafo sui cani e i gatti.

All'articolo 40 sono elencate le prescrizioni relative ai certificati sanitari che devono accompagnare il materiale germinale di cani e gatti o di animali della famiglia *Camelidae* o *Cervidae* contengono almeno le informazioni di cui all'allegato IV, punto 2. Successivamente, anche qui il Reg Del UE 2023/647 ha eliminato il riferimento ai cani e i gatti.

Gli articoli 41, 42 e 43 prescrivono **l'obbligo di notifica** degli spostamenti, tuttavia all'articolo 41 con il Reg Del UE 2023/647 sono stati eliminati i riferimenti ai cani e i gatti.

Il capo 4 si occupa della concessione di deroghe da parte delle autorità competenti per il materiale germinale. L'articolo 44 fornisce ulteriori norme per la concessione di deroghe da parte delle autorità competenti per il **materiale germinale destinato a fini scientifici**. “Le autorità competenti degli Stati membri di origine possono concedere deroghe per i movimenti verso un altro Stato membro di materiale germinale destinato a fini scientifici che non è conforme alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui al capo 1 o 3, purché l'operatore dello stabilimento di spedizione abbia ottenuto per iscritto il consenso preliminare dell'autorità competente dello Stato membro di destinazione ad accettare la partita di materiale germinale”. Al punto due stabilisce che “L'autorità competente dello Stato membro di destinazione accetta la partita di materiale germinale di cui al paragrafo 1 solo se l'operatore dello stabilimento di destinazione che riceve tale materiale germinale provvede affinché il materiale germinale sia utilizzato unicamente a fini scientifici, in condizioni tali da prevenire la diffusione di malattie di categoria D”.

All'articolo 45 sono fornite le norme per la concessione di deroghe da parte delle autorità competenti riguardo il materiale germinale spostato in **banche genetiche** di due Stati membri. Al punto 1 viene riportato che l'autorità competente può concedere delle deroghe purché l'operatore abbia ottenuto per iscritto un consenso preliminare da parte dello Stato di destinazione. Il materiale germinale spostato può provenire da: “razze a rischio di estinzione non conformi alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui al capo 1; o animali terrestri diversi da bovini, suini, ovini, caprini ed equini, detenuti in stabilimenti confinati, non conformi alle prescrizioni in materia di

36

sanità animale di cui all'articolo 37". Al punto secondo, invece, definisce le condizioni affinché l'autorità competente nello stabilimento di destinazione accetti le partite di materiale germinale. Queste sono: "l'operatore della banca genetica destinataria del materiale germinale provveda affinché il materiale germinale sia utilizzato unicamente per la conservazione *ex situ* e l'uso sostenibile delle risorse genetiche di animali terrestri detenuti per le quali è stata costituita la banca genetica destinataria; disponga di informazioni sufficienti, comprese le informazioni fornite dall'autorità competente dello Stato membro di origine o i risultati delle prove, o effettui un trattamento del materiale germinale in modo da prevenire la diffusione dell'afta epizootica, dell'infezione da virus della peste bovina e di altre malattie elencate".

L'articolo 46 indica le norme relative all'**autodichiarazione** per il materiale germinale destinato a fini scientifici o a essere spostato in banche genetiche in un altro Stato membro e informazioni che devono figurare in tale documento. Al punto 1 viene riportato quanto segue: "Se il materiale germinale destinato a fini scientifici o allo stoccaggio in banche genetiche deve essere spostato in un altro Stato membro, l'operatore dello stabilimento di spedizione provvede affinché un'autodichiarazione accompagni tale materiale germinale durante il trasporto verso il luogo di destinazione". Al punto 2 riporta quanto segue: "L'operatore dello stabilimento di spedizione provvede affinché l'autodichiarazione di cui al punto 1 contenga almeno le seguenti informazioni: il nome e l'indirizzo dello speditore e del destinatario; il nome e l'indirizzo del luogo di spedizione e del luogo di destinazione; se il materiale germinale è stato spostato in uno stabilimento di trasformazione di materiale germinale o a partire dallo stesso, le date di tali movimenti; il tipo di materiale germinale e le specie di animali donatori; il numero di paillettes o degli altri contenitori che costituiscono la partita da spedire; le seguenti informazioni che consentono di identificare il materiale germinale: la marcatura apposta sulle paillette o sugli altri contenitori; il luogo e la data della loro raccolta o produzione; i risultati disponibili delle prove di cui all'articolo 45, paragrafo 2, lettera b)".

Secondo l'articolo 47 gli operatori che spostano materiale germinale in banche genetiche o a fini scientifici hanno l'**obbligo di notificare** in anticipo tale movimentazione fornendo le informazioni citate al punto 2 dell'articolo 46.

L'allegato I, alla parte I, fornisce le prescrizioni per i **centri di raccolta dello sperma** di cui all'articolo 4. Il veterinario del centro provvede affinché nel centro di raccolta dello sperma siano detenuti solamente animali che nei 30 giorni antecedenti alla raccolta e durante il periodo della raccolta stessa non siano stati utilizzati per la riproduzione naturale. Nel centro di raccolta dello sperma deve essere conservata la documentazione conforme alle prescrizioni di cui all'articolo 8. Inoltre, il veterinario responsabile si provvede affinché sia impedito (efficacemente secondo il Reg Del UE 2023/647) l'accesso di persone non autorizzate e i visitatori autorizzati rispettino le prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza, ovvero "Il veterinario del centro deve inoltre stabilire le prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza per il funzionamento del centro di raccolta dello sperma e misure atte a garantire la conformità a tali prescrizioni; deve ammettere nel centro di raccolta dello sperma solo animali di specie il cui sperma deve essere raccolto. In deroga a quanto detto, il veterinario del centro può autorizzare l'ammissione nel centro di raccolta dello sperma di animali detenuti diversi da bovini, suini, ovini, caprini o equini, purché essi non comportino alcun rischio di infezione per le specie il cui sperma deve essere raccolto e siano conformi alle prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza". Il veterinario del centro di raccolta si deve assicurare che ogni singola dose di seme sia identificata conformemente alle prescrizioni di cui all'articolo 10. La raccolta, la trasformazione e lo stoccaggio dello sperma devono aver luogo soltanto nei locali destinati a tale scopo e in condizioni igieniche rigorose. Il seme manipolato (trasformato o immagazzinato) in un centro di raccolta deve provenire a sua volta da un centro di raccolta, non deve venire a contatto con materiale germinale di stato sanitario inferiore e la strumentazione utilizzata per la raccolta e la manipolazione deve essere pulita e disinfettata prima dell'uso, a meno che non sia monouso. Nel caso in cui il centro di produzione seme per equini è situato entro il perimetro di uno stabilimento registrato che ospita anche un centro di inseminazione artificiale o una stazione per la monta naturale, deve esserci una rigorosa separazione tra gli strumenti

e le attrezzature che vengono a contatto con gli animali donatori, il loro sperma e gli altri animali detenuti nel centro di raccolta dello sperma e lo sperma, gli strumenti e le attrezzature utilizzati per l'inseminazione artificiale o la monta naturale. Inoltre, qualsiasi prodotto biologico di origine animale utilizzato per la trasformazione dello sperma, compresi i diluenti, gli additivi o i riempitivi, deve provenire da fonti che non comportano alcun rischio per la sanità animale o che sono trattate prima dell'uso in modo da prevenire tale rischio. I recipienti utilizzati per lo stoccaggio e quelli utilizzati per il trasporto devono essere puliti e disinfettati o sterilizzati, ad eccezione dei recipienti monouso nuovi. Infine, il veterinario del centro di raccolta si deve assicurare che il personale dipendente del centro di raccolta dello sperma abbia ricevuto una formazione adeguata sulle tecniche igieniche e di disinfezione volte a prevenire la diffusione delle malattie. In deroga al paragrafo precedente "il veterinario del centro può consentire che lo sperma non raccolto in un centro di raccolta dello sperma sia trasformato nel centro di raccolta dello sperma, purché siano soddisfatte le seguenti condizioni, ovvero che tale sperma è raccolto da animali che soddisfano le seguenti prescrizioni di cui all'allegato II: per quanto riguarda i bovini, le prescrizioni di cui alla parte 1, capitolo I, punto 1, lettera b), e, a seconda dei casi, alla parte 5, capitoli I, II e III; per quanto riguarda i suini, le prescrizioni di cui alla parte 2, capitolo I, punto 1, lettera b), e, a seconda dei casi, alla parte 5, capitoli I e IV; per quanto riguarda gli ovini e i caprini, le prescrizioni di cui alla parte 3, capitolo I, punto 1, lettera c), e, a seconda dei casi, alla parte 5, capitoli I, II e III; per quanto riguarda gli equini, le prescrizioni di cui alla parte 4, capitolo I, punto 1, lettera a). La trasformazione è effettuata con attrezzature distinte o in un momento diverso da quello in cui è trasformato lo sperma destinato a essere spostato in un altro Stato membro. In quest'ultimo caso le attrezzature devono essere pulite e sterilizzate dopo l'uso. Tale sperma non è spostato in un altro Stato membro e non viene a contatto né è immagazzinato in alcun momento con sperma destinato a essere spostato in un altro Stato membro. Tale sperma è identificabile grazie a una marcatura che deve essere diversa da quella di cui", al paragrafo precedente. Il punto e) viene modificato dal Reg Del UE 2023/647 come segue: "il veterinario del centro di un centro di raccolta dello sperma di equini situato entro il perimetro di uno stabilimento registrato che ospita anche un centro di inseminazione artificiale o una stazione per la monta naturale deve

provvedere affinché gli equini che entrano nello stabilimento soddisfino le prescrizioni di cui all'articolo 23, paragrafo 1, lettera a), e può disporre che, qualora non sia possibile escludere il contatto diretto di equini maschi donatori con equini femmine, equini maschi castrati di prova o equini maschi non castrati utilizzati nello stabilimento al di fuori del centro di raccolta dello sperma per la monta naturale, tali equini femmine ed equini maschi debbano soddisfare tutte le prescrizioni di cui all'articolo 23, paragrafo 1.” Il Regolamento riprende con il punto 2, riguardante le strutture, le attrezzature e le procedure operative per quanto riguarda la raccolta, la trasformazione, lo stoccaggio e il trasporto di sperma di bovini, suini, ovini, caprini o equini, le prescrizioni sono: “Il centro di raccolta dello sperma deve disporre almeno di locali di stabulazione degli animali provvisti di dispositivi di chiusura e, se richiesto, di una zona di esercizio per gli equini fisicamente separata dalle strutture di raccolta dello sperma e dai locali adibiti alla trasformazione e allo stoccaggio; strutture per l'isolamento degli animali risultati positivi alle prove di cui all'allegato II del presente regolamento o che presentano sintomi o segni di malattie di categoria D pertinenti per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini o gli equini, che non abbiano alcun collegamento diretto con i locali di stabulazione ordinaria di cui al punto i); strutture di raccolta dello sperma, che possono essere all'aperto purché siano protette da condizioni meteorologiche avverse, con pavimenti antiscivolo all'interno della zona di raccolta dello sperma e attorno ad essa; un locale separato per la pulizia e la disinfezione o la sterilizzazione delle attrezzature; un locale per la trasformazione dello sperma, separato dalle strutture di raccolta dello sperma e dal locale per la pulizia delle attrezzature di cui al punto iv), non situato necessariamente nello stesso luogo; un locale di stoccaggio dello sperma, non situato necessariamente nello stesso luogo. Tale locale di stoccaggio deve disporre delle attrezzature necessarie per immagazzinare il materiale germinale ed essere costruito in modo da proteggere tale materiale germinale e le attrezzature da condizioni meteorologiche e ambientali avverse”. “Il centro di raccolta dello sperma deve essere costruito o isolato in modo da prevenire il contatto con il bestiame che si trova all'esterno; essere costruito in modo da poter essere pulito e disinfettato facilmente, ad eccezione dei locali amministrativi e, nel caso di equini, della zona di esercizio; deve essere costruito in modo da impedire efficacemente l'accesso di persone non autorizzate”.

La parte 2 dell'allegato I fornisce le prescrizioni per il riconoscimento del **gruppo di raccolta embrioni**, sempre per bovini, suini, ovini, caprini ed equini. "Il veterinario del gruppo è responsabile di tutte le operazioni del gruppo di raccolta di embrioni, comprendenti tra l'altro: la verifica dell'identità e dello stato sanitario degli animali donatori; l'esame clinico degli animali donatori e gli interventi chirurgici sugli stessi; le procedure di disinfezione e igiene, comprese le procedure atte a garantire che il trasporto degli embrioni al laboratorio sia effettuato in modo igienico e sicuro; la conservazione della documentazione, conformemente alle prescrizioni di cui all'articolo 8, paragrafo 1), lettera b); la marcatura delle paillette e degli altri contenitori nei quali sono collocati gli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) gli embrioni, conformemente alle prescrizioni di cui all'articolo 10; la formazione dei membri del gruppo di raccolta di embrioni sulle tecniche igieniche e di disinfezione volte a prevenire la diffusione delle malattie". Inoltre, "il veterinario del gruppo deve stabilire le prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza per il funzionamento del gruppo di raccolta di embrioni e misure atte a garantire la conformità a tali prescrizioni, tra cui prove su campioni nell'ambito di un sistema di controllo della qualità". Le strutture, le attrezzature e le procedure operative del gruppo di raccolta di embrioni devono essere conformi alle prescrizioni seguenti: "il gruppo di raccolta di embrioni deve disporre di un laboratorio in cui gli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) gli embrioni possano essere esaminati, trasformati e imballati con attrezzature adeguate; tale laboratorio deve essere un laboratorio con sede stabile, che deve disporre di quanto segue: un locale in cui gli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) gli embrioni possano essere trasformati, fisicamente separato dall'area utilizzata per manipolare gli animali donatori durante la raccolta; un locale o un'area per la pulizia e la sterilizzazione degli strumenti utilizzati per la raccolta e la trasformazione degli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) degli embrioni, salvo qualora si ricorra unicamente a strumenti monouso nuovi, un locale per immagazzinare gli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) gli embrioni". Oppure deve disporre di "un laboratorio mobile, che deve avere una parte del veicolo appositamente attrezzata, costituita da due reparti distinti. Un reparto «pulito» per l'esame e la trasformazione degli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) degli embrioni e un altro reparto per

sistemare le attrezzature ed i materiali che sono stati a contatto con gli animali donatori; utilizzare unicamente strumenti monouso nuovi, salvo qualora la sterilizzazione degli strumenti e la fornitura dei liquidi e di altri prodotti necessari per la raccolta e la trasformazione degli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) degli embrioni siano effettuate in un laboratorio con sede stabile”. I laboratori devono essere tali da impedire contaminazioni crociate. Infine, il gruppo di raccolta deve disporre di locali di stoccaggio che comprendano almeno un locale che possa essere chiuso a chiave per lo stoccaggio degli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) degli embrioni, possano essere facilmente puliti e disinfettati, dispongano di registri con le movimentazioni in entrata e uscita degli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) degli embrioni; dispongano di recipienti utilizzati per lo stoccaggio degli ovociti o (ovociti aggiunti dal Reg Del UE 2023/647) o degli embrioni concepiti *in vivo*.

Nella parte 3 dell'allegato I vengono date le prescrizioni per il **riconoscimento del gruppo di produzione embrioni** di cui all'articolo 4. Il veterinario del gruppo, oltre alle responsabilità previste per il gruppo raccolta embrioni, “deve assicurarsi che i membri del gruppo abbiano ricevuto una formazione adeguata sul controllo delle malattie e sulle tecniche di laboratorio, in particolare sulle procedure di lavoro in condizioni sterili”. Oltre alle prescrizioni per le attrezzature del gruppo raccolta embrioni, il gruppo deve disporre di un “laboratorio con sede stabile dotato di attrezzature e strutture adeguate, comprendenti aree o locali separati per il prelievo degli ovociti delle ovaie, la trasformazione degli ovociti e degli embrioni, lo stoccaggio degli embrioni e dello sperma. Il laboratorio deve essere dotato di un impianto a flusso laminare o di altro tipo adeguato, in cui si eseguono tutte le operazioni tecniche che richiedono condizioni sterili particolari (segnatamente la trasformazione di ovociti, embrioni e sperma). La centrifugazione dello sperma può tuttavia aver luogo al di fuori dell'impianto a flusso laminare o di altro tipo, purché sia stata adottata ogni precauzione igienica; se gli ovociti e gli altri tessuti devono essere raccolti in un macello, il gruppo di produzione di embrioni deve disporre di adeguate attrezzature per effettuare in modo igienico e sicuro la raccolta delle ovaie e degli altri tessuti e il loro trasporto al laboratorio di trasformazione. Il gruppo di

raccolta di embrioni può esternalizzare la raccolta degli ovociti a un gruppo di professionisti specializzati, purché le attività di quest'ultimo figurino nel riconoscimento del gruppo di produzione di embrioni rilasciato dall'autorità competente e le responsabilità del veterinario del gruppo" siano estese a tali attività; "il gruppo di produzione di embrioni deve utilizzare sperma conforme alle prescrizioni di cui al presente regolamento e immagazzinato per il funzionamento del gruppo di produzione di embrioni in recipienti separati nei locali", per lo stoccaggio degli embrioni prodotti, come descritti per il gruppo raccolta.

La parte 4 dell'allegato I riporta le prescrizioni per il riconoscimento di uno **stabilimento di trasformazione** di materiale germinale di cui all'articolo 4.

La parte 5 dell'allegato riporta le prescrizioni per il riconoscimento di un **centro di stoccaggio di materiale germinale** di cui all'articolo 4. Al paragrafo 1 vengono elencate le responsabilità del veterinario del centro di cui all'articolo 4, paragrafo 1, lettera a), punto i). Alla lettera a vengono indicati i provvedimenti che questo deve prendere: "il veterinario del centro deve provvedere affinché: i) nel centro di stoccaggio di materiale germinale sia conservata una documentazione conforme alle prescrizioni di cui all'articolo 8, paragrafo 1, lettera c); ii) sia efficacemente impedito l'accesso di persone non autorizzate; iii) i visitatori autorizzati rispettino le prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza di cui alla lettera b), punto i); iv) ogni singola dose di sperma, ovociti o embrioni rechi una marcatura chiara, conformemente alle prescrizioni di cui all'articolo 10; v) lo stoccaggio di materiale germinale abbia luogo soltanto nei locali destinati a tale scopo e in condizioni igieniche rigorose; vi) tutti gli strumenti che vengono a contatto con il materiale germinale siano puliti e disinfettati o sterilizzati prima dell'uso, ad eccezione degli strumenti monouso nuovi; vii) prima dell'inizio di ogni operazione di riempimento, i recipienti utilizzati per lo stoccaggio e quelli utilizzati per il trasporto siano puliti e disinfettati o sterilizzati, ad eccezione dei contenitori monouso nuovi; viii) gli agenti criogeni utilizzati per conservare o immagazzinare il materiale germinale non siano stati impiegati in precedenza per altri prodotti; ix) il personale dipendente del centro di stoccaggio di materiale germinale abbia ricevuto una formazione adeguata sulle

tecniche igieniche e di disinfezione volte a prevenire la diffusione delle malattie”. Alla lettera b vengono elencati alcuni obblighi del veterinario del centro, questi sono: “i) dover stabilire le prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza per il funzionamento del centro di stoccaggio di materiale germinale e misure atte a garantire la conformità a tali prescrizioni; ii) dover ammettere in un centro di stoccaggio di materiale germinale solo sperma, ovociti o embrioni raccolti, prodotti, trasformati e immagazzinati in uno stabilimento riconosciuto di materiale germinale e trasportati in condizioni tali da prevenire la contaminazione crociata dello sperma, degli ovociti o degli embrioni poiché è stato evitato il contatto con materiale germinale non conforme alle norme stabilite dal presente regolamento”. Al paragrafo 2 vengono fornite le prescrizioni per le strutture, le attrezzature e le procedure operative di un centro di stoccaggio di materiale germinale di cui all’articolo 4, paragrafo 1, lettera b), punto v). Queste sono le seguenti: “a) il centro di stoccaggio di materiale germinale deve disporre di un locale di stoccaggio dotato delle attrezzature necessarie per immagazzinare il materiale germinale e deve essere costruito in modo da proteggere tale materiale germinale e le attrezzature da condizioni meteorologiche e ambientali avverse; b) se lo stoccaggio non è limitato al materiale germinale di un solo tipo o di un’unica specie: i) il centro di stoccaggio di materiale germinale deve disporre di recipienti distinti per lo stoccaggio del materiale germinale di ciascun tipo e di ciascuna specie immagazzinato presso il centro, e ii) la manipolazione del materiale germinale di tipi e specie differenti immagazzinato deve essere effettuata da personale distinto o avvenire in momenti diversi; c) il centro di stoccaggio di materiale germinale deve essere costruito in modo da poter essere pulito e disinfettato facilmente, ad eccezione dei locali amministrativi; d) soppresso dal Reg Del UE 2023/647; e) il centro di stoccaggio di materiale germinale deve essere costruito in modo da impedire efficacemente l’accesso di persone non autorizzate”.

L’allegato II fornisce ulteriori prescrizioni in materia di **sanità animale** per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini e gli equini da cui è raccolto il materiale germinale nonché in materia di quarantena e di prove di laboratorio o di altro tipo effettuate su tali animali, secondo quanto previsto negli articoli 15 fino al 23. La parte 1 si occupa dei **bovini**. Al capitolo I vengono date le prescrizioni per i bovini da cui è raccolto lo

sperma. Tutti i bovini ammessi in un centro di **raccolta dello sperma** devono soddisfare le seguenti prescrizioni: gli animali devono essere stati sottoposti a quarantena in impianti di quarantena in cui erano presenti solo altri artiodattili di stato sanitario almeno equivalente; nei 30 giorni precedenti l'inizio della quarantena, gli animali devono essere stati sottoposti, con esito negativo in ciascun caso, alle seguenti prove, ad eccezione del test per la ricerca degli anticorpi per la diarrea virale bovina: per quanto riguarda l'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*), un'intradermotuberculinizzazione di cui all'allegato I, parte 2, punto 1, del Reg Del UE 2020/688; per quanto riguarda l'infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, una prova sierologica di cui all'allegato I, parte 1, punto 1, del Reg Del UE 2020/688; per quanto riguarda la leucosi bovina enzootica, una prova sierologica di cui all'allegato I, parte 4, lettera a), del Reg Del UE 2020/688; “per quanto riguarda la rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva, una prova sierologica (virus intero) effettuata su un campione di sangue se gli animali non provengono da uno stabilimento indenne da rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva; per quanto riguarda la diarrea virale bovina: una prova di isolamento del virus, una prova per la ricerca del genoma virale o una prova per la ricerca dell'antigene del virus, e una prova sierologica per determinare la presenza o l'assenza di anticorpi.” Durante la quarantena e per un periodo almeno pari a 21 giorni, o a 7 giorni nel caso delle prove per rinotracheite infettiva o diarrea virale bovina, dopo essere stati ammessi nell'impianto di quarantena, gli animali devono essere stati sottoposti nuovamente, con esito negativo in ciascun caso, alle prove per la *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*; per la rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva, anche se provengono da allevamento indenne; per la diarrea virale bovina. “Gli animali sieronegativi o sieropositivi possono essere ammessi nel centro di raccolta dello sperma solo se non viene rilevata alcuna sieroconversione negli animali risultati sieronegativi prima dell'ingresso nell'impianto di quarantena. Nel caso di una sieroconversione, tutti gli animali rimasti sieronegativi devono essere tenuti nell'impianto di quarantena per un periodo prolungato finché non si rilevi più alcuna sieroconversione nel gruppo di animali per un periodo pari a 3 settimane. Gli animali risultati positivi alle prove sierologiche possono essere ammessi nel centro di raccolta dello sperma”. Sempre

dopo 21 giorni, gli animali devono essere testati per quanto riguarda la campilobatteriosi genitale bovina (*Campylobacter fetus* spp *venerealis*): “nel caso di animali di età inferiore a 6 mesi o detenuti a partire da tale età in un gruppo dello stesso sesso, senza venire a contatto con le femmine prima della quarantena, attraverso un’unica prova effettuata su un campione di liquido di lavaggio di materiale prepuziale, o prove effettuate su campioni di liquido di lavaggio di materiale prepuziale prelevati in 3 occasioni, ad intervalli di almeno 7 giorni”. Per quanto riguarda la tricomoniiasi (*Trichomonas foetus*): “nel caso di animali di età inferiore a 6 mesi o detenuti a partire da tale età in un gruppo dello stesso sesso, senza venire a contatto con le femmine prima della quarantena attraverso un’unica prova effettuata su un campione di materiale prepuziale, o prove effettuate su campioni di materiale prepuziale prelevati in 3 occasioni, ad intervalli di almeno 7 giorni. Se una delle prove effettuate durante la quarantena risulta positiva, l’animale in questione deve essere immediatamente allontanato dall’impianto di quarantena. In caso di quarantena di un gruppo di animali, l’autorità competente deve adottare tutte le misure necessarie per permettere che gli animali rimanenti siano ammessi nel centro di raccolta dello sperma conformemente alla parte 1, capitolo I, del presente allegato”. “Prima della spedizione iniziale di sperma di tori risultati positivi alle prove sierologiche per la diarrea virale bovina, un campione di sperma di ciascun animale deve essere sottoposto a una prova di isolamento del virus o a un saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per la ricerca dell’antigene virale della diarrea virale bovina. In caso di risultato positivo, il toro deve essere allontanato dal centro di raccolta dello sperma e tutto il suo sperma deve essere distrutto”. “Tutti i bovini detenuti in un centro di raccolta dello sperma devono essere sottoposti almeno una volta all’anno, con esito negativo, nuovamente alle seguenti prove (prove di *routine* obbligatorie): *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, leucosi bovina enzootica, rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva, diarrea virale bovina, quest’ultima con una prova sierologica per la ricerca di un anticorpo, effettuata solo sugli animali sieronegativi. “Se un animale risulta positivo alle prove sierologiche, ogni eiaculato di tale animale raccolto dopo l’ultima prova con esito negativo deve essere eliminato o risultare negativo a prove effettuate per la ricerca del virus o del genoma virale;” devono essere ancora nuovamente testati per la

campilobatteriosi genitale bovina e la tricomoniassi, con una prova effettuata su un campione di materiale prepuziale; "devono essere sottoposti a prova solo i tori utilizzati per la produzione di sperma o che vengono a contatto con tori utilizzati per la produzione di sperma; i tori che vengono reimpiegati per la raccolta dello sperma dopo un periodo di interruzione di oltre sei mesi devono essere sottoposti a prova nell'arco di un periodo di 30 giorni prima di riprendere la produzione". Nel caso in cui una delle prove di *routine* dovesse essere positiva "l'animale deve essere isolato e il suo sperma raccolto dopo l'ultima prova con esito negativo non può essere spostato in un altro Stato membro, ad eccezione, per quanto riguarda la diarrea virale bovina, dello sperma di ogni eiaculato risultato negativo alla prova per la ricerca del virus della diarrea virale bovina o del genoma virale". L'animale comunque deve essere allontanato dal centro di raccolta dello sperma. "Lo sperma raccolto da tutti gli altri animali nel centro di raccolta dello sperma in seguito al prelievo dell'ultimo campione risultato negativo a una delle prove di *routine* deve essere immagazzinato separatamente e non può essere oggetto di movimenti tra Stati membri finché lo stato sanitario del centro di raccolta dello sperma non sia stato ripristinato e lo sperma immagazzinato non sia stato sottoposto a indagini ufficiali appropriate per escludere la presenza di patogeni che causano le malattie ricercate nelle prove di *routine*".

Il Capitolo II si occupa dei **bovini donatori di embrioni** e stabilisce che "i bovini donatori devono essere stati sottoposti a esame clinico da parte del veterinario del gruppo o di un membro del gruppo e certificati esenti da sintomi o segni di malattie di categoria D pertinenti per gli animali della specie bovina il giorno della raccolta degli embrioni. Lo sperma utilizzato per l'inseminazione artificiale dei bovini donatori deve essere stato raccolto, trasformato e immagazzinato conformemente alle prescrizioni dell'allegato II, parte 1, capitolo I, e dell'allegato III, parte 1".

Al Capitolo III (**produzione di embrioni**) viene stabilito che: "se gli ovociti sono prelevati da singoli bovini vivi per aspirazione da ovaie asportate chirurgicamente («ovariectomia») o per aspirazione transvaginale ad ultrasuoni *ovum pick-up*, agli animali donatori di tali ovociti si applicano le prescrizioni di cui al capitolo II. Nel caso di bovini donatori di ovaie e altri tessuti che devono essere raccolti dopo la

macellazione in un macello, tali animali non devono essere stati destinati alla macellazione nel quadro di un programma di eradicazione approvato né devono provenire da uno stabilimento situato in una zona soggetta a restrizioni istituita in seguito a un focolaio, nei bovini donatori, di una malattia di categoria A o di una malattia emergente conformemente all'articolo 6 del Reg UE 2016/429. Il macello presso il quale sono raccolti le ovaie e gli altri tessuti non deve essere situato in una zona soggetta a restrizioni istituita in seguito a un focolaio, nei bovini donatori, di una malattia di categoria A o di una malattia emergente conformemente all'articolo 6 del Reg UE 2016/429. Lo sperma utilizzato per la fecondazione degli ovociti di bovini ai fini della produzione in vitro di embrioni deve essere stato raccolto, trasformato e immagazzinato conformemente alle prescrizioni dell'allegato II, parte 1, capitolo I, e dell'allegato III, parte 1”.

La parte 2 si occupa dei suini. Il capitolo I riporta le prescrizioni per i **suini** da cui è raccolto lo sperma., ovvero tutti i suini ammessi in un **centro di raccolta dello sperma** devono essere stati sottoposti a quarantena in impianti di quarantena in cui erano presenti solo altri artiodattili di stato sanitario almeno equivalente; nei 30 giorni precedenti l'ingresso nell'impianto di quarantena gli animali devono essere stati sottoposti, con esito negativo, alle seguenti prove: “per quanto riguarda l'infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, una prova all'antigene di brucella tamponato (prova del rosa bengala), un saggio ELISA competitivo o un ELISA indiretto per la ricerca di anticorpi contro le specie di *Brucella* in fase liscia. Se uno degli animali risulta positivo alle prove sierologiche per la ricerca di anticorpi contro le specie di *Brucella* in fase liscia, gli animali risultati negativi presenti nello stesso stabilimento non possono essere ammessi nell'impianto di quarantena finché non sia stato confermato lo stato di indenne da infezione da *Brucella* dello stabilimento di origine degli animali risultati positivi; per quanto riguarda l'infezione da virus della malattia di Aujeszky (nel caso di animali non vaccinati), un saggio ELISA per la ricerca degli anticorpi al virus intero della malattia di Aujeszky o alla glicoproteina B (ADV-gB) o glicoproteina D (ADV-gD) del virus o una prova di sieroneutralizzazione; nel caso di animali vaccinati, con vaccino privato di globulina gE, un saggio ELISA per la ricerca degli anticorpi alla glicoproteina E (ADV-gE) del virus della malattia di

Aujeszky. Le prove sierologiche per l'infezione da virus della malattia di Aujeszky devono essere conformi alle norme di cui all'allegato I, parte 7, del Reg Del UE 2020/688; per quanto riguarda la peste suina classica, un saggio ELISA per la ricerca di anticorpi o una prova di sieroneutralizzazione, effettuati su animali provenienti da uno Stato membro o da una zona dello stesso in cui è stata segnalata la peste suina classica o sono state effettuate vaccinazioni contro tale malattia nei 12 mesi precedenti; per quanto riguarda l'infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini, una prova sierologica, prova dell'immunoperossidasi su monostrato (IPMA), saggio di immunofluorescenza (IFA) o ELISA. Gli animali in un periodo almeno pari ai 21 giorni successivi all'ammissione nell'impianto di quarantena sono nuovamente sottoposti al test della *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, come sopra. Gli animali risultati positivi a una delle prove devono essere allontanati dall'impianto di quarantena, salvo qualora il sospetto di infezione da *Brucella* sia stato escluso (vedi dopo). Vengono nuovamente testati, come sopra, per l'Aujeszky e gli animali che risultano positivi devono essere immediatamente allontanati dall'impianto di quarantena; nuovamente (la prova per la peste suina classica prevista nel regolamento viene soppressa Reg Del UE 2023/647) per la sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini. Per quest'ultima le disposizioni vengono sostituite dal Reg Del UE 2023/647 come segue: la malattia viene esclusa con "una prova sierologica (IPMA, IFA o ELISA) o una prova per la ricerca del genoma virale (RT-PCR, *nested* RT-PCR, RT-PCR *real time*). "Se uno degli animali risulta positivo alle prove sierologiche per la ricerca dell'infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini, l'autorità competente deve classificare tutti gli animali presenti nell'impianto di quarantena come casi sospetti conformemente all'articolo 9, paragrafo 1, lettera b), del Reg Del UE 2020/689". L'operatore deve isolare immediatamente gli animali positivi dagli altri animali presenti nell'impianto di quarantena. L'autorità competente deve condurre un'indagine per confermare o escludere l'infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini conformemente all'articolo 8 del Reg Del UE 2020/689. Se uno degli animali risulta positivo alle prove per la ricerca del genoma virale del virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini, l'autorità competente deve classificare tutti gli animali presenti nell'impianto di quarantena

come casi confermati conformemente all'articolo 9, paragrafo 2, lettera b), del Reg Del UE 2020/689. L'operatore deve allontanare immediatamente tali animali dall'impianto di quarantena e seguire le istruzioni dell'autorità competente". Tornando al regolamento nella sua stesura principale, "In caso di quarantena di un gruppo di animali, l'autorità competente deve adottare tutte le misure necessarie per garantire che gli animali rimanenti che sono risultati negativi alle prove di cui sopra abbiano uno stato sanitario soddisfacente prima di essere ammessi nel centro di raccolta dello sperma conformemente al presente capitolo". In caso di sospetto di infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* devono essere adottate le seguenti misure: per quanto riguarda gli animali risultati positivi all'infezione da *Brucella* in una delle prove di cui sopra, deve essere applicato il seguente protocollo: i sieri positivi sono sottoposti ad almeno una delle prove alternative che non sia stata già effettuata. Viene svolta un'indagine epidemiologica presso lo stabilimento o gli stabilimenti di origine degli animali risultati positivi a *Brucella*. Non prima di 7 giorni dalla positività, vengono nuovamente raccolti i campioni dai soggetti positivi e dagli animali dell'allevamento e ritestati, oppure tutti gli animali positivi sono sottoposti a intradermoreazione alla brucellina; il sospetto di infezione da *Brucella* può essere escluso purché l'indagine epidemiologica sullo stabilimento o sugli stabilimenti di origine non abbia evidenziato la presenza di infezione da *Brucella* e a condizione che siano state effettuate, con esito negativo, le ulteriori prove oppure se al secondo controllo tutti gli animali risultati positivi alle prove siano stati sottoposti, in ciascun caso con esito negativo, a un'ispezione *post mortem* e a una prova per la ricerca dell'agente (PCR o coltura batteriologica) per le specie di *Brucella* in fase liscia. Una volta escluso il sospetto di infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, tutti gli animali dell'impianto di quarantena possono essere ammessi nel centro di raccolta dello sperma. Le prove di *routine* obbligatorie per i suini detenuti presso i centri di raccolta dello sperma sono nuovamente: *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, Aujeszky; peste suina classica, sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (solo una prova sierologica). Per la peste le disposizioni vengono sostituite dal Reg Del UE 2023/647 come segue: "per quanto riguarda la peste suina classica, un saggio ELISA per la ricerca di anticorpi o una prova di sieroneutralizzazione, effettuati su animali situati in uno Stato membro o in una zona dello stesso in cui è stata segnalata la peste

suina classica o sono state effettuate vaccinazioni contro tale malattia nei 12 mesi precedenti”. Tornando al regolamento al punto b) viene stabilito che: “le prove elencate devono essere effettuate da tutti gli animali immediatamente prima di lasciare il centro di raccolta dello sperma o all’arrivo al macello e, in ogni caso, entro 12 mesi dalla data di ammissione nel centro di raccolta; oppure almeno: ogni tre mesi, dal 25 % degli animali presenti nel centro di raccolta dello sperma per effettuare prove per la ricerca dell’infezione da *Brucella*, dell’infezione da virus della malattia di Aujeszky e della peste suina classica, e ogni mese almeno dal 10% degli animali presenti nel centro di raccolta dello sperma per effettuare prove per la ricerca dell’infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini; oppure almeno ogni mese, dal 10% degli animali presenti nel centro di raccolta dello sperma per effettuare prove per la ricerca dell’infezione da *Brucella*, dell’infezione da virus della malattia di Aujeszky, della peste suina classica e della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini. Nel caso di campionamento effettuato conformemente alle due opzioni, il veterinario del centro deve provvedere affinché gli animali sottoposti a campionamento siano rappresentativi dell’intera popolazione di tale centro, in particolare per quanto riguarda le classi di età e i locali di stabulazione. Se le prove sono effettuate conformemente al punto 2, lettera b), punto ii), il veterinario del centro deve provvedere affinché tutti gli animali siano sottoposti a prove per la ricerca delle malattie di cui al punto 2, lettera a), almeno ogni 12 mesi dalla data di ammissione nel centro di raccolta dello sperma. Se una delle prove di *routine* risulta positiva, l’animale deve essere isolato e lo sperma da esso raccolto dopo l’ultima prova con esito negativo non può essere oggetto di movimenti tra Stati membri. “L’animale di cui al primo comma deve essere immediatamente allontanato dal centro di raccolta dello sperma. Lo sperma raccolto da tutti gli altri animali presenti nel centro di raccolta dello sperma in seguito al prelievo dell’ultimo campione risultato negativo a una delle prove indicate al punto 2, lettera a), deve essere immagazzinato separatamente e non può essere oggetto di movimenti tra Stati membri finché lo stato sanitario del centro di raccolta dello sperma non sia stato ripristinato e lo sperma immagazzinato non sia stato sottoposto a indagini ufficiali appropriate per escludere la presenza di patogeni che causano le malattie” elencate.

Il capitolo II stabilisce che i suini **donatori di embrioni o oociti** “devono essere stati sottoposti a esame clinico da parte del veterinario del gruppo o di un membro del gruppo e certificati esenti da sintomi o segni di malattie di categoria D pertinenti per i suini il giorno della raccolta degli ovociti o degli embrioni. Oltre alle prescrizioni di cui sopra, le femmine donatrici della specie suina, ad eccezione delle donatrici di embrioni concepiti *in vivo* sottoposti a un trattamento con tripsina, devono provenire da uno Stato membro o da una zona dello stesso indenne da infezione da virus della malattia di Aujeszky o nel quale è condotto un programma di eradicazione approvato per l’infezione da virus della malattia di Aujeszky. Per quanto riguarda l’infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini, le femmine della specie suine donatrici di embrioni concepiti *in vivo* devono essere sottoposte, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca dell’infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini in due occasioni ad almeno 21 giorni di intervallo; la seconda prova deve essere effettuata nei 15 giorni precedenti la raccolta degli embrioni. Lo sperma utilizzato per l’inseminazione artificiale dei suini donatori deve essere stato raccolto, trasformato e immagazzinato conformemente alle prescrizioni dell’allegato II, parte 2, capitolo I, e dell’allegato III, parte 1”.

La parte 3 si occupa degli **ovini e dei caprini**, il capitolo I della produzione di sperma. “Tutti gli ovini e i caprini ammessi in un centro di **raccolta dello sperma** devono soddisfare le seguenti prescrizioni: gli animali devono essere stati sottoposti a quarantena in impianti di quarantena in cui erano presenti solo altri artiodattili di stato sanitario almeno equivalente; nel caso di ovini, devono provenire da uno stabilimento in cui, nei 60 giorni precedenti la loro permanenza negli impianti di quarantena, siano stati sottoposti a una prova sierologica per la ricerca dell’epididimite ovina (*Brucella ovis*) o a qualsiasi altra prova con sensibilità e specificità equivalenti documentate. Se gli ovini sono detenuti insieme a caprini, anche tali caprini devono essere sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca dell’epididimite ovina; gli animali sono stati sottoposti alle seguenti prove effettuate, con esito negativo in ciascun caso, su un campione di sangue prelevato nei 30 giorni precedenti l’inizio del periodo di quarantena. Per quanto riguarda l’infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, una prova sierologica di cui all’allegato I, parte 1, punto 1, del

Reg Del UE 2020/688; nel caso di ovini, per quanto riguarda l'epididimite ovina (*Brucella ovis*), una prova sierologica o qualsiasi altra prova con sensibilità e specificità equivalenti documentate. Se gli ovini sono detenuti insieme a caprini, si procede come prima. Gli animali sono sottoposti nuovamente, con esito negativo, alle seguenti prove effettuate su campioni prelevati durante il periodo di quarantena e in un periodo almeno pari ai 21 giorni successivi alla data di ammissione nell'impianto di quarantena: *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, epididimite ovina (anche sui caprini se detenuti insieme agli ovini). Tutti gli ovini e i caprini detenuti in un centro riconosciuto di raccolta dello sperma devono essere sottoposti almeno una volta all'anno (prove di *routine*), con esito negativo, nuovamente alle seguenti prove: *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, epididimite ovina (anche sui caprini se detenuti insieme agli ovini). Se una delle prove risulta positiva, l'animale deve essere isolato e il suo sperma raccolto in seguito all'ultima prova negativa non può essere spostato tra Stati membri. L'animale deve essere allontanato dal centro di raccolta dello sperma. Lo sperma raccolto da tutti gli altri animali presenti nel centro di raccolta dello sperma in seguito al prelievo dell'ultimo campione risultato negativo a una delle prove di *routine* deve essere immagazzinato separatamente e non può essere spostato tra Stati membri finché lo stato sanitario del centro di raccolta dello sperma non sia stato ripristinato e lo sperma immagazzinato non sia stato sottoposto a indagini ufficiali appropriate per escludere la presenza di patogeni che causano le malattie" elencate.

Il capitolo II (**ovociti ed embrioni**) stabilisce che "gli ovini e i caprini donatori di ovociti devono essere stati sottoposti a esame clinico da parte del veterinario del gruppo o di un membro del gruppo e certificati esenti da sintomi o segni di malattie di categoria D pertinenti per gli animali delle specie ovina e caprina il giorno della raccolta degli ovociti o degli embrioni. Lo sperma utilizzato per l'inseminazione artificiale degli ovini e dei caprini donatori deve essere stato raccolto, trasformato e immagazzinato conformemente alle prescrizioni dell'allegato II, parte 3, capitolo I, e dell'allegato III, parte 1".

La parte 4 fornisce le prescrizioni riguardo gli **equini**. Il capitolo I fornisce le indicazioni sanitarie per gli stalloni destinati alla **raccolta del seme**. Il veterinario del centro deve assicurarsi che lo stallone sia sottoposto alle seguenti prove: un test di immunodiffusione in gel di agar (test di Coggins) o un saggio ELISA per l'anemia infettiva equina, con esito negativo; una prova di isolamento del virus dell'arterite equina o per la ricerca del genoma tramite PCR (reazione a catena della polimerasi) o PCR in tempo reale effettuata, con esito negativo, su una percentuale di tutto lo sperma dello stallone donatore, salvo qualora tale stallone sia stato sottoposto a una prova di sieroneutralizzazione per l'arterite virale equina, il cui esito sia stato negativo con una diluizione del siero pari a 1:4; una prova di identificazione dell'agente della metrite contagiosa equina (*Taylorella equigenitalis*) effettuata, con esito negativo in ciascun caso, in due occasioni ad almeno sette giorni di intervallo e comunque non prima di sette giorni (trattamento sistemico) o 21 giorni (trattamento locale) da un eventuale trattamento antimicrobico dello stallone donatore, su almeno tre campioni (tamponi) prelevati da tale animale (dalla guaina del pene o prepuzio, dall'uretra, dalla fossa del glande). I campioni per *Taylorella* devono essere collocati in un terreno di trasporto con carbone attivo, per esempio terreno Amies, prima di essere inviati al laboratorio. I campioni devono essere sottoposti ad almeno una delle seguenti prove: coltura in condizioni microaerofile per un periodo almeno pari a sette giorni per l'isolamento della *T. equigenitalis*, allestita entro le 24 ore successive al prelievo dei campioni dall'animale donatore, o 48 ore se i campioni sono tenuti a bassa temperatura durante il trasporto, oppure PCR o PCR in tempo reale per la ricerca del genoma della *T. equigenitalis*, effettuata entro le 48 ore successive al prelievo dei campioni dall'animale donatore. Inoltre, lo stallone deve essere sottoposto ad uno dei seguenti programmi di controllo. “Se lo stallone donatore ha soggiornato in modo continuativo nel centro di raccolta dello sperma per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la data della prima raccolta di sperma e durante il periodo di raccolta, e se nessun equino nel centro di raccolta dello sperma è venuto a contatto diretto con equini di stato sanitario inferiore a quello dello stallone donatore”, le prove prescritte “devono essere effettuate su campioni prelevati dallo stallone donatore almeno una volta l'anno (prove di *routine* obbligatorie) all'inizio del periodo riproduttivo o precedentemente alla prima raccolta di sperma destinato a essere spostato in un altro

Stato membro come sperma fresco, refrigerato o congelato, e almeno 14 giorni dopo la data di inizio del periodo di permanenza nel centro di almeno 30 giorni che precede la data della prima raccolta”. “Se lo stallone donatore ha soggiornato nel centro di raccolta dello sperma per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la data della prima raccolta di sperma e durante il periodo di raccolta, ma ha potuto lasciare tale centro di raccolta dello sperma occasionalmente sotto la responsabilità del veterinario del centro per un periodo totale inferiore a 14 giorni durante il periodo di raccolta, o altri equini del centro di raccolta dello sperma sono venuti a contatto diretto con equini di stato sanitario inferiore”, le prove prescritte “devono essere effettuate nel modo seguente: almeno una volta l’anno su campioni prelevati dallo stallone donatore all’inizio del periodo riproduttivo o precedentemente alla prima raccolta di sperma destinato a essere spostato in un altro Stato membro come sperma fresco, refrigerato o congelato e almeno 14 giorni dopo la data di inizio del periodo di permanenza nel centro di almeno 30 giorni, che precede la data della prima raccolta”, e durante il periodo di raccolta dello sperma destinato a essere spostato un altro Stato membro come sperma fresco, refrigerato o congelato, nel modo seguente: per la prova per l’anemia infettiva equina, su campioni prelevati non più di 90 giorni prima della data di raccolta dello sperma destinato a essere spostato in un altro Stato membro; per la prova del virus dell’arterite virale equina su campioni prelevati non più di 30 giorni prima della data di raccolta dello sperma destinato a essere spostato in un altro Stato membro, salvo qualora lo stato di non eliminatore del virus di uno stallone donatore sia confermato da una prova di isolamento del virus o tramite PCR o PCR in tempo reale, effettuate su campioni di una percentuale di tutto lo sperma prelevato non più di sei mesi prima della data di raccolta dello sperma destinato a essere spostato in un altro Stato membro, e lo stallone donatore sia stato sottoposto a una prova di sieroneutralizzazione per l’arterite virale equina il cui esito sia stato positivo con una diluizione del siero almeno pari a 1:4; per l’isolamento della *T. equigenitalis* su campioni prelevati non più di 60 giorni prima della data di raccolta dello sperma destinato a essere spostato in un altro Stato membro; nel caso della PCR o della PCR in tempo reale, la prova può essere effettuata su tre campioni (tamponi) prelevati in un’unica occasione. Se lo stallone donatore non soddisfa le condizioni di soggiorno di cui sopra e lo sperma raccolto è destinato a essere spostato in un altro Stato membro

come sperma congelato, le prove prescritte devono essere effettuate su campioni prelevati dallo stallone donatore nel modo seguente: “almeno una volta l’anno all’inizio del periodo riproduttivo, durante il periodo di stoccaggio di cui all’allegato III, parte 1, punto 2, lettera b), e prima che lo sperma sia utilizzato o allontanato dal centro di raccolta dello sperma, su campioni prelevati non prima di 14 giorni ed entro 90 giorni dalla data di raccolta dello sperma. In deroga a quest’ultimo comma, il campionamento dopo la raccolta e le prove per l’arterite virale equina non sono richiesti se lo stato di non eliminatore del virus di uno stallone donatore sieropositivo è confermato da una prova di isolamento del virus, da PCR o PCR in tempo reale effettuate, con esito negativo, su campioni di una percentuale di tutto lo sperma dello stallone donatore prelevato due volte l’anno a un intervallo di almeno quattro mesi e lo stallone donatore è stato sottoposto a una prova di sieroneutralizzazione per l’arterite virale equina, il cui esito sia stato positivo con una diluizione del siero almeno pari a 1:4. Nel caso in cui una delle prove sanitarie risulti positiva, lo stallone donatore deve essere isolato e lo sperma da esso raccolto dopo l’ultima prova negativa non può essere spostato tra Stati membri, ad eccezione, per l’arterite virale equina, di ogni eiaculato di sperma sottoposto, con esito negativo, alla prova di isolamento del virus per l’arterite virale equina. Lo sperma raccolto da tutti gli altri stalloni presenti nel centro di raccolta dello sperma in seguito al prelievo dell’ultimo campione risultato negativo deve essere immagazzinato separatamente e non può essere spostato tra Stati membri finché lo stato sanitario del centro di raccolta dello sperma non sia stato ripristinato e lo sperma immagazzinato non sia stato sottoposto a indagini ufficiali appropriate per escludere la presenza di patogeni”.

Il capitolo II fornisce le informazioni sanitarie per gli **equidi donatori di embrioni o ovociti**. Tutte le fattrici prima della raccolta devono essere sottoposte a esame clinico da parte del veterinario del gruppo o di un membro del gruppo e certificati esenti da sintomi o segni di malattie di categoria D. Inoltre, le fattrici non devono essere utilizzate per la riproduzione naturale per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la data di raccolta degli ovociti o degli embrioni e tra la data del primo prelievo di campioni e quella di raccolta degli ovociti e degli embrioni. I donatori devono essere sottoposti a un test come sopra per l’anemia infettiva equina effettuato,

con esito negativo, su campioni di sangue prelevati almeno 14 giorni dopo la data di inizio del periodo di 30 giorni e non più di 90 giorni prima della raccolta degli ovociti o degli embrioni destinati a essere spostati tra Stati membri. Inoltre, devono essere sottoposti a una prova di identificazione dell'agente della metrite contagiosa equina (*T. equigenitalis*) effettuata, con esito negativo in ciascun caso, comunque non prima di sette giorni (trattamento sistemico) o 21 giorni (trattamento locale) da un eventuale trattamento antimicrobico dell'animale donatore, su almeno due campioni (tamponi) prelevati da tale animale (dalle superfici della mucosa della fossetta clitoridea, dai seni clitoridei). "Lo sperma utilizzato per l'inseminazione artificiale degli animali donatori deve essere stato raccolto, trasformato e immagazzinato conformemente alle prescrizioni dell'allegato II, parte 4, capitolo I, e dell'allegato III, parte 1".

Alla parte 5 sono fornite le altre prescrizioni in materia di **sanità animale** per i bovini, i suini, gli ovini e i caprini e per gli animali delle famiglie Camelidae e Cervidae da cui è raccolto il materiale germinale, nonché in materia di **quarantena** e di **prove di laboratorio** o di altro tipo effettuate su tali animali, secondo quanto previsto agli articoli 20, 21, 22 e 38. Al capitolo I vengono date le indicazioni riguardo l'afta epizootica. Al punto 1 viene stabilito che i bovini, i suini, gli ovini e i caprini donatori di sperma, ovociti o embrioni: "a) devono provenire da stabilimenti: i) situati in una zona in cui l'afta epizootica non è stata segnalata in un raggio di 10 km attorno allo stabilimento per un periodo almeno pari ai 30 giorni immediatamente precedenti la data di raccolta; ii) in cui l'afta epizootica non è stata segnalata per un periodo almeno pari ai 3 mesi immediatamente precedenti la data di raccolta; b) non devono essere stati vaccinati contro l'afta epizootica nei 12 mesi immediatamente precedenti la data di raccolta". Al paragrafo 2 si stabilisce che il veterinario del centro deve provvedere affinché: "a) i bovini, i suini, gli ovini e i caprini donatori di sperma siano ammessi nel centro di raccolta dello sperma solo dopo essere stati sottoposti a isolamento nell'impianto di quarantena il quale, il giorno dell'ammissione degli animali nel centro di raccolta dello sperma", deve avere gli stessi requisiti dello stabilimento di provenienza per quanto riguarda l'afta. Inoltre provvede affinché: "b) lo sperma sia spostato in un altro Stato membro solo se sono soddisfatte le seguenti condizioni: i) il centro di raccolta dello sperma è situato in una zona in cui l'afta epizootica non è stata

segnalata in un raggio di 10 km attorno a tale centro di raccolta dello sperma per un periodo almeno pari a 30 giorni; ii) il centro di raccolta dello sperma è indenne da afta epizootica da un periodo almeno pari ai 3 mesi precedenti la data di raccolta dello sperma e ai 30 giorni successivi alla data di raccolta oppure, nel caso di sperma fresco, fino alla data di spedizione della partita di sperma in un altro Stato membro; iii) nel caso di sperma fresco, l'animale donatore è rimasto nel centro di raccolta dello sperma di cui al punto i) per un periodo continuativo almeno pari ai 30 giorni immediatamente precedenti la data di raccolta dello sperma". Al paragrafo 3, "in deroga al punto 1, lettera b), il veterinario del centro può autorizzare la spedizione di sperma raccolto da un animale donatore detenuto che è stato vaccinato contro l'afta epizootica nei 12 mesi immediatamente precedenti la data di raccolta, purché: a) l'animale donatore non sia stato vaccinato contro l'afta epizootica almeno nei 30 giorni immediatamente precedenti la data di raccolta; b) il 5 % (con un minimo di 5 paillette) di ciascun quantitativo di sperma raccolto da un animale donatore in qualunque momento sia sottoposto, con esito negativo, a una prova di isolamento del virus per l'afta epizootica". Al paragrafo 4, in deroga al punto 1, lettera b), "il veterinario del gruppo può autorizzare la spedizione verso un altro Stato membro di embrioni concepiti in vivo raccolti da un animale donatore che è stato vaccinato contro l'afta epizootica nei 12 mesi immediatamente precedenti la data di raccolta, purché: a) la femmina donatrice non sia stata vaccinata contro l'afta epizootica almeno nei 30 giorni immediatamente precedenti la data di raccolta; b) lo sperma utilizzato per la fecondazione sia stato raccolto da un maschio donatore conforme alle condizioni di cui al punto 1, lettera b), o lo sperma sia conforme alle condizioni di cui al punto 2; c) prima del congelamento, gli embrioni siano stati sottoposti a lavaggio con tripsina effettuato conformemente alle raccomandazioni del manuale IETS (1); d) gli embrioni congelati siano immagazzinati per un periodo almeno pari a 30 giorni dalla data di raccolta e, durante questo periodo, gli animali donatori non abbiano presentato alcun segno clinico di afta epizootica".

Al capitolo II vengono fornite le prescrizioni per i bovini, gli ovini e i caprini nonché per gli animali delle famiglie Camelidae e Cervidae per quanto riguarda l'infezione da virus della **febbre catarrale degli ovini** (sierotipi 1-24). Al paragrafo 1 sono

fornite le condizioni che i donatori di sperma devono soddisfare: “a) sono stati detenuti in uno Stato membro o in una zona dello stesso indenne da infezione da virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24) per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta dello sperma e durante tale raccolta; b) sono stati detenuti in una zona stagionalmente indenne dalla febbre catarrale degli ovini durante il periodo stagionalmente indenne da tale malattia, per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta dello sperma e durante tale raccolta, in uno Stato membro o in una zona dello stesso: i) con un programma di eradicazione approvato per l’infezione da virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24), oppure ii) in cui l’autorità competente del luogo di origine della partita di sperma ha ottenuto per iscritto il consenso preliminare dell’autorità competente dello Stato membro di destinazione per quanto riguarda le condizioni per l’istituzione di tale zona stagionalmente indenne e l’accettazione della partita di sperma; c) sono stati detenuti in uno stabilimento protetto dai vettori per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta dello sperma e durante tale raccolta; d) sono stati sottoposti a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi al sierogruppo 1-24 del virus della febbre catarrale degli ovini effettuata, con esito negativo, tra 28 e 60 giorni dalla data di ciascuna raccolta dello sperma; e) sono stati sottoposti a una prova di identificazione dell’agente del virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24) effettuata, con esito negativo, su campioni di sangue prelevati all’inizio e alla fine della raccolta dello sperma e durante tale raccolta, a intervalli di: i) almeno 7 giorni, in caso di prova di isolamento del virus; o ii) almeno 28 giorni, in caso di PCR”. Al paragrafo 2 sono fornite le indicazioni per i donatori di embrioni concepiti *in vivo* o di ovociti per la produzione *in vitro* di embrioni, che devono soddisfare almeno una delle seguenti condizioni: “ a) sono stati detenuti in uno Stato membro o in una zona dello stesso indenne da infezione da virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24) per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta degli ovociti o degli embrioni e durante tale raccolta; b) sono stati detenuti in una zona stagionalmente indenne dalla febbre catarrale degli ovini durante il periodo stagionalmente indenne da tale malattia, per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta degli ovociti o degli embrioni e durante tale raccolta, in uno Stato membro o in una zona dello stesso: i) con un programma di eradicazione

approvato per l'infezione da virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24), oppure ii) in cui l'autorità competente del luogo di origine della partita di ovociti o embrioni ha ottenuto per iscritto il consenso preliminare dell'autorità competente dello Stato membro di destinazione per quanto riguarda le condizioni per l'istituzione di tale zona stagionalmente indenne e l'accettazione della partita di ovociti o embrioni; c) sono stati detenuti in uno stabilimento protetto dai vettori per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta degli ovociti o degli embrioni e durante tale raccolta; d) sono stati sottoposti a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi al sierogruppo 1-24 del virus della febbre catarrale degli ovini effettuata, con esito negativo, su un campione di sangue prelevato tra 28 e 60 giorni dalla data di raccolta degli ovociti o degli embrioni; e) sono stati sottoposti a una prova di identificazione dell'agente del virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24) effettuata, con esito negativo, su un campione di sangue prelevato il giorno della raccolta degli ovociti o degli embrioni". Al paragrafo 3 sono date le indicazioni sullo sperma utilizzato per fecondare gli ovociti, che deve essere raccolto da animali conformi alle prescrizioni di cui al paragrafo 1.

Il capitolo III (prescrizioni per i bovini, gli ovini e i caprini per quanto riguarda l'infezione da **virus della malattia emorragica**) è completamente sostituito dal Reg Del UE 2023/647 come segue: "I bovini, gli ovini e i caprini donatori di sperma devono soddisfare almeno una delle seguenti condizioni: a) sono stati detenuti per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta dello sperma e durante tale raccolta in uno Stato membro o in una zona dello stesso in cui l'infezione da virus della malattia emorragica epizootica non è stata segnalata per un periodo almeno pari ai due anni precedenti in un raggio di 150 km attorno allo stabilimento; b) sono stati detenuti per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta dello sperma e durante tale raccolta in uno Stato membro o in una zona dello stesso stagionalmente indenni da infezione da virus della malattia emorragica epizootica; c) sono stati detenuti in uno stabilimento protetto dai vettori per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta dello sperma e durante tale raccolta; d) sono stati sottoposti a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi all'infezione da virus della malattia emorragica epizootica effettuata, con esito negativo, almeno ogni 60

giorni durante tutto il periodo di raccolta e tra 28 e 60 giorni dalla data di raccolta finale dello sperma; e) sono stati sottoposti a una prova di identificazione dell'agente dell'infezione da virus della malattia emorragica epizootica effettuata, con esito negativo, su campioni di sangue prelevati all'inizio e alla fine della raccolta dello sperma e durante tale raccolta, a intervalli di: i) almeno sette giorni, in caso di prova di isolamento del virus; o ii) almeno 28 giorni, in caso di PCR". Al punto 2, stabilisce che: "I bovini, gli ovini e i caprini donatori di ovociti per la produzione in vitro di embrioni e donatori di embrioni concepiti *in vivo* devono soddisfare almeno una delle seguenti condizioni: a) sono stati detenuti per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta degli ovociti o degli embrioni e durante tale raccolta in uno Stato membro o in una zona dello stesso in cui l'infezione da virus della malattia emorragica epizootica non è stata segnalata per un periodo almeno pari ai 2 anni precedenti in un raggio di 150 km attorno allo stabilimento; b) sono stati detenuti per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta degli ovociti o degli embrioni e durante tale raccolta in uno Stato membro o in una zona dello stesso stagionalmente indenni da infezione da virus della malattia emorragica epizootica; c) sono stati detenuti in uno stabilimento protetto dai vettori per un periodo almeno pari ai 60 giorni precedenti la raccolta degli ovociti o degli embrioni e durante tale raccolta; d) sono stati sottoposti a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi all'infezione da virus della malattia emorragica epizootica effettuata, con esito negativo, su un campione di sangue prelevato tra 28 e 60 giorni dalla data di raccolta degli ovociti o degli embrioni; e) sono stati sottoposti a una prova di identificazione dell'agente dell'infezione da virus della malattia emorragica epizootica effettuata, con esito negativo, su un campione di sangue prelevato il giorno della raccolta degli ovociti o degli embrioni. Lo sperma utilizzato per fecondare gli ovociti deve essere raccolto da animali conformi alle prescrizioni di cui al punto 1".

Tornando al Regolamento, al capitolo IV sono fornite le prescrizioni che uno stabilimento deve rispettare per essere considerato **indenne da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* nei suini**. Per poter essere considerato indenne, uno stabilimento di suini deve soddisfare le seguenti prescrizioni: "a) l'infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* nei suini deve essere una malattia soggetta a

obbligo di denuncia nello Stato membro; b) l'infezione da *Brucella* non è stata confermata nello stabilimento per un periodo almeno pari ai 3 anni precedenti; c) gli animali che presentano segni clinici compatibili con l'infezione da *Brucella*, quali aborti od orchite, sono sottoposti, con esito negativo, alle necessarie prove diagnostiche; d) nessun suino appartenente allo stabilimento è stato vaccinato contro l'infezione da *Brucella* almeno nei 3 anni precedenti; e) i suini introdotti nello stabilimento: i) provengono da stabilimenti indenni per un periodo almeno pari ai 3 anni precedenti o sono stati sottoposti a una prova effettuata, con esito negativo, su un campione prelevato nei 30 giorni precedenti la data di spedizione; ii) non sono stati vaccinati contro l'infezione da *Brucella* per un periodo almeno pari ai 3 anni precedenti; f) per un periodo almeno pari ai 3 anni precedenti non è stata constatata alcuna evidenza di infezione da *Brucella* in altre unità epidemiologiche dello stesso stabilimento o sono state attuate misure per prevenire l'eventuale trasmissione dell'infezione da tali altre unità epidemiologiche”.

L'allegato III fornisce prescrizioni in materia di sanità animale per la **raccolta**, la **produzione**, la **trasformazione** e lo **stoccaggio** di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini, secondo quanto previsto all'articolo 26. La parte 1 fornisce prescrizioni in materia di sanità animale per la raccolta, la trasformazione e lo stoccaggio di **sperma** fresco, refrigerato o congelato di bovini, suini, ovini, caprini ed equini e per il trasporto di tale sperma. “Tutti gli strumenti utilizzati per la raccolta, la trasformazione, la conservazione o il congelamento dello sperma devono essere puliti e disinfettati o sterilizzati prima dell'uso, ad eccezione degli strumenti monouso nuovi. Lo sperma congelato deve essere collocato e immagazzinato in recipienti di stoccaggio che sono stati puliti e disinfettati o sterilizzati prima dell'uso, o sono recipienti monouso nuovi, con un agente criogeno, che non deve essere stato utilizzato in precedenza per altri prodotti biologici di origine animale”. “Lo sperma deve essere immagazzinato, prima della spedizione o dell'uso, in condizioni autorizzate per un periodo minimo di 30 giorni dalla data di raccolta”. Ove necessario, gli antibiotici o le miscele di antibiotici possono essere aggiunti allo sperma o contenuti nei diluenti per lo sperma (le specifiche del regolamento vengono successivamente soppresse dal Reg Del UE 2023/647). Il Regolamento viene ripreso al punto 6: “In caso di aggiunta

di un antibiotico o di una miscela di antibiotici allo sperma nel certificato sanitario che accompagna la partita devono essere indicati i nomi degli antibiotici aggiunti e la loro concentrazione o la denominazione commerciale del diluente per lo sperma contenente antibiotici. L'aggiunta dell'antibiotico allo sperma o al diluente deve avvenire dopo la diluizione finale; nel caso di sperma congelato, l'aggiunta deve avvenire prima che lo sperma venga congelato. Per quanto riguarda lo sperma congelato o refrigerato, immediatamente dopo l'aggiunta degli antibiotici, lo sperma diluito deve essere conservato a una temperatura di almeno 5 °C, ad eccezione dello sperma di suini, che può essere conservato a una temperatura di almeno 15 °C per un periodo non inferiore a 45 minuti, oppure a una combinazione tempo-temperatura con un'attività battericida equivalente documentata”.

La parte 2 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per la raccolta e la trasformazione di **embrioni** concepiti *in vivo* di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Gli embrioni concepiti *in vivo* devono essere raccolti, trasformati e conservati conformemente alle prescrizioni indicate di seguito. “Gli embrioni devono essere raccolti e trasformati da un gruppo di raccolta di embrioni, senza venire a contatto con altre partite di embrioni non conformi alle prescrizioni di cui al presente regolamento”. “Gli embrioni devono essere raccolti in un'area separata dalle altre parti dei locali o dello stabilimento, che deve essere mantenuta in buono stato e deve essere costruita con materiali che consentano di pulirla e disinfettarla agevolmente ed efficacemente”. “Gli embrioni devono essere trasformati (esaminati, lavati, trattati e collocati in paillette o altri contenitori) in un laboratorio con sede stabile o mobile”. “Tutte le attrezzature utilizzate per raccogliere, manipolare, lavare, congelare e immagazzinare gli embrioni devono essere pulite e disinfettate o sterilizzate prima dell'uso, conformemente alle raccomandazioni del manuale IETS, o essere attrezzature monouso nuove”. “Qualsiasi prodotto biologico di origine animale utilizzato nei mezzi e nelle soluzioni per la raccolta, la trasformazione, il lavaggio o lo stoccaggio degli embrioni deve essere privo di microorganismi patogeni. I mezzi e le soluzioni utilizzati per la raccolta, il congelamento e lo stoccaggio degli embrioni devono essere sterilizzati con metodi autorizzati conformemente alle raccomandazioni del manuale IETS e manipolati in modo tale da garantire la sterilità”.

“In caso di aggiunta di antibiotici o di una miscela di antibiotici ai mezzi utilizzati per la raccolta, la trasformazione, il lavaggio e lo stoccaggio, conformemente alle raccomandazioni del manuale IETS, nel certificato sanitario che accompagna la partita devono essere indicati i nomi degli antibiotici aggiunti e la loro concentrazione”. “Gli agenti criogeni utilizzati per conservare o immagazzinare gli embrioni non devono essere stati utilizzati in precedenza per altri prodotti biologici di origine animale”. “Gli embrioni devono essere lavati conformemente alle raccomandazioni del manuale IETS e avere una zona pellucida o, nel caso di embrioni di equini, la capsula embrionale intatta, prima e immediatamente dopo il lavaggio. Ciascun embrione deve essere lavato almeno 10 volte in un liquido speciale per embrioni, che deve essere cambiato ogni volta. Ogni bagno deve avere un grado di diluizione 100 volte superiore al bagno precedente e ad ogni passaggio deve essere utilizzata una micropipetta sterile. La procedura di lavaggio standard deve essere modificata per includere lavaggi supplementari con l’enzima tripsina, conformemente alle raccomandazioni del manuale IETS, se è necessaria l’inattivazione o l’eliminazione di determinati patogeni”. “Gli embrioni di animali donatori diversi non possono essere lavati contemporaneamente. La zona pellucida di ciascun embrione o, nel caso di embrioni di equini, la capsula embrionale, deve essere esaminata su tutta la superficie a un ingrandimento di almeno 50 volte ed essere certificata intatta e priva di sostanze aderenti. Gli embrioni che hanno superato l’esame di cui al punto 10 devono essere collocati in una paillette o in un altro contenitore pulito e disinfettato o sterile, salvo qualora si tratti di paillette o contenitori monouso nuovi, marcato conformemente all’articolo 10, paragrafi 1 e 5, e immediatamente sigillato. Se del caso, ogni embrione deve essere congelato al più presto e immagazzinato nei locali di stoccaggio che si trovano sotto la responsabilità del veterinario del gruppo. Se non esistono altre procedure per la verifica dello stato sanitario degli animali donatori, o ai fini della verifica della conformità alle prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza stabilite dal veterinario del gruppo, anche nell’ambito del sistema di controllo della qualità, il gruppo di raccolta di embrioni può, conformemente alle raccomandazioni del manuale IETS, sottoporre a un laboratorio ufficiale o a un laboratorio autorizzato dall’autorità competente campioni di *routine* di embrioni o ovociti non vitali, liquidi di risciacquo o di lavaggio risultanti dalle loro attività per la

ricerca di contaminazioni batteriche e virali, a una frequenza che deve essere stabilita dal veterinario del gruppo”.

La parte 3 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per la raccolta e la trasformazione di **ovociti**, **ovaie** e altri tessuti per la produzione in vitro di embrioni di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Oltre alle prescrizioni di cui alla parte 2, alla raccolta, alla trasformazione e al trasporto di ovociti, ovaie e altri tessuti da utilizzare per la fecondazione in vitro e la coltura in vitro si applicano le ulteriori prescrizioni indicate di seguito. “Le ovaie e gli altri tessuti raccolti in un macello da un singolo animale donatore o da un lotto di animali donatori devono essere raccolti in un macello riconosciuto conformemente all’articolo 148 del Reg UE 2017/625. Tali potenziali animali donatori devono essere stati sottoposti a ispezioni *ante mortem* e *post mortem*, effettuate da un veterinario del macello, che deve averli certificati esenti da sintomi e segni di malattie delle categorie A, B, C e D pertinenti per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini o gli equini. Il macello deve essere situato in una zona in cui l’afta epizootica non è stata segnalata in un raggio di 10 km per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la data di raccolta delle ovaie e degli altri tessuti. Le ovaie possono essere introdotte nel laboratorio di un gruppo di produzione di embrioni ai fini della trasformazione soltanto dopo che sia stata completata, con esito soddisfacente, l’ispezione *post mortem* degli animali donatori. Se in un singolo animale donatore, in un lotto di animali donatori o in qualsiasi animale macellato il medesimo giorno nello stesso macello viene constatata una malattia di categorie A, B, C e D, tutte le ovaie e gli altri tessuti provenienti da tali animali donatori devono essere rintracciati ed eliminati. Le attrezzature utilizzate per la rimozione e il trasporto delle ovaie e degli altri tessuti devono essere pulite e disinfettate o sterilizzate prima dell’uso, ad eccezione delle attrezzature monouso nuove, e destinate esclusivamente a tali scopi. Per la manipolazione degli ovociti e degli embrioni provenienti da singoli animali donatori diversi e da lotti di animali donatori diversi devono essere utilizzate attrezzature distinte”.

La parte 4 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per la trasformazione di **embrioni** prodotti *in vitro* di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Oltre alle

prescrizioni già elencate alla parte 2, alla trasformazione degli embrioni prodotti *in vitro* si applicano ulteriori prescrizioni. “Al termine del periodo di coltura *in vitro* ma prima del congelamento, dello stoccaggio e del trasporto degli embrioni, questi devono essere lavati e sottoposti ai trattamenti (devono essere utilizzati agenti criogeni nuovi; la zona pellucida di ciascun embrione o, nel caso di embrioni di equini, la capsula embrionale, deve essere esaminata su tutta la superficie a un ingrandimento di almeno 50 volte ed essere certificata intatta e priva di sostanze aderenti; gli embrioni considerati di buona qualità devono essere collocati in una paillette o in un altro contenitore pulito e disinfettato o sterile, salvo qualora si tratti di paillette o contenitori monouso nuovi, marcato conformemente all’articolo 10, e immediatamente sigillato). Gli embrioni provenienti da singoli animali donatori diversi o da lotti di animali donatori diversi non possono essere lavati contemporaneamente. Gli embrioni provenienti da singoli animali donatori diversi o da lotti di animali donatori diversi non possono essere, inoltre, collocati nella stessa paillette o nello stesso altro contenitore”.

La parte 5 fornisce le prescrizioni in materia di sanità animale per la trasformazione di **embrioni micromanipolati** di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Prima di qualsiasi micromanipolazione che comprometta l’integrità della zona pellucida o, nel caso di embrioni di equini, della capsula embrionale, tutti gli embrioni o gli ovociti devono essere raccolti e trasformati conformemente alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui alle parti 2, 3 e 4. “Una micromanipolazione dell’embrione che comporti la penetrazione della zona pellucida o, nel caso di embrioni di equini, della capsula embrionale, deve essere effettuata in un laboratorio conforme, che si trova sotto la responsabilità del veterinario del gruppo. Ciascun gruppo di produzione di embrioni deve conservare una documentazione relativa alle proprie attività conformemente all’articolo 8. Nel caso di embrioni prodotti mediante fecondazione *in vitro*, l’identificazione degli embrioni può essere effettuata sulla base di un lotto di animali donatori, ma deve indicare la data e il luogo di raccolta delle ovaie e degli ovociti. Essa deve altresì consentire di rintracciare lo stabilimento di origine degli animali donatori. Qualsiasi micromanipolazione che comporti la penetrazione della zona pellucida o, nel caso di embrioni di equini, della capsula embrionale, deve essere

effettuata in strutture riconosciute a tal fine e dopo l'ultimo lavaggio ed esame. Tale micromanipolazione può essere effettuata solo su un embrione con una zona pellucida o, nel caso di embrioni di equini, una capsula embrionale intatta”.

Nella parte 6 sono riportate le prescrizioni riguardo lo **stoccaggio** di embrioni concepiti *in vivo*, di embrioni prodotti *in vitro* e di ovociti di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. “Ciascun gruppo di raccolta di embrioni e gruppo di produzione di embrioni deve provvedere affinché gli embrioni e gli ovociti siano immagazzinati a temperature adeguate nei locali di stoccaggio di cui all'allegato I. Possono essere introdotti nei locali di stoccaggio solo gli embrioni raccolti da un gruppo di raccolta di embrioni o gli ovociti raccolti da un gruppo di produzione di embrioni e gli embrioni prodotti da tale gruppo, e trasportati in condizioni tali da prevenire la contaminazione crociata degli embrioni e degli ovociti poiché è stato evitato il contatto con embrioni e ovociti non conformi alle prescrizioni di cui al presente regolamento. Gli embrioni concepiti *in vivo*, gli embrioni prodotti *in vitro* e gli ovociti devono essere immagazzinati in recipienti distinti per lo stoccaggio di ciascun tipo di materiale germinale e la manipolazione di tale materiale germinale di tipi e specie differenti immagazzinato deve essere effettuata da personale distinto o avvenire in momenti diversi. Il veterinario del gruppo può disporre che gli embrioni non raccolti da un gruppo di raccolta di embrioni o gli ovociti non raccolti da un gruppo di produzione di embrioni e gli embrioni non prodotti da tale gruppo possano essere trasformati dal gruppo di raccolta di embrioni o dal gruppo di produzione di embrioni, purché: tali ovociti ed embrioni siano raccolti da animali che soddisfano le condizioni di cui (per quanto riguarda i bovini, all'allegato II, parte 1, capitolo II, punto 1 e, a seconda dei casi, all'allegato II, parte 5, capitoli I, II e III; per quanto riguarda i suini, all'allegato II, parte 2, capitolo II, punti 1, 2 e 3 e, a seconda dei casi, all'allegato II, parte 5, capitoli I e IV; per quanto riguarda gli ovini e i caprini, all'allegato II, parte 3, capitolo II, punto 1 e, a seconda dei casi, all'allegato II, parte 5, capitoli da I a III; per quanto riguarda gli equini, all'allegato II, parte 4, capitolo II, punti 1 e 2) la trasformazione sia effettuata con attrezzature distinte o in un momento diverso da quello in cui sono trasformati gli ovociti e gli embrioni destinati a essere spostati in un altro Stato membro. In quest'ultimo caso le attrezzature devono essere pulite e

sterilizzate dopo l'uso; tali ovociti ed embrioni non siano spostati in un altro Stato membro e non vengano a contatto né siano immagazzinati in alcun momento con ovociti ed embrioni destinati a essere spostati in un altro Stato membro; tali ovociti ed embrioni siano identificabili mediante una marcatura diversa da quella di cui all'allegato I. Prima della loro spedizione in un altro Stato membro gli embrioni o gli ovociti congelati devono essere immagazzinati nei locali di stoccaggio di cui all'allegato I, per un periodo almeno pari a 30 giorni dalla data della loro raccolta o produzione. Solo gli embrioni o gli ovociti provenienti da singoli animali donatori o da un unico lotto di animali donatori, secondo quanto stabilito alla parte 3, punto 1, possono essere collocati nella stessa paillette o nello stesso altro contenitore”.

L'allegato IV riporta le informazioni che devono figurare nel **certificato sanitario** per il materiale germinale spostato tra stati membri, secondo quanto previsto agli articoli 31 e 40. “Il certificato sanitario per il materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini spostato tra gli Stati membri, secondo quanto previsto all'articolo 31, deve contenere almeno le seguenti informazioni: il nome e l'indirizzo dello speditore e del destinatario; il nome e l'indirizzo dello stabilimento di spedizione, il numero di riconoscimento unico di tale stabilimento, se lo stabilimento di spedizione è uno stabilimento riconosciuto di materiale germinale o uno stabilimento confinato, secondo quanto previsto all'articolo 14; il numero di registrazione unico di tale stabilimento, se lo stabilimento di spedizione è uno stabilimento in cui sono detenuti ovini e caprini, secondo quanto previsto all'articolo 13; il nome e l'indirizzo dello stabilimento di destinazione, e il numero di riconoscimento unico di tale stabilimento, se lo stabilimento di destinazione è uno stabilimento riconosciuto di materiale germinale o uno stabilimento confinato; il numero di registrazione unico di tale stabilimento, se lo stabilimento di destinazione è uno stabilimento registrato di materiale germinale o uno stabilimento registrato di qualsiasi altro tipo; il tipo di materiale germinale e le specie degli animali donatori; il numero di paillette o degli altri contenitori da spedire; le informazioni che consentono di identificare il materiale germinale: la specie, la razza e l'identificazione degli animali donatori da cui è stato raccolto il materiale germinale, conformemente alle prescrizioni di cui alla parte III, titolo I, II, III o IV, del Reg Del UE 2019/2035; la

marcatura apposta sulle paillette o sugli altri contenitori, conformemente alle prescrizioni di cui all'articolo 10; il luogo e la data della loro raccolta o produzione; il numero che figura sul sigillo apposto sul recipiente utilizzato per il trasporto; le informazioni relative alla situazione della sanità animale, le ulteriori garanzie e, se necessario, i risultati delle prove in relazione: allo Stato membro o alla zona dello stesso; allo stabilimento di origine degli animali donatori; allo stabilimento di materiale germinale o, nel caso di cui all'articolo 14, allo stabilimento confinato di raccolta o produzione, trasformazione e stoccaggio di materiale germinale; agli animali donatori da cui è stato raccolto il materiale germinale; al materiale germinale da spedire; la data e il luogo di rilascio del certificato sanitario, il nome, la qualifica e la firma del veterinario ufficiale e il timbro dell'autorità competente del luogo di origine della partita". Al punto 2 invece: "Il certificato sanitario per il materiale germinale di animali terrestri (con il Reg Del UE 2023/647 vengono soppressi i riferimenti al cane e gatto) diversi da bovini, suini, ovini, caprini ed equini, detenuti in stabilimenti confinati, nonché di animali delle famiglie Camelidae e Cervidae spostato tra Stati membri, secondo quanto previsto all'articolo 40, deve contenere almeno le seguenti informazioni: il nome e l'indirizzo dello speditore e del destinatario (il nome e l'indirizzo dello stabilimento di spedizione, e il numero di registrazione unico, se allo stabilimento di spedizione è stato assegnato tale numero di registrazione; il numero di riconoscimento unico di tale stabilimento confinato, se lo stabilimento di spedizione è uno stabilimento confinato); il nome e l'indirizzo dello stabilimento di destinazione e, se lo stabilimento di destinazione è uno stabilimento confinato, il numero di riconoscimento unico di tale stabilimento confinato; il tipo di materiale germinale e le specie degli animali donatori; il numero di paillette o degli altri contenitori da spedire; le informazioni che consentono di identificare il materiale germinale (la specie e, se necessario, la sottospecie, nonché l'identificazione degli animali donatori da cui è stato raccolto il materiale germinale: nel caso di cani e gatti, conformemente all'articolo 17, paragrafo 1, del Reg UE 2013/576 o all'articolo 70 del Reg Del UE 2019/2035, nel caso di animali terrestri diversi da bovini, suini, ovini, caprini ed equini, detenuti in stabilimenti confinati, conformemente alle norme di tale stabilimento confinato, oppure nel caso di animali delle famiglie Camelidae e Cervidae, conformemente all'articolo 73, paragrafo 1 o 2, o all'articolo 74 del Reg

69

Del UE 2019/2035; la marcatura apposta sulle paillette o sugli altri contenitori conformemente all'articolo 11; il luogo e la data della loro raccolta o produzione); il numero che figura sul sigillo apposto sul recipiente utilizzato per il trasporto; le informazioni relative alla situazione della sanità animale, le ulteriori garanzie e, se necessario, i risultati delle prove in relazione (allo Stato membro o alla zona dello stesso; allo stabilimento di origine degli animali donatori; agli animali donatori da cui è stato raccolto il materiale germinale; al materiale germinale da spedire; la data e il luogo di rilascio del certificato sanitario, il nome, la qualifica e la firma del veterinario ufficiale e il timbro dell'autorità competente del luogo di origine della partita)".

## **Regolamento Delegato UE 2020/687**

Il Regolamento Delegato (UE) 2020/687 (Reg Del UE 2020/687), fa riferimento alle norme di determinate **malattie elencate**, riguardo la sensibilizzazione, la prevenzione e il controllo di tali malattie negli animali terrestri e acquatici detenuti e selvatici. In particolare, al capo primo del regolamento sono date le indicazioni per le misure di controllo per le malattie di categoria A negli animali terrestri detenuti. Nella prima sezione vengono date le misure in caso di sospetto di malattia. Nella sezione due sono invece indicate le misure di controllo in caso di conferma ufficiale della presenza di una malattia di categoria A. Il capo secondo definisce le misure di controllo delle malattie per le malattie di categoria A di animali terrestri detenuti in zone soggette a restrizioni. Alla sezione 1 vengono fornite le misure generali di controllo delle malattie nella zona soggetta a restrizioni. La sezione 2 fornisce le misure di controllo delle malattie nella zona di protezione. Le misure di controllo per le malattie nella zona di sorveglianza sono indicate nella sezione 3, mentre alla sezione 4 vengono fornite le deroghe applicabili nella zona soggetta a restrizioni in caso di ulteriori focolai di malattia. Gli allegati forniscono le specifiche nelle procedure da effettuare per la diagnostica al monitoraggio, al raggio minimo delle zone di protezione e sorveglianza. L'allegato VI, sostituito con il regolamento delegato (UE) 2021/1140 (Reg Del UE 2021/1140), fornisce i divieti di attività riguardanti animali e prodotti

collegati alle malattie di categoria A. In particolare, viene fatto divieto di: movimenti di sperma, ovociti ed embrioni ottenuti da animali detenuti delle specie elencate da stabilimenti situati nella zona soggetta a restrizioni; raccolta di sperma, ovociti ed embrioni di animali detenuti delle specie elencate; inseminazione artificiale itinerante di animali detenuti delle specie elencate; monta naturale itinerante di animali detenuti delle specie elencate.

## **Regolamento Delegato UE 2020/688**

Il Regolamento Delegato (UE) 2020/688 (Reg Del UE 2020/688) integra le norme per la prevenzione e il controllo delle **malattie degli animali trasmissibili** agli animali o all'uomo di cui all'articolo 5, paragrafo 1, del Reg UE 2016/429 per quanto riguarda i movimenti all'interno dell'Unione Europea di animali terrestri detenuti, di animali selvatici terrestri e di uova da cova, tuttavia, non riguarda direttamente il materiale germinale o i prodotti di origine animale. Fornisce le prescrizioni generali per i movimenti di animali terrestri detenuti e di uova da cova all'interno dell'Unione e le misure di prevenzione delle malattie in relazione al trasporto all'interno dell'Unione, in aggiunta a quelle previste dal Reg UE 2016/429. Fornisce le direttive riguardo le prove di laboratorio o di altro tipo da effettuare riguardo le prescrizioni in materia di sanità animale sugli animali e sul materiale germinale prelevato in riferimento al Reg UE 2020/686. Inoltre, all'articolo 7 sono espresse le prescrizioni supplementari in materia di vaccinazione per i movimenti di animali terrestri verso altri Stati membri contro le malattie di categoria A per i movimenti di animali terrestri e di uova da cova verso un altro Stato membro.

L'articolo 10 riporta le prescrizioni sanitarie riguardanti i **bovini donatori** che vengono spostati in un centro di raccolta di uno Stato membro. I bovini sono spostati solo se: "a) gli animali hanno soggiornato in modo continuativo nello stabilimento per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la partenza, o dalla nascita se di età inferiore a 30 giorni, e durante tale periodo non sono stati a contatto con bovini detenuti di stato sanitario inferiore o soggetti a restrizioni dei movimenti per motivi

di sanità animale oppure con animali detenuti provenienti da uno stabilimento non conforme alle prescrizioni di cui alla lettera b); b) qualsiasi animale che entri nell'Unione da un paese terzo o territorio nei 30 giorni precedenti la partenza degli animali di cui alla lettera a), e sia introdotto nello stabilimento in cui soggiornavano tali animali, è tenuto separato in modo da evitare il contatto diretto e indiretto con tutti gli altri animali dello stabilimento; c) gli animali provengono da uno stabilimento indenne da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* senza vaccinazione dei bovini ed è soddisfatta una delle seguenti condizioni: i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da infezione da *Brucella* per quanto riguarda la popolazione bovina; o ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell'infezione da *Brucella* effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 1, su un campione prelevato nei 30 giorni precedenti la partenza e, in caso di capi femmine nel periodo del post-parto, prelevato almeno 30 giorni dopo il parto; o iii) gli animali hanno un'età inferiore a 12 mesi; o iv) gli animali sono castrati; d) gli animali provengono da uno stabilimento indenne da infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*) ed è soddisfatta almeno una delle seguenti condizioni: i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne; o ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 2, nei 30 giorni precedenti la partenza; o iii) gli animali hanno un'età inferiore a 6 settimane; e) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di infezione da virus della rabbia negli animali terrestri detenuti nei 30 giorni precedenti la partenza; f) gli animali provengono da uno stabilimento intorno al quale, in un raggio di almeno 150 km, nei due anni precedenti la partenza non sono stati segnalati casi di infezione da virus della malattia emorragica epizootica negli animali detenuti delle specie elencate per tale malattia; g) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di carbonchio ematico negli ungulati nei 15 giorni precedenti la partenza; h) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di surra (*Trypanosoma evansi*) nei 30 giorni precedenti la partenza e, qualora provengano da uno stabilimento in cui sono stati segnalati casi di surra nei 2

anni precedenti la partenza, dopo l'ultimo focolaio lo stabilimento interessato è rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché: i) gli animali infetti non sono stati allontanati dallo stabilimento; e ii) gli animali rimanenti nello stabilimento non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca della surra effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 3, su campioni prelevati almeno 6 mesi dopo che gli animali infetti sono stati allontanati dallo stabilimento; i) tranne che per i bovini detenuti di cui all'articolo 11, paragrafo 4, all'articolo 12, paragrafo 4, e all'articolo 13, gli animali soddisfano almeno una delle prescrizioni per l'infezione da virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24) di cui all'allegato V, parte II, capitolo 2, sezione 1, punti da 1 a 3, del Reg Del UE 2020/689; j) le condizioni di cui agli articoli 32 e 33 sono soddisfatte, ove applicabili”.

L'articolo 11 fornisce ulteriori prescrizioni supplementari per i movimenti di bovini detenuti verso altri Stati membri o loro zone aventi lo status di indenne da malattia per malattie specifiche. “Al punto 1 stabilisce che “gli operatori spostano bovini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da leucosi bovina enzootica solo se gli animali sono conformi alle prescrizioni di cui all'articolo 10 e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) gli animali provengono da uno stabilimento indenne da leucosi bovina enzootica; b) se gli animali provengono da uno stabilimento non indenne da leucosi bovina enzootica, non sono stati segnalati casi di tale malattia nello stabilimento in questione nei 24 mesi precedenti la partenza, e (se hanno un'età superiore a 24 mesi, gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca della leucosi bovina enzootica effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 4; su campioni prelevati in due occasioni ad almeno quattro mesi di intervallo, mentre gli animali erano tenuti in isolamento dagli altri bovini presenti nello stabilimento; su un campione prelevato nei 30 giorni precedenti la partenza, e tutti i bovini di età superiore a 24 mesi detenuti nello stabilimento sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca della leucosi bovina enzootica effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 4, su campioni prelevati in due occasioni ad almeno 4 mesi di intervallo nei 12 mesi precedenti la partenza degli animali); se hanno un'età inferiore a 24 mesi, gli animali

sono nati da madri che sono state sottoposte, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca della leucosi bovina enzootica effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 4, su campioni prelevati in due occasioni ad almeno quattro mesi di intervallo nei 12 mesi precedenti la partenza degli animali".

Al punto 2 vengono fornite le prescrizioni in materia di rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva. "Gli operatori spostano bovini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva solo se gli animali sono conformi alle prescrizioni di cui all'articolo 10 e non sono stati vaccinati contro la rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) se gli animali provengono da uno stabilimento indenne da rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva (lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva; gli animali sono stati sottoposti a quarantena per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la partenza e sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro l'herpesvirus bovino (virus intero) di tipo 1 (BHV-1), effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 5, su un campione prelevato nei 15 giorni precedenti la partenza); b) se provengono da uno stabilimento non indenne da rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva, gli animali sono stati tenuti in uno stabilimento riconosciuto di quarantena per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la partenza e sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il BHV-1 (virus intero), effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 5, su un campione prelevato almeno 21 giorni dopo l'inizio della quarantena".

Al punto 3 sono fornite 1 indicazioni per gli operatori che spostano bovini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da diarrea virale bovina, avendo cura di farlo solo se gli animali sono conformi alle prescrizioni di cui all'articolo 10 e non sono stati vaccinati contro la diarrea virale bovina e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) se gli animali provengono da uno stabilimento indenne da diarrea virale bovina, i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di

indenne da diarrea virale bovina o è stato sottoposto, con esito negativo, a un regime di prove di cui all'allegato IV, parte VI, capitolo 1, sezione 2, punto 1, lettera c), punto ii) o punto iii), del Reg Del UE 2020/689 nei 4 mesi precedenti la partenza degli animali; o ii) gli animali sono stati sottoposti singolarmente a prove per escludere la presenza del virus della diarrea virale bovina prima della partenza; b) se provengono da uno stabilimento non indenne da diarrea virale bovina, gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell'antigene o del genoma del virus della diarrea virale bovina effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 6, e i) gli animali sono stati tenuti in uno stabilimento riconosciuto di quarantena per un periodo almeno pari ai 21 giorni precedenti la partenza e, nel caso di femmine gravide, sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus della diarrea virale bovina effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 6, su campioni prelevati almeno 21 giorni dopo l'inizio della quarantena; o ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito positivo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus della diarrea virale bovina effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 6, su campioni prelevati prima della partenza o, nel caso di femmine gravide, prima dell'inseminazione precedente l'attuale gestazione”.

All'articolo 12 al punto 1 viene stabilito che “gli operatori spostano bovini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi un programma di eradicazione approvato per la leucosi bovina enzootica solo se gli animali sono conformi alle prescrizioni di cui all'articolo 10 e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) gli animali provengono da uno stabilimento indenne da leucosi bovina enzootica; o b) se gli animali provengono da uno stabilimento non indenne da leucosi bovina enzootica, non sono stati segnalati casi di tale malattia nello stabilimento in questione nei 24 mesi precedenti la partenza degli animali, e i) se hanno un'età superiore a 24 mesi, gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca della leucosi bovina enzootica effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 4 (su campioni prelevati in due occasioni ad almeno quattro mesi di intervallo, mentre gli animali erano tenuti in isolamento dagli altri bovini presenti nello stabilimento; su campioni prelevati nei 30

giorni precedenti la partenza, purché tutti i bovini di età superiore a 24 mesi detenuti nello stabilimento siano stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca della leucosi bovina enzootica effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 4, su campioni prelevati in due occasioni ad almeno quattro mesi di intervallo nei 12 mesi precedenti la partenza degli animali); ii) se hanno un'età inferiore a 24 mesi, gli animali sono nati da madri che sono state sottoposte, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca della leucosi bovina enzootica effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 4, su campioni prelevati in due occasioni ad almeno 4 mesi di intervallo nei 12 mesi precedenti la partenza degli animali". Al punto 2 viene stabilito che "gli operatori spostano bovini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi un programma di eradicazione approvato per la rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva solo se gli animali sono conformi alle prescrizioni di cui all'articolo 10 e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) se gli animali provengono da uno stabilimento indenne da rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva, i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva; o ii) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi un programma di eradicazione approvato per la rinotracheite infettiva bovina/vulvovaginite pustolosa infettiva; o iii) gli animali sono stati sottoposti a quarantena per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la partenza e sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il BHV-1 (virus intero) o, nel caso di animali vaccinati con vaccino gE-deleto, degli anticorpi contro la glicoproteina E del BHV-1, effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 5, su un campione prelevato nei 15 giorni precedenti la partenza; o iv) gli animali sono destinati a uno stabilimento in cui sono detenuti bovini per la produzione di carne senza che questi vengano a contatto con bovini di altri stabilimenti e dal quale sono spostati direttamente al macello; b) se provengono da uno stabilimento non indenne da rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva, gli animali sono stati tenuti in uno stabilimento riconosciuto di quarantena per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la partenza e sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova

sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il BHV-1 (virus intero), effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 5, su un campione prelevato almeno 21 giorni dopo l'inizio della quarantena". Al punto 3 si stabilisce che "gli operatori spostano bovini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi un programma di eradicazione approvato per la diarrea virale bovina solo se gli animali sono conformi alle prescrizioni di cui all'articolo 10 e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) se gli animali provengono da uno stabilimento indenne da diarrea virale bovina, i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da diarrea virale bovina; ii) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi un programma di eradicazione approvato per la diarrea virale bovina; iii) lo stabilimento è stato sottoposto, con esito negativo, a un regime di prove di cui all'allegato IV, parte VI, capitolo 1, sezione 2, punto 1, lettera c), punto ii) o punto iii), del Reg Del UE 2020/689 nei 4 mesi precedenti la partenza degli animali; iv) gli animali sono stati sottoposti singolarmente a prove per escludere la presenza del virus della diarrea virale bovina prima della partenza; v) gli animali sono destinati a uno stabilimento in cui sono detenuti bovini per la produzione di carne separatamente da bovini di altri stabilimenti e dal quale sono spostati direttamente al macello; b) se provengono da uno stabilimento non indenne da diarrea virale bovina, gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell'antigene o del genoma del virus della diarrea virale bovina effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 6, e i) gli animali sono stati tenuti in uno stabilimento riconosciuto di quarantena per un periodo almeno pari ai 21 giorni precedenti la partenza e, nel caso di femmine gravide, sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus della diarrea virale bovina effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 6, su campioni prelevati almeno 21 giorni dopo l'inizio della quarantena; o ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito positivo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus della diarrea virale bovina effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 6, su campioni prelevati prima della partenza o, nel caso di femmine gravide, prima dell'inseminazione precedente l'attuale gestazione".

L'articolo 15 viene richiamato perché riporta le prescrizioni degli **ovini e caprini donatori**, prima della movimentazione del loro germoplasma: “a) gli animali hanno soggiornato in modo continuativo nello stabilimento per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la partenza, o dalla nascita se di età inferiore a 30 giorni, e durante tale periodo non sono stati a contatto con ovini o caprini detenuti di stato sanitario inferiore o soggetti a restrizioni dei movimenti per motivi di sanità animale oppure con animali detenuti provenienti da uno stabilimento non conforme alle prescrizioni di cui alla lettera b); b) qualsiasi animale che entri nell'Unione da un paese terzo o territorio nei 30 giorni precedenti la partenza degli animali di cui alla lettera a), e sia introdotto nello stabilimento in cui soggiornavano tali animali, è tenuto separato in modo da evitare il contatto diretto e indiretto con tutti gli altri animali dello stabilimento; c) tranne qualora siano spostati conformemente all'articolo 16, gli animali provengono da uno stabilimento indenne da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* con o senza vaccinazione di ovini e caprini; e i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da infezione da *Brucella* per quanto riguarda la popolazione ovina e caprina; o ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell'infezione da *Brucella* effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 1, su un campione prelevato nei 30 giorni precedenti la partenza e, in caso di capi femmine nel periodo del post-parto, prelevato almeno 30 giorni dopo il parto; o iii) gli animali hanno un'età inferiore a 6 mesi; o iv) gli animali sono castrati; d) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di infezione da virus della rabbia negli animali terrestri detenuti nei 30 giorni precedenti la partenza; e) gli animali provengono da uno stabilimento intorno al quale, in un raggio di almeno 150 km, nei due anni precedenti la partenza non sono stati segnalati casi di infezione da virus della malattia emorragica epizootica negli animali detenuti delle specie elencate per tale malattia; f) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di carbonchio ematico negli ungulati nei 15 giorni precedenti la partenza; g) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di surra (*Trypanosoma evansi*) nei 30 giorni precedenti la partenza e, qualora provengano da uno stabilimento in cui sono stati segnalati casi di surra nei due anni precedenti la partenza, dopo l'ultimo focolaio lo stabilimento interessato è

rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché: i) gli animali infetti non sono stati allontanati dallo stabilimento; e ii) gli animali rimanenti nello stabilimento non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca della surra effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 3, su campioni prelevati almeno 6 mesi dopo che gli animali infetti sono stati allontanati dallo stabilimento; h) tranne qualora siano spostati conformemente all'articolo 17, gli animali soddisfano almeno una delle prescrizioni per l'infezione da virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24) di cui all'allegato V, parte II, capitolo 2, sezione 1, punti da 1 a 3, del Reg Del UE 2020/689; i) le condizioni di cui agli articoli 32 e 33 sono soddisfatte, ove applicabili. 2. Gli operatori spostano ovini detenuti verso un altro Stato membro solo se in conformità alle prescrizioni di cui al paragrafo 1 e se gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*) nei 42 giorni precedenti la partenza. 3. Gli operatori spostano caprini detenuti verso un altro Stato membro solo se in conformità alle prescrizioni di cui al paragrafo 1 e se gli animali provengono da uno stabilimento in cui è stata effettuata la sorveglianza per l'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* sui caprini detenuti nello stabilimento conformemente all'allegato II, parte 1, punti 1 e 2, almeno nel corso dei 12 mesi precedenti la partenza e durante tale periodo i) nello stabilimento di cui al paragrafo 1, lettera a), sono stati introdotti solo caprini provenienti da stabilimenti che applicano le misure di cui al presente paragrafo; ii) qualora siano stati segnalati casi di infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* nei caprini detenuti nello stabilimento, sono state adottate misure conformemente all'allegato II, parte 1, punto 3.

L'articolo 19 al punto 1 stabilisce che “gli operatori spostano **suini** detenuti verso un altro Stato membro solo se sono soddisfatte le seguenti prescrizioni: a) gli animali hanno soggiornato in modo continuativo nello stabilimento per un periodo almeno pari ai 30 giorni precedenti la partenza, o dalla nascita se di età inferiore a 30 giorni, e durante tale periodo non sono stati a contatto con suini detenuti di stato sanitario inferiore o soggetti a restrizioni dei movimenti per motivi di sanità animale oppure con animali detenuti provenienti da uno stabilimento non conforme alle prescrizioni di cui alla lettera b); b) qualsiasi animale che entri nell'Unione da un paese terzo o

territorio nei 30 giorni precedenti la partenza degli animali di cui alla lettera a), e sia introdotto nello stabilimento in cui soggiornavano tali animali, è tenuto separato in modo da evitare il contatto diretto e indiretto con tutti gli altri animali dello stabilimento; c) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di infezione da virus della rabbia negli animali terrestri detenuti nei 30 giorni precedenti la partenza; d) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di infezione da virus della malattia di Aujeszky nei 30 giorni precedenti la partenza; e) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di carbonchio ematico negli ungulati nei 15 giorni precedenti la partenza; f) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* nei suini nei 42 giorni precedenti la partenza e in cui almeno nel corso dei 12 mesi precedenti la partenza i) sono state applicate misure di biosicurezza e di riduzione dei rischi, anche per quanto riguarda le condizioni di stabulazione e i sistemi di alimentazione, nella misura necessaria ad impedire la trasmissione dell'infezione da *Brucella* dagli animali selvatici delle specie elencate per tale malattia ai suini detenuti nello stabilimento e sono stati introdotti solo suini provenienti da stabilimenti che applicano misure equivalenti di biosicurezza e di riduzione dei rischi; ii) è stata effettuata la sorveglianza per l'infezione da *Brucella* sui suini detenuti nello stabilimento conformemente all'allegato III, punti 1 e 2, almeno nel corso dei 12 mesi precedenti la partenza e durante tale periodo (nello stabilimento di cui alla lettera a) sono stati introdotti solo suini provenienti da stabilimenti che applicano le misure di cui al punto i) o al presente punto; qualora siano stati segnalati casi di infezione da *Brucella* nei suini detenuti nello stabilimento, sono state adottate misure conformemente all'allegato III, punto 3)".

All'articolo 20, punto 1 si stabilisce che "gli operatori spostano suini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da infezione da virus della malattia di Aujeszky solo se sono conformi alle prescrizioni di cui all'articolo 19, non sono vaccinati contro l'infezione da virus della malattia di Aujeszky e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) se gli animali provengono da uno stabilimento indenne da infezione da virus della malattia di

Aujeszky, i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da infezione da virus della malattia di Aujeszky; ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus intero della malattia di Aujeszky effettuata con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 7, su un campione prelevato nei 15 giorni precedenti la partenza. Per i suini di età inferiore a quattro mesi, nati da madri vaccinate con vaccino gE-deleto, può essere utilizzato il metodo diagnostico per la ricerca degli anticorpi contro la glicoproteina E del virus della malattia di Aujeszky di cui all'allegato I, parte 7. Il numero di suini sottoposti a prova deve consentire perlomeno di rilevare una sieroprevalenza della partita del 10 % con il 95 % di confidenza; b) se gli animali provengono da uno stabilimento non indenne da infezione da virus della malattia di Aujeszky, sono soddisfatte le seguenti prescrizioni: i) gli animali sono stati tenuti in uno stabilimento riconosciuto di quarantena per un periodo di almeno 30 giorni; ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus intero della malattia di Aujeszky effettuata con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 7, su campioni prelevati in due occasioni ad almeno 30 giorni di intervallo, di cui l'ultimo prelevato nei 15 giorni precedenti la partenza". Al punto 2 viene stabilito che "gli operatori spostano suini detenuti verso un altro Stato membro o una sua zona aventi un programma di eradicazione approvato per l'infezione da virus della malattia di Aujeszky solo se in conformità alle prescrizioni di cui all'articolo 19 e purché siano soddisfatte le prescrizioni di cui alla lettera a) o alla lettera b): a) se gli animali provengono da uno stabilimento indenne da infezione da virus della malattia di Aujeszky, i) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi lo status di indenne da infezione da virus della malattia di Aujeszky; ii) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o una sua zona aventi un programma di eradicazione approvato per l'infezione da virus della malattia di Aujeszky; iii) gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus intero della malattia di Aujeszky o degli anticorpi contro la glicoproteina E del virus della malattia di Aujeszky, ove applicabile, effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 7, su un campione prelevato nei 15 giorni precedenti la partenza. Il numero di

81

suini sottoposti a prova deve consentire perlomeno di rilevare una sieroprevalenza della partita del 10 % con il 95 % di confidenza; b) se gli animali provengono da uno stabilimento non indenne da infezione da virus della malattia di Aujeszky, sono soddisfatte le seguenti prescrizioni: ( i) gli animali sono stati tenuti in uno stabilimento riconosciuto di quarantena per un periodo di almeno 30 giorni; ii) gli animali sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca degli anticorpi contro il virus intero della malattia di Aujeszky o degli anticorpi contro la glicoproteina E del virus della malattia di Aujeszky, ove applicabile, effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 7, su campioni prelevati in due occasioni ad almeno 30 giorni di intervallo, di cui l'ultimo prelevato nei 15 giorni precedenti la partenza)".

L'articolo 22 al punto 1 stabilisce: "Gli operatori spostano **equini** in un altro Stato membro solo se sono soddisfatte le seguenti prescrizioni: a) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di surra (*Trypanosoma evansi*) nei 30 giorni precedenti la partenza o, qualora provengano da uno stabilimento in cui sono stati segnalati casi di surra nei 2 anni precedenti la partenza, dopo l'ultimo focolaio lo stabilimento interessato è rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché: i) gli animali infetti non sono stati allontanati dallo stabilimento; ii) gli animali rimanenti nello stabilimento non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca della surra effettuata con uno dei metodi diagnostici di cui all'allegato I, parte 3, su campioni prelevati almeno sei mesi dopo che l'ultimo animale infetto è stato allontanato dallo stabilimento; b) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di durina nei sei mesi precedenti la partenza o, qualora provengano da uno stabilimento in cui sono stati segnalati casi di durina nei due anni precedenti la partenza, dopo l'ultimo focolaio lo stabilimento interessato è rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché: i) gli animali infetti non sono stati abbattuti e distrutti o macellati, o gli equini maschi infetti interi non sono stati sottoposti a castrazione; e ii) gli equini rimanenti nello stabilimento, ad eccezione degli equini maschi castrati di cui al punto i), non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca della durina effettuata con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 8, su campioni prelevati almeno sei mesi dopo il

completamento delle misure di cui al punto i); c) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di anemia infettiva equina nei 90 giorni precedenti la partenza o, qualora provengano da uno stabilimento in cui sono stati segnalati casi di anemia infettiva equina nei 12 mesi precedenti la partenza, dopo l'ultimo focolaio lo stabilimento interessato è rimasto soggetto a restrizioni dei movimenti finché: i) gli animali infetti non sono stati abbattuti e distrutti o macellati e lo stabilimento non è stato pulito e disinfettato; ii) gli animali rimanenti nello stabilimento non sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell'anemia infettiva equina effettuata con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 9, su campioni prelevati in due occasioni ad almeno tre mesi di intervallo dopo il completamento delle misure di cui al punto i); d) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di encefalomielite equina venezuelana nei sei mesi precedenti la partenza o, qualora provengano da uno stabilimento situato in uno Stato membro o una sua zona in cui sono stati segnalati casi di encefalomielite equina venezuelana negli ultimi due anni, soddisfano le condizioni di cui al punto i) e le condizioni di cui al punto ii) o al punto iii): i) nel periodo almeno pari ai 21 giorni precedenti la partenza, sono rimasti clinicamente sani e qualsiasi animale di cui al punto ii) o al punto iii) che abbia manifestato un innalzamento della temperatura corporea, rilevata quotidianamente, al di sopra dei valori fisiologici è stato sottoposto, con esito negativo, a una prova diagnostica per la ricerca dell'encefalomielite equina venezuelana con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 10, punto 1, lettera a); ii) gli animali sono stati tenuti in quarantena per un periodo di almeno 21 giorni, protetti da attacchi di insetti vettori, e ( sono stati vaccinati contro l'encefalomielite equina venezuelana mediante un primo ciclo vaccinale completo e rivaccinati secondo le indicazioni del fabbricante durante un periodo non inferiore ai 60 giorni e non superiore ai 12 mesi precedenti la data di spedizione; sono stati sottoposti, con esito negativo, a una prova per la ricerca dell'encefalomielite equina venezuelana effettuata con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 10, punto 1, lettera b), su un campione prelevato almeno 14 giorni dopo la data di inizio della quarantena); iii) gli animali sono stati sottoposti una prova per la ricerca dell'encefalomielite equina venezuelana con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 10, punto 1, lettera b), senza incremento del titolo degli anticorpi, effettuata su campioni appaiati

prelevati in due occasioni a 21 giorni di intervallo, di cui il secondo prelevato nei 10 giorni precedenti la data di partenza; a una prova per la ricerca del genoma del virus dell'encefalomielite equina venezuelana effettuata, con esito negativo, con il metodo diagnostico di cui all'allegato I, parte 10, punto 2, su un campione prelevato nelle 48 ore precedenti la partenza, e gli animali sono stati protetti da attacchi di insetti vettori nel periodo dopo il campionamento fino alla partenza; gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di infezione da virus della rabbia negli animali terrestri detenuti nei 30 giorni precedenti la partenza; f) gli animali provengono da uno stabilimento in cui non sono stati segnalati casi di carbonchio ematico negli ungulati nei 15 giorni precedenti la partenza; g) gli animali non sono stati a contatto con animali detenuti delle specie elencate per le malattie di cui alle lettere da a) a f) non conformi alle prescrizioni di cui alle lettere da a) a e) nei 30 giorni precedenti la partenza e non conformi alla prescrizione di cui alla lettera f) nei 15 giorni precedenti la partenza. Al punto 2, in deroga al punto 1, lettere a), b) e c), le restrizioni dei movimenti di cui al paragrafo 1, lettere a), b) e c), si applicano per almeno 30 giorni dopo che l'ultimo animale dello stabilimento delle specie elencate per le rispettive malattie di cui al paragrafo 1, lettere a), b) e c), è stato abbattuto e distrutto o macellato e i locali sono stati puliti e disinfettati”.

L'allegato I prescrive i **metodi diagnostici**. La parte 1 prescrive le prove per l'infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*. Le prove sierologiche per bovini, ovini, caprini e camelidi sono: “a) prove con antigene brucella tamponato; b) prova di fissazione del complemento (CFT); c) ELISA indiretto (I-ELISA); d) metodo di fluorescenza polarizzata (FPA); e) ELISA competitivo (C-ELISA). Le stesse prove si effettuano e per i suini. È inoltre effettuabile la prova di intradermoreazione alla brucellina (BST) per ovini, caprini e suini. La parte 2 prescrive le prove per l'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*) e sono le prove di intradermoreazione alla tubercolina: a) intradermotuberculinizzazione unica (IDT); b) intradermotuberculinizzazione comparativa (IDT comparativa); e tra le prove disponibili per campioni di sangue, la prova del gamma-interferone. La parte 3 prescrive le prove sierologiche per la surra (*Trypanosoma evansi*): a) saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per la

tripanosomiasi; b) saggio di agglutinazione su carta per la tripanosomiasi (CATT) con una diluizione del siero di 1:4. La parte 4 prescrive le prove sierologiche per la leucosi bovina enzootica e sono nel sangue: i) test di immunodiffusione in gel di agar (AGID); ii) ELISA di blocco (B-ELISA); iii) ELISA indiretto (I-ELISA); nel latte: i) ELISA indiretto (I-ELISA). La parte 7 prescrive le prove per i suini per l'infezione da virus della malattia di Aujeszky e sono l'ELISA ADV, che è un'ELISA utilizzato per la ricerca degli anticorpi contro il virus intero della malattia di Aujeszky o contro la sua glicoproteina B (ADV-gB) o glicoproteina D (ADV-gD), per il controllo dei lotti dei kit ADV-gB e ADV-gD o dei kit per il virus intero della malattia di Aujeszky, il siero di riferimento comunitario ADV 1 o i relativi substandard devono essere catalogati come positivi a una diluizione di 1:2. Per i suini di età inferiore a quattro mesi nati da madri vaccinate con vaccino gE-deleto, un'ELISA gE (b), che è un'ELISA utilizzato per la ricerca degli anticorpi contro la glicoproteina E dell'ADV, per il controllo dei lotti, il siero di riferimento comunitario ADV 1 o i relativi substandard devono essere catalogati come positivi a una diluizione di 1:8. La parte 8 richiede per la durina una prova di fissazione del complemento per la durina a una diluizione del siero di 1:5. La parte 9 richiede per l'anemia infettiva equina come prove sierologiche: a) test di immunodiffusione in gel di agar (AGID); b) saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per l'anemia infettiva equina.

L'allegato II alla parte 1 dà le **prescrizioni minime** per un programma pre-movimenti per quanto riguarda l'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*) nei **caprini**. Il paragrafo 1 fornisce il programma di sorveglianza pre-movimenti per la ricerca dell'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* in uno stabilimento ai fini dei movimenti di caprini detenuti verso un altro Stato membro, secondo quanto previsto all'articolo 15, paragrafo 3, deve comprendere almeno i seguenti elementi: a) ispezione *post mortem* di tutti i caprini dello stabilimento macellati; b) esame *post mortem* di tutti i caprini morti di età superiore a 9 mesi, salvo qualora ciò non sia possibile per motivi logistici o non sia necessario per motivi scientifici; c) una visita annuale di sanità animale effettuata da un veterinario; d) prove annuali effettuate, con esito negativo, su tutti i caprini detenuti nello stabilimento a fini di riproduzione. Al paragrafo 2, in deroga al

paragrafo 1, le prove annuali di cui al punto 1, lettera d), non sono necessarie se l'autorità competente ritiene, sulla base di una valutazione del rischio, che il rischio di infezione sia trascurabile nello Stato membro o nella zona e se sono soddisfatte le seguenti condizioni: “a) il programma di sorveglianza pre-movimenti di cui al paragrafo 1 è condotto nello stabilimento da almeno 24 mesi e durante tale periodo nei caprini detenuti nello stabilimento non sono stati segnalati casi di infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis*; b) lo stabilimento è situato in uno Stato membro o in una sua zona indenni da infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* nella relativa popolazione di bovini”. Il paragrafo 3 dice che “se sono stati segnalati casi di infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* nei caprini detenuti nello stabilimento, tali animali possono essere spostati in un altro Stato membro solo una volta che siano stati sottoposti a prove, con esito negativo, tutti i caprini di età superiore a sei settimane detenuti nello stabilimento. Tali prove devono essere effettuate su campioni prelevati non prima di 42 giorni dall'allontanamento dell'ultimo caso confermato e dell'ultimo animale risultato positivo a prove effettuate mediante un metodo diagnostico.

La parte 2 fornisce le **prescrizioni minime** per un programma pre-movimenti per quanto riguarda l'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*) nei camelidi.

Alla parte 3 vengono fornite le prescrizioni minime per un programma pre-movimenti per quanto riguarda l'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*) nei cervidi.

L'allegato VII fornisce le indicazioni sulla validità delle **vaccinazioni antirabbiche** per cani, gatti, furetti e altri carnivori. Tuttavia, per quanto riguarda i donatori queste indicazioni sono al momento sospesi dal Reg Del UE 2023/647.

## **Regolamento Delegato UE 2020/689**

Il Regolamento Delegato (UE) 2020/689 (Reg Del UE 2020/689) integra le disposizioni relative alla **sorveglianza**, ai programmi di **eradicazione** e allo **status di indenne** da malattia per determinate malattie elencate ed emergenti degli animali terrestri, degli animali acquatici e di altri animali di cui al Reg UE 2016/429. Consente di classificare gli animali donatori di germoplasma ritenuti positivi alle prove di laboratorio previste dal Reg Del EU 686/2020; dà indicazione sugli altri animali detenuti nello stabilimento e sugli interventi epidemiologici negli allevamenti di provenienza.

## **Regolamento di esecuzione UE 2020/690**

Il Regolamento di esecuzione (UE) 2020/690 (Reg Ese UE2020/690) della Commissione fornisce le indicazioni per applicare il Reg UE 2016/429 riguardo le malattie elencate oggetto di programmi di sorveglianza dell'Unione, l'**ambito geografico di applicazione** di tali programmi e le malattie elencate per le quali può essere stabilito lo status di indenne da malattia dei compartimenti.

## **Regolamento Delegato UE 2020/692**

Il Regolamento Delegato (UE) 2020/692 (Reg Del UE 2020/692) stabilisce le **norme integrative relative all'ingresso nell'Unione** di partite di determinate specie e categorie di animali, materiale germinale e prodotti di origine animale da paesi terzi o territori o loro zone o, in caso di animali di acquacoltura, da loro compartimenti. Esso stabilisce inoltre norme riguardanti i movimenti e la manipolazione di tali partite dopo l'ingresso nell'Unione. La parte I stabilisce gli obblighi per le autorità competenti degli Stati membri di autorizzare l'ingresso nell'Unione di partite di animali, materiale germinale e prodotti di origine animale delle specie e categorie di

animali di cui alle parti da II a VI (articoli 3 e 4). Sono stabiliti inoltre, gli obblighi degli operatori per quanto riguarda l'ingresso nell'Unione, e i movimenti e la manipolazione dopo l'ingresso, di partite di animali, materiale germinale e prodotti di origine animale di cui alle parti da II a VI (articolo 5). Infine, la parte I stabilisce le prescrizioni generali in materia di sanità animale per l'ingresso nell'Unione, e per i movimenti e la manipolazione dopo l'ingresso, così come le deroghe a tali prescrizioni generali, applicabili a tutte le specie e categorie di animali, materiale germinale e prodotti di origine animale di cui alle parti da II a VI (articoli da 6 a 10). La parte III stabilisce le prescrizioni generali in materia di sanità animale per l'ingresso nell'Unione, i movimenti e la manipolazione dopo l'ingresso, come pure le deroghe a tali prescrizioni, per quanto riguarda il materiale germinale delle seguenti specie e categorie di animali terrestri detenuti: bovini, suini, ovini, caprini ed equini; pollame e volatili in cattività; animali diversi da quelli elencati precedentemente.

## **Regolamento di Esecuzione 2020/999**

Il Regolamento di Esecuzione (UE) 2020/999 (Reg Ese UE 2020/999) stabilisce norme relative al materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Tali norme riguardano le informazioni che gli operatori devono fornire nelle **domande di riconoscimento degli stabilimenti** di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini e i termini entro i quali tali informazioni devono essere trasmesse, come pure i termini entro i quali l'autorità competente deve essere informata dell'eventuale cessazione dell'attività degli stabilimenti di materiale germinale da essa riconosciuti. Inoltre, riguardano le prescrizioni e le specifiche tecniche per la marcatura del materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini, come pure i requisiti operativi relativi alla sua tracciabilità.

Le informazioni che gli operatori devono riportare sono descritte all'articolo 3 del presente regolamento. Gli operatori che intendono avviare uno stabilimento di materiale germinale devono fornire nella domanda di richiesta per quanto riguarda l'operatore, come descritto nel punto a): il nome e l'indirizzo dell'operatore dello

stabilimento di materiale germinale. Le informazioni relative allo stabilimento sono elencate al punto b), ovvero: l'indirizzo; il nome del veterinario del centro o del veterinario del gruppo nominato dall'operatore conformemente all'articolo 4 del Reg Del UE 2020/686; le attività, tra i tipi elencati di seguito, che saranno svolte presso lo stabilimento di materiale germinale (la raccolta, la trasformazione e lo stoccaggio dello sperma, o la raccolta, la trasformazione e lo stoccaggio di embrioni, o la raccolta, la trasformazione e lo stoccaggio di ovociti e la produzione, la trasformazione e lo stoccaggio di embrioni, o la trasformazione e lo stoccaggio di sperma, ovociti o embrioni freschi, refrigerati o congelati, lo stoccaggio di sperma, ovociti o embrioni freschi, refrigerati o congelati); una descrizione delle modalità di trasformazione del materiale germinale e, qualora la totalità o parte della trasformazione debba essere effettuata presso altri stabilimenti di trasformazione di materiale germinale, il nome e i recapiti di tali stabilimenti di trasformazione di materiale germinale; le prescrizioni in materia di biosicurezza per il funzionamento dello stabilimento di materiale germinale (una descrizione della struttura e una planimetria dello stabilimento di materiale germinale; le procedure operative standard per la raccolta, la produzione, la trasformazione, lo stoccaggio e il trasporto di materiale germinale, in funzione del tipo di stabilimento di materiale germinale; le procedure stabilite e le istruzioni impartite dal veterinario del centro o dal veterinario del gruppo per l'attuazione delle prescrizioni in materia di sanità animale e di biosicurezza presso lo stabilimento di materiale germinale; un piano di lotta agli insetti e di derattizzazione; informazioni sul formato della documentazione conservata conformemente all'articolo 8 del Reg Del UE 2020/686; le procedure per la pulizia e la disinfezione delle strutture e delle attrezzature; un piano di emergenza in caso di segni clinici di malattie elencate o di un risultato positivo a una prova per la ricerca di patogeni per gli animali che provocano malattie elencate; un impegno a dare notifica all'autorità competente prima di procedere all'attuazione di eventuali cambiamenti significativi delle prescrizioni in materia di biosicurezza per il funzionamento dello stabilimento di materiale germinale. Al punto c) sono riportate le informazioni da inserire per quanto riguarda il materiale germinale: il tipo di materiale germinale che sarà raccolto, prodotto, trasformato o immagazzinato, precisando se si tratti di sperma, ovociti o embrioni; la specie degli animali donatori, precisando se si tratti di bovini, suini, ovini, caprini o

equini; le condizioni di stoccaggio del materiale germinale, precisando se si tratti di materiale fresco, refrigerato o congelato. La domanda di richiesta deve essere presentata esclusivamente in formato elettronico.

L'articolo 4 riporta i **termini** entro i quali gli operatori sono tenuti a fornire informazioni nelle domande di riconoscimento degli stabilimenti di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini e le informazioni in merito all'eventuale cessazione dell'attività. Ciascuno stato membro stabilisce i termini entro i quali gli operatori sono tenuti a fornire all'autorità competente le informazioni riportate all'art. 3 necessarie al riconoscimento degli stabilimenti, oppure le informazioni in merito all'eventuale cessazione dell'attività di stabilimenti riconosciuti di materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. Inoltre, viene riportato che l'autorità competente è tenuta a informare gli operatori in merito: all'obbligo di fornire le informazioni prescritte dall'articolo 3, riguardo l'eventuale rigetto di una domanda di riconoscimento di uno stabilimento di materiale germinale presentata conformemente all'articolo 3 del Reg Del UE 2020/686. I termini sopra elencati, non superano comunque i 90 giorni prima della data prevista per l'inizio dell'attività da parte dell'operatore presso lo stabilimento di materiale germinale. Infine, salvo diversa indicazione da parte dell'autorità competente, gli eventuali cambiamenti significativi delle prescrizioni in materia di biosicurezza per il funzionamento dello stabilimento di materiale germinale si ritengono approvati entro un termine di 90 giorni a decorrere dalla data in cui l'operatore ha dato notifica di tali cambiamenti.

All'articolo 5 vengono riportate ulteriori prescrizioni e specifiche tecniche per la **marcatore del materiale germinale** di bovini, suini, ovini, caprini ed equini e requisiti operativi relativi alla sua tracciabilità. Al punto 1 viene indicato che gli operatori che appongono un marchio sul materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini, secondo quanto prescritto dall'articolo 121, paragrafo 1, del Reg UE 2016/429, provvedono affinché: “ a) sia apposto un marchio su ciascuna paillette o su ciascun altro contenitore in cui lo sperma, gli ovociti o gli embrioni, separati o meno in singole dosi, sono collocati, immagazzinati e trasportati, conformemente alle

prescrizioni in materia di tracciabilità di cui all'articolo 10 del Reg Del UE 2020/686, come pure alle prescrizioni e alle specifiche tecniche per la marcatura di cui alla parte 1 dell'allegato del presente regolamento; b) siano rispettati i requisiti operativi relativi alla tracciabilità del materiale germinale di cui alla parte 2 dell'allegato". Al punto 2 viene indicato che sulla base delle prescrizioni e delle specifiche tecniche per la marcatura di cui alla parte 1 dell'allegato, ciascuno Stato membro stabilisce le norme, applicate nel proprio territorio, relative alle caratteristiche e alla forma della marcatura apposta sulle paillette e sugli altri contenitori in cui il materiale germinale è collocato, immagazzinato e trasportato, e ne informa la Commissione e gli altri Stati membri.

L'allegato alla parte 1 riporta le prescrizioni e specifiche tecniche per la marcatura delle paillette e degli altri contenitori in cui lo sperma, gli ovociti o gli embrioni sono collocati, immagazzinati e trasportati. Al punto 1 la marcatura apposta sulle paillette e sugli altri contenitori deve essere chiaramente leggibile e tutte le informazioni in essa contenute devono essere stampate o scritte in modo chiaro. Al punto 2 riporta che la marcatura apposta sulle paillette e sugli altri contenitori di cui al punto 1, anche sotto forma di codice, deve comprendere le seguenti informazioni: "a) la data di raccolta o di produzione dello sperma, degli ovociti o degli embrioni, espressa almeno in uno dei seguenti formati: ggmmaa, aammgg, gg/mm/aa, aa/mm/gg, gg.mm.aa, aa.mm.gg.; o, se le condizioni di cui alla parte 2, punto 2, sono soddisfatte in ogni momento, il numero di giorni trascorsi a partire da una data stabilita, espresso in un codice a cinque cifre; b) la specie degli animali donatori; c) i codici di identificazione degli animali donatori, secondo la definizione di cui all'articolo 2, punto 18, del Reg Del UE 2019/2035 della Commissione o, nel caso dei suini, almeno il numero di registrazione unico dello stabilimento di nascita degli animali donatori, secondo la definizione di cui all'articolo 2, punto 15, del medesimo regolamento delegato o, nel caso degli equini, il codice unico, secondo la definizione di cui all'articolo 2, punto 17, del medesimo regolamento delegato; d) il numero di riconoscimento unico o il numero di registrazione unico dello stabilimento di raccolta o produzione, trasformazione e stoccaggio dello sperma, degli ovociti o degli embrioni, che deve comprendere il nome o il codice ISO 3166-1 alpha-2 del paese di origine". Al punto 3 viene riportato che nella marcatura possono essere omesse le informazioni sulla

specie degli animali donatori di cui al punto 2, lettera b), se la specie degli animali donatori può essere determinata sulla base delle informazioni stampate o scritte sulla paillette o su un altro contenitore per quanto riguarda: “a) il numero di riconoscimento unico dello stabilimento di materiale germinale di raccolta o produzione, trasformazione e stoccaggio dello sperma, degli ovociti o degli embrioni, oppure il numero di registrazione unico dello stabilimento di raccolta, trasformazione e stoccaggio dello sperma di ovini e caprini, oppure b) la razza degli animali donatori”. Al punto 4 si riporta che, se un’unica paillette o un unico altro contenitore contiene sperma raccolto da più di un animale donatore o embrioni, e sulla paillette o su tale altro contenitore non vi è spazio sufficiente per stampare o scrivere l’identificazione di ciascun animale donatore, i codici o i numeri di cui al punto 2, lettera c), possono essere riportati sotto forma di codice numerico. Al punto 5 dice che la marcatura apposta sulle paillette e sugli altri contenitori può comprendere qualsiasi altra informazione pertinente (quale il nome degli animali donatori, la razza, l’indicazione del sesso dello sperma sessato o il numero di identificazione individuale dei suini donatori). Al punto 6 indica che in caso di sperma sessato, se lo sperma è stato sessato presso uno stabilimento di trasformazione di materiale germinale, la marcatura apposta sulle paillette e sugli altri contenitori deve comprendere il numero di riconoscimento unico dello stabilimento di trasformazione di materiale germinale nel quale lo sperma è stato sessato. Se sulla paillette o sull’altro contenitore non vi è spazio sufficiente per stampare o scrivere il numero di riconoscimento unico dello stabilimento di trasformazione di materiale germinale, tale numero di riconoscimento unico può essere riportato sotto forma di codice numerico. Il punto 7 riporta che la totalità o parte delle informazioni di cui ai punti da 2 a 6 può essere codificata elettronicamente sulle paillette o sugli altri contenitori.

La parte 2 riporta i requisiti operativi relativi alla **tracciabilità** dello sperma, degli ovociti o degli embrioni. Al punto 1 viene riportato che ciascuna partita di materiale germinale deve essere accompagnata da specifiche che forniscano spiegazioni in merito alla marcatura stampata o scritta sulle paillette e sugli altri contenitori in cui sono collocati lo sperma, gli ovociti o gli embrioni. Al punto 2 viene indicato che il sistema impiegato per indicare la data di raccolta o di produzione dello sperma, degli

ovociti o degli embrioni deve essere riportato nelle specifiche che accompagnano il materiale germinale. Se la data è indicata sotto forma di numero di giorni trascorsi a partire da una data stabilita, espresso in un codice a cinque cifre, occorre precisare tale data. Al punto 3 si indica che, se il materiale germinale è marcato con dei codici tecnici, nelle specifiche bisogna indicare quali sono le informazioni codificate ed a cosa corrispondono tali codici. Infine, al punto 4 viene indicato che, se le paillettes o i contenitori sono identificati con dei codici elettronici, l'operatore responsabile della partita di materiale germinale deve mettere a disposizione un lettore che ne consenta la decodifica.

## **Regolamento di Esecuzione UE 2020/2002**

Il Regolamento di esecuzione (UE) 2020/2002 (Reg Ese UE 2020/2002) fissa le norme concernenti per quanto riguarda la **notifica** nell'Unione e la comunicazione nell'Unione delle malattie elencate, i formati e le procedure per la presentazione e la comunicazione dei programmi di sorveglianza dell'Unione e dei programmi di eradicazione nonché per le domande di riconoscimento dello status di indenne da malattia, e il sistema informatico per il trattamento delle informazioni. Le malattie di categoria E pertinenti ai fini della notifica nell'Unione dei focolai e le informazioni che gli Stati membri devono fornire per la notifica nell'Unione e la comunicazione nell'Unione in merito all'individuazione delle malattie di categoria E. Definisce i termini e la frequenza per la notifica nell'Unione e la comunicazione nell'Unione delle malattie; il formato e la procedura per comunicare alla Commissione i risultati dei programmi di sorveglianza dell'Unione nonché le informazioni, il formato e la procedura per comunicare alla Commissione e agli altri Stati membri i risultati dei programmi di eradicazione; il formato e la struttura dei dati che devono essere inseriti nel sistema informatico per il trattamento delle informazioni per la notifica nell'Unione e la comunicazione nell'Unione delle malattie. Rende noto l'elenco delle regioni di notifica e di comunicazione; il formato e la procedura per la presentazione dei programmi di sorveglianza dell'Unione, per informazione, alla Commissione e

agli altri Stati membri; le informazioni, il formato e i requisiti procedurali per quanto riguarda la presentazione alla Commissione, per approvazione, dei progetti di programmi obbligatori e facoltativi di eradicazione e per quanto riguarda gli indicatori di risultato necessari per valutare l'efficacia dell'applicazione di tali programmi, nonché i formati e le procedure per le domande di riconoscimento dello status di indenne da malattia di tutto il territorio degli Stati membri, o di loro zone e compartimenti, e per lo scambio di informazioni tra gli Stati membri e la Commissione su Stati membri, loro zone e compartimenti indenni da malattia. Infine, definisce le procedure per l'istituzione e l'uso del sistema d'informazione sulle malattie animali (ADIS).

### **Regolamento di Esecuzione UE 2021/404**

Il Regolamento di Esecuzione (UE) 2021/404 (Reg Ese UE 2021/404) stabilisce gli **elenchi di paesi terzi**, territori o loro zone o, in caso di animali di acquacoltura, loro compartimenti, da cui è autorizzato l'ingresso nell'Unione di partite delle specie e categorie di animali, materiale germinale o prodotti di origine animale che rientrano nell'ambito di applicazione del Reg Del UE 2020/692. Gli elenchi e alcune norme generali riguardanti gli elenchi figurano negli allegati da I a XXII del presente regolamento. Questo regolamento stabilisce inoltre le condizioni specifiche e le garanzie in materia di sanità animale per l'ingresso nell'Unione di determinate partite e precisa i modelli di certificati sanitari che devono essere utilizzati dal paese terzo o territorio di origine delle partite.

### **Regolamento di Esecuzione UE 2022/1345**

Il Regolamento di esecuzione (UE) 2022/1345 (Reg Ese UE 2022/1345) stabilisce le norme riguardo le informazioni che gli operatori degli stabilimenti di animali terrestri detenuti e degli incubatoi devono fornire ai fini della **registrazione** dei loro

stabilimenti, come previsto all'articolo 84, paragrafo 1, del Reg UE 2016/429. I tipi di stabilimenti di che detengono animali terrestri che comportano un rischio irrilevante e che gli Stati membri possono esonerare dall'obbligo di registrazione in conformità all'articolo 85 del Reg UE 2016/429. Inoltre, fornisce le informazioni che gli operatori degli stabilimenti di animali terrestri detenuti e degli incubatoi devono fornire nella domanda di riconoscimento dei loro stabilimenti, come previsto all'articolo 96, paragrafo 1, del Reg UE 2016/429.

### **Regolamento Delegato UE 2023/647**

Il Reg Del UE 2023/647 della Commissione del 13 gennaio 2023 reca alcune **modifiche** del Reg Del UE 2020/686, già integrate nell'analisi degli articoli di questa trattazione. Il Reg, modificando alcuni articoli, integra la produzione e manipolazione degli embrioni con quella degli ovociti, essendoci laboratori che non attuano la fecondazione *in vitro*, laboratori che venivano non inclusi nella versione precedente. Elimina o meglio sospende temporaneamente gli articoli che si occupavano di cane e gatto. Integra alcune disposizioni per la peste suina e per la malattia emorragica epizootica.

## **Regolamento UE 2016/1012**

Il Regolamento (UE) 2016/1012 dell'8 giugno 2016 (Reg UE 2016/1012) è la norma europea che stabilisce le **condizioni zootecniche e genealogiche** applicabili alla riproduzione, agli scambi commerciali e all'ingresso nell'Unione di animali riproduttori di razza pura, di suini ibridi riproduttori e del loro materiale germinale. Questo, al punto 10 premette che “la ricerca della competitività nel settore zootecnico non dovrebbe comportare l'estinzione di razze le cui caratteristiche sono adattate a specifici contesti biofisici. Le razze locali, ove il numero di capi che le compone sia troppo ridotto, potrebbero correre il rischio di perdere la diversità genetica. In quanto elemento importante della biodiversità agricola, le risorse genetiche animali rappresentano una base indispensabile per lo sviluppo sostenibile del settore zootecnico e offrono la possibilità di adattare gli animali alle mutevoli condizioni ambientali e di produzione, nonché alle esigenze del mercato e dei consumatori. Gli atti giuridici dell'Unione europea in materia di riproduzione dovrebbero pertanto contribuire alla conservazione delle risorse genetiche animali, alla protezione della biodiversità e alla produzione di prodotti regionali tipici di qualità in base alle caratteristiche qualitative ereditarie specifiche delle razze locali di animali domestici. Gli atti giuridici dell'Unione dovrebbero inoltre promuovere programmi genetici validi per il miglioramento delle razze e, in particolare nel caso di razze a rischio di estinzione o razze autoctone che non sono comunemente diffuse nell'Unione, nonché la conservazione delle razze e della diversità genetica all'interno delle razze e tra di esse.” Inoltre, al punto 21: “nel caso di una razza a rischio di estinzione o di una razza autoctona non comunemente diffusa in uno o più territori dell'Unione, è altresì opportuno che un'autorità competente abbia la facoltà di rifiutare l'approvazione di un ulteriore programma genetico per la medesima razza in ragione del fatto che quell'ulteriore programma genetico impedirebbe l'efficace attuazione del programma genetico esistente, in particolare a causa del mancato coordinamento o scambio di informazioni genealogiche e zootecniche che dia luogo a mancati vantaggi derivanti da una valutazione comune dei dati raccolti sulla razza in questione”. E al punto 23: “se lo scopo del programma genetico è quello di conservare la razza, i requisiti di tale programma potrebbero essere integrati da misure di conservazione *ex situ* e *in situ*”

oppure da qualsiasi altro strumento per il monitoraggio dello status della razza che ne assicuri una conservazione sostenibile a lungo termine.” Ancora, al punto 26 “ove sussista la necessità riconosciuta di mantenere o promuovere lo sviluppo di una razza su un determinato territorio o nel caso di una razza a rischio di estinzione, l'autorità competente stessa dovrebbe avere la possibilità di effettuare, in via temporanea, un programma genetico per la razza in parola purché non esista effettivamente un programma genetico attivo per tale razza. Tuttavia, un'autorità competente che effettui un siffatto programma genetico non dovrebbe più avere questa possibilità se il programma genetico può essere ceduto a un operatore che soddisfa i requisiti necessari per la corretta attuazione di tale programma genetico.” Infine, al punto 27: “Poiché la conservazione delle razze a rischio di estinzione impone la creazione e il riconoscimento di enti selezionatori con un numero limitato di animali riproduttori che partecipano ai loro programmi genetici, è opportuno che le dimensioni della popolazione di riproduttori non sia considerato un requisito essenziale per il riconoscimento di enti selezionatori che si occupano di razze a rischio di estinzione o per l'approvazione dei loro programmi genetici, in particolare poiché il riconoscimento è accordato a livello nazionale”.

Premesso ciò, il seguente regolamento stabilisce le norme zootecniche e genealogiche applicabili agli scambi commerciali di animali riproduttori e del loro materiale germinale, nonché al loro ingresso nell'UE, le norme relative all'iscrizione di animali riproduttori in libri genealogici e all'ammissione alla riproduzione di animali riproduttori e del loro materiale germinale, nonché le norme relative alla prova di *performance* e alla valutazione genetica di animali riproduttori. Questo regolamento si applica agli animali riproduttori e al loro materiale germinale qualora, essi stessi o i discendenti ottenuti dal loro materiale germinale siano destinati a essere iscritti o registrati come animali riproduttori di razza pura in un libro genealogico. Tuttavia, questo regolamento non si applica agli animali riproduttori e al loro materiale germinale quando questi siano destinati a **sperimentazioni tecniche o scientifiche** eseguite sotto la supervisione delle autorità competenti. Quest'ultimo punto è di fondamentale importanza, e inoltre si collega a quanto premesso dal regolamento

stesso per la conservazione delle razze a limitata diffusione o a rischio di estinzione, consentendo in tal modo di operare più rapidamente sulla tutela delle specie stesse.

## Fonti del diritto nazionale

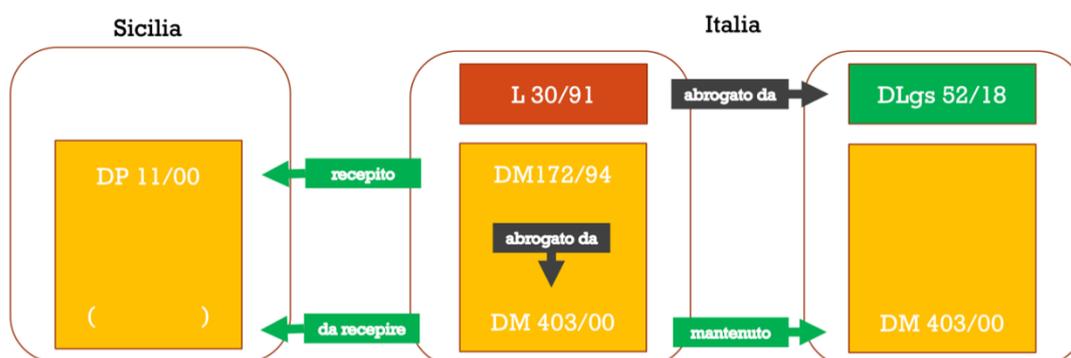


Figura 1. Confronto tra la normativa nazionale e regionale sulla riproduzione animale.

In Italia, la **legge n°30 del 15/01/1991** (L 1991/30) individuava i principi fondamentali relativi al settore della riproduzione animale, ferme restando le funzioni trasferite alle regioni in materia. Tenendo conto dell'art. 117 della Costituzione Italiana, che attribuisce competenza alle regioni ai fini dell'emanazione delle norme legislative, entro i limiti che vengono posti dallo stesso articolo. "Art. 117. - La regione emana per le seguenti materie norme legislative nei limiti dei principi fondamentali stabiliti dalle leggi Stato sempreché le norme stesse non siano in contrasto con l'interesse nazionale e con quello di altre regioni: [...] agricoltura e foreste; artigianato; altre materie indicate da leggi costituzionali. Le leggi della Repubblica possono demandare alla regione il potere di emanare norme per la loro attuazione". La legge stabiliva i requisiti dei soggetti maschi delle specie bovina e bufalina, suina, ovina e caprina ed equina; i quali, per essere abilitati alla riproduzione (sia essa in monta naturale o artificiale), dovevano essere iscritti al libro genealogico, al registro anagrafico ed ai diversi registri come nel caso di equidi e suini. Facevano eccezione ovini e caprini, per cui questi requisiti si applicavano solamente negli allevamenti appartenenti al libro genealogico o al registro anagrafico. L'Art. 6. stabiliva che il Ministero dell'agricoltura e delle foreste, su parere dell'Istituto sperimentale per la zootecnia e sentite le regioni interessate, poteva autorizzare, anche

in deroga ai requisiti l'impiego di riproduttori e di materiali di riproduzione a fini di ricerca e di sperimentazione.

Il **Decreto Ministeriale del 13 gennaio 1994**, n. 172 (DM 172/94) era il regolamento di esecuzione della L 1991/30; in esso sono riportate le disposizioni riguardo la monta naturale pubblica e privata per la riproduzione animale (capo I), l'inseminazione artificiale (capo II), gli embrioni (capo III), la certificazione, raccolta, elaborazione dei dati degli interventi fecondativi (capo IV), la vigilanza e i controlli (capo V), l'importazione ed esportazione di bestiame e del materiale da riproduzione (capo VI). Questo regolamento è oggi abrogato dal DM 403/00. Tuttavia, alcune Regioni, tra cui la Sicilia, hanno emanato norme regionali e circolari basate su questo regolamento e in particolare sugli allegati. Cioè, le Regioni o le autorità competenti invece di aggiornare la modulistica e i requisiti alla luce della normativa italiana e comunitaria, semplicemente continuano ad usare come riferimento quelli del DM 172/94. Questa tendenza per quanto riguarda i requisiti sanitari rischia in molti casi di testare malattie in più (che può essere un comportamento preventivo e prudentiale) rispetto alla normativa vigente (Reg Del 2020/686). Il rischio maggiore è quando i dispositivi regionali o direttamente l'autorità competente richiedano esami e procedure oggi in contrasto con la normativa europea e con gli scenari di diffusione di malattie non contemplate nel DM 172/94, ma oggi considerate prioritarie nell'Unione.

Vengono in particolare richiamati gli allegati per un'analisi più dettagliata. L'allegato I riporta il modello di **certificato per l'intervento fecondativo** (il cosiddetto CIF), che viene rilasciato sia in seguito ad inseminazione artificiale, sia in seguito a monta naturale. L'allegato II riporta, invece, il **certificato di impianto embrionale** che viene rilasciato in seguito ad impianto embrionale. All'allegato III viene fornito invece il modulo di accompagnamento del materiale seminale congelato. Infine, all'allegato IV vi è il certificato di accompagnamento degli embrioni congelati.





ALLEGATO 3

CERTIFICATO ACCOMPAGNAMENTO MATERIALE SEMINALE CONGELATO				
<b>Mittente</b> (rag. soc. e indirizzo.)		<b>Destinatario</b> (rag. soc. e indirizzo.)		
_____		_____		
_____		_____		
Codice fiscale o partita I.V.A.		Codice fiscale o partita I.V.A.		
_____		_____		
<b>Codice A.N.</b> (se centro f.a.)		<b>Codice A.N.</b> (se allevatore)		
_____		_____		
<b>CONTO VENDITA</b> se diverso da destinatario rag. soc. e indirizzo		_____		OPER. PRATICO <input type="checkbox"/>
_____		_____		VETERINARIO <input type="checkbox"/>
Codice fiscale o partita I.V.A.		_____		
_____		_____		
Descrizione Articolo		Importo	Raccolta: data e progressivo dell'eiaculato	N° dosi
Specie e Razza	Matricola LG riproduttore maschio			
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
_____	_____	<input type="checkbox"/>	____ n°	_____
<b>Data</b>		<b>Firma</b> (mittente)		
_____		_____		

Il modulo può essere modificato ma i campi nonché il numero dei caratteri per campo va mantenuto

Figura 4. Allegato III. Certificato di accompagnamento del materiale seminale congelato del DM 172/94.

ALLEGATO 4

CERTIFICATO ACCOMPAGNAMENTO EMBRIONI CONGELATI				
Mittente (rag.soc. e indirizzo.)		Destinatario (rag.soc. e indirizzo.)		
Codice fiscale e partita I.V.A.		Codice fiscale e partita I.V.A.		
Codice A.N. (se centro f.a.)		Codice A.N. (se allevatore)		
CONTO VENDITA se diversi da destinatario rag.soc. e indirizzo.		Codice fiscale e partita I.V.A.		
Specie e Razza	Descrizione Articolata Matricole LG riprodut. maschio 1° riga riprodut. femmina 2° riga	Importato	Data espianto (embrioni espiantati)	N° Embrioni
[ ] [ ]	[ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	[ ] [ ]
[ ] [ ]	[ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	[ ] [ ]
[ ] [ ]	[ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	[ ] [ ]
[ ] [ ]	[ ] [ ]	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	[ ] [ ]
Data		Firma (mittente)		

Il modulo può essere modificato ma i campi nonché il numero dei caratteri per campo va mantenuto

Figura 5. Allegato IV. Certificato di accompagnamento degli embrioni congelati del DM 172/94.

L'allegato 5 riporta le informazioni che devono figurare nei **registri di carico e scarico**. Il punto 1 riporta le informazioni che devono riportare nei registri i centri di produzione del seme e nei recapiti. Queste informazioni sono:” a) numero progressivo della registrazione; b) data della registrazione; c) destinatario o mittente; d) specie e razza; e) matricola del riproduttore maschio; f) identificazione della partita; g) numero delle dosi; h) Paese di provenienza, se importato”. Al punto 2 sono riportate le informazioni indicate nei registri dai gruppi di raccolta e/o dai centri di produzione di

embrioni congelati, che sono: a) numero progressivo; b) data della registrazione; c) destinatario o mittente; d) specie o razza; e) matricola del riproduttore maschio; f) matricola del riproduttore femmina (se presente); g) data dell'espianto; h) numero di embrioni presenti”.

L'allegato VI riporta i **requisiti sanitari per i riproduttori maschi adibiti alla monta naturale pubblica**. Tuttavia, la monta naturale pubblica al giorno d'oggi è in disuso per quasi tutte le specie, fanno eccezione gli equidi, dove le stazioni di monta naturale pubblica e la monta privata trovano ancora largo spazio in materia di riproduzione animale. Vengono qui richiamati i requisiti sanitari relativi agli equini. “Un riproduttore equino, per essere autorizzato alla monta naturale pubblica, deve essere stato sottoposto, almeno 1 volta l'anno e poi, da non oltre 30 giorni dall'utilizzo, con esito negativo, ad accertamento diagnostico per: anemia infettiva, arterite virale, encefalite virale, morbo coitale maligno (durina, *Tripanosoma equiperdum*), morva, metrite equina contagiosa (*Taylorella equigenitalis*), rinopolmonite infettiva (EHV)”. L'encefalite, la morva e la rinopolmonite non sono oggi richieste neanche per la produzione di seme (Reg UE 686/2020), tra l'altro per l'encefalite (gruppo di malattie) la diagnosi è prettamente clinica.

All'allegato VII sono riportati i **requisiti sanitari dei riproduttori destinati ai centri di produzione del seme**. “Un **bovino**, per essere ammesso ad un centro di raccolta dello sperma, deve: a) essere stato sottoposto ad un periodo di isolamento di almeno 30 giorni; b) provenire da un centro genetico per la valutazione dei riproduttori o provenire direttamente da un allevamento riconosciuto dal Ministero delle risorse agricole, alimentari e forestali: ufficialmente indenne da tubercolosi, ufficialmente indenne o indenne da brucellosi, ufficialmente indenne da leucosi bovina enzootica o essere nato da una vacca che sia stata sottoposta, con risultato negativo, ad un test sierologico per la ricerca della leucosi bovina enzootica al massimo 30 giorni prima dell'ammissione dell'animale al centro. Qualora questa esigenza non potesse essere soddisfatta, lo sperma non potrà essere ammesso al commercio prima che il donatore abbia raggiunto i 2 anni di età e sia stato esaminato negativo; c) essere stato sottoposto, prima del periodo di isolamento e da non oltre 30 giorni, con esito negativo, ad

accertamenti diagnostici per: tubercolosi, brucellosi, leucosi bovina enzootica, rinotracheite bovina (IBR), diarrea virale dei bovini (BVD). In deroga al comma precedente può essere consentita l'introduzione di bovini che abbiano dato esito positivo al test diagnostico per la IBR in seguito a vaccinazione. Nel caso in cui nulla osti da parte dell'autorità competente affinché i controlli vengano eseguiti nel luogo di isolamento, il periodo di isolamento decorre a partire dalla data di comunicazione dei relativi esiti; d) durante i 30 giorni d'isolamento gli animali devono essere sottoposti, con esito negativo, ad accertamento diagnostico per: brucellosi, campilobatteriosi, tricomoniasi, IBR. Se qualcuna delle prove dovesse risultare positiva, l'animale dovrebbe essere immediatamente allontanato; e) aver subito un trattamento contro la leptospirosi con due iniezioni di streptomina (25 mg/kg p.v.) ad un intervallo di 14 giorni; f) non presentare sintomi clinici di malattia il giorno dell'ammissione e provenire da una stazione d'isolamento che al giorno della consegna risponda ufficialmente alle condizioni seguenti: essere situata al centro di una zona, del raggio di 10 Km, nella quale, per almeno 30 giorni, non si siano manifestati casi di afta epizootica, essere indenne, almeno da 3 mesi, da afta epizootica e brucellosi, essere indenne, almeno da trenta giorni, da BVD, encefalite spongiforme bovina, febbre catarrale maligna, leucosi bovina enzootica, peste bovina, pleuropolmonite essudativa contagiosa, IBR, tubercolosi; g) essere sottoposti, almeno una volta all'anno, agli accertamenti diagnostici di cui alle precedenti lettere c) e d), ad eccezione dell'accertamento diagnostico per la BVD". In linea di massima, tutte queste prescrizioni sono in linea con il Reg Del Eu 686/2020, ovviamente vanno aggiornate le prove diagnostiche, il riferimento ad eventuali vaccini, l'elenco delle malattie per cui si attua la sorveglianza (lettera f). Il trattamento per la leptospirosi è assolutamente abrogato, in particolare oggi alla luce delle problematiche di antibioticoresistenza. Mancano le prescrizioni (incluse le prove sierologiche) per la febbre catarrale, la malattia emorragica e l'afta. Il regolamento contempla separatamente il bufalo, sebbene con prescrizioni quasi sovrapponibili. Oggi, in base alla definizione di bovino (art. 2, Reg Del EU 2020/686), il **bufalo** viene assolutamente equiparato per prescrizioni sanitarie.

Per gli **equini** (e gli **asini**, sempre secondo l'art. 2, Reg Del EU 2020/686) il regolamento prescriveva. “Un equino, per essere ammesso ad un centro di raccolta dello sperma, deve: a) essere stato sottoposto, prima del periodo di isolamento di 30 giorni e da non oltre 30 giorni, con esito negativo, salvo quanto diversamente stabilito da provvedimenti del Ministero della Sanità in ordine a specifici piani di profilassi e/o eradicazione, agli accertamenti diagnostici per: anemia infettiva, arterite virale, encefalite virale, morbo coitale maligno, morva, metrite equina contagiosa, rinopolmonite infettiva. Nel caso in cui nulla osti da parte dell'autorità competente affinché i controlli vengano eseguiti nel luogo d'isolamento, il periodo d'isolamento decorre a partire dalla data di comunicazione dei relativi esiti. Se qualcuna delle prove dovesse risultare positiva, l'animale dovrebbe essere immediatamente allontanato; b) non presentare sintomi clinici di malattia il giorno dell'ammissione e provenire da una stazione di isolamento che al giorno della consegna sia rimasta indenne, almeno da 30 giorni, da anemia infettiva, arterite virale, encefaliti virali, metrite contagiosa, morbo coitale maligno, morva, peste equina, rinopolmonite infettiva, salmonellosi (*S. abortus equi*); c) essere sottoposti, almeno una volta l'anno, agli accertamenti diagnostici di cui alla precedente lettera a)”. Tutto l'articolo deve essere rivisto alla luce del Reg Del EU 2020/686, in quanto si riferisce ad uno solo dei 3 scenari previsti dall'attuale normativa. Nuovamente si fa riferimento a test diagnostici non più necessari (encefalite virale, morva, rinopolmonite infettiva), sebbene inclusi nella lista di malattie da sorvegliare.

Per gli **ovini** e i **caprini** il regolamento prescriveva: “un ovino o un caprino, per essere ammesso ad un centro di raccolta dello sperma, deve: a) essere stato sottoposto ad un periodo di isolamento di almeno 30 giorni; b) provenire da un allevamento ufficialmente indenne da brucellosi; c) essere stato sottoposto, prima del periodo di isolamento di trenta giorni e da non oltre trenta giorni, con esito negativo, agli accertamenti diagnostici per: agalassia contagiosa (*Mycoplasma agalatae*), artrite-encefalite virale della capra, brucellosi, scrapie, visna-maedi, aborto enzootico (*Chlamydia abortus*). Nel caso in cui nulla osti da parte dell'autorità competente affinché i controlli vengano eseguiti nel luogo di isolamento, il periodo di isolamento decorre a partire dalla data di comunicazione dei relativi esiti. Se qualcuna delle prove

dovesse risultare positiva, l'animale deve essere immediatamente allontanato; d) non presentare sintomi clinici di malattia il giorno dell'ammissione e provenire da una stazione di isolamento che al giorno della consegna risponda ufficialmente alle condizioni seguenti: essere situata al centro di una zona, del raggio di 10 km, nella quale, per almeno 30 giorni, non si siano manifestati casi di afta epizootica, essere indenni, almeno da 3 mesi, da afta epizootica e brucellosi, essere indenni, almeno da 30 giorni, da aborto enzootico, adenomatosi polmonare, agalassia contagiosa, artrite encefalite virale della capra, *blue tongue*, peste dei piccoli ruminanti, scrapie, vaiolo, visna-maedi; e) essere sottoposti, almeno una volta all'anno, agli accertamenti diagnostici di cui alla precedente lettera c)”. Tutto questo paragrafo va rivisto alla luce del Reg Del EU 2020/686. Oggi non sono necessarie prove per agalassia contagiosa (*Mycoplasma agalatae*), artrite-encefalite virale della capra, visna-maedi, aborto enzootico (*Chlamydia abortus*). Mancano le prescrizioni (incluse le prove sierologiche) per la *B. ovis*, febbre catarrale, la malattia emorragica e l'afta. Per la scrapie esiste una normativa specifica, che in breve stabilisce che tutti i riproduttori siano genotipizzati per eliminare genotipi non resistenti alla malattia (DM 2015/25).

Per i **suini** il regolamento prescriveva: “tutti i verri ammessi in un centro riconosciuto di raccolta dello sperma, devono: a) essere stati sottoposti ad un periodo di isolamento di almeno 30 giorni in installazioni rispondenti ai requisiti di cui alla successiva lettera f) e riconosciute dalle autorità dello Stato membro ed in cui si trovano solamente verri che sono almeno dello stesso stato sanitario; b) essere stati scelti, prima dell'isolamento di cui sopra, da aziende: ufficialmente indenni da peste suina classica, indenni da brucellosi, nelle quali nessun animale vaccinato contro l'afta epizootica sia stato presente nei 12 mesi precedenti, nelle quali nessuna manifestazione clinica sierologica o virologica della malattia di Aujeszky sia stata osservata nei 12 mesi precedenti, che non formino oggetto di divieti, per quanto riguarda la peste suina africana, l'esantema vescicolare dei suini, la malattia di Teschen e l'afta epizootica. Gli animali non possono essere stati presenti precedentemente in allevamenti di stato sanitario inferiore; c) essere stati sottoposti, prima dell'isolamento di cui alla lettera a) e durante i 30 giorni precedenti, con risultati negativi, agli accertamenti diagnostici per: brucellosi, peste suina classica. Nel caso in cui nulla osti da parte dell'autorità

competente affinché i controlli vengano eseguiti nel luogo di isolamento, il periodo di isolamento decorre a partire dalla data di comunicazione dei relativi esiti; d) essere stati sottoposti, durante gli ultimi 15 giorni del periodo di isolamento, agli accertamenti diagnostici, con esito negativo, per: brucellosi, peste suina classica, afta epizootica, malattia di Aujeszky. Fatte salve le disposizioni applicabili in caso di peste suina e afta epizootica, se qualcuna delle prove di cui sopra risulti positiva, l'animale deve essere immediatamente allontanato dai locali di isolamento. Nel caso di isolamento in gruppo, l'autorità competente prende le misure necessarie per permettere che gli animali restanti siano ammessi al centro di raccolta secondo le procedure previste dal presente regolamento. Gli animali possono essere ammessi al centro di raccolta solo dopo esplicito permesso del veterinario responsabile del centro. Tutti i movimenti in entrata ed in uscita devono essere registrati; e) aver subito un trattamento contro la leptospirosi con due iniezioni di streptomina (25 mg/kg p.v.) ad un intervallo di 14 giorni; f) essere esenti da sintomi clinici di malattia il giorno dell'ammissione e provenire da una stazione di isolamento che, al giorno della consegna, risponda ai seguenti requisiti: essere situata al centro di una zona, del raggio di 10 km, nella quale per almeno 30 giorni non si siano manifestati casi di afta epizootica e di peste suina, essere indenni, almeno da 3 mesi, da afta epizootica e brucellosi, essere indenni, almeno da 30 giorni, dalla malattia di Aujeszky, nonché da malattia vescicolare dei suini, morbo di Teschen, peste suina africana, peste suina classica; g) essere sottoposti, con esito negativo, alle seguenti prove: nel caso di suini non vaccinati, prova di sieroneutralizzazione o test Elisa con impiego di tutti gli antigeni virali, nel caso di suini vaccinati con vaccino privato di glicoproteina I, test Elisa per gli antigeni GI per quanto riguarda la malattia di Aujeszky". "Tutti i verri presenti da più di 12 mesi nel centro di raccolta devono essere sottoposti alle prove di cui ai punti I. e II. Al più tardi 18 mesi dopo la loro ammissione. Fatte salve le disposizioni applicabili in caso di peste suina e afta epizootica, se qualcuna delle prove di cui sopra risulti positiva, l'animale deve essere isolato ed il suo sperma raccolto dopo la data dell'ultima prova negativa non può essere commercializzato. Lo sperma raccolto da tutti gli altri animali del centro dalla data della prova positiva è immagazzinato separatamente e non può essere commercializzato sinché non sia stato ripristinato lo stato sanitario del centro". Tutto questo paragrafo va rivisto alla luce

del Reg Del EU 2020/686. Le prove di laboratorio e i riferimenti ai vaccini vanno aggiornati. In quarantena l'intervallo delle prove è di 21 giorni e non di 15. Oggi non sono necessarie prove per l'afta, sono richieste misure di controllo di ordine superiore. Mancano le prescrizioni (incluse le prove sierologiche) per la malattia respiratoria e riproduttiva dei suini. Il trattamento per la leptospirosi è assolutamente abrogato, in particolare oggi alla luce delle problematiche di antibioticoresistenza.

L'allegato VIII elenca i **requisiti sanitari per la raccolta dello sperma**. Al punto 1 lo sperma deve provenire da animali che: a) non mostrino segni di malattia il giorno della raccolta; b) non siano stati vaccinati contro l'afta epizootica; c) immediatamente prima della raccolta abbiano soggiornato presso un centro riconosciuto di raccolta dello sperma per un periodo continuo di almeno 30 giorni; d) non vengano ammessi alla monta naturale; e) si trovino presso centri di produzione dello sperma che siano rimasti indenni da afta epizootica da 3 mesi almeno prima della raccolta fino a 30 giorni dopo la raccolta e che siano situati al centro di una zona del raggio di 10 km nella quale per almeno 30 giorni non si siano verificati casi di afta epizootica; f) abbiano soggiornato presso centri di produzione dello sperma che siano rimasti indenni, nel periodo compreso fra 30 giorni prima della raccolta e 30 giorni dopo la raccolta, dalle seguenti malattie: per i bovini, afta epizootica, brucellosi, diarrea virale bovina, encefalite spongiforme bovina, febbre catarrale maligna, leucosi bovina enzootica, peste bovina, pleuropolmonite essudativa contagiosa, IBR, tubercolosi; per i suini, afta epizootica, brucellosi, malattia vescicolare dei suini, morbo di Teschen, peste suina africana, peste suina classica; per i bufali, afta epizootica, *blue tongue*, brucellosi, clamidiosi, BVD, febbre della vallata del Rift, febbre Q, leptospirosi, leucosi bovina enzootica, peste bovina, piroplasmosi, pleuropolmonite essudativa contagiosa, IBR, tricomoniasi, tubercolosi, vibriosi genitale; per gli equini, anemia infettiva, arterite virale, encefaliti virali, metrite contagiosa, morbo coitale maligno, morva, peste equina, rinopolmonite infettiva, *S. abortus equi*; per gli ovini e caprini, aborto enzootico, adenomatosi polmonare, afta epizootica, agalassia contagiosa, artrite encefalite virale della capra, *blue tongue*, brucellosi, peste dei piccoli ruminanti, scrapie, vaiolo, visna-maedi. Anche questo paragrafo va rivisto alla luce del Reg Del EU 2020/686, per quanto riguarda tempi, malattie e prescrizioni relative.

Al punto 2 sono elencati gli **antibiotici** che possono essere aggiunti alle seguenti concentrazioni nello sperma diluito definitivo (500 U.I. per ml di streptomina; 500 U.I. per ml di penicillina; 150 micron per ml di lincomicina; 300 micron per ml di spectinomicina). È possibile anche usare una concentrazione diversa di antibiotici con effetto equivalente contro campilobatteri, leptospire e micoplasmi. Subito dopo l'aggiunta degli antibiotici lo sperma diluito deve essere tenuto ad una temperatura di almeno 5°C per non meno di 45 minuti. Al punto 3 lo sperma destinato agli scambi intracomunitari deve: “a) essere immagazzinato nelle condizioni previste dal presente regolamento per un periodo minimo di trenta giorni prima della spedizione; b) essere trasportato in recipienti puliti, disinfettati e sterilizzati prima dell'impiego ed opportunamente sigillati e numerati, prima della loro uscita dal locale di immagazzinamento riconosciuto”. Tutte le indicazioni relative a tipo, dosaggio di antibiotico o eventuali tempistiche per garantire l'azione battericida vanno assolutamente riviste alla luce della normativa (Reg Del EU 2020/686) e delle nuove indicazioni disponibili per gli antibiotici utilizzati.

All'allegato IX sono elencati i **requisiti sanitari per la raccolta ed il trattamento di embrioni**. Al punto 1 vengono fornite le indicazioni in merito ai prodotti di origine animale utilizzati nella raccolta e per il trattamento degli embrioni e nel mezzo di trasporto, questi devono provenire da fonti che non comportano rischi per la salute degli animali o subiscono, prima dell'uso, un trattamento tale da prevenire eventuali rischi, ed inoltre: “a) l'agente criogeno non è stato impiegato in precedenza per altri prodotti di origine animale; b) ogni embrione viene lavato almeno 10 volte in uno speciale bagno per embrioni che deve essere rinnovato ogni volta e che, salvo decisione contraria in applicazione della lettera f), deve contenere tripsina, conformemente alle procedure internazionalmente riconosciute. Ogni bagno deve avere un grado di diluizione 100 volte superiore al bagno precedente e ad ogni passaggio deve essere utilizzata una micropipetta sterile; c) dopo l'ultimo lavaggio ogni embrione deve essere sottoposto ad esame microscopico su tutta la superficie in modo da constatare se la zona pellucida è intatta e priva di qualsiasi sostanza aderente; d) ogni partita di embrioni che ha superato con successo l'esame di cui alla lettera c) è collocata in un recipiente sterile munito di un contrassegno conformemente all'art.

26, lettera h), che viene immediatamente sigillato; e) ove occorra, ogni embrione è quanto prima congelato e immagazzinato in un locale sottoposto al controllo del veterinario del gruppo e soggetto ad ispezione regolare da parte del veterinario ufficiale; f) conformemente a quanto previsto dalle norme comunitarie sarà elaborato un protocollo relativo ai liquidi di lavaggio e di sciacquo autorizzati, alle tecniche di lavaggio e, se necessario, ai trattamenti enzimatici, nonché al mezzo di conservazione autorizzato per il trasporto. Fino all'adozione di un protocollo relativo ai trattamenti enzimatici, le norme nazionali relative all'impiego di tripsina rimangono applicabili, nel rispetto delle disposizioni generali del trattato; g) ogni gruppo di raccolta di embrioni deve sottoporre ad analisi ufficiali per la ricerca di infezioni batteriche e virali campioni di sciacquo di liquidi di lavaggio, di embrioni disgregati e di ovuli non fecondati, prelevati nel corso delle sue attività. La procedura relativa alla campionatura ed all'esecuzione delle analisi, nonché le norme che devono venir rispettate, sono stabilite con decreto del Ministro della Sanità. Il non rispetto di dette norme comporta la revoca dell'autorizzazione regionale.” Il presente allegato non è in contrasto con la normativa europea, mancano solo i riferimenti agli embrioni micromanipolati.

L'allegato X si riferisce ai **requisiti sanitari degli animali donatori di embrioni**. Ai fini della raccolta di embrioni, gli animali donatori devono soddisfare le seguenti condizioni: “a) essere rimasti nel territorio dello Stato o nel territorio della Comunità o del Paese terzo di raccolta nei 6 mesi precedenti la raccolta in un allevamento che soddisfi alle condizioni stabilite al presente regolamento nel caso di animali destinati alla produzione di sperma; per la specie bovina è obbligatorio che: provengano da un allevamento ufficialmente indenne da leucosi bovina enzootica o che non abbia presentato negli ultimi 3 anni, alcun segno clinico riferibile a leucosi bovina enzootica; non abbiano presentato, nell'anno precedente, alcun segno clinico riferibile a IBR; b) nei 6 mesi precedenti la raccolta degli embrioni gli animali donatori abbiano soggiornato in periodi successivi in non più di 2 diverse mandrie di stato sanitario inferiore. Il giorno in cui vengono prelevati gli embrioni occorre che gli animali donatori siano detenuti in una azienda che non sia oggetto di misure di interdizione o quarantena e che non presenti segni clinici di malattia. L'allegato va completamente

rivisto per tempi, definizioni, malattie in accordo al Reg Del EU 2020/686. I requisiti, inoltre, nella vigente normativa sono diversificati per specie.

Il **Decreto Ministeriale del 19 luglio 2000, n. 403** (DM 403/00) è il nuovo regolamento esecutivo della L 1991/30 che ha abrogato il DM 172/94. Questo regolamento pur riferendosi ad una norma abrogata è di fatto mantenuto in vigore dal Dlgs 52/18 (art. 15). Tuttavia, la Corte costituzionale, con sentenza 13 - 28 luglio 2004, n. 283 (in G.U. 1<sup>a</sup> s.s. 04/08/2004, n. 30), "dichiara che non spetta allo Stato disciplinare [...] la materia della riproduzione animale nelle Province autonome di Trento e di Bolzano" e pertanto annulla il DM 403/00 per queste provincie, che hanno una propria disciplina. La stessa richiesta non è stata ad oggi avanzata dalla regione Sicilia. Il DM 403/00 dà le indicazioni in materia di: monta naturale pubblica e privata, stazioni di inseminazione artificiale (IA) equina pubblica, inseminazione artificiale (impianti, centri di produzione, recapiti, pratica dell'IA), embrioni, certificati di intervento fecondativo (CIF), controlli, *import-export* di animali o materiale germinale. Il primo capo tratta della monta naturale pubblica e privata, al secondo capo, invece, sono trattati i requisiti per le stazioni di inseminazione artificiale e naturale equina.

Il capo 3 riporta le tematiche dell'inseminazione artificiale. L'articolo 10 individua gli impianti adibiti alla **produzione e distribuzione di materiale seminale** per l'inseminazione artificiale. I centri di produzione dello sperma provvedono alla raccolta, preparazione, controllo, confezione, conservazione e distribuzione ai recapiti del materiale seminale. Per il solo materiale seminale fresco e refrigerato, considerate le caratteristiche di conservazione, è ammessa la distribuzione diretta alle aziende agricole, ai medici veterinari ed agli operatori pratici di inseminazione artificiale. I centri genetici sono equiparati, limitatamente all'esercizio dell'attività di valutazione genetica, ai centri di produzione dello sperma. Nei centri di produzione di materiale seminale equino è possibile provvedere, previa espressa autorizzazione, anche all'inseminazione delle fattrici con materiale seminale fresco ivi prodotto. I recapiti sono dei centri che provvedono alla conservazione e alla ridistribuzione del materiale seminale congelato e degli embrioni congelati forniti, rispettivamente, dai centri di

produzione dello sperma e dai centri di produzione degli embrioni, con i quali sono collegati anche ai fini della responsabilità circa l'impiego del seme e degli embrioni.

L'articolo 11 riporta le informazioni pertinenti riguardo le autorizzazioni dei **centri di produzione seme**, al punto 1 definisce che questi possono operare esclusivamente previa concessione di un'autorizzazione, rilasciata dalla regione competente per territorio. Le regioni prevedono le modalità di presentazione delle domande di autorizzazione, che devono comunque contenere: "a) nome e cognome, dati anagrafici, codice fiscale, partita IVA e residenza del richiedente o denominazione, sede, partita IVA e generalità complete del legale rappresentante, se trattasi di persona giuridica; b) nome e cognome, dati anagrafici, codice univoco nazionale ed indirizzo del veterinario responsabile della gestione sanitaria del centro; c) ubicazione e descrizione dei fabbricati ed impianti, corredate da prospetto dei locali e attrezzature, con allegata pianta planimetrica e relativi estremi catastali; d) elenco dei recapiti collegati; e) indicazione dei riproduttori presenti (specie e razza); f) informazioni specifiche sull'organizzazione tecnica e commerciale per la produzione e la distribuzione del materiale seminale. Al punto 2 viene riportato che le regioni attribuiscono a ciascun centro di produzione un numero di codice univoco a livello nazionale. Al punto 3 a regione può revocare l'autorizzazione qualora il centro si renda inadempiente agli obblighi previsti dall'articolo 13, oppure vengano meno una o più condizioni prescritte per il rilascio dell'autorizzazione medesima. Le regioni comunicano al Ministero delle politiche agricole e forestali e al Ministero della sanità l'elenco dei centri autorizzati e di quelli revocati. Il Ministero delle politiche agricole e forestali, annualmente, provvede a divulgare l'elenco dei centri di produzione dello sperma operanti, distinti per singola specie. Il punto 4, infine, riferisce che l'autorizzazione fa riferimento esplicito alla persona del titolare, al tipo di impianto, alla ubicazione del medesimo ed alle specie trattate. Da un confronto tra l'articolo 11 e il Reg ESE UE 2020/999, non emergono contraddizioni, ma utili integrazioni.

L'articolo 12 fa riferimento ai **requisiti dei centri di produzione dello sperma**. Questi affinché siano autorizzati devono: "a) essere posti, in permanenza, sotto la direzione sanitaria di un veterinario responsabile; b) essere in possesso di un

certificato della azienda sanitaria locale di competenza, dal quale risulti che sono garantite le necessarie misure di igiene e sanità. c) disporre di :1) adeguati locali o strutture di stabulazione rispondenti alle disposizioni per il benessere degli animali, con possibilità di isolamento degli animali stessi; 2) un ambiente per il prelievo del materiale seminale, comprendente un locale separato per la pulizia, la disinfezione e la sterilizzazione delle attrezzature; 3) un locale per il trattamento e la confezione del materiale seminale; 4) un locale per la conservazione del materiale seminale; 5) servizi igienici per il personale ed un locale ad uso spogliatoio. d) Essere recintati in modo da prevenire qualsiasi contatto con animali che si trovano al di fuori del centro; e) essere strutturati in modo che i locali di stabulazione siano materialmente separati dai locali di trattamento del materiale seminale e che entrambi siano separati dal locale di conservazione del materiale seminale; f) disporre di una sorveglianza che impedisca l'accesso alle persone non autorizzate. Eventuali visite al centro dovranno avvenire nel rispetto delle condizioni stabilite dal veterinario responsabile della gestione sanitaria del centro medesimo; g) disporre di personale tecnicamente competente, adeguatamente addestrato ai procedimenti di disinfezione ed alle tecniche igieniche per il controllo della propagazione delle malattie; h) essere costruiti in modo che i locali di stabulazione degli animali e quelli di raccolta, di trattamento e di immagazzinamento dello sperma possano essere agevolmente puliti e disinfettati; i) disporre di locali o ambienti di isolamento privi di comunicazione diretta con quelli destinati alla normale stabulazione dei riproduttori; l) disporre, qualora si provveda ai sensi dell'articolo 10, all'inseminazione di fattrici con materiale seminale equino fresco, di un locale situato in prossimità degli altri ambienti, ma non comunicante con essi, destinato agli accertamenti relativi allo stato sanitario dell'apparato genitale delle fattrici ed, eventualmente, alla terapia, nonché di locali idonei alla inseminazione”.

L'articolo 13 fa riferimento agli **obblighi dei centri di produzione dello sperma**. I centri di produzione dello sperma hanno l'obbligo di:” a) vietare il ricovero nella stessa struttura di stabulazione di animali di specie diverse; tuttavia, sono ammessi altri animali domestici assolutamente necessari al funzionamento normale del centro di produzione, sempreché essi non presentino alcun rischio di infezione per gli animali delle cui specie lo sperma deve essere raccolto, e soddisfino le condizioni stabilite dal

veterinario responsabile della gestione sanitaria del centro. Qualora il centro sia stato autorizzato a produrre materiale seminale di specie diverse, le rispettive strutture di stabulazione e di prelievo del materiale seminale, nonché le relative attrezzature di raccolta e di trattamento, devono essere nettamente separate; b) allevare esclusivamente riproduttori maschi autorizzati all'inseminazione artificiale o giovani riproduttori ammessi ad una prova di valutazione genetica, anche nel caso di produzione per conto terzi; c) uniformarsi alle prescrizioni emanate dalle competenti autorità sanitarie, in materia di profilassi e polizia veterinaria; d) denunciare la comparsa nei propri animali di qualsiasi malattia infettiva o diffusiva; e) seguire le norme sanitarie in materia di prelievo, preparazione e conservazione del materiale seminale stabilite dal Ministero della sanità; f) comunicare alla regione competente l'eventuale sostituzione del veterinario responsabile della direzione sanitaria dell'impianto; g) rendere pubbliche le tariffe del materiale seminale di ciascun riproduttore e comunicarle tempestivamente alla regione competente; h) annotare su apposito registro, per ciascuno dei riproduttori presenti: specie, razza, data di nascita, identificazione, malattie riscontrate, vaccinazioni praticate e controlli effettuati sul materiale seminale; i) tenere un registro con l'indicazione giornaliera del materiale seminale prelevato da ciascun riproduttore, con l'indicazione delle dosi valide prodotte per ciascuna partita. Per il materiale seminale congelato deve essere indicato, inoltre, il numero identificativo di ciascuna partita (tenere un registro cronologico di carico del materiale seminale prodotto e di scarico del materiale seminale in uscita, distinguendo il materiale seminale fresco da quello refrigerato e da quello congelato. Nello stesso registro deve essere registrato il carico e lo scarico del materiale seminale proveniente da altri centri di produzione); m) distribuire il materiale seminale esclusivamente in fiale o altri contenitori sigillati e riportanti chiare e inamovibili indicazioni sul centro di produzione dello sperma, identificazione della partita (data o giorno progressivo entro anno e anno di raccolta dello sperma), specie, razza o tipo genetico, matricola del riproduttore; n) rilasciare, per ciascuna partita di materiale seminale prodotto od importato, a richiesta degli acquirenti, un certificato attestante, oltre ai dati identificativi della partita medesima, le caratteristiche qualitative rilevate, secondo quanto previsto dall'articolo 37, comma 1; o) rilasciare per ogni atto di vendita di materiale seminale un documento accompagnatorio contenente i dati della

partita (specie, razza, matricola del riproduttore maschio e identificazione della partita) cui il materiale seminale appartiene. Il documento non è necessario qualora dette informazioni siano già contenute nella fattura; p) sottostare a tutti gli obblighi e soddisfare tutti i requisiti previsti per i recapiti, nonché disporre della relativa autorizzazione, qualora distribuiscano direttamente materiale seminale; q) detenere o sottoporre annualmente alle valutazioni genetiche previste dai libri genealogici o registri anagrafici un numero di riproduttori maschi delle specie o razze per le quali si richiede l'autorizzazione, non inferiore al 5% del totale dei riproduttori maschi in prova per le medesime valutazioni genetiche nell'anno precedente, salvo diverse disposizioni previste dal libro genealogico o registro anagrafico in ordine alla valutazione genetica. Per i centri di produzione già in possesso di autorizzazione ai sensi della legge 25 luglio 1952, n. 1009 (L 1952/1009), il numero dei riproduttori da sottoporre a valutazione genetica non può comunque essere inferiore al 3% del totale; r) seguire le procedure atte al controllo qualitativo del materiale seminale, così come disciplinato dall'articolo 37". Al punto 2 viene indicato che i centri di produzione seme possono distribuire dosi eterospermiche di materiale seminale suino fresco o refrigerato, ottenute miscelando il materiale seminale di due verri della stessa razza o tipo genetico, purché entrambi in possesso dei requisiti previsti per l'impiego in inseminazione artificiale pubblica. Dette dosi vengono distribuite in contenitori che recano, al posto della matricola del verro, un codice alfanumerico che, in base alle registrazioni del centro di produzione, permette di risalire all'identità dei 2 verri produttori. Da un confronto tra questi articoli e l'allegato I parte 1 del Reg Del Ue 686/2020, non emergono contraddizioni. Le norme si completano approfondendo scenari differenti.

L'articolo 14 fa riferimento alle **autorizzazioni** che devono avere i centri **recapiti**. "Al paragrafo 1 viene detto che i recapiti possono operare esclusivamente previa concessione di un'autorizzazione rilasciata dalla regione competente per territorio. Ad ogni recapito viene attribuito un numero di codice univoco nazionale. Al paragrafo 2 dice che le regioni possono revocare l'autorizzazione qualora il gestore si renda inadempiente agli obblighi previsti dall'articolo 16, oppure, vengano meno una o più condizioni prescritte per il rilascio dell'autorizzazione medesima. Le regioni

comunicano al Ministero delle politiche agricole e forestali e al Ministero della sanità l'elenco dei recapiti autorizzati e di quelli revocati. Il Ministero delle politiche agricole e forestali annualmente provvede a divulgare l'elenco dei recapiti operanti. Al punto 3 stabilisce che le regioni prevedono le modalità di presentazione delle domande di autorizzazione, che devono comunque contenere: a) nome e cognome, dati anagrafici, codice fiscale, partita IVA. e residenza del richiedente, o denominazione, sede, partita IVA e generalità complete del legale rappresentante se trattasi di persona giuridica; b) ubicazione e descrizione dei fabbricati e relativi estremi catastali; c) elenco dei centri nazionali di produzione dello sperma, dei centri di produzione degli embrioni e dei gruppi di raccolta degli embrioni dai quali provengono rispettivamente il materiale seminale e gli embrioni distribuiti; d) indicazioni specifiche sulla organizzazione della distribuzione”.

L’articolo 15 stabilisce dei requisiti al fine del rilascio dell'autorizzazione, devono:” a) essere diretti da un esperto zootecnico in possesso di un diploma di scuola media superiore o diploma di laurea ad indirizzo agrario o zootecnico, fatti salvi i recapiti già in possesso di autorizzazione regionale ai sensi della L 1952/1009; b) disporre di appositi locali dotati di aspiratori dei fumi di azoto, pareti lavabili e servizi igienici, nonché di contenitori idonei alla conservazione del materiale seminale ed embrioni confezionati”.

L’articolo 16 stabilisce che recapiti hanno l'obbligo di: “a) detenere e distribuire materiale seminale ed embrioni provenienti esclusivamente dai centri nazionali di produzione dello sperma o di embrioni con i quali sono collegati. Il passaggio di materiale seminale o di embrioni tra recapiti è consentito solo se entrambi i recapiti interessati risultano formalmente collegati con il centro di produzione nazionale di origine del materiale riproduttivo scambiato; b) tenere un registro cronologico di carico per il materiale seminale disponibile da cui risulti la relativa provenienza e di scarico per quello distribuito, da cui risultino gli allevamenti acquirenti o i nominativi degli operatori che l'hanno acquistato o ricevuto in deposito per l'impiego esclusivo in azienda; c) comunicare trimestralmente alla regione il numero di dosi di materiale seminale ed embrioni, distinte per riproduttore, distribuite ai vari allevamenti e agli

operatori identificati dal relativo codice; d) rendere pubblico il prezzo a dose di materiale seminale per ciascun riproduttore e comunicarlo alla regione; e) distribuire materiale seminale ed embrionale esclusivamente a: allevatori o loro delegati, direttamente o a domicilio, operatori di cui agli articoli 21 e 31, altri recapiti collegati funzionalmente allo stesso centro secondo quanto previsto alla lettera a); f) rilasciare, per ogni atto di vendita di materiale seminale congelato o di embrioni, un documento accompagnatorio contenente i dati relativi a specie, razza e matricola del riproduttore maschio cui il materiale seminale appartiene. Il documento non è necessario qualora dette informazioni siano già contenute nella fattura. Qualora il trasferimento del materiale seminale o degli embrioni avvenga fra recapiti collegati ai sensi della lettera a), dovranno essere fornite le indicazioni previste per i centri all'articolo 13, comma 1, lettera o); g) divulgare e mettere a disposizione dei veterinari, dei tecnici e degli allevatori le pubblicazioni ufficiali aggiornate delle associazioni nazionali allevatori di specie e razza, relative alle valutazioni genetiche dei riproduttori italiani, nonché gli elenchi dei riproduttori esteri approvati per l'uso in Italia; h) consentire il libero accesso nei locali del recapito al personale incaricato della vigilanza, il quale può effettuare le verifiche ed i controlli del materiale seminale a qualsiasi titolo commercializzato". Riguardo i recapiti di cui agli articoli 14-16, la normativa europea non fa esplicito riferimento a queste strutture. Si potrebbe fare un parallelismo con i centri di stoccaggio di materiale germinale, tuttavia rispetto ai recapiti, c'è una differenza in termini di autorizzazioni e funzioni. In particolare, il centro di stoccaggio di materiale germinale è sotto la responsabilità di un veterinario del centro, a differenza dei recapiti che possono essere sotto la tutela di un esperto zootecnico in possesso di un diploma di scuola media superiore o diploma di laurea ad indirizzo agrario o zootecnico. Lo stesso DM ribadisce la dimensione tipicamente nazionale del recapito, che non ha tra le funzioni la movimentazione del materiale germinale tra i paesi europei ed extraeuropei.

L'articolo 18 stabilisce i **requisiti dei riproduttori maschi** destinati alla riproduzione artificiale. Al paragrafo 1 viene detto che "il riproduttore maschio, per essere adibito alla produzione di materiale seminale da utilizzare in inseminazione artificiale, deve soddisfare le seguenti condizioni: a) essere iscritto nella sezione "riproduttori maschi"

del libro genealogico o del registro anagrafico della razza di appartenenza o in un registro dei suini riproduttori ibridi. L'iscrizione è attestata dal certificato genealogico o anagrafico, rilasciato dall'associazione degli allevatori o dall'ente che tiene i suddetti libri o registri; b) aver superato con esito positivo le valutazioni genetiche, per l'ammissione alla inseminazione artificiale, programmate ed organizzate dalle associazioni degli allevatori o dall'ente competente che tiene il libro o registro, o essere stato ammesso ad una prova di valutazione genetica, qualora trattasi di un giovane riproduttore. In questo ultimo caso, l'utilizzazione del materiale seminale è consentita nei limiti quantitativi necessari per la realizzazione, da parte dell'associazione degli allevatori o dell'ente competente, delle prove medesime; c) essere identificato, qualora trattasi di bovini, bufalini, ovini, caprini e suini con le modalità previste” dalla normativa vigente (Reg UE 2019/2035); “d) disporre di un certificato di accertamento dell'ascendenza basato sull'analisi del gruppo sanguigno o altro metodo adeguato, rilasciato dall'associazione degli allevatori o dall'ente competente che tiene il libro genealogico o il registro; e) essere in possesso delle certificazioni sanitarie, rilasciate dalle aziende sanitarie locali, che attestino i requisiti stabiliti dal Ministero della sanità; f) essere sottoposto, almeno due volte l'anno, agli accertamenti sanitari effettuati a cura delle aziende sanitarie locali, che attestino l'assenza di malattie infettive e diffuse, a norma delle vigenti disposizioni di polizia veterinaria e delle ordinanze emanate dal Ministero della sanità; g) provenire da un centro genetico o da altro centro di produzione di pari livello sanitario, oppure essere risultato negativo, prima dell'ammissione al centro, alle prove stabilite dal Ministero della sanità ed effettuate durante l'isolamento di almeno 30 giorni in appositi locali adibiti a quarantena”. La normativa europea riguardo gli animali donatori, nel Reg Del UE 2020/686 (allegato 2), non fa esplicito riferimento ai requisiti genetici di questi, ma dedica un ampio approfondimento ai requisiti sanitari, che invece qui sono rinviate alle “vigenti disposizioni”.

L'articolo 19 stabilisce al paragrafo 1 che la raccolta del materiale seminale destinato alla fecondazione artificiale deve essere effettuata esclusivamente all'interno degli appositi locali del centro di produzione dello sperma. Il riproduttore maschio, durante la permanenza nel centro di produzione dello sperma, non può essere adibito alla

monta naturale. Al paragrafo 2 stabilisce che i giovani riproduttori maschi in attesa dell'esito della valutazione genetica non possono essere spostati dal centro di produzione dello sperma senza preventiva comunicazione all'azienda sanitaria locale competente e, prima di essere riammessi al centro, devono essere sottoposti nuovamente agli accertamenti sanitari previsti per essere adibiti alla inseminazione artificiale.

L'articolo 20 riguarda l'inseminazione artificiale per le **razze autoctone e per i tipi etnici a limitata diffusione**. In merito a questo le regioni, previa comunicazione al Ministero delle politiche agricole e forestali, possono autorizzare, su specifica richiesta dei centri di produzione dello sperma, la raccolta del materiale seminale di riproduttori maschi di razze autoctone e tipi etnici a limitata diffusione, iscritti nell'apposito registro anagrafico, direttamente nelle aziende che li ospitano. L'utilizzo dell'inseminazione artificiale è coordinato dall'Associazione Italiana Allevatori nel quadro dell'attività di recupero e potenziamento promossa per tali razze e tipi etnici dal Ministero delle politiche agricole e forestali o dalle regioni. L'articolo 20, sebbene la normativa europea sia molto più recente può trovare riscontri positivi nell'art. 29 Reg UE 2016/1012 e 45 del Reg Del UE 2020/686.

L'articolo 22 si riferisce alla conservazione del materiale seminale in allevamento. L'allevatore può detenere nella propria azienda materiale seminale esclusivamente per l'inseminazione delle fattrici del proprio allevamento. Egli può rifornirsi di materiale seminale congelato esclusivamente presso un recapito, e di materiale seminale fresco o refrigerato sia presso un recapito, sia presso un centro di produzione. Tuttavia, l'inseminazione artificiale deve comunque provvedere un veterinario o un operatore pratico.

Il tema del capo 4 sono gli **embrioni**. L'articolo 23 definisce le organizzazioni per la raccolta e produzione di embrioni ed oociti. Queste si distinguono in: a) gruppi di raccolta: costituiti da uno o più tecnici o da un gruppo organizzato di tecnici che, sotto la direzione di un veterinario responsabile, provvedono, anche per conto terzi, alla raccolta, al trattamento ed alla conservazione degli embrioni di animali di interesse zootecnico, con esclusione degli embrioni concepiti tramite fecondazione *in vitro*;

provvedono altresì al trasferimento di detti embrioni su fattrici riceventi; b) centri di produzione: costituiti da strutture di laboratorio e da personale qualificato che provvedono al prelievo di oociti di animali di interesse zootecnico, alla loro fecondazione in vitro, alla coltura degli embrioni ottenuti, agli eventuali trattamenti, nonché al congelamento, conservazione e alla distribuzione degli embrioni prodotti tramite i recapiti.

L'articolo 24 fornisce le indicazioni per le **autorizzazioni dei gruppi di raccolta**. “I gruppi di raccolta degli embrioni possono operare esclusivamente previa concessione di una autorizzazione rilasciata dalla regione competente per territorio. Le regioni prevedono le modalità di presentazione delle domande di autorizzazione, che devono comunque contenere: a) nome, cognome, dati anagrafici, codice fiscale, partita IVA e residenza del richiedente o denominazione, sede, partita IVA e generalità complete del legale rappresentante se trattasi di persona giuridica; b) nome e cognome, dati anagrafici, codice univoco nazionale ed indirizzo del veterinario responsabile della gestione sanitaria della raccolta, del trattamento e della conservazione degli embrioni; c) indicazione delle specie trattate; d) indicazione delle attrezzature utilizzate; e) ubicazione e descrizione dei locali del laboratorio stabile con il quale si è collegati ai sensi dell'articolo 26, comma 1, lettera d). Le regioni attribuiscono ad ogni gruppo di raccolta un numero di codice univoco a livello nazionale. Inoltre, le regioni possono revocare l'autorizzazione del gruppo di raccolta e comunicano al Ministero delle politiche agricole e forestali ed al Ministero della sanità l'elenco dei gruppi di raccolta autorizzati e di quelli revocati.

L'articolo 25 fornisce le indicazioni per le **autorizzazioni dei centri di produzione** di embrioni, questi possono operare esclusivamente previa concessione di una autorizzazione rilasciata dalla regione competente per territorio. “Le regioni prevedono le modalità di presentazione delle domande di autorizzazione, che devono comunque contenere: a) nome, cognome, dati anagrafici, codice fiscale, partita IVA. e residenza del richiedente o denominazione, sede, partita IVA e generalità complete del legale rappresentante se trattasi di persona giuridica; b) nome e cognome, dati anagrafici, codice univoco nazionale ed indirizzo del veterinario responsabile della

gestione sanitaria del centro; c) indicazione delle specie trattate; d) informazioni specifiche sull'organizzazione tecnica e commerciale; e) modalità di certificazione degli embrioni prodotti; f) ubicazione e descrizione dei fabbricati, degli impianti, locali ed attrezzature ed allegata pianta planimetrica. Le regioni attribuiscono ad ogni centro di produzione un numero di codice univoco a livello nazionale”. Inoltre, le regioni possono revocare l’autorizzazione del gruppo di raccolta e comunicano al Ministero delle politiche agricole e forestali ed al Ministero della sanità l'elenco dei gruppi di raccolta autorizzati e di quelli revocati. Da un confronto tra l’articolo 24 e 35 e il Reg Ese UE 2020/999, non emergono contraddizioni, ma utili integrazioni.

L’articolo 26 fornisce i **requisiti dei gruppi di raccolta** degli embrioni, ai fini del rilascio dell'autorizzazione: “a) operare stabilmente sotto la direzione di un veterinario responsabile della gestione tecnico-sanitaria del prelievo, del trattamento e dell'immagazzinaggio degli embrioni; b) disporre di strutture di laboratorio fisse o mobili che consentano l'esame, il trattamento ed il confezionamento degli embrioni e comprendano almeno un'area di lavoro, un microscopio ed un impianto criogenico; c) disporre, ove usufruiscano di un laboratorio stabile (di un locale destinato al trattamento degli embrioni, adiacente, ma fisicamente separato, dal luogo di accoglimento degli animali donatori; di un locale o di un ambiente per la pulizia e la sterilizzazione degli strumenti e del materiale utilizzato per il prelievo degli embrioni); d) disporre, ove usufruiscano di un laboratorio mobile, di una parte del veicolo appositamente attrezzata e composta da due aree distinte: una per l'esame ed il trattamento degli embrioni, l'altra per depositarvi le attrezzature ed i materiali che sono stati in contatto con gli animali donatori. Il laboratorio mobile deve sempre essere collegato con un laboratorio stabile, in modo che siano assicurate la sterilizzazione delle attrezzature e la fornitura dei liquidi e degli altri prodotti necessari per il prelievo ed il trattamento degli embrioni; e) essere in possesso di un certificato dell'azienda sanitaria locale di competenza, dal quale risulti che sono garantite le necessarie misure di igiene e sanità, [...]”. Questo articolo e i seguenti vanno integrato con la norma di ordine superiore rappresentato dall’allegato I del Reg Del 686/2020.

L'articolo 27 si riferisce ai **requisiti dei centri di produzione** degli embrioni, questi devono: a) operare stabilmente sotto la direzione di un veterinario responsabile della gestione tecnico-sanitaria del prelievo e del trattamento degli oociti, nonché del trattamento e della conservazione degli embrioni prodotti con fecondazione in vitro; b) essere in possesso di un certificato dell'azienda sanitaria locale di competenza dal quale risulti che sono garantite le necessarie misure di igiene e sanità, c) disporre di personale tecnicamente competente, adeguatamente addestrato ai procedimenti di disinfezione ed alle tecniche igieniche per il controllo della propagazione delle malattie; d) disporre di locali per il trattamento degli embrioni privi di comunicazione diretta con quelli destinati alla eventuale stabulazione di animali; e) essere costruiti in modo tale che i locali di trattamento ed immagazzinamento degli embrioni e di eventuale stabulazione di animali possano essere agevolmente puliti e disinfettati; f) non utilizzare un laboratorio situato in una zona dichiarata infetta dalle competenti autorità sanitarie; g) disporre, ove usufruiscano di un laboratorio mobile, di una parte del veicolo appositamente attrezzata e composta da due aree distinte: una per l'esame ed il trattamento degli embrioni, l'altra per depositarvi le attrezzature ed i materiali che sono stati in contatto con gli animali donatori. Il laboratorio mobile deve sempre essere collegato con un laboratorio stabile, in modo che siano assicurate la sterilizzazione delle attrezzature e la fornitura dei liquidi e degli altri prodotti necessari per il prelievo ed il trattamento degli embrioni.

L'articolo 28 fa riferimento agli **obblighi per i gruppi di raccolta** di embrioni, questi hanno l'obbligo di: a) uniformarsi alle prescrizioni emanate dalle competenti autorità sanitarie in materia di profilassi e polizia veterinaria; b) seguire le norme sanitarie in materia di raccolta, trattamento e immagazzinaggio degli embrioni stabilite dal Ministero della sanità; c) comunicare alla regione competente l'eventuale sostituzione del veterinario responsabile della direzione sanitaria del gruppo; d) tenere un registro di carico e scarico per gli embrioni raccolti, impiantati e immagazzinati sia presso lo stesso gruppo di raccolta, sia presso l'allevamento delle donatrici; e) conservare gli embrioni esclusivamente in fiale o altri contenitori sigillati e riportanti chiare ed inamovibili indicazioni su: numero di codice del gruppo di raccolta, data di raccolta degli embrioni, specie, razza o tipo genetico, matricola

dei donatori. In caso di più embrioni in un singolo contenitore, gli embrioni medesimi debbono provenire tutti dallo stesso intervento fecondativo; f) rilasciare, per ogni atto di raccolta per conto terzi o di vendita di embrioni, un documento accompagnatorio dell'embrione contenente i dati identificativi della partita: specie, razza, numero di identificazione, o matricola nel caso degli equini, della donatrice e del riproduttore maschio; g) rilasciare, a richiesta degli acquirenti, per ciascun embrione o gruppo di embrioni di un medesimo contenitore, un certificato attestante, oltre i dati identificativi dell'embrione o degli embrioni medesimi, le caratteristiche qualitative rilevate secondo quanto previsto dall'articolo 37, comma 2; h) certificare, su appositi moduli forniti dalle regioni, l'intervento di trasferimento embrionale, indicando la data, specie, razza o tipo genetico e matricola dei donatori, specie, razza o tipo genetico e matricola, se presente, della ricevente, nonché generalità del proprietario della stessa; i) non operare in zona dichiarata infetta dalla competente autorità sanitaria; l) provvedere alla sterilizzazione delle attrezzature che vengono a contatto con gli embrioni o con gli animali donatori durante la raccolta, nonché, prima dell'uso, dei contenitori per il magazzinaggio e il trasporto.

L'articolo 29 definisce gli **obblighi per i centri di produzione** di embrioni, questi hanno l'obbligo di: “a) uniformarsi alle prescrizioni emanate dalle competenti autorità sanitarie in materia di profilassi e polizia veterinaria; b) seguire le norme sanitarie in materia di raccolta, trattamento e immagazzinaggio degli oociti e degli embrioni stabilite dal Ministero della sanità; c) comunicare alla regione competente l'eventuale sostituzione del veterinario responsabile della direzione sanitaria del centro; d) annotare, su apposito registro dei prelievi, per ciascuna donatrice di oociti: specie, razza, codice di identificazione e, se trattasi di animale vivo, stato sanitario riscontrato al momento del prelievo; e) tenere un apposito registro di laboratorio con l'indicazione giornaliera delle fecondazioni in vitro effettuate, con l'indicazione degli embrioni prodotti e del materiale seminale utilizzato; f) tenere un registro di carico degli embrioni prodotti e di scarico degli embrioni in uscita; g) rilasciare, per ogni atto di raccolta per conto terzi o di vendita di embrioni, un documento accompagnatorio dell'embrione contenente i dati identificativi della partita: specie,

razza, numero di identificazione, o matricola nel caso degli equini, della donatrice e del riproduttore maschio; h) distribuire gli embrioni esclusivamente in fiale o altri contenitori sigillati e riportanti chiare ed inamovibili indicazioni su: codice di identificazione del centro di produzione di embrioni, data di raccolta degli embrioni, specie, razza o tipo genetico, matricola del padre e della madre. In caso di più embrioni in un singolo contenitore, gli embrioni medesimi debbono provenire tutti dallo stesso intervento fecondativo; i) rilasciare, a richiesta degli acquirenti, per ciascun embrione o gruppo di embrioni di un medesimo contenitore un certificato attestante, oltre i dati identificativi dell'embrione o degli embrioni medesimi, le caratteristiche qualitative rilevate secondo quanto previsto dall'articolo 37, comma 2; l) sottostare a tutti gli obblighi e soddisfare tutti i requisiti previsti per i recapiti, nonché disporre della relativa autorizzazione, qualora distribuiscano direttamente embrioni; m) provvedere alla sterilizzazione delle attrezzature per l'asportazione ed il trasporto delle ovaie. Dette attrezzature devono essere usate esclusivamente per tale scopo”.

L'articolo 30 (**requisiti dei donatori**) al paragrafo 1 stabilisce che gli embrioni, esclusi quelli concepiti tramite fecondazione *in vitro*, devono: “a) provenire dalla fecondazione di un oocita di femmina iscritta al libro genealogico, o registro anagrafico, con materiale seminale di riproduttore autorizzato alla inseminazione artificiale; tale requisito non è richiesto per le razze autoctone ed i tipi etnici a limitata diffusione, presi in considerazione nel quadro dell'attività di recupero e potenziamento promossa dal Ministero delle politiche agricole e forestali o dalle regioni; b) provenire da animali donatori che soddisfino i requisiti sanitari stabiliti dal Ministero della sanità”. Il paragrafo 2 riguarda gli oociti per la successiva fecondazione *in vitro*, questi devono: “a) provenire da femmina o gruppi di femmine iscritte nei libri genealogici o registri anagrafici, o da femmina non iscritta ai suddetti libri o registri, purché di razza chiaramente riconoscibile; b) essere fecondati *in vitro* con materiale seminale di riproduttore autorizzato alla inseminazione artificiale; tale requisito non è richiesto per le razze autoctone ed i tipi etnici a limitata diffusione; c) essere prelevati da donatrici provenienti da allevamenti situati in zone non dichiarate infette dalle competenti autorità, e, comunque, da donatrici macellate per cause diverse da

quelle di profilassi”. Al paragrafo 3, infine dice che “la certificazione dell'origine degli embrioni raccolti o prodotti provenienti da femmine iscritte nei libri genealogici o nei registri anagrafici è disciplinata dal competente libro o registro”.

L'articolo 31 dà le direttive riguardo la pratica dell'**impianto degli embrioni**. “I veterinari che intendono praticare l'impianto embrionale devono essere iscritti negli appositi elenchi tenuti dalla competente regione, che attribuisce a ciascun iscritto un codice identificativo. Le regioni devono prevedere le modalità di presentazione delle domande di iscrizione, che devono comunque contenere: a) eventuali recapiti a cui si ricorre per la fornitura del materiale embrionale; b) iscrizione all'albo professionale. Le regioni possono sospendere o revocare iscrizione nei suddetti elenchi. I veterinari hanno l'obbligo di: a) rifornirsi di embrioni esclusivamente presso i recapiti autorizzati; b) mantenere in buono stato di conservazione gli embrioni; c) certificare su appositi moduli forniti dalle regioni, l'intervento di impianto embrionale”.

L'articolo 32 riguarda la **conservazione degli embrioni in allevamento**. “L'allevatore può conservare, per l'utilizzazione nella propria azienda, embrioni prelevati nell'azienda medesima dai gruppi di raccolta di cui all'articolo 23 o acquistati presso un recapito. Questi devono essere conservati in un locale dedicato devono essere accompagnati dal documento di cui all'articolo 16, comma 1, lettera f) e di cui all'articolo 28, comma 1, lettera f). L'impianto embrionale deve comunque essere fatto un veterinario ai sensi dell'articolo 31. Infine, l'allevatore può cedere ad altro allevatore embrioni prelevati dai propri animali e conservati nella propria azienda, purché accompagnati dai documenti previsti all'articolo 28, lettera f).

Al capo V gli articoli da 33 a 35 danno le disposizioni riguardo le certificazioni degli interventi fecondativi e degli impianti embrionali. Vengono date le disposizioni riguardo le informazioni, la modulistica e il flusso di informazioni.

Il capo VI dà le disposizioni riguardo vigilanza, controlli di qualità e controlli sanitari.

Il capo VII dà le disposizioni per l'importazione e l'esportazione di bestiame e materiale da riproduzione, ponendo l'attenzione sugli scambi tra paesi terzi.

Infine, il capo VIII fornisce le disposizioni finali. L'articolo 42 al comma 1 dispone che con decreto del Ministero delle politiche agricole e forestali sono predisposti i moduli tipo per la certificazione degli interventi fecondativi e di impianto embrionale, nonché le indicazioni minime che devono essere contenute nei registri di carico e scarico. Al comma 2 dispone che con decreto del Ministero della sanità sono stabiliti requisiti sanitari. Ad oggi questi decreti non sono stati emanati, ecco perché le Regioni continuano ad usare la modulistica e i requisiti del DM 172/94, nonostante, soprattutto per i requisiti, la norma rischi di andare in contraddizione con la normativa europea.

Come anticipato, con l'emanazione del **Decreto Legislativo n° 52 del 2018** (Dlgs 52/18) la L 1991/30 viene abrogata. Il Dlgs 52/18 è una legge quadro che demanda a un regolamento di esecuzione i comportamenti tecnici obbligatori da seguire per un corretto esercizio dell'attività di riproduzione animale naturale e strumentale. La delega all'emanazione di tale regolamento viene demandata al Ministro competente, di concerto con il Ministero della Sanità e sentita la conferenza Stato-Regioni. In particolare, sono affidati alle Regioni compiti specifici in materia di rilascio, revoca e sospensione delle autorizzazioni a gestire: stazioni di monta pubblica e/o privata; centri di produzione di materiale seminale fresco, refrigerato e congelato; stazioni di inseminazione artificiale pubblica per gli equini centri di produzione embrioni; gruppi di raccolta embrioni; recapiti. Sono, inoltre, di competenza delle Regioni: la gestione degli elenchi dei veterinari e degli operatori che esercitano la fecondazione artificiale e il trapianto embrionale; la modulistica relativa alla materia; la raccolta e l'elaborazione dei dati conseguenti. Il cuore del Dlgs 52/18 è racchiuso nel suo primo articolo, che al punto primo dice: "Il presente decreto individua i principi fondamentali della disciplina relativa alle condizioni zootecniche e genealogiche applicabili alla riproduzione animale per il raggiungimento degli obiettivi stabiliti dalla politica agricola comune, in modo da perseguire, omogeneamente sul territorio nazionale, la corretta gestione del patrimonio genetico delle razze di interesse

zootecnico nei settori della riproduzione, selezione, ricostituzione, creazione di nuove razze e conservazione della biodiversità zootecnica, ferme restando le competenze attribuite dall'ordinamento vigente alle regioni e province autonome di Trento e di Bolzano e nel rispetto del principio di separazione tra le attività di miglioramento genetico, di competenza nazionale, e quelle di consulenza, di competenza regionale”.

Al capo I, il presente decreto dà le indicazioni per quanto riguarda libri genealogici, raccolta dati in allevamento, e valutazioni genetiche del bestiame. Le attività di raccolta dati in allevamento, finalizzate anche alla realizzazione di un programma genetico, sono fondamentali per monitorare la consistenza di una razza, nel presente regolamento, vengono indicate le modalità di raccolta, e di gestione degli stessi. L'iscrizione dei soggetti ai libri genealogici, invece, costituisce elemento fondamentale per l'identificazione di una razza e la sua certificazione, requisito fondamentale per il riproduttore.

Il capo II, invece, riguarda esclusivamente la **riproduzione animale**. Come già citato dall'abrogata L 1991/30, in particolare l'Art. 7, definisce gli obblighi dell'utilizzo di soggetti maschi iscritti ai rispettivi libri genealogici sia per la monta naturale, sia per l'inseminazione artificiale, ad eccezione degli ovini e dei caprini, se non partecipano ad un programma genetico. Anche in questo regolamento vengono confermate le rispettive deroghe a regioni e province autonome per “l'impiego per la riproduzione in monta naturale di cavalli e asini stalloni, con esclusione di cavalli da corsa e per sport equestri, che rispondano, per razza e produzione tipica, alle esigenze e all'indirizzo zootecnico locale e per i quali non sia stato approvato un programma genetico.” Mentre “nelle zone di produzione dei muli e dei bardotti, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano possono autorizzare l'impiego di asini stalloni abilitati alla fecondazione di cavalle e di cavalli stalloni abilitati alla fecondazione delle asine”. Riguardo il trapianto embrionale, la presente norma, autorizza lo stesso a condizione che gli embrioni provengano da un padre iscritto al libro genealogico. Al punto 6 dispone che: “Sono vietati l'esercizio della fecondazione in forma girovaga per le specie suina ed equina e la monta pubblica naturale per la specie suina”. Mentre l'articolo 8 dà delle importanti indicazioni sulla

pratica dell'inseminazione artificiale, dando indicazioni su chi può operare. L'Art. 10 recita: "Il Ministero, su parere del Centro di ricerca zootecnia e acquacoltura del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria e sentite le regioni interessate, può autorizzare, anche in deroga a quanto stabilito nell'articolo 7, l'impiego di riproduttori e di materiale di riproduzione animale a fini di ricerca e di sperimentazione." Tale regola risulta fondamentale, per la valutazione dei riproduttori, o ancor di più per la salvaguardia di determinate razze autoctone a rischio estinzione. L'articolo 11 richiama sul rispetto del Reg UE 2016/429.

L'articolo 12 riporta le **sanzioni**. Al primo comma riporta che "è sanzionato chiunque adibisce alla riproduzione animale o utilizza per trapianti, embrioni o altro materiale riproduttivo in modo difforme da quanto previsto nell'articolo 7". Le sanzioni amministrative applicate sono le seguenti: a) il pagamento della somma di 1.032,91 euro per ciascun capo adibito o della somma di 51,65 euro per ogni dose di materiale riproduttivo utilizzata nell'ambito della specie bovina o bufalina; b) il pagamento della somma di 206,58 euro per ciascun capo adibito o della somma di 20,66 euro per ogni dose di materiale riproduttivo utilizzata nell'ambito della specie suina; nei casi di utilizzazione del verro in forma girovaga o in monta pubblica di cui all'articolo 7, comma 6, la sanzione suddetta è aumentata di un terzo per ciascun capo; c) il pagamento della somma di 103,29 euro per ciascun capo adibito o della somma di 10,33 euro per ogni dose di materiale riproduttivo utilizzata nell'ambito della specie ovina e caprina; d) il pagamento della somma di 2.065,83 euro per ciascun capo adibito o della somma di 103,29 euro, per ogni dose di materiale riproduttivo utilizzata nell'ambito della specie equina; in caso di utilizzazione dello stallone in forma girovaga, di cui all'articolo 7, comma 6, la sanzione anzidetta è aumentata di un terzo per ciascun capo" Al secondo comma riporta che "nelle ipotesi in cui il materiale riproduttivo è utilizzato in modo difforme, questo è confiscato e ne viene ordinata la distruzione a spese del contravventore, inoltre, il capo o i capi utilizzati sono sequestrati cautelatamente". Al terzo comma riporta che "le sanzioni amministrative, aumentate di un terzo, si applicano, salvo che il fatto costituisca reato, anche a chiunque impiega, per la riproduzione, animali privi dei requisiti sanitari stabiliti dall'articolo 4 del DM 403/00, nonché a chiunque produce, distribuisce e utilizza

materiale seminale o embrioni privi dei requisiti sanitari stabiliti dagli articoli 18 e 30 del DM 403/00. Al quarto comma viene indicato che: “il responsabile di ciascuno degli Enti selezionatori, che gestisce un programma genetico in difformità dalle prescrizioni in esso contenute è punito con la sanzione amministrativa pecuniaria da 2.582,28 euro a 15.493,71 euro.”. Al quinto comma riporta che le sanzioni di cui ai commi 1 e 2 si applicano alle violazioni dell'articolo 40 del DM 403/00 in materia di requisiti del bestiame e del materiale seminale e controlli ammessi all'importazione e all'esportazione. Al comma sei viene riportato che salvo che il fatto costituisca reato si dispone la sanzione amministrativa pecuniaria nella ipotesi di violazione delle disposizioni del DM 403/00 in materia di: autorizzazioni, in materia di obblighi connessi alla gestione di stazioni di monta, in materia di centri di produzione dello sperma, in materia di recapiti, in materia di gruppi di raccolta, in materia di centri di produzione di embrioni. Queste sono così elencate: a) “la sanzione amministrativa del pagamento di una somma da 774,86 euro a 4.648,11 euro, nell'ipotesi di violazione delle disposizioni in materia di autorizzazioni, di obblighi connessi alla gestione di stazioni di monta, di requisiti e obblighi delle stazioni di inseminazione artificiale di equidi, di requisiti e obblighi di centri di produzione dello sperma e di stoccaggio di materiale germinale, di recapiti, di gruppi di raccolta di embrioni e di centri di produzione di embrioni, di flusso di informazioni relative ai dati degli interventi fecondativi o di impianto embrionale nonché di autocontrollo di qualità del materiale germinale e di qualità del seme bovino e bufalino; b) la sanzione amministrativa del pagamento di una somma da 258,23 euro a 1.549,37 euro nell'ipotesi di violazione delle disposizioni in materia di pratica di inseminazione artificiale nonché del relativo flusso di informazioni da parte di medici veterinari ed operatori pratici”. Il comma 7 fa riferimento agli illeciti amministrativi previsti dal presente decreto, dove si applicano le disposizioni del capo I della legge 24 novembre 1981, n. 689 (L 1981/689), con le seguenti modificazioni:” a) è escluso il pagamento in misura ridotta, salvo che per le infrazioni di cui al comma 4; b) il Presidente della Giunta regionale competente ad applicare le sanzioni ne dà comunicazione al Ministero”.

Infine, l'articolo 15 (disposizioni finali) ricorda che la L 1991/30 viene abrogata, ma non lo sono le norme e i regolamenti che ad essa si riferiscono (DM 403/00), che si intendono riferite alle corrispondenti disposizioni del presente decreto.

Un'ultima recente norma nazionale che merita di essere citata è il **Decreto legislativo 5 agosto 2022, n. 134** (Dlgs 2022/134) sulle disposizioni in materia di sistema di identificazione e registrazione degli operatori, degli stabilimenti e degli animali per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del Reg UE 2016/429, emanata dal Presidente della Repubblica, vista la legge 22 aprile 2021 n. 53 (L 2021/53) recante delega al Governo per il recepimento delle direttive europee e l'attuazione di altri atti dell'Unione europea legge di delegazione europea 2019-2020.

Il presente decreto, all'art. 1 comma 1, detta disposizioni in materia di riorganizzazione del sistema di identificazione e registrazione, di seguito denominato «sistema I&R», in attuazione della parte IV «Registrazione, riconoscimento, tracciabilità e movimenti» del Reg UE 2016/429. Al comma 2 sono elencate le disposizioni ovvero: a) registrazione e riconoscimento degli stabilimenti in cui sono detenuti animali o materiale germinale [...]; b) identificazione e registrazione degli animali detenuti delle specie bovina, equina, ovina, caprina, suina, dei camelidi e dei cervidi, come definiti dal Reg Del UE 2019/2035; c) identificazione, registrazione nella Banca dati nazionale (BDN), e tracciabilità degli animali detenuti, diversi da quelli di cui alla lettera b). La riorganizzazione nazionale del sistema I&R, di cui al comma 3, ha la finalità di: a) assicurare la registrazione e il riconoscimento degli stabilimenti e degli operatori; b) garantire, con le modalità previste per le varie specie e tipologie di animali, la tracciabilità degli animali, del materiale germinale e dei prodotti di origine animale, anche ai fini della trasmissione delle relative informazioni al consumatore finale e ai fini della trasparenza di mercato; c) garantire il supporto per l'applicazione efficace delle misure di prevenzione e controllo delle malattie di cui al regolamento; d) contribuire alla tutela della salute pubblica e del patrimonio zootecnico; e) assicurare la disponibilità delle informazioni alle Autorità competenti e alle amministrazioni pubbliche per lo svolgimento di compiti istituzionali se direttamente connessi al sistema I&R; f) definire le azioni correttive e le sanzioni che

le Autorità competenti devono adottare in caso di violazione delle disposizioni del sistema I&R; g) garantire il supporto dei dati nella BDN, per la programmazione e l'esecuzione dei controlli di sanità pubblica veterinaria e di quelli previsti dalla regolamentazione vigente in materia di erogazione dei premi comunitari.

L'art. 2 del presente regolamento fornisce le **definizioni**, tra tutte viene indicato per la prima volta il **sistema I&R**, ovvero il sistema nazionale di identificazione e registrazione degli operatori e dei trasportatori, delle attività, degli stabilimenti, del materiale germinale, degli animali e dei loro eventi, ai sensi del Reg UE 2016/429 e del presente decreto.

All'articolo 3 vengono designate le **autorità competenti**. Il Ministero della salute è l'autorità veterinaria centrale, insieme ai Servizi veterinari delle regioni, delle Province autonome di Trento e Bolzano, le ASL, e le altre amministrazioni nell'ambito di rispettiva competenza, è l'autorità competenti alla programmazione, esecuzione, monitoraggio e rendicontazione dei controlli ufficiali in materia di sistema I&R, e all'accertamento e contestazione delle relative sanzioni amministrative. Il Ministero della salute, inoltre, si avvale del centro servizi nazionale (CSN) per la gestione tecnica della BDN, per la predisposizione dell'elenco dei fornitori dei marchi auricolari nonché per la predisposizione, anche ai fini delle procedure connesse all'attuazione della «politica agricola comune» (PAC), delle procedure operative per la gestione e l'aggiornamento sistema I&R nonché per la trasmissione informatica dei relativi dati. All'articolo 4 sono fornite le indicazioni relative alle competenze e responsabilità.

L'art. 5 fornisce le indicazioni in materia di **registrazione**. Al comma 1 vengono date le disposizioni agli obblighi per la registrazione degli operatori degli stabilimenti in cui sono detenuti animali o materiale germinale, nonché quelli che effettuano operazioni di raccolta indipendentemente da uno stabilimento ed i trasportatori, prima di iniziare la propria attività secondo le modalità stabilite dal Reg UE 2016/429 [...]. L'operatore registrato deve garantire per la sua attività: “a) la trasmissione delle comunicazioni e l'acquisizione delle autorizzazioni previste dalle vigenti disposizioni, nazionali e locali, prima di avviare la sua attività; b) la custodia e il

133

benessere degli animali, oltre che il rispetto degli obblighi previsti dal regolamento;

c) la comunicazione delle modifiche e cessazioni delle attività registrate, inserendo le informazioni in BDN entro sette giorni dalle variazioni, con le modalità indicate nel manuale operativo, ai fini dell'aggiornamento del registro di cui all'articolo 7”.

L'art. 6 fa riferimento al riconoscimento degli stabilimenti, tra cui gli stabilimenti di materiale germinale per bovini, suini, ovini, caprini ed equini, da cui il materiale germinale di tali animali è spostato in un altro Stato membro, e altri stabilimenti a cui fa riferimento il Reg UE 2016/429. L'operatore prima di iniziare la propria attività, presenta istanza di riconoscimento alla ASL competente per territorio, e con le modalità di cui al manuale operativo ed inizia la propria attività solo dopo che il riconoscimento è stato approvato e registrato in BDN.

L'operatore dello stabilimento che ha ottenuto il riconoscimento, deve garantire per la sua attività: a) la trasmissione delle comunicazioni e l'acquisizione delle autorizzazioni previste dalle vigenti disposizioni, nazionali e locali, prima di avviare la sua attività; b) la custodia e il benessere degli animali, oltre che il rispetto degli obblighi previsti dal Reg UE 2016/429 c) la comunicazione delle modifiche e cessazioni delle attività riconosciute, inserendo in BDN le informazioni entro sette giorni dalle variazioni con le modalità indicate nel manuale operativo, ai fini dell'aggiornamento del registro di cui all'articolo 7. L'articolo 7, infatti, fornisce le indicazioni riguardo il registro nazionale degli operatori e degli stabilimenti in BDN. L'operatore deve garantire la veridicità dei dati forniti e trasmessi in BDN. Le ASL registrano in BDN i dati di propria competenza.

L'articolo 8 riguarda la **documentazione** fornita. In particolare, riguardo gli stabilimenti di materiale germinale, di cui al comma 2, “l'operatore degli stabilimenti di materiale germinale è tenuto all'obbligo di conservazione della documentazione previsto dagli articoli 103 e 106 del Reg UE 2016/429, in formato cartaceo o elettronico, per almeno 3 anni decorrenti dalla data di emissione”. In deroga ai commi da 1 a 5, il comma 6 recita: “sono esentati dall'obbligo di conservare la documentazione: a) gli operatori e i trasportatori per cui tali informazioni sono presenti ed aggiornate in BDN; b) gli operatori degli stabilimenti e i trasportatori che

134

presentano un rischio ridotto di diffusione delle malattie elencate o emergenti, ai sensi degli articoli 103, paragrafo 2, e 104, paragrafo 2, 105, paragrafo 2, 186, paragrafo 2, 188, paragrafo 2, e 190 del Reg UE 2016/429 [...]”.

L'articolo 9 fornisce le indicazioni riguardo l'identificazione e registrazione degli animali e degli eventi. L'articolo 10 fornisce le indicazioni riguardo la tracciabilità di animali oggetto di scambi ed importazioni. Al comma 2, in deroga a quanto previsto dal comma 1, stabilisce che i movimenti di ungulati e pollame oggetto di scambi tra Stati dell'Unione europea possono essere effettuati anche tramite il passaggio in centri di raccolta.

Le fonti del diritto nazionale e l'*Animal Health Law* hanno molti aspetti in comune, d'altra parte possono considerarsi il frutto dell'elaborazione e del perfezionamento delle stesse direttive europee. Tuttavia, la normativa nazionale per certi aspetti può risultare al giorno d'oggi lievemente carente, soprattutto riguardo gli aspetti sanitari. Riguardo gli aspetti burocratici, non si fa esplicito riferimento a trasmissione di domande e modulistiche per mezzo di PEC, tuttavia, questo aspetto può essere gestito dalle autorità competenti per territorio. Ritornando agli aspetti sanitari, i requisiti per l'ammissione alla raccolta di materiale seminale sono stati aggiornati, tenendo in considerazione lo stato epidemiologico attuale, tuttavia, viene lasciata la decisione di aggiungere altri esami qualora lo si ritenesse opportuno. L'aspetto dove si sofferma maggiormente il Reg Del UE 2020/686 sono le prescrizioni in materia di biosicurezza. Oggi, metterle in primo piano ed enfatizzarle è fondamentale, soprattutto in nell'ottica di un mercato e di scambi (comunitari e non) sempre più frequenti e tenendo conto dell'emergenza o, meglio, della possibilità di arrivo di nuove malattie.

## **Normativa siciliana**

In Sicilia, la disciplina della riproduzione animale nel settore zootecnico è regolata dalle norme procedurali per l'attuazione degli adempimenti di competenza della Regione. L'unica norma vigente è il **Decreto Presidenziale della regione Sicilia n. 11 del 6 marzo 2000** (DP 11/00), che recepisce il DM 172/94, e come tale è tecnicamente abrogata poiché fa riferimento ad una norma abrogata. Nessun atto recepisce o non recepisce il Dlgs 52/18 e il DM 403/00 ed eventuali aggiornamenti o modificazioni. Il DP 11/00 ha solo lo scopo di fornire indicazioni pratiche per individuare gli uffici e gli enti responsabili del rilascio delle autorizzazioni e per il flusso delle informazioni. Gli organismi di controllo, in ambito di libri genealogici, dati genetici, CIF, sono indicati nell'Associazione Allevatori della Sicilia (A.R.A.S.), per le specie bovina, bufalina, suina, ovina e caprina, mentre per gli equidi il compito spetta all'Istituto di Incremento Ippico per la Sicilia (I.I.I.), che per la regione provvedono a comunicare i dati relativi ai libri genealogici, dati genetici, e produzioni. Tuttavia, ad oggi con la cessazione dell'ARAS, le sue funzioni sono assolte dall'Istituto Sperimentale Zootecnico della Sicilia (I.S.Z.S.).

Le tematiche principali del DP 11/00 possono essere divise in: monta naturale, inseminazione artificiale, produzione di materiale germinale.

Riguardo la monta naturale pubblica e privata equina, chiunque intenda gestire una stazione di monta naturale equina deve essere autorizzato dall'I.I.I., dopo aver presentato una richiesta in duplice copia, una copia autenticata all'I.I.I. ed una in copia autenticata al settore veterinario dell'ASP competente per territorio. Le istanze devono pervenire all'Istituto entro e non oltre il 15 settembre di ogni anno antecedente a quello di inizio dell'attività. L'ASP, entro 30 giorni dalla data di ricezione della domanda, provvede alla verifica del possesso dei requisiti previsti dalla normativa in materia, comunicandone l'esito all'Istituto. L'I.I.I., rilascerà o meno l'autorizzazione, attribuendo a ciascuna stazione di monta un numero di codice univoco a livello nazionale, comunicando entro 30 giorni all'Assessorato regionale dell'agricoltura e foreste, all'Assessorato regionale della sanità, all'Ispettorato Provinciale per

l'Agricoltura (IPA) competente per territorio, all'ASP competente per territorio, nonché all'A.R.A.S., l'avvenuto rilascio dell'autorizzazione. L'I.I.I. provvede, annualmente, al rilascio del modello CIF (certificato di intervento fecondativo).

I gestori delle stazioni di fecondazione equina, nelle quali opereranno gli stalloni equini o asinini iscritti al libro genealogico o registro anagrafico ed i soggetti di interesse locale entro il 15 settembre di ogni anno antecedente a quello di inizio dell'attività, dovranno inoltrare istanza di rilascio del bollettino CIF, specificando il numero di bollette richieste; tale istanza dovrà essere inoltrata in carta semplice all'I.I.I. ed al settore veterinario dell'ASP competente per territorio. L'ASP, espletate le verifiche di propria competenza, trasmetterà all'I.I.I., entro 30 giorni dalla data di ricezione dell'istanza, apposita certificazione attestante che i soggetti rispondono ai requisiti sanitari.

Riguardo i centri per la produzione di materiale seminale per l'inseminazione artificiale e i recapiti devono essere autorizzati dagli IPA competenti per territorio. Esclusivamente per i centri di produzione e/o distribuzione dello sperma equino, l'autorizzazione viene rilasciata dall'I.I.I. Gli interessati alle autorizzazioni devono presentare apposita richiesta da produrre in duplice copia, di cui una in carta legale ed autenticata all'IPA, o all'I.I.I. ed una in copia autenticata all'ASP competente per territorio. Nei centri di produzione di materiale seminale equino, inoltre, è possibile provvedere, solo su richiesta regolarmente autorizzata dall'I.I.I., anche all'inseminazione delle fattrici con materiale seminale fresco ivi prodotto.

L'ASP, espletate le verifiche di propria competenza, trasmette all'IPA o all'I.I.I. apposita certificazione attestante il possesso dei requisiti previsti dalla normativa vigente (nel regolamento si fa riferimento al DM 172/94, tuttavia essendo stato abrogato bisognerebbe far riferimento alla normativa vigente ovvero al Reg UE 2020/686, piuttosto che al DM 403/00 o Dlgs 52/18). L'IPA o l'I.I.I. in seguito a parere positivo ricevuto dall'ASP rilasciano l'autorizzazione al centro, attribuendo un codice univoco a livello nazionale. Inoltre, entro il 30 novembre di ogni anno, comunicano l'elenco degli impianti autorizzati o revocati all'Assessorato regionale

dell'agricoltura e delle foreste ed all'Assessorato regionale della sanità, che provvederà a sua volta a comunicare i dati al Ministero.

La fecondazione artificiale suina aziendale, di cui all'articolo 6, può essere concessa previa comunicazione all'IPA competente per territorio, all'ASP competente per territorio ed all'A.R.A.S., entro 60 giorni dall'inizio di detta attività, lo svolgimento di tale pratica.

Riguardo le razze autoctone, all'articolo 7 vengono date le direttive per la raccolta di materiale seminale: "l'Assessorato regionale dell'agricoltura e delle foreste, in relazione agli indirizzi zootecnici della Regione, sentito il Ministero delle politiche agricole, può autorizzare, su specifica richiesta dei centri di produzione dello sperma, la raccolta del materiale seminale di riproduttori maschi di razze autoctone e tipi etnici a limitata diffusione, iscritti nell'apposito registro anagrafico, direttamente nelle aziende che li ospitano. Gli interessati alle autorizzazioni devono presentare apposita richiesta da produrre in duplice copia, di cui una in carta legale ed autenticata all'Assessorato regionale dell'agricoltura e delle foreste ed una copia autenticata all'Assessorato regionale della sanità. L'Ispettorato regionale veterinario dell'Assessorato della sanità dispone i controlli previsti, che verranno effettuati dall'ASP competente per territorio. Infine, l'Assessore regionale per l'agricoltura e le foreste, viste le risultanze dell'istruttoria effettuata dagli uffici competenti, provvede al rilascio o al diniego dell'autorizzazione dandone notifica agli interessati".

La pratica della fecondazione artificiale è regolamentata dall'art. 8, come da normativa nazionale possono praticarla i veterinari e gli operatori pratici. Questi devono essere iscritti in appositi elenchi tenuti dall'ASP competente per territorio che attribuirà a ciascun iscritto uno specifico codice identificativo univoco a livello nazionale. Le richieste di iscrizione in detti elenchi devono essere presentate al settore veterinario dell'ASP competente per territorio, in carta legale ed autenticate e complete della documentazione richiesta.

All'art. 9 sono date le specifiche per la produzione, raccolta, conservazione e distribuzione degli embrioni e/o oociti "Le organizzazioni adibite alla produzione,

raccolta, conservazione e distribuzione degli embrioni e/o oociti devono essere autorizzate dagli IPA competenti per territorio. Gli interessati devono presentare una richiesta in duplice copia di cui una all'IPA ed una copia all'ASP competente per territorio. L'ASP, espletate le verifiche di propria competenza, trasmette all'IPA apposita certificazione attestante il possesso dei requisiti previsti dalla normativa vigente in materia. Infine, l'IPA, viste le risultanze dell'istruttoria eseguita dall'ASP, provvede al rilascio o al diniego dell'autorizzazione, avendo cura altresì di attribuire a ciascuna organizzazione un numero di codice univoco a livello nazionale".

L'articolo 11 dispone le modalità operative relative al flusso d'informazioni. "Il responsabile della certificazione e della registrazione dei dati degli interventi fecondativi o del trasferimento di embrioni, entro 60 giorni dalla data di compilazione, deve trasmettere la parte di modulo all'uopo predisposta all'A.R.A.S. - ufficio provinciale, che provvede alle incombenze previste" dalla vigente normativa, "effettuando altresì la trasmissione dei dati elaborati all'Assessorato regionale dell'agricoltura e delle foreste ed all'Ispettorato veterinario dell'Assessorato regionale della sanità. I dati aggregati a livello regionale dall'A.R.A.S. sono trasmessi dall'Assessorato regionale dell'agricoltura e delle foreste, ogni anno, entro i 120 giorni successivi, al Ministero delle politiche agricole. I centri di produzione dello sperma, i recapiti, i centri di produzione di oociti ed embrioni devono trasmettere all'Assessorato regionale dell'agricoltura e delle foreste, relativamente a ciascun semestre dell'anno ed entro i 30 giorni successivi, i dati riassuntivi di cui ai registri", previsti dalla normativa. "I dati aggregati a livello regionale sono trasmessi dall'Assessorato regionale dell'agricoltura e delle foreste, ogni semestre, entro i 90 giorni successivi, al Ministero delle politiche agricole, all'Assessorato regionale della sanità ed all'A.R.A.S.". Tuttavia, come anticipato, venendo a mancare la figura dell'A.R.A.S. e considerato alcune difficoltà operative dell'I.S.Z.S., il flusso delle informazioni a loro destinate viene dirottato alle Associazioni Nazionali di razza che detengono i libri genealogici.

I controlli di qualità, (già previsti dal DM 172/94) sono affidati all'Istituto sperimentale Lazzaro Spallanzani, mentre per i controlli sanitari le ASP competenti per territorio, avvalendosi anche della collaborazione tecnico-scientifica dell'Istituto

zooprofilattico sperimentale per la Sicilia "A. Mirri", esercitano i controlli e gli accertamenti previsti. Infine, all'art. 14 viene fatto divieto di commercializzazione e obbligo di distruzione del materiale seminale difforme.

La **circolare 1032/S-287/A** (C 1032/S-287/A) emanata il 21.09.2000 dall'Assessorato della sanità e dall'Assessorato dell'agricoltura e delle foreste contiene le modalità operative non specificate nel DP 11/00. Anch'essa è tecnicamente abrogata, ma contiene istruzioni e allegati operativi, come per esempio i moduli per le domande di autorizzazione, sebbene questi devono essere aggiornati per quanto riguarda i destinatari e soprattutto alla luce della normativa europea.

Infine, l'I.I.I. pubblica sul suo sito il **Regolamento di stalloneria privata** (I.I.I. 2017), di cui si ha l'ultima versione aggiornata al 2017, rappresenta una *soft law* che riprende essenzialmente tutta la normativa esaminata. Interessa solo gli equidi ed è il riferimento operativo cui conviene riferirsi per la modulistica.

## **Sostegno alle razze autoctone**

L'allevatore che alleva razze autoctone riceve un contributo specifico. Fino al 2022, Il PSR Sicilia prevedeva la cosiddetta misura 10.1, nel nuovo Complemento di Programmazione per lo Sviluppo Rurale Sicilia (CPSRS, 2023), che è per l'appunto un dispositivo regionale di complemento alla PAC 2023-2027, l'intervento corrispondente è il **SRA14 - ACA14 - Allevatori custodi dell'agrobiodiversità**. L'intervento si inserisce nell'ambito della strategia UE sulla biodiversità che rappresenta uno dei pilastri di attuazione del *Green Deal* Europeo. L'intervento prevede un sostegno ad UBA (minimo richiesto 2 UBA per allevamento) a favore dei beneficiari che si impegnano volontariamente nella conservazione delle risorse genetiche animali locali soggette a rischio di estinzione o di erosione genetica. L'utilizzo ai fini produttivi di queste razze può contrastare infatti il depauperamento o la perdita delle stesse, comportando al tempo stesso una riduzione della redditività causata da maggiori costi e/o minori ricavi per gli allevatori. Pertanto, l'importo del pagamento annuale è calcolato su tale base, in relazione al numero di UBA allevate. L'intervento ha anche lo scopo di incrementare il numero di beneficiari che si impegnano nell'opera di conservazione con la finalità di tutelare la biodiversità animale. La Regione Siciliana per il seguente intervento, ai sensi del Reg UE 2021/2115 art. 70 comma 6 lettera b), prevede un periodo di impegno di durata di 5 anni. L'intervento può essere collegato con l'intervento SRA30 "Benessere animale", e ciò dà un maggiore ristoro agli allevatori. I beneficiari sono le aziende ma anche eventuali enti pubblici o privati che detengono capi oggetto della misura (Comuni, Corpo Forestale, Istituto d'Incremento Ippico, Istituto Zootecnico Sperimentale della Sicilia, Università, etc.). Per essere ammessi è necessaria l'iscrizione della razza/popolazione a rischio di estinzione/erosione all'Anagrafe Nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare della legge n. 194 del 2015 (L 2015/194) oppure presenti nel Libro Genealogico e/o Registro Anagrafico di Razza. Le razze individuate dall'intervento sono: per i bovini, Modicana compresa la Siciliana, e Cinisara; per gli ovini, Barbaresca Siciliana e Noticiana; per i caprini, Girgentana, Argentata dell'Etna e Messinese; il Suino nero siciliano; e tra gli Equidi, Cavallo Sanfratellano, Purosangue orientale, Asino Ragusano e Asino Pantesco), con

codice di allevamento regionale e iscritti nei Libri Genealogici/Registri. I pagamenti sono accordati, su tutto il territorio nazionale, per un periodo di 5 anni, qualora siano rispettati i seguenti impegni che vanno oltre le condizioni elencate all'articolo 70, paragrafo 3 del Reg UE 2021/2115: allevare animali di una o più razze a rischio di estinzione/erosione genetica, anche appartenenti a specie diverse; mantenere la consistenza della razza/popolazione per tutto il periodo di impegno, ad eccezione dei casi di forza maggiore riconosciuti a livello normativo. Il beneficiario è soggetto ai seguenti altri obblighi: rispetto delle norme di Condizionalità (art. 12, Reg UE 2021/2115), rispetto delle norme di Condizionalità sociale (art. 14, Reg UE 2021/2115). L'importo annuale del pagamento è calcolato per UBA allevata sulla base dei mancati redditi e dei maggiori costi di allevamenti di razze maggiormente produttive connessi agli impegni. Si ritiene di dover considerare tutti i capi a rischio estinzione/erosione genetica e non solamente il numero delle fattrici. Sono ammissibili i costi di transazione. Sono altresì ammissibili maggiori costi di transazione legati ad approcci collettivi (es. accordi di filiera) o comunque congiunti agli impegni: in tali casi, possono essere riconosciuti anche pagamenti basati sui risultati. Sono principi di selezione: aziende che praticano zootecnia biologica (Reg CE 2007/834); aziende che attivano forme di cooperazione ai sensi dell'art.77 "Cooperazione" del Reg UE 2021/2115, per lo sviluppo di filiere produttive specifiche per le razze locali a limitata diffusione; aziende ubicate in aree caratterizzate da particolari pregi ambientali; aziende ubicate in aree caratterizzate da criticità ambientali; tipologia aziendale (fattorie sociali, fattorie didattiche, agriturismi ecc.).

Gli enti pubblici o privati che effettuano studi di valorizzazione delle razze o popolazioni autoctone ricevono un contributo specifico. Fino al 2022, Il PSR Sicilia prevedeva la cosiddetta misura 10.2b, nel nuovo Complemento di Programmazione per lo Sviluppo Rurale Sicilia, l'intervento corrispondente è il **SRA16 – ACA16 – Conservazione agrobiodiversità – Banche del germoplasma**. L'intervento, sostiene le attività riguardanti la conservazione, l'uso sostenibile e lo sviluppo delle risorse genetiche in agricoltura attraverso azioni finalizzate alla caratterizzazione, raccolta e utilizzo sostenibile delle risorse genetiche autoctone minacciate di erosione

genetica e non, allo scopo di conoscerne e valorizzarne l'unicità genetica e le relative potenzialità produttive, in considerazione della loro importanza ai fini scientifici, economici, ecologici, storici e culturali, in conformità con il Reg Del UE 2022/126 articolo 45 paragrafo 1, lettera b). La conservazione e la valorizzazione delle risorse genetiche locali ivi comprese le varietà o materiale eterogeneo appropriato con un grado elevato di diversità genetica, necessitano possibilmente di un'attività scientifica sistematica diretta alla genotipizzazione e alla fenotipizzazione delle risorse genetiche, anche allo scopo di individuare caratteristiche specifiche di adattamento alle diverse e mutate condizioni pedoclimatiche, e/o per particolari impieghi. Le attività oggetto del sostegno per la conservazione, l'uso sostenibile e lo sviluppo delle risorse genetiche in agricoltura sono dettagliate nelle seguenti azioni: a) azioni mirate: a.1) individuazione, recupero, caratterizzazione, valutazione delle risorse genetiche locali, del materiale eterogeneo appropriato (elevata diversità genetica), ed iscrizione di quelle a rischio di estinzione nei repertori/registri regionali; a.2) conservazione *in situ/on farm* ed *ex situ* delle risorse genetiche; a.3) tutela, mantenimento, gestione, caratterizzazione e valorizzazione delle risorse genetiche microbiche conservate nelle collezioni *ex situ*; a.4) costituzione e sviluppo di materiale eterogeneo ai sensi del Reg UE 2018/848 o comunque di varietà a larga base genetica; a.5) valorizzazione delle risorse genetiche locali e del materiale eterogeneo appropriato, tramite: i. Qualificazione dei processi e delle produzioni; ii. Certificazione di filiera; percorsi di valorizzazione delle varie filiere di produzione; iii. Percorsi del cibo e dell'agro-biodiversità; iv. Ottimizzazione delle tecniche colturali per le specifiche varietà vegetali o materiale eterogeneo (Reg UE 2018/848) e dei sistemi di allevamento di particolari razze animali, nella direzione di una maggiore sostenibilità ambientale; v. Individuazione e valorizzazione delle caratteristiche organolettiche, chimico-nutrizionali, microbiologiche e sensoriali delle produzioni; reintroduzione in coltivazione/allevamento/produzione; produzione del materiale genetico per la moltiplicazione e riproduzione (qualità, aspetti sanitari e fitosanitari, reintroduzione in commercio); vi. Sviluppo e introduzione di metodi di gestione e selezione anche partecipativa, delle risorse genetiche volte a valorizzare la biodiversità vegetale, animale e microbica che meglio si evolve e si adatta all'agroecosistema locale incrementandone la capacità di resilienza; a.6) sviluppo, tenuta, implementazione e

pubblicazione su Internet di repertori/registri/banche dati regionali delle risorse genetiche locali; a.7) mantenimento dei repertori/registri regionali del patrimonio genetico e funzionamento delle reti di conservazione e sicurezza previsti dalle leggi regionali di settore; b) azioni concertate: b.1) attivazione di progetti a carattere comprensoriale sul territorio per la tutela e valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare, in particolare in zone Natura 2000 o ad alto valore naturalistico; b.2) attivazione e/o sostegno alle comunità locali vocate alla tutela e valorizzazione dell'agro biodiversità di un territorio, alla diffusione della cultura rurale ad essa legata e ai temi dell'agro-ecologia e dell'economia circolare; b.3) *networking* (creazioni di reti e animazione delle stesse) a livello regionale e/o nazionale e/o transnazionale, tra tutti i soggetti coinvolti; c) azioni di accompagnamento: c.1) comunicazione, informazione, scambi di conoscenze, aggiornamento professionale degli operatori e dei tecnici a supporto degli Agricoltori e Allevatori. L'intervento si applica su tutto il territorio nazionale e per azioni diverse da quelle sostenute dagli interventi SRA14 "Allevatori custodi dell'agrobiodiversità" e SRA15 "Agricoltori custodi dell'agrobiodiversità". I beneficiari di quest'intervento sono: gli imprenditori agricoli, in forma singola o associata, ai sensi dell'art. 2135 del Codice civile; gli agricoltori e allevatori custodi ai sensi della L 2015/194 o ai sensi delle leggi regionali/provinciali in materia; i soggetti pubblici e/o privati che operano nel campo della ricerca di comprovata esperienza nelle azioni da finanziare; altri soggetti pubblici e/o privati, in forma singola o associata; i centri di conservazione *ex situ*/collezioni/banche del germoplasma ai sensi della L 2015/194 o ai sensi delle leggi regionali/provincia vigenti in materia; le Regioni e Province Autonome; gli Enti/Agenzie regionali individuati dalle Regioni e province Autonome ai sensi di norme regionali e/o per competenze specifiche, tecniche e/o scientifiche in materia di risorse genetiche e agro biodiversità. Questi si impegnano a realizzare le attività previste dall'intervento conformemente a quanto definito con atto di concessione dell'Autorità di Gestione, fatte salve eventuali varianti e/o deroghe stabilite dalla stessa. Inoltre, ogni beneficiario è soggetto ai seguenti altri obblighi. Al fine di corrispondere agli obblighi di informazione e pubblicità per le operazioni oggetto di sostegno del FEASR, si applica quanto previsto dalle disposizioni attuative dal Regolamento Delegato e della normativa nazionale in materia; nel caso di operazioni

144

realizzate da Enti Pubblici ed Organismi di diritto pubblico, deve essere garantito il rispetto della normativa generale sugli appalti, di cui al Dlgs 2016/50. L'intervento di cui sopra può coprire i costi di funzionamento. Gli investimenti e le relative spese generali possono essere sovvenzionati solo pro-quota, sulla base dell'utilizzo effettivo ai fini dell'intervento (anche in termini di tempo). Al fine di garantire l'effetto incentivo del contributo pubblico, sono ammissibili al sostegno solo le operazioni per le quali il beneficiario ha avviato i lavori o le attività dopo la presentazione di una domanda di sostegno. Fanno eccezione le attività preparatorie che possono essere avviate prima presentazione della citata domanda o alla pubblicazione dell'invito a presentare proposte, entro un termine stabilito dalle stesse autorità di gestione non superiore a 24 mesi. Il termine ultimo di ammissibilità delle spese per i beneficiari è fissato nelle disposizioni attuative. È possibile attuare la costruzione, l'acquisizione, (incluso il *leasing*), il miglioramento di beni immobili esclusivamente funzionali al raggiungimento dell'obiettivo del presente intervento. Sono coperte le spese per conservazione *in vivo* di nuclei di risorse genetiche animali locali a rischio di erosione genetica; per l'acquisto di nuovi macchinari e attrezzature esclusivamente necessarie al raggiungimento degli obiettivi del presente intervento. Sono coperte le spese per l'acquisto di beni e servizi e/o rimborsi spesa forfettari, funzionali alla realizzazione dei progetti ammessi a finanziamento e pertinenti all'azione finanziata comprese quelle per l'affidamento agli allevatori custodi di attività di conservazione di razze animali a rischio di estinzione diverse da quelle previste dall'Intervento SRA14 realizzate in collaborazione con le Banche del germoplasma animale. Sono incluse inoltre, le spese di gestione (anche in forma forfettaria come percentuale di altre spese), spese di funzionamento, di personale, di formazione, spese finanziarie, spese di rete, spese per incarichi professionali per la realizzazione di attività specialistiche. Sono possibili spese per investimenti immateriali come acquisizione o sviluppo o manutenzione di programmi informatici, licenze, marchi commerciali, ecc. Sono comprese altresì le spese per il personale (comprese missioni e trasferte) dipendente, a tempo indeterminato o determinato, destinato a tempo pieno o parziale alle attività dell'intervento, compreso assegni di ricerca, borse di studio, entro i limiti previsti dall'Autorità di Gestione; spese per studi specifici su temi inerenti la conservazione, uso e sviluppo sostenibile delle risorse genetiche di interesse agricolo

e alimentare solo se correlati al raggiungimento dell'obiettivo specifico n. 6; spese per il monitoraggio sanitario ed eventuali analisi di laboratorio delle risorse genetiche animali compresi i materiali eterogenei appropriati con un grado elevato di diversità genetica – conservate *in situ/on farm* e nelle collezioni *ex situ*. Le spese generali riguardano gli onorari di architetti, ingegneri e consulenti, compensi per consulenze in materia di sostenibilità ambientale ed economica, inclusi studi di fattibilità. Gli studi di fattibilità rimangono spese ammissibili anche quando, in base ai loro risultati, non sono effettuate spese relative agli investimenti previsti. Le Spese generali indirette riferite ad affitto di locali, utenze energetiche, idriche e telefoniche, collegamenti telematici, manutenzione ordinaria, spese postali, etc. sono calcolate come tasso forfettario entro i limiti previsti dalle Autorità di Gestione. La forma sostegno è un pagamento del 100%. Il contributo è erogato a rendicontazione delle attività svolte in unica soluzione o per stati di avanzamento lavori, con un importo unitario previsto compreso tra 100.000,00-150.000,00 euro. I beneficiari sono selezionati in base alle priorità relative alle finalità specifiche dell'intervento, ai diversi settori produttivi, per priorità territoriali o priorità legate a determinate qualità del soggetto richiedente (soggetto scientifico, esperienza professionale necessaria, esperienza di gestione di reti di conservazione dell'agrobiodiversità, ecc.), priorità legate al rischio di estinzione e di erosione genetica delle risorse genetiche animali; priorità relative a varietà e razze iscritte o da iscrivere all' Anagrafe nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare della L 2015/194; priorità legata a progetti di durata pluriennale.

Per le razze regolarmente iscritte è stato istituito il **Programma di Sviluppo Rurale Nazionale** (PNSR). La sottomisura 10.2 mira a sostenere l'attività di caratterizzazione delle risorse genetiche animali di interesse zootecnico e salvaguardia della biodiversità. Il tema principale è centrato sulla biodiversità delle specie d'interesse zootecnico intesa come caratterizzazione, miglioramento genetico e conservazione delle razze. Questa sottomisura è cofinanziata con risorse dell'UE attraverso il Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR) e con risorse nazionali attraverso il Fondo di Rotazione per l'attuazione delle politiche comunitarie. I destinatari dei fondi sono gli enti pubblici e privati di qualsiasi natura (incluse università e istituti di

ricerca), singoli o associati con altri Enti pubblici e/o privati che dimostrino una documentata capacità operativa e professionale in relazione alla tematica di riferimento. A fronte dell'avviso pubblico emanato a fine 2016, per essere ammessi alla presentazione della domanda i proponenti dovevano essere in possesso di 4 requisiti fondamentali: avere nello statuto attività che prevedano il miglioramento genetico (selezione) della razza e/o razze (biodiversità animale ad interesse zootecnico); ambito operativo riferito a livello nazionale; sede nel territorio italiano; idonee capacità tecnico-scientifiche e capacità di gestione amministrativo-contabile. I comparti zootecnici interessati sono: bovini latte, bovini carne, bovini duplice attitudine, ovi-caprini, suini, cunicoli, equidi, avicoli e bufalini. Tra gli obiettivi della sottomisura 10.2 troviamo la conservazione e caratterizzazione del patrimonio genetico animale e il mantenimento della variabilità genetica. Quest'obiettivo viene perseguito attraverso una serie di azioni finalizzate alla caratterizzazione, alla raccolta e all'utilizzo sostenibile delle risorse genetiche in agricoltura. Lo scopo è quello di conoscerne e valorizzarne l'unicità genetica e le relative potenzialità produttive, in considerazione della loro importanza ai fini scientifici, economici, ecologici, storici e culturali. Il concetto di conservazione include, oltre a quello della salvaguardia, anche l'uso sostenibile della biodiversità animale ad interesse zootecnico. Tra le attività oggetto di finanziamento della sottomisura si trovano: la caratterizzazione fenotipica genetica delle razze e delle specie autoctone allevate in Italia; la stima di indici genetici e genomici, di piani di accoppiamento e gestione riproduttiva in relazione alle nuove finalità (benessere animale, emissioni gas ad effetto serra nell'ambiente, miglioramento dell'efficienza riproduttiva e salvaguardia della biodiversità); il miglioramento delle risorse genetiche animali ad interesse zootecnico; l'individuazione di caratteri di resistenza genetica alle principali malattie di interesse zootecnico. Queste azioni vengono applicate solamente alle razze di interesse zootecnico. Il vantaggio principale che offre la sottomisura è quello di disporre di nuove informazioni e dati, riferite anche a razze minacciate di estinzione o di erosione genetica, per l'elaborazione, tra l'altro, di indici genetici in tema di benessere animale e riduzione dell'impatto ambientale degli allevamenti. Altri vantaggi che potranno derivare in tempi medio-lunghi dalla realizzazione delle attività oggetto della sottomisura sono: nuove informazioni e servizi per gli allevatori (es. accoppiamenti

programmati in riferimento ai nuovi indici genetici); monitoraggio della diversità genetica tra ed entro le razze autoctone italiane; valutazione e individuazione di caratteri di resistenza genetica degli animali di interesse zootecnico alle malattie; raccolta di materiale biologico e germoplasma anche di razze minacciate di estinzione o di erosione genetica; riduzione dell'impatto ambientale e miglioramento del benessere animale; miglioramento della sostenibilità economica, sociale ed ambientale nel settore zootecnico; incentivo allo svolgimento di attività in aree svantaggiate o marginali tramite la valorizzazione delle razze. Per accedere alla sottomisura si può presentare domanda di sostegno ai sensi dell'avviso di selezione pubblicato sul GURI e sul sito del MIPAAF. I progetti possono essere presentati in forma singola o collettiva per uno solo dei comparti indicati. La prima fase della misura 10.2, la cui conclusione era prevista per il 31 dicembre 2019, ha avuto una proroga della chiusura delle attività che va da febbraio a giugno 2020, a seconda dei comparti. Alla sottomisura sono stati assegnati complessivamente circa 50 milioni di euro, a titolo di contributo pubblico a valere sui fondi FEASR e nazionali, per le operazioni da concludersi entro il 31 dicembre 2019. Alla fine delle attività progettuali i beneficiari dovranno pubblicare almeno un indice genetico relativo alle nuove finalità del bando (benessere animale, emissioni gas ad effetto serra nell'ambiente, miglioramento dell'efficienza riproduttiva e salvaguardia della biodiversità). È stato pubblicato il nuovo bando per le annualità 2020-2023, la cui decorrenza sarà successiva alla conclusione delle attività della prima fase in quanto le due fasi non possono andare in sovrapposizione al quale si potrà accedere con le medesime modalità dell'avviso precedente. Con riferimento alla sottomisura 10.2 è stato approvato un secondo avviso con DM 41184/19. Quest'ultimo consentirà, tra l'altro, di ultimare lo studio e la caratterizzazione delle razze presenti sul territorio italiano e, allo stesso tempo, raccogliere e conservare il germoplasma di razze a limitata diffusione, al riguardo è stato previsto un criterio di selezione riferito al numero di razze coinvolte nel progetto. Sono stati ammessi a contributo complessivamente 9 progetti, di cui n. 4 singoli per i comparti zootecnici: bovini latte, cunicoli, suini e ovi-caprini e n. 5 collettivi per i comparti: bufalini, bovini carne, equidi, bovini duplice attitudine e avicoli, per un totale di 24 domande di sostegno approvate e un contributo concesso pari a € 45.724.236,84. Per i progetti afferenti al II avviso pubblico, le

148

attività dovranno concludersi, salvo eventuali proroghe, entro il 30 giugno 2023. Sono stati ammessi a contributo, nell'ambito del primo avviso pubblico con periodicità 2016-2019, approvato con DM 31294/16 8 progetti presentati per i diversi comparti (avicoli, equidi, suini, cunicoli, ovi-caprini, bovini a duplice attitudine, bovini da carne e bovini da latte) per un totale di circa 43 milioni di euro. I bufalini rappresentano l'unico comparto per cui non sono stati ammessi progetti nella prima fase di finanziamento. I principali risultati finora ottenuti riguardano l'elevato numero di razze animali caratterizzati; le razze coinvolte dalla sottomisura 10.2 sono pari al 58% delle razze riconosciute a livello nazionale. Nel 2018 sono state effettuate 39.177 analisi di caratterizzazione genetica, al fine di individuare linee di sangue da conservare e valorizzare. Sulla base della caratterizzazione genetica è possibile inoltre: valutare lo stato della biodiversità in una popolazione, stimare i valori riproduttivi degli animali delle razze per le quali è possibile attuare programmi di miglioramento genetico (indici genomici); selezionare nuovi caratteri per soddisfare le esigenze di sostenibilità ed economicità dei sistemi produttivi, a beneficio dei consumatori e dell'ambiente; diagnosticare ed eradicare geni dannosi (es. malattie genetiche). Alla fine delle attività progettuali i beneficiari dovranno pubblicare almeno un indice genetico relativo alle nuove finalità del bando (benessere animale, emissioni gas a effetto serra nell'ambiente, miglioramento dell'efficienza riproduttiva e salvaguardia della biodiversità). In riferimento all'avanzamento finanziario della presente sottomisura, sono state fino ad ora liquidati, da parte dell'Organismo pagatore AGEA, circa 11,5 milioni di euro.

Altre opportunità di sostegno possono venire da altra misura opportunamente indirizzate sulle razze autoctone come, ad esempio, la cooperazione (**misura 16.1** del PSR Sicilia 2014-22), che in diversi casi è stata utilizzata per la razza Cinisara e Modicana.

## **Conservazione del germoplasma siciliano in razze a rischio di erosione genetica**

### **Gli equidi**

La Sicilia è una regione italiana con un'antica tradizione equestre che risale ai tempi delle dominazioni dell'antica Grecia del 600 a.C. Fino al XVI secolo in Sicilia erano allevati due tipi genetici di cavalli: il cavallo Asiatico e il Nord Africano. L'incrocio tra questi due diede origine al cavallo Siciliano (Chiari, 1901). Grazie alla sua bellezza e armonia nelle forme, fu considerato un'eccellente razza. Infatti, nel XV secolo, Leonardo da Vinci scelse un nobile cavallo Siciliano appartenente a Galeazzo Sanseverino come modello per i suoi studi sulle proporzioni del corpo del cavallo. Agli inizi del XX secolo il cavallo Siciliano continuò a mantenere la sua eccellente reputazione e fu una delle poche razze equine italiane riconosciute (Diffloth, 1923). Oggi in Sicilia sono presenti tre differenti razze equine, il Purosangue Orientale, il Sanfratellano e il Siciliano. Questi cavalli probabilmente avranno avuto lo stesso progenitore ancestrale, il cavallo nobile Siciliano, ma nei secoli e con il susseguirsi delle dominazioni, si sono differenziate acquisendo caratteri unici di eleganza, rusticità e resistenza uniche. Tra gli equidi, non bisogna dimenticare gli asini, che da sempre, insieme al cavallo e al mulo hanno accompagnato la quotidianità dalla realtà rurale e militare siciliana. I primi asini (*Equus asinus*) addomesticati circa 6000 anni fa furono gli asini selvaggi africani (*E. africanus*) (Beja-Pereira et al., 2004; Rossel et al., 2008). Per molti secoli l'asino è stato utilizzato come animale da soma, ed ancora oggi viene utilizzato come tale nelle regioni più povere del mondo (Starkey, 2000), ma nei paesi più sviluppati questo tipo d'impiego è venuto a mancare portando molte razze asinine quasi all'estinzione.

La Sicilia, in particolare durante i primi due conflitti mondiali, è stata una delle regioni con le più importanti produzioni di muli di pregio. Muli frutto dell'ibridazione di cavalle locali e non con asini siciliani (Panteschi o Ragusani).



Figura 6. Mulo siciliano durante le campagne d'Africa (<http://tradizioneattacchi.eu/asino-ragusano.htm>).

Se il cavallo nei secoli ha accompagnato le casate nobiliari, o veniva dato in dono a principi, considerato animale di pregio o di lusso quasi, l'asino e il mulo hanno accompagnato la nobile vita delle campagne siciliane. In Sicilia il suo allevamento è millenario, e i parallelismi con le culture che hanno dominato l'isola (greci e bizantini) dimostrano l'importanza di questo animale. Probabilmente i primi asini arrivarono con le rotte commerciali nell'isola. Si presume, infatti, che furono gli stessi arabi (Bizantini o Turchi) a portare gli asini in Sicilia. L'etimologia del nome siciliano asino, ovvero *sceccu* probabilmente deriva dal turco *sscek* (asino) (Oddo, 2013). L'importanza dell'animale da soma nella cultura agricola locale non è da sottovalutare, anche se con la modernizzazione questi animali vanno via via scomparendo. Basti pensare non molti anni fa Villafrati era noto per essere il paese degli *scecchi issalora* (asini dei gessai). Fino agli anni 50, infatti, l'attività principale era l'estrazione del gesso, che veniva trasportato a dorso degli asini dai paesi limitrofi fino a Palermo (Oddo, 2013). In Sicilia sono presenti 3 razze asinine: il Grigio Siciliano, il Pantesco e il Ragusano.



Figura 7. *Scecchi issalora di Villafrati* (<http://cesim-marineo.blogspot.com/2013/12/da-li-scecchi-issalori-di-villafrati.html>).

## **Sanfratellano, Purosangue Orientale Siciliano, Ragusano, Pantesco**

Il cavallo **Sanfratellano** è un'antica razza equina, la tradizione vuole che discenda dai cavalli da battaglia e da soma che accompagnarono i fondatori dell'antica San Filadelfio, oggi San Fratello, in provincia di Messina, e cioè di quei Lombardi venuti nell'XI secolo. Le origini del cavallo Sanfratellano risalgono al Medioevo, quando popolazioni indigene di cavalli siciliani furono incrociate con cavalli nord africani, orientali e spagnoli (Fogliata, 1910). Nel 1925 per migliorare e ingentilire la struttura morfologica del Sanfratellano furono limitatamente introdotti stalloni Purosangue Inglese e Orientale (Hendricks, 1995). Mentre, più recentemente, dal 1930 e occasionalmente fino alla fine del XIX secolo, è stato introdotto sangue Maremmano nei piani d'accoppiamento, per migliorare l'altezza al garrese e la taglia (Chiofalo et al., 2003; Liotta e Chiofalo, 2004; Zuccaro et al., 2008). Il Sanfratellano è un cavallo meso-dolicomorfo, si presenta come un cavallo imponente, nobile ed elegante. Il mantello solitamente è morello o baio oscuro, la testa ha un profilo rettilineo, talvolta leggermente montonino, non presenta peli bianchi, il collo è corto con una buona muscolatura, mai tozzo, con una lunga ed elegante criniera, la spalla è muscolosa con una buona inclinazione, il garrese è giustamente pronunciato e il dorso di giuste proporzioni, può presentarsi lievemente insellato, i lombi sono ampi e ben attaccati, a

groppe è muscolosa e con la giusta inclinazione, il petto e il torace si presentano ampi e in armonia con le altre regioni, gli arti sono robusti e ben sviluppati. Il cavallo Sanfratellano, oggi, vive ancora allo stato brado libero e selvaggio su una superficie boschiva di oltre 11.000 ettari situati per la maggior parte in provincia di Messina e più dettagliatamente nel territorio dei Comuni di Acquadolci, Caronia, Militello Rosmarino, S. Agata Militello, Sanfratello e Mistretta, sulle pendici settentrionali dei Monti Nebrodi, in una zona che si estende fra la collina e la montagna. Ha una consistenza di circa 1600 capi riproduttori. L'I.I.I. d'intesa con l'Associazione Nazionale Allevatori Razze Equine e Asinine Italiane (ANAREAI) sono gli enti responsabili della conservazione *in situ* di questa razza equina. Deve essere considerata una razza da sella ma recentemente c'è stato un crescente interesse verso la produzione di carne soprattutto da animali non idonei ad essere iscritti nel Libro Genealogico (Lanza et al., 2009). Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione del cavallo Sanfratellano: Equinbio.2, capofila ANAREAI, PNSR 2020/24 – Sottomisura 10.2; Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; Recupero, conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche equine ed asinine siciliane, capofila I.I.I., PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



Figura 8. Stallone Sanfratellano presso la stazione di monta di Ciccaldò a San Fratello (ME).

**Il Purosangue Orientale Siciliano (PSO)** è una delle razze equine la cui identità razziale è sopravvissuta solo in Sicilia ed è certificata nel “Registro italiano degli stalloni” dal 1875. Questa razza rappresenta un nucleo siciliano di cavalli di origine Araba-Orientale importati dalla Siria e dalla Mesopotamia nel 1864 (Balbo, 1995). Tuttavia, le origini sono ben più remote, infatti, nel corso dei secoli, in Sicilia, sia per le dominazioni arabe, sia per gli scambi anche commerciali, la presenza di cavalli provenienti dal Medio Oriente e dal Nord Africa era costante. Nel XIX secolo, ad Italia unita le autorità ippiche militari, responsabili della selezione, vedevano nello stallone di origini orientali il riproduttore di elezione per la popolazione equina dell’Isola. Agli inizi del XX secolo le commissioni militari si recarono più volte nei Paesi arabi per acquistare direttamente dalle tribù beduine i riproduttori da assegnare ai depositi stalloni del meridione. Precedentemente alcuni allevatori siciliani, ed in particolare i Grimaldi di Nixima, introdussero nell’Isola pregevoli riproduttori di origine orientale. Merita, inoltre, di essere menzionata la consuetudine di un tempo di porgere in dono alla casa regnante ed alle alte cariche politiche un cavallo di pregio, che trovava la massima espressione nello stallone arabo. Diversi di questi soggetti provenienti dalle zone di origine, vennero dati in uso al “Deposito Stalloni di Catania”. Da tutto ciò si comprende come sia stata prolungata e continua nel tempo l’introduzione di una matrice genetica di tipo arabo–orientale in Sicilia. Il PSO è un cavallo mesomorfo e meso-dolicomorfo alto circa 1,50 cm al garrese, la testa è piccola, fronte larga e profilo rettilineo, non camuso, l’occhio è grande vivace e molto espressivo, le narici sono ampie, il torace è ampio e profondo, gli arti sono sottili e robusti, le articolazioni spesse, gli zoccoli sono duri e compatti. Le sue caratteristiche morfologiche ne fanno un cavallo adatto alla sella, con particolare predisposizione alla corsa e alle gare di *endurance* su lunga distanza. Oggi il PSO ha una consistenza di poco più di 40 capi riproduttori. La razza è allevata e valorizzata *in situ* dall’I.I.I. Tra le razze siciliane, è quella che presenta maggiore rischio genetico (Zuccaro et al., 2008; Guastella et al., 2011; Criscione et al., 2022). Sono molto limitati gli studi sulle possibilità di crioconservazione del materiale seminale di questa razza. Un interessante contributo congressuale (Bazzano et al., 2022a) ha dimostrato un effetto positivo di un’integrazione alimentare nelle caratteristiche cinetiche degli spermatozoi nel PSO. Nello studio gli autori utilizzano una vagina artificiale di tipo

Missouri, e un congelamento utilizzando un mestruo commerciale IMV Technologies a due *step*. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione del PSO: Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; Recupero, conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche equine ed asinine siciliane, capofila I.I.I., PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



*Figura 9. Stallone di razza Purosangue Orientale presso l'Ippodromo della Favorita, Palermo.*

L'asino **Grigio Siciliano** o **Ferrante** è una razza asinina non attualmente riconosciuta. Tuttavia, i dati storici evidenziano la presenza di asini dal mantello grigio in Sicilia almeno dal XVII secolo. Morfologicamente è un asino dalla bassa statura intorno ai 124 cm al garrese, il mantello è di colore grigio uniforme (può essere ordinario, chiaro e scuro), l'addome, l'interno delle cosce e il muso sono bianchi (Liotta et al., 2005). La popolazione attualmente censita è meno di centinaio di capi. L'asino **Pantesco** o asino di Pantelleria, originario dell'isola di Pantelleria, è una razza antica, le cui origini risalgono alle dominazioni arabe, quando questi traversando il Mediterraneo si fermavano sull'isola lasciando degli asini, e grazie all'isolamento geografico questa razza si è conservata fino ai giorni nostri (Mascheroni, 1929). L'asino Pantesco è un asino di tipo dolicomorfo, ha un pelo corto e sottile, il colore del mantello varia dal baio al morello, con ventre di biscia, muso e contorno occhi bianco. La testa è piccola, asciutta con occhi grandi. La fronte è larga e le orecchie piccole e ben portate. La linea dorso-lombare e dritta, la spalla è quasi

dritta, forte e di giusta lunghezza, la groppa è larga, gli arti sono molto robusti e muscolosi. Lo zoccolo è durissimo e non richiede ferratura. L'altezza al garrese è di circa 125–130 cm, è un asino agile che si adatta bene ai terreni difficili (Baroncini, 1987; Zumbo et al., 2004; Di Rosa et al., 2007a). Per molti anni è stato impiegato in agricoltura per coltivare gli aspri pendii dell'isola, da sempre utilizzato per la produzione di muli, soprattutto durante i conflitti mondiali. L'impiego di stalloni Panteschi è documentato dal 1926; secondo quanto riportato nei modelli A-ter del vecchio Deposito Stalloni di Catania, stalloni Panteschi vennero impiegati presso le stazioni di monta dal 1927 al 1972 (Bordonaro et al., 2012). I muli ottenuti furono esportati in Grecia e America, tuttavia proprio dopo la Seconda guerra mondiale, con la meccanizzazione dell'agricoltura, la razza ha visto il suo declino, fino ad arrivare quasi all'estinzione (Bordonaro et al., 2012). Negli ultimi 20 anni l'Azienda Foreste Demaniali di Trapani ha condotto una selezione morfologica e genetica di più di 200 soggetti Panteschi allevati tra isole Egadi e la provincia di Trapani. Nove di questi (3 maschi e 6 femmine) furono selezionati per ricostituire la razza. Oggi la consistenza è di poco più di 66 capi. È una razza poco studiata anche se ben caratterizzata geneticamente (Bordonaro et al., 2012; Colli et al., 2013; Mazzatenta et al., 2021). Alcuni autori hanno verificato, che l'esiguità della popolazione può essere facilmente messa a rischio da malattie infettive altamente diffuse, come gli herpesvirus (Mira et al., 2021). Infine, sono stati condotti dei programmi di *embryo transfer* (ET) per conservare la razza (Camillo et al., 2010). In questo studio sono state selezionate 5 asine per un programma di ET, d'età compresa tra 2 e 5 anni, fecondate in monta naturale o inseminate con seme fresco. Sono stati monitorati 83 cicli estrali e 98 ovulazioni, durante le quali sono stati ottenuti 63 embrioni. Il numero di embrioni ottenuti era influenzato dal numero di ovulazioni per ciclo (133% e 63%, per doppia o singola ovulazione), dal giorno del *flushing* (12%, 83%, e 75% per i giorni 7, 8, and 9 dopo l'ovulazione) e dalla ripetitività del numero di embrioni ottenuti nei cicli successivi (60%, 79%, e 100% per i cicli da 1 a 7, da 8 a 14, e da 15 a 24). Tutti gli embrioni ottenuti, tranne 3 sono stati classificati come eccellenti. Come riceventi sono state utilizzate delle asine Ragusane. Di queste, 13 al 14° giorno erano gravide, al controllo successivo, al 25° giorno, solo 10 erano gravide, mentre al 50° giorno, solamente 9. I riassorbimenti tra 14 e 50 giorni di gestazione (30,7%) sono stati

influenzati dal giorno di ovulazione delle riceventi; infatti, le 7 riceventi che avevano ovulato tra 5 e 6 giorni, mantenevano la gravidanza, mentre 3 riceventi su 4 che avevano ovulato tra 7 e 8 giorni avevano perso la gravidanza, come una delle due che aveva ovulato da 3 giorni.

L'I.I.I. d'intesa con l'ANAREAI sono gli enti responsabili della conservazione *in situ* di questa razza asinina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: Equinbio.2, capofila ANAREAI, PNSR 2020/24 – Sottomisura 10.2, Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; Recupero, Conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche equine ed asinine siciliane, capofila I.I.I., PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



Figura 10. Asini di Pantelleria o Pantesco presso la tenuta di Ambelia, Scordia (CT).

L'asino **Ragusano** è una razza molto giovane, è stata selezionata nel XX secolo in particolare nel territorio ibleo, a partire da incroci di asini panteschi e siciliani, migliorato successivamente con soggetti Martina Franca e Catalani. Il Regio Deposito Cavalli Stalloni di Catania, oggi I.I.I., iniziò la selezione di un asino con delle caratteristiche-tipo che tutt'oggi si possono riscontrare nell'asino Ragusano. Nel 1930 il capostipite "Pacifico", di razza Pantasca, inizia a lavorare nelle stazioni di monta selezionate sul territorio ragusano, tuttavia, soltanto nel 1942 furono avviati i programmi di selezione. Grazie al lavoro dell'I.I.I. nel 1953 arrivò il riconoscimento

ufficiale della razza Ragusana, nome attribuito dalla zona di maggiore produzione. L'asino Ragusano ha un mantello baio scuro, con ventre grigio chiaro esteso anteriormente e posteriormente alle facce interne degli arti fino ai due terzi dell'avambraccio e della coscia; sugli occhi è presente una focatura, il musello è biancastro con peli rasati ben delimitato fin sopra le narici con sfumature focate; la criniera e la coda sono nere. La testa del Ragusano non è pesante, con bella espressione, a profilo quasi rettilineo, con fronte larga e piatta, orecchie ben portate e di giusta lunghezza, occhi grandi a fior di testa. Il collo è ben attaccato alla testa ed alle spalle, si presenta muscoloso; la spalla è lievemente diritta e ben attaccata, il garrese è poco rilevato, la linea dorso-lombare è diritta, i lombi sono larghi e bene attaccati, groppa e petto sono larghi, gli arti sono robusti e muscolosi (Baroncini, 1987). L'altezza al garrese è tra 130 e 140 cm, il peso medio di un animale adulto è compreso tra 300 e 350 kg. Oggi il Ragusano ha una consistenza di poco più di 4500 capi (dati [vetinfo](#)). Sono stati condotti alcuni contributi scientifici sulla collezione e caratterizzazione del germoplasma maschile (Quartuccio et al., 2011a; b; Fazio et al., 2017); sul profilo genetico e sulla genealogia (Bordonaro et al., 2012; Colli et al., 2013; Bertolini et al., 2015; Mazzatenta et al., 2021); sulla valutazione dei profili ematologici e biochimici in asine in lattazione e nei neonati (Caldin et al., 2005; Alberghina et al., 2013; Veronesi et al., 2014; Bazzano et al., 2022b), sulle caratteristiche del latte e della curva di lattazione (Cunsolo et al., 2007; 2009; Saletti et al., 2012; Bordonaro et al., 2013; Brumini et al., 2013; Tidona et al., 2014; Randazzo et al., 2016; Cunsolo et al., 2017; Malacarne et al., 2017; Cosenza et al., 2018; Malacarne et al., 2019; Polidori e Vincenzetti, 2019); sulla valutazione del benessere dell'asina (Valle et al., 2007), e sulla prevalenza di alcune parassitosi (Machačová et al., 2013). Nello studio di Quartuccio et al. (2011a) è stato calcolato che sono necessari almeno 3 giorni di prelievi di seme per ridurre la riserva extragonadale e stabilizzare la produzione spermatica, che nell'asino ragusano varia da 7 a  $23 \times 10^9$  di spermatozoi ed è poco influenzata dal volume testicolare. Nel secondo contributo degli autori (Quartuccio et al., 2011b) è stata valutata la possibilità di prelevare il seme in stazione e sono state misurate le caratteristiche comportamentali e i parametri seminali in questa razza. Gli eiaculati presentavano un numero totale di spermatozoi di  $14 \pm 5 \times 10^9$ , alti valori di motilità ( $80 \pm 10\%$ ) e vitalità

(80±9%) e bassa percentuale di anomalie spermatiche. Il tempo di latenza dalla presentazione della femmina (T1), all'erezione del pene era di 9±4 minuti, il tempo di eiaculazione (T2) era di 32±3 secondi, il tempo complessivo per la raccolta dello sperma (T3) era di 14±5 minuti e il numero di spinte pelviche era 7±1. T1 e T3 erano statisticamente altamente correlati (P=0,0066), mentre T2 influenzava significativamente il TNS (P=0,05). Nel terzo contributo degli autori (Fazio et al., 2017) è stata ulteriormente validata la tecnica di prelievo di seme in stazione rispetto a quella con vagina artificiale, dimostrando valori più bassi di ACTH (p<0,0001) e cortisolo (p<0,0001) e creatinina (p<0,0001).

L'I.I.I. d'intesa con l'ANAREAI sono gli enti responsabili della conservazione *in situ* di questa razza asinina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: Equinbio.2, capofila ANAREAI, PNSR 2020/24 – Sottomisura 10.2, Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; Recupero, Conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche equine ed asinine siciliane, capofila I.I.I., PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



Figura 11. Asino Ragusano presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Messina.



*Figura 12. Paride, asino Ragusano presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Messina*

## **Esp 1. Prelievo e congelamento del materiale seminale in equidi siciliani**

### **Introduzione**

Il prelievo del seme nello stallone è da tempo una parte importante del management riproduttivo degli equidi in generale. Col tempo si è passato dal prelevare il seme solamente per valutazioni e analisi, a manipolare l'eiaculato per usarlo su cavalle distanti, a conservare il seme da un giorno ad anni. Negli anni anche la tecnica di prelievo è cambiata, le attuali tecniche di prelievo, basate sull'uso della vagina artificiale, sono state precedute dall'utilizzo di spugne poste nella vagina della cavalla prima del salto (Berliner, 1940; Nishikawa, 1959; Swire, 1962), che ovviamente comportava importanti contaminazioni. Successivamente, si provò ad utilizzare un *condom*, inserito nella vagina della cavalla; con il rischio di rottura e perdita dell'eiaculato (Swire, 1962). Le prime vagine artificiali furono introdotte intorno gli anni 40 del ventesimo secolo, all'inizio i risultati furono scarsi, ma necessari a capire l'importanza, ad esempio, che la temperatura e la pressione della vagina erano fondamentali per l'eiaculazione. Berliner (1940) introdusse la prima vagina artificiale che riusciva a tenere la quantità d'acqua sufficiente a mantenere la pressione. Infatti, bisogna ricordare che è la stimolazione del glande che trasmette gli impulsi nervosi necessari all'eiaculazione. Dalla nascita di questa vagina artificiali, si sono perfezionate quelle odierne, usate comunemente, tra cui ricordiamo il modello Missouri (morbida) e i modelli Colorado o Hannover (rigide) (Love, 1992). Le tecniche descritte prevedono che lo stallone effettui il salto su cavalla o sul manichino. Tuttavia, potrebbe capitare che lo stallone per vari motivi, quali traumi o altro, non effettui il salto. Un'alternativa è quella di prelevare il seme in *standing* ovvero in stazione quadrupedale (Crump e Crump, 1989; McDonnell e Love, 1990). Questa tecnica è effettuata utilizzando la vagina artificiale o mettendo il *condom* sul pene dello stallone. L'acqua deve avere una temperatura di 45–50°C, e affinché ci sia l'eiaculazione bisogna sollecitare la base del pene e il glande.

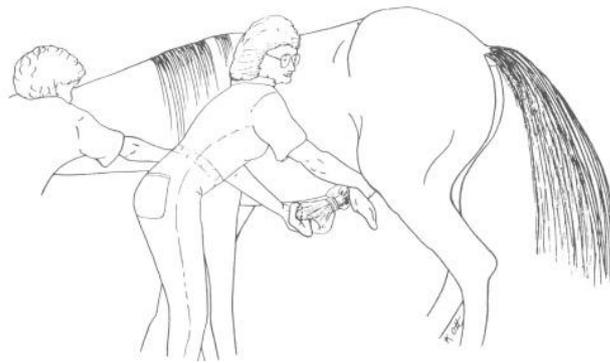


Figura 13. Prelievo di seme nello stallone mediante l'utilizzo del condom (da Love et al., 1992)

Love et al., 1992 hanno utilizzato con successo questa tecnica anche in stalloni che avevano perso completamente la capacità di erezione, e, in particolare, in caso di parafimosi (Memon et al., 1988). Nel caso in cui anche questa tecnica, dopo diversi tentativi non dovesse andare a buon fine, un'alternativa è il prelievo *ex copula* indotto farmacologicamente. I protocolli farmacologici utilizzabili sono diversi, generalmente prevedono l'utilizzo di alfa 2 agonisti, stimolatori della muscolatura liscia usati singolarmente o in associazione. Uno dei primi protocolli prevedeva l'utilizzo di imipramina (McDonnell et al., 1987), ma non ebbe molto successo, successivamente qualche anno dopo venne utilizzata la xylazina per indurre l'ejaculazione, anche in questo caso la percentuale di riuscita non era altissima; tuttavia, la qualità dell'ejaculato era sovrapponibile a quello ottenuto tramite prelievo classico (McDonnell e Love 1991; McDonnell, 1992; Cavalero et al., 2019). Ottimi risultati furono dati invece dalla somministrazione combinata di imipramina e xylazina, gli ejaculati ottenuti era di qualità simile a quelli ottenuti in maniera convenzionale; tuttavia, alcuni erano presenti alcuni effetti collaterali come scialorrea, emolisi e leggera sedazione in stazione (McDonnell e Oristaglio Turner, 1994). Un effetto simile a quello della xylazina è dato dalla detomidina. Diversi autori, infatti, riportano l'impiego sia singolarmente (Rowley et al., 1999) sia combinata con ossitocina o imipramina (Cavalero et al., 2019; 2020). Infine, McDonnell (1992) descrive l'utilizzo di  $PGF2\alpha$  al dosaggio di 0,01-0,15 mg/Kg per indurre l'ejaculazione *ex copula*; la percentuale di successo era alta, il 75%, tuttavia, gli effetti collaterali dati dall'utilizzo di alte dosi di farmaco erano notevoli. In casi estremi, dopo mancata riuscita di prelievo seminale sia in maniera tradizionale, sia

162

farmacologica, o dopo improvvisa morte dell'animale, o dopo una castrazione, l'ultima alternativa è il prelievo epididimale. Questa metodica può essere considerata un vero salvataggio genetico, poiché il seme una volta prelevato, può essere anche congelato e mantenuto in eterno. Nel 1957 fu descritta la prima gravidanza di una cavalla come risultato di inseminazione artificiale con seme congelato da spermatozoi epididimali, ottenuti dopo castrazione (Barker e Gandier, 1957). Le metodiche descritte per ottenere il seme dalla coda dell'epididimo sono diverse. Queste vanno dall'aspirazione (Sharma et al., 1997), alla flottazione, dove dopo aver tagliato l'epididimo, questo viene posto in un gel medium per un periodo di tempo (Hewitt et al., 2001), o a un *flushing* retrogrado attraverso una siringa attraverso una siringa attaccata al dotto deferente, gli spermatozoi sono spinti da un extender e fuoriescono da un taglio fatto nella giunzione corpo-coda (Garde et al., 1994). Martinez-Pastor et al. (2006) hanno comparato le tecniche di flottazione e *flushing* retrogrado. Con il *flushing* si ottenevano un maggior numero di spermatozoi e questi non risultavano contaminati da altre cellule dovute ai tagli dell'epididimo. Un'altra tecnica di lavaggio epididimale consiste nella completa separazione tra testicolo ed epididimo, separato l'epididimo, viene rimosso il connettivo circostante e il dotto deferente viene raddrizzato. Successivamente, vengono fatti dei tagli per agevolare il *flushing*, l'epididimo viene posto verticalmente su una piastra Petri, all'estremità superiore viene posta una siringa contenente l'*extender*, che inoculato nel dotto farà uscire dalla parte opposta il seme. Con questa tecnica il numero di spermatozoi ottenuto è di gran lunga maggiore rispetto a quello ottenuto con vagina artificiale (Granemann, 2006). Nello stallone la tecnica di lavaggio epididimale risulta essere efficace (Tiplady et al., 2002, Muradás et al., 2006). Le cellule prelevate hanno una vitalità di 24h a temperatura ambiente (Muradás et al., 2006, Neild et al., 2006, Granemann, 2006), il seme può essere utilizzato fresco, refrigerato o congelato (Morris et al., 2002) con risultati buoni di gravidanze (Barker e Gandier, 1957; Morris et al., 2002). La motilità degli spermatozoi epididimali risulta essere simile a quella degli spermatozoi ottenuti dopo eiaculazione; tuttavia, dopo congelamento e scongelamento risulta essere molto più bassa (Tiplady et al., 2002).

Dopo il prelievo le fasi successive sono: separazione del gel dalla frazione spermatica e valutazione dell'eiaculato. La fase di separazione avviene al momento della raccolta dato che i contenitori utilizzati sono dotati di un filtro che separa da subito le due frazioni, e a fine raccolta basta semplicemente eliminare il filtro. Effettuata una valutazione macroscopica di colore, odore, volume e viscosità e la valutazione della concentrazione fatta tramite spettrofotometro, si passa alla valutazione microscopica di motilità totale, motilità progressiva, vitalità, integrità di membrana e alterazioni morfologiche secondo le metodiche descritte da Love (2016). Dopo la valutazione il seme viene diluito 1:1, o 2:1 se è molto concentrato, con un *extender* commerciale a base di latte scremato e con l'aggiunta di antibiotico. L'antibiotico è fondamentale per limitare la crescita batterica, mentre il mestruo deve essere aggiunto ad una temperatura di 37°C per evitare lo *shock* termico (Alvarenga et al., 2016). Una volta diluito il seme, si passa alla fase di centrifugazione. Questa fase è molto importante in quanto prima di congelare il seme bisogna eliminare tutto il plasma seminale, poiché questo ha effetti sul seme, tra i quali quello di partecipare alla capacitazione degli spermatozoi, e ciò potrebbe influenzare negativamente il congelamento (Aurich et al., 1996). Il seme viene centrifugato a temperatura ambiente per 10 min ad una velocità di 600 x g (Dell'Aqua et al., 2001). Per ridurre al minimo il danneggiamento del seme può essere utilizzato un cuscinetto posto sulle provette, che "ammortizza" gli spermatozoi durante la fase di centrifuga, in questo caso il tempo di centrifuga sarà di 20 min e la velocità sarà di 1000 x g (Loomis, 2006; Bliss et al., 2012). Una volta centrifugato il seme il surnatante viene eliminato usando una siringa e il pellet ottenuto può essere sospeso con un *extender* con crioprotettore. I mestruai commerciali sono generalmente composti da stabilizzanti del pH, sostanze che neutralizzano le tossine del metabolismo degli spermatozoi, antibiotici, nutrienti per gli spermatozoi, crioprotettori (glicerolo, glicole etilenico, metilformaldeide), che impediscono la formazione di cristalli tra le cellule e quindi il danneggiamento. La quantità di mestruo con crioprotettore aggiunta è solitamente calcolata per ottenere una concentrazione di 200 o 400 Milioni di spermatozoi per ml. Diluito il seme, questo viene caricato su delle paillettes da 0,5 ml che vengono sigillate, pronto per essere congelato. Il congelamento inizia con una fase di equilibratura a 5°C. questa fase varia in base al mestruo commerciale utilizzato (20 min BotuCrio; 120 min INRAFreeze). Il processo

di congelamento deve essere tale da impedire la formazione di cristalli e di esporre le cellule a soluzioni super sature. La curva di congelamento può essere divisa in due *step*. La prima fase è l'equilibratura a 5°C, successivamente si passa alla fase di congelamento che prevede la discesa da 5°C a -196°C ad una velocità da 20 a 50°C al minuto. In assenza di congelatore programmabile, questa seconda fase può essere fatta in vapori d'azoto, ovvero per 10 minuti le *paillettes* sono poste in un *rack* (zattera) a 3 cm d'altezza dall'azoto liquido posto in un contenitore, passati 10 min le *paillettes* vengono immerse direttamente in azoto per finire il congelamento (Alvarenga et al., 2016).

Scopo di questa prima esperienza, è stato la messa a punto di protocolli di prelievo di seme in razze di equidi siciliani tenuto conto delle loro peculiarità etologiche e della ridotta possibilità di addestramento dei soggetti.

## **Materiali e Metodi**

Tra marzo 2021 e maggio 2022 10 stalloni (6 asinini e 4 equini) appartenenti a razze autoctone siciliane sono stati sottoposti a prelievo di seme. Il materiale seminale è stato raccolto presso il centro di produzione di materiale seminale dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Messina, autorizzato dall'Istituto di Incremento Ippico per la Sicilia (ME0100C) ai sensi dell'art. 3 del Reg Del UE 2020/686 e nelle stazioni di monta dell'Istituto di Incremento Ippico per la Sicilia (autorizzato di diritto alla produzione di materiale seminale dal DP 11/00) nelle sedi della Tenuta di Ambelia (Militello val di Catania – CT) e della stazione di monta Ciccaldò (San Fratello – ME), mentre per quanto riguarda lo stallone PSO la raccolta del materiale seminale è avvenuta presso il centro di riproduzione artificiale equina EQUIBBI (PA0103C).

Gli stalloni erano tutti nati e rimasti sin dalla nascita in Sicilia e negli allevamenti di provenienza non erano stati segnalati casi di surra (*Trypanosoma evansi*) nei 30 giorni precedenti, casi di durina (*T. equiperdum*), nei 6 mesi precedenti; casi di anemia

infettiva equina nei 90 giorni precedenti; casi di encefalomielite equina venezuelana nei 6 mesi precedenti; casi di infezione da virus della rabbia negli animali terrestri detenuti nei 30 giorni precedenti; casi di carbonchio ematico negli ungulati nei 15 giorni precedenti (Reg Del UE 688/2020). Tutti gli stalloni erano identificati conformemente alle prescrizioni di legge (Reg Del UE 2019/2035), con un transponder iniettabile (*microchip*) e con un documento unico di identificazione a vita (passaporto). Gli stabilimenti di provenienza si trovavano da almeno 30 giorni in una zona non soggette a restrizioni per malattie di categoria A o emergenti e in cui non sono state segnalate malattie di categoria D. Gli stalloni nei 30 giorni precedenti non erano stati adibiti alla monta naturale. Il giorno della raccolta dello sperma non presentavano sintomi né segni clinici di nessuna delle malattie di categoria D, né di nessuna delle malattie emergenti. Inoltre in conformità all'articolo 23 e all'allegato II, parte 4 del Reg Del UE 2020/686 erano effettuate le seguenti prove da parte dell'autorità competente (Veterinario ufficiale, dipartimenti di sanità animale e igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche) e all'inizio della stagione riproduttiva: un test di immunodiffusione in gel di agar (test di Coggins) per l'anemia infettiva equina, con esito negativo; una prova di sieroneutralizzazione per l'arterite virale equina, con esito negativo con una diluizione del siero pari a 1:4; una prova di identificazione dell'agente della metrite contagiosa equina (*Taylorella equigenitalis*) effettuata, con esito negativo in ciascun caso, in due occasioni ad almeno 7 giorni di intervallo e comunque non prima di 7 giorni (trattamento sistemico) o 21 giorni (trattamento locale) da un eventuale trattamento antimicrobico dello stallone donatore, su tre campioni (tamponi) prelevati da tale animale almeno: dalla guaina del pene (prepuzio), dall'uretra, dalla fossa del glande. I campioni per la *T. equigenitalis* venivano posti in un terreno di trasporto con carbone attivo (Amies), prima di essere inviati al laboratorio. Oltre a questi, in accordo alle indicazioni regionali per l'approvazione alla monta dell'I.I.I. gli stalloni venivano testati per morbo coitale benigno (EHV-1), influenza equina e morva.

Il giorno stabilito del prelievo una cavalla/asina in calore veniva preparata per stimolare il maschio. La fase iniziale prevedeva la preparazione della vagina artificiale. La vagina artificiale utilizzata era di tipo rigido modello Hannover

(Minitube, USA). La preparazione della vagina artificiale prevedeva due fasi: una fase di preriscaldamento e una di riempimento vera e propria. La fase di preriscaldamento serviva per far sì che la vagina non si raffreddasse rapidamente durante l'utilizzo. Quindi inizialmente veniva introdotta una quantità d'acqua pari a circa 2,5 litri ad una temperatura di circa 60°, dopodiché quando lo stallone era pronto per il salto, questa veniva svuotata totalmente. La seconda fase di preparazione consisteva nel mettere internamente una guaina monouso collegata al contenitore di raccolta e fissata esternamente; successivamente veniva riempita con una quantità d'acqua pari a 2-2,5 litri d'acqua a 45°C a seconda dello stallone. Il contenitore (Semen collection bottle, plastic, Minitube, USA) di raccolta utilizzato aveva un volume di 200 ml ed era provvisto di un filtro (Nylon semen filter Colorado, Minitube, USA), in modo tale da separare al momento del prelievo le differenti frazioni dell'eiaculato (gel e liquido seminale). Durante la preparazione della vagina artificiale un altro operatore era addetto alla preparazione dello stallone. Questo veniva condotto vicino la cavalla in calore, inizialmente col fine di provocare lo sfoderamento del pene in modo tale da poter far una detersione con acqua tiepida e cotone. Fatto ciò, lo stallone era pronto per il salto, e veniva condotto al manichino, dove vicino vi era la cavalla in calore. Una volta sul manichino un operatore prendeva il pene dello stallone deviandolo dentro la vagina artificiale, fino ad eiaculazione completa. Ad eiaculazione avvenuta veniva aperta la valvola dell'acqua in modo tale da agevolare la fuoriuscita del pene dalla vagina. Si lasciava ancora qualche secondo la vagina in posizione verticale in modo da far scivolare il seme verso il contenitore, si rimuoveva il contenitore e il filtro e si trasferiva il seme in laboratorio.

Nel caso in cui il tentativo sul manichino falliva, si procedeva con il salto direttamente sulla cavalla/asina, contenuta opportunamente per evitare calci allo stallone ed all'operatore, per rendere il salto più naturale. In particolare, veniva fatta passare una corda al collo della cavalla, facendola passare attraverso le gambe anteriori; quindi, facendola uscire lateralmente e girare dietro gli arti posteriori all'altezza dei garretti e ritornare avanti attraverso gli anteriori, mantenendo in tensione la corda.

In caso di ulteriore insuccesso si optava per il prelievo di seme utilizzando il *condom* (*Condom for stallions, latex*, Minitube, USA). Il *condom* veniva posto sul glande dello stallone, dopodiché si portava lo stallone verso la cavalla e si lasciava effettuare il salto e la penetrazione, cosicché al momento dell'eiaculazione il *condom* potesse raccogliere il materiale seminale. Avvenuto il salto, una volta che lo stallone era sceso, il *condom* veniva sfilato dal pene dello stallone. Dopodiché in laboratorio l'eiaculato veniva trasferito prima in un recipiente sterile in modo tale da valutare il volume tal qual e agevolare la manovra di filtraggio. Questa veniva fatta mettendo un filtro per eiaculato (filtro Ø 240 mm, IMV technologies, France) su delle provette Falcon da 50 ml, dove veniva versato e filtrato l'eiaculato in modo tale da separare le differenti frazioni dell'eiaculato (gel e liquido seminale).

La fase successiva era quella di valutazione dell'eiaculato ottenuto. Il seme veniva valutato sia macroscopicamente (volume, colore, viscosità), sia microscopicamente (concentrazione, motilità totale e progressiva, morfologia, vitalità). La concentrazione veniva valutata con due sistemi alternativi: tramite fotometro (Fotometro equini Accucell, IMV technologies, France) o con sistema SCA, quando disponibile. Nel primo caso, dopo aver tarato il fotometro con una cuvette di soluzione di NaCl allo 0,9%, si preparava una cuvette con 100µl di seme a cui venivano aggiunti a 1900 µl di soluzione di NaCl allo 0,9% e si avviava il fotometro. Il risultato ottenuto era il numero di spermatozoi per ml del campione.

Per la valutazione della vitalità e della morfologia un operatore prelevava una goccia (3µl) di seme dal campione, che veniva messa in un vetrino ad orologio alla quale venivano aggiunte una goccia di eosina e due gocce di nigrosina (tecnica di Blom), successivamente veniva miscelato e strisciato su un vetrino portaoggetti, per essere montato e letto in seguito. Questa colorazione, infatti, permetteva di distinguere gli spermatozoi vivi da quelli danneggiati o morti, e consentiva di valutare eventuali alterazioni e i dati ottenuti venivano valutati insieme a quelli ottenuti dal sistema SCA. Il vetrino, dopo esser stato montato con balsamo e vetrino copri-oggetti, veniva visto al microscopio ad un ingrandimento di 20x. Il colorante nigrosina fungeva da sfondo, facendo da contrasto con gli spermatozoi, mentre l'eosina penetrava la membrana

cellulare degli spermatozoi morti o con membrana cellulare danneggiata colorandoli in rosa, gli spermatozoi vivi non venivano colorati. Quindi si procedeva contando 100 spermatozoi e facendo il rapporto in percentuale tra vivi e morti.

Contemporaneamente un altro operatore prelevava una goccia (3 $\mu$ l) di seme dal campione che poneva in una camera di Leja (Vetrino Leja a 4 camere, IMV technologies, France) per la valutazione del seme, posta su un microscopio ottico (Nikon iEclipse, Nikon, Japan) con tavolinetto riscaldato a 37°C, con telecamera collegata a un computer con sistema SCA (Sperm Class Analyzer, MICROPTICA, Hamilton Thorne Company). Si procedeva quindi con l'analisi; l'eiaculato veniva valutato ad un ingrandimento di 10x a contrasto di fase. Messa a fuoco il campione e dopo aver dato una prima valutazione visiva, si procedeva con la valutazione della motilità attraverso il sistema SCA. Avviato il programma SCA Evolution, si procedeva alla registrazione dell'animale e del campione, inserendo, in particolare, i dati relativi al volume o di eventuali diluizioni del campione, in modo tale da permettere successivamente al software l'elaborazione dei dati. Avviata l'analisi e messo a fuoco il campione, venivano acquisite 5 o più videoregistrazioni di campi diversi, scegliendo dei campi privi di aggregati o elementi estranei, attraverso le quali il sistema calcolava in automatico una serie di parametri, dai quali elabora alla fine un referto. Il sistema dalle registrazioni fatte calcolava la concentrazione degli spermatozoi per ml riportando anche il numero totale degli spermatozoi per campione di seme. Dopodiché, passava alla valutazione della motilità totale, calcolando i PR (progressivi), NP (non progressivi), IM (immobili); misurava l'area delle teste, il numero di cellule rotonde, le traiettorie circolari, la VLC (velocità curvilinea), la VSL (velocità lineare), la VAP (velocità media), la LIN (indice di linearità), la STR (indice di rettilinearità), la WOB (indice di oscillazione), la AL (ampiezza del movimento laterale della testa), la BFC (frequenza battito), la MC (*Mucous penetration*) e gli H (iperattivi).

Valutato il seme, se per i soggetti per cui si era autorizzati e se la valutazione dell'eiaculato avesse dato esito positivo, ovvero una condizione di normospermia, si poteva procedere alla fase di congelamento. Quindi venivano preparate le paillettes,

marcate secondo l'art. 10 del Reg Del UE 2020/686, ovvero riportando: la data di produzione; la specie, la razza e il numero di microchip dell'animale; il numero unico di riconoscimento dello stabilimento (ME0100C). La metodica di congelamento utilizzata era di tipo *two steps*, utilizzando il mestruo commerciale INRAFreeze (IMV technologies). Il seme veniva diluito in rapporto 1:1 con mestruo INRA96 a 36°C in delle provette Falcon da 50 ml. Il seme diluito veniva posto quindi per 10 minuti in un bagnomaria a 22°C e successivamente si procedeva alla fase di centrifuga. La centrifugazione avveniva ad una velocità di 600g per 10 min a 22°C, in modo da far depositare un *pellet* di seme sul fondo della provetta. Attraverso una siringa da inseminazione e una cannuccia *Aspitem* (IMV technologies), il surnatante veniva eliminato. La fase successiva prevedeva la seconda diluizione del *pellet* di seme, utilizzando il mestruo INRAFreeze (IMV technologies). Questa diluizione veniva fatta in modo tale da ottenere una concentrazione finale di spermatozoi di  $100 \times 10^6$ /ml. A questa fase seguiva la fase di equilibratura a 4°C per 75' effettuata in un Cabinet a 4°C (Minitube, USA), dove dopo i primi 30 min di equilibratura venivano riempite le *paillettes*. Trascorsa la fase di equilibratura, seguiva la fase di congelamento effettuata in vapori d'azoto per 10 min, ad un'altezza di 6 cm dal livello di azoto liquido (velocità stimata: -60°C/min da +4 a -140°C). Trascorso il tempo, le *paillettes*, venivano immerse in azoto liquido e successivamente stoccate in un bidone criogenico dedicato. Dopo 24h si procedeva alla prova di scongelamento, per ogni partita venivano scongelate 2 *paillettes* medie in acqua a 37° C per 14', quindi il materiale seminale in esse contenuto era miscelato in un'unica provetta. Come per la fase pre-congelamento veniva fatta una valutazione della motilità. Per la valutazione della motilità 3 aliquote da 3µl venivano poste su 3 diverse camere di Leja preriscaldate a 37°C, da ciascuna delle quali vengono videoregistrati 6 campi microscopici, tramite microscopio a contrasto di fase dotato di obiettivo 10x a contrasto di fase negativo e di tavolino termostato tarato a 37° C e analizzate dal software SCA. Nei soggetti in cui si procedeva con il congelamento, poiché il prelievo veniva fatto presso l'Ospedale Veterinario Universitari Didattico (OVUD) dell'Università degli Studi di Messina con un periodo di soggiorno inferiore ai 30 giorni, in accordo all'allegato II del Reg Del UE 2020/686 si procedeva alla ripetizione degli esami non prima di 14 giorni dal prelievo e non oltre i 90 giorni. Il

seme veniva comunque trattenuto nel centro per almeno 30 gg e comunque non prima dell'esito della seconda prova.

## **Risultati e Discussioni**

Sono stati selezionati 6 soggetti asinini (3 Panteschi e 3 Ragusani) e 4 soggetti equini (3 Sanfratellani e 1 PSO). I soggetti in esame erano degli stalloni autorizzati alla monta dall'I.I.I. per la Sicilia, i 3 asini Panteschi e un asino Ragusano erano di proprietà dell'I.I.I., mentre i Sanfratellani, il PSO e 2 asini Ragusani erano di proprietà di allevatori locali.

L'autorizzazione al congelamento del seme è stata ottenuta per il PSO Frodo di Ambelia e per gli asini Ragusani Max e Paride. La tecnica classica ed anche la più semplice e sicura per l'operatore di prelievo del seme nello stallone prevede il salto su manchino e l'utilizzo di una vagina artificiale. Tuttavia, l'indole, le condizioni di allevamento, la sensibilità degli animali, la non facilità di addestramento degli stessi, hanno contribuito all'utilizzo di metodiche differenti, per adattarsi ai soggetti in esame. Per far sì che uno stallone salti su manichino è necessario un periodo di *training* preferibilmente in età giovanile; tuttavia, data la limitata disponibilità di tempo per la conservazione del germoplasma, l'età degli animali a disposizione, il *training* non è stato possibile.

Il soggetto PSO è stato l'unico stallone che, pur non avendo mai montato è saltato senza problemi su manichino. L'unica variante alla tecnica di prelievo è stata quella di inserire la vagina artificiale in stazione, una volta avvenuta l'erezione, consentendo di effettuare comunque il salto sul manichino. Ciò può essere giustificato e spiegato col fatto che si trattava di un soggetto sportivo che ha avuto da sempre un rapporto diretto e quotidiano con l'operatore e non aveva mai fatto monte in libertà; lo stallone non ha, tra l'altro mostrato segni di inibizione al momento delle manipolazioni legate al prelievo del materiale seminale. Ben diversa è stata invece la situazione espressa dai soggetti di razza Sanfratellano. Questi, infatti, pur essendo degli stalloni domati,

non sono stati mai abituati alle manipolazioni durante la monta, in quanto solitamente effettuano la monta naturale. Il manichino rappresentava per loro quasi un ostacolo, infatti, dopo i primi tentativi, si optava per utilizzare una cavalla contenuta con delle balze. Tuttavia, anche questa tecnica è stata infruttuosa, infatti gli stalloni non tolleravano sia la manipolazione dell'operatore, sia il contatto con la vagina artificiale. Quest'ultimo fatto probabilmente è stato influenzato anche da una non ottimale preparazione della vagina artificiale in campo nella stazione di monta in contrada Ciccaldo (San Fratello, ME). Date le difficoltà di prelievo, anche per non stressare eccessivamente gli animali, si optava per l'utilizzo del *condom*. In questo modo è stato possibile ottenere un eiaculato completo pur rischiando gli inconvenienti descritti da Swire (1962) come la rottura dello stesso. Nel soggetto Napoleone, dopo diversi tentativi non fruttuosi di prelievo del seme con manichino, cavalla impastoiata, vagina artificiale e *condom* si sospendevano le operazioni di raccolta per la presenza di segni di malattia respiratoria nello stallone (rinite, inappetenza, rialzo febbrile). Ad un approfondimento sierologico lo stallone risultava positivo all'Herpesvirus. La rinopolmonite è una malattia che andava esclusa secondo il DM172/94, ancora preso come riferimento dal regolamento di stalloneria dell'I.I.I. Oggi la malattia è stata ridimensionata anche per la grande diffusione dell'infezione latente (stalloni non eliminatori) e della profilassi vaccinale, la cui positività ad oggi non è distinguibile dall'infezione. Rimane una malattia importante e contagiosa degli equidi che deve essere sorvegliata ed anche ricercata in determinate condizioni geografiche ed anamnestiche (rientro da mostre, fiere, trasporto) ed esclusa, almeno clinicamente, il giorno del prelievo.

La raccolta di seme nei soggetti asinini veniva fatta per tutti con la stessa metodica, ovvero vagina artificiale di tipo Hannover e salto su asina in calore. Tuttavia, anche se gli stalloni venivano condotti alla monta, per far sì che esprimessero al meglio il loro rituale di corteggiamento, ben diverso dagli equini, anche con qualche rischio per l'operatore, l'asino veniva lasciato più libero durante il salto. Infatti, l'asino ha un rituale particolare prima del salto, che prevede una lunga fase di eccitazione, con ripetute interazioni con l'asina (morsi, *flehmen*, avvicinamenti, false monte) (Quartuccio et al., 2011a). Queste importantissime fasi preliminari non possono

facilmente essere sostituite dal manichino né da un'eventuale cavalla in calore che non possiede a sua volta i *pattern* comportamentali tipici dell'asina (urinazione, masticazione, orecchie basse). Dopo questo rituale di corteggiamento, lo stallone ha delle piccole minzioni che precedono la fase di erezione e quindi il salto.



*Figura 14. Comportamento sessuale degli asini. In alto lo stallone annusa e morde i garretti della femmina. In basso a sinistra la facies della femmina in estro (masticamento). In basso a destra il flehmen*

La differenza delle tecniche di prelievo influenzava i risultati dell'analisi seminale. I soggetti Sanfratellani, per i quali si è optato per l'utilizzo del *condom* hanno dato un eiaculato più scarso in termini di volume e di qualità. Infatti, sia lo stress dovuto ai tentativi precedenti sia il fatto di non poter separare al momento della raccolta il gel dal liquido seminale, hanno influito sul risultato finale della stessa. La tecnica di prelievo ha comportato un inconveniente durante il prelievo dello stallone Orlando; infatti, la rottura del *condom* ha consentito di recuperare solamente 15 ml di eiaculato. Altro inconveniente è stato dovuto alla non possibilità di eliminare il gel al momento dell'eiaculazione. La fase di filtraggio dell'eiaculato ed eliminazione del gel ha influito negativamente sul volume finale del liquido seminale; inoltre, il contatto tra

spermatozoi e gel potrebbe aver avuto un effetto negativo sulla motilità. La valutazione macroscopica dell'eiaculato, i cui dati sono riportati in tabella 2, evidenziava, in particolare per lo stallone Indiano un aumento della viscosità, questo potrebbe essere stato causato anche dalla prolungata fase di eccitazione dovuta all'insuccesso dei primi tentativi di prelievo. Infatti, la frazione di gel separata tramite filtrazione era in media di 25 ml. Se i volumi non differivano di molto tra loro i risultati dell'analisi microscopica evidenziavano che lo stallone Orlando aveva delle *performance* nettamente superiori all'altro stallone, pur essendo entrambi dei buoni riproduttori in monta naturale.

ID	VOL	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ	ANOMALIE
INDIANO	17 ml	BIANCO	AUMENTATA	15%	10%
ORLANDO	15 ml	BIANCO/ GRIGIASTRO	NORMALE	80%	7%

*Tabella 2. Valutazione dell'eiaculato di stalloni Sanfratellani.*

I restanti parametri microscopici venivano valutati con sistema SCA e riportati in figura 15 e 16.

Referenza: 10-3-21



Data (giorno/mese/anno): 27/03/2021

Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

Codice: san fratellano 27-03-21



Animale: san fratellano, INDIANO

Ordinario (27/03/2021 16:00:08)

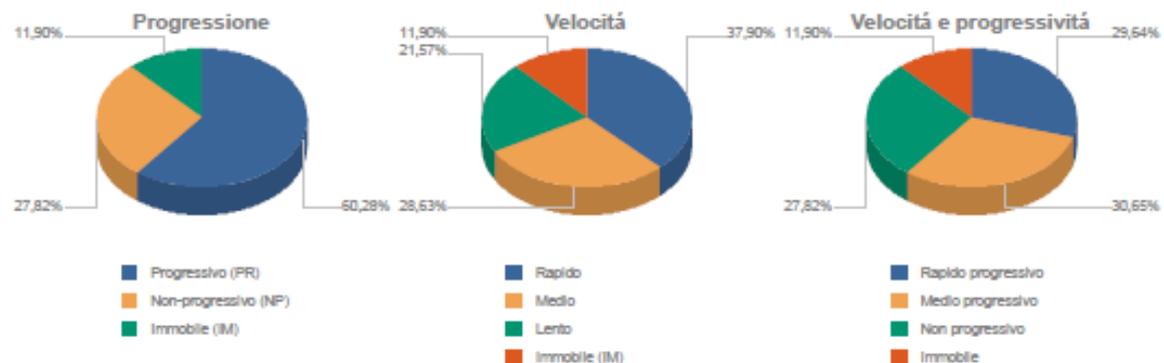
Concentrazione		
62,80 Milioni / ML	753,62 M/Campione	Volume (mL): 12,00

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	299	60,28	37,86	454,30
Non-progressivo (NP)	138	27,82	17,47	209,88
Immobile (IM)	59	11,90	7,47	89,64

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	437	88,10	55,33	663,98

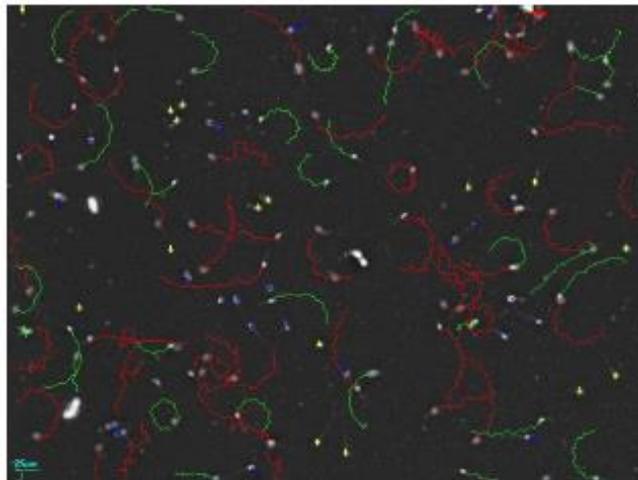
Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	188	37,90	23,80	285,65
Medio	142	28,63	17,98	215,75
Lento	107	21,57	13,55	162,58
Immobile (IM)	59	11,90	7,47	89,64

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	147	29,64	18,61	223,35
Medio progressivo	152	30,65	19,25	230,95
Non progressivo	138	27,82	17,47	209,88
Immobile	59	11,90	7,47	89,64



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	26,68	22,76	25,69	27,53	27,84	µm <sup>2</sup>

Cellule rotonde	Concentrazione		Traiettorie circolari		Totale	percentuale (%)
	1,85	Milioni / ML			241	48,59 %
<b>Media. Valori di velocità</b>	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità	
Velocità curvilinea - VCL	81,54	21,95	75,10	118,99	µm/s	
Velocità lineare - VSL	40,69	6,57	42,38	57,88	µm/s	
Md. Valore - VAP	59,45	11,97	60,20	84,76	µm/s	
Indice linearità - LIN	49,90	29,92	56,43	48,65	%	
Indice rettilineità - STR	68,44	54,85	70,39	68,29	%	
Indice oscillazione - WOB	72,92	54,55	80,17	71,24	%	
<b>Media. Valori di altri parametri</b>	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità		
Media. Ampiezza del movimento laterale de	3,37	2,35	4,15	µm		
Frequenza battito - BCF	9,69	9,17	10,10	Hz		
Hyperactive	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione		
	51	10,28	6,46	77,49		



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 15. Referto SCA dello stallone Sanfratellano Indiano.

Referenza: 10-3-21



Data (giorno/mese/anno): 27/03/2021

Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

Codice: san fratellano 27-03-21



Animale: Sanfratellano  
ORLANDO

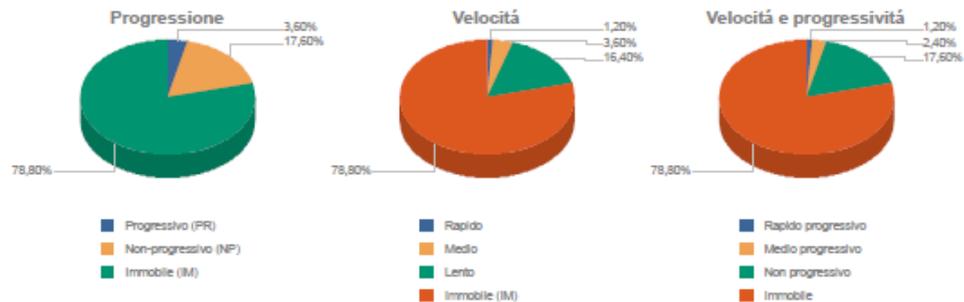
Concentrazione		
34,75 Milioni / ML	17,37 M/Campione	Volume (mL): 0,50

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	9	3,60	1,25	0,63
Non-progressivo (NP)	44	17,60	6,12	3,06
Immobile (IM)	197	78,80	27,38	13,69

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	53	21,20	7,37	3,68

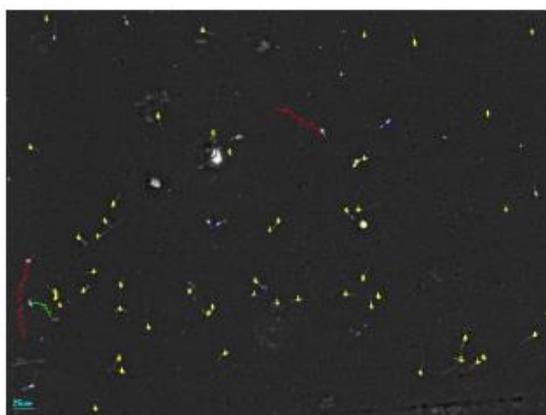
Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	3	1,20	0,42	0,21
Medio	9	3,60	1,25	0,63
Lento	41	16,40	5,70	2,85
Immobile (IM)	197	78,80	27,38	13,69

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	3	1,20	0,42	0,21
Medio progressivo	6	2,40	0,83	0,42
Non progressivo	44	17,60	6,12	3,06
Immobile	197	78,80	27,38	13,69



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	19,83	19,44	20,87	25,02	13,73	µm <sup>2</sup>

Concentrazione		Traiettorie circolari			Totale	Percentuale (%)
Cellule rotonde	1,71				45	18,00 %
Media. Valori di velocità		Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL		31,62	18,38	60,46	75,07	µm/s
Velocità lineare - VSL		10,24	3,31	22,45	37,12	µm/s
Md. Valore - VAP		14,28	6,23	30,34	43,42	µm/s
Indice linearità - LIN		32,38	17,99	37,13	49,44	%
Indice rettilineità - STR		71,68	53,11	74,01	85,49	%
Indice oscillazione - WOB		45,18	33,87	50,17	57,84	%
Media. Valori di altri parametri		Media	Medio	Rapido progressivo	Unità	
Media. Ampiezza del movimento laterale de		3,38	2,93	3,00	µm	
Frequenza battito - BCF		12,03	12,37	7,00	Hz	
		Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione	
Hyperactive		2	0,80	0,28	0,14	



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 16. Referto SCA dello stallone Sanfratellano Orlando.

Dal confronto tra i due stalloni, a conferma dell'analisi preliminare, i valori di concentrazione e motilità, erano 4 volte superiori nel primo stallone. La valutazione della vitalità era quasi sovrapponibile alla motilità totale, le lievi differenze evidenziate sono attribuibili al fatto che il colorante può penetrare anche spermatozoi mobili, ma con membrana citoplasmatica lievemente danneggiata. Nonostante la pochezza dei soggetti, le difficoltà di prelievo e le problematiche sanitarie, questi dati rappresentano la prima caratterizzazione cinetica dell'eiaculato di uno stallone Sanfratellano.

Lo stallone PSO, non avendo mai montato, e quindi in assenza di dati sulla fertilità è stato sottoposto ad una sessione preliminare di prelievo. La valutazione preliminare

dava sei buoni risultati di fertilità, in termini di volume e motilità, inoltre, la raccolta preliminare ha consentito di eliminare gli spermatozoi più vecchi dalla coda dell'epididimo, dando la possibilità di ottenere un miglior risultato il giorno del congelamento. Il giorno del congelamento l'eiaculato ottenuto aveva un volume di 80 ml, il colore era bianco/grigiastro, l'aspetto era lattescente, e la viscosità era normale. Il centro EQUIBBI non era provvisto di sistema SCA per la valutazione microscopica del seme, per cui la concentrazione era stabilita con fotometro e la valutazione fatta con microscopio a contrasto di fase. I dati della valutazione pre-congelamento (*fresh*) e dopo centrifuga ed aggiunta dell'*extender* con crioprotettore e refrigerazione (*chilled*) sono riportati nella tabella 3.

FRODO DI AMBELIA	VOL	CONC	MOT	VIT	ANOMALIE	MOT PROG
FRESH	80	68 M/ml	95%	85%	5%	80,00%
CHILLED	40	198 M/ml	95%	100%	5%	80%

Tabella 3. Valutazione seme Frodo di Ambelia (PSO)

L'eccellente qualità dell'eiaculato, considerato anche il fatto che lo stallone fosse "vergine" è stata confermata anche dalla valutazione post-congelamento come riportato nel referto SCA allegato (Figura 17). I valori di motilità post congelamento confrontati con la vitalità del campione post centrifuga, evidenziano l'importanza della valutazione della vitalità (VIT) prima del congelamento. Infatti, valutare la percentuale di spermatozoi vivi con membrana citoplasmatica integra, può essere un buon indicatore della percentuale di spermatozoi vivi e mobili post congelamento. Il seme di questo stallone PSO, uno dei primi ad essere congelato, è conservato presso la banca del germoplasma Sicilgermobank nei locali dell'OVUD di Messina (ME0100R).

Referenza: 1015



Data (giorno/mese/anno): 19/04/2023  
Centro: Laboratory

Codice: SCAtemp8



Animale: Frodo di Ambelia

Nuovo (19/04/2023 13:10)

**Concentrazione**

194,41 Milioni / ML

97,21 M/Campione

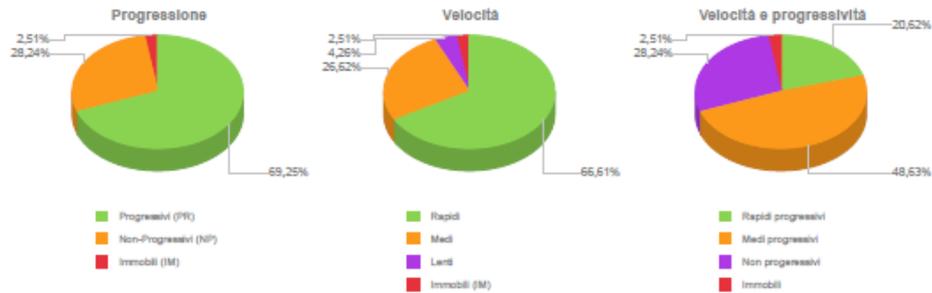
Volume (mL): 0,50  
Diluzione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	3644	69,25	134,63	67,32
Non-Progressivi (NP)	1.486	28,24	54,90	27,45
Immobili (IM)	132	2,51	4,88	2,44

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	5130	97,49	189,53	94,77

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	3.505	68,61	129,50	64,75
Medi	1.401	28,62	51,76	25,88
Lenti	224	4,28	8,28	4,14
Immobili (IM)	132	2,51	4,88	2,44

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	1.085	20,62	40,09	20,04
Medi progressivi	2.559	48,63	94,54	47,27
Non progressivi	1.486	28,24	54,90	27,45
Immobili	132	2,51	4,88	2,44



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	18,19	15,75	17,40	19,30	16,94	µm²

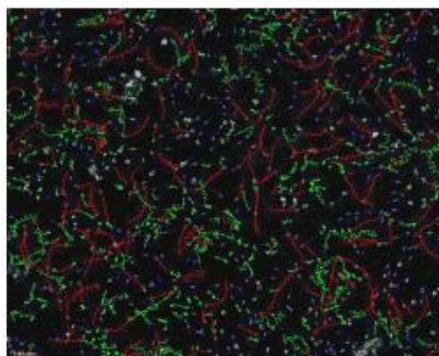
	Concentrazione	Totale	%
Cellule rotonde	0,07 Milioni / ML	4.273	81,20 %
Traiettorie circolari			

Referenza: 1015      Codice: SCAtemp6      Animale: Frodo di Ambelia      Data (giorno/mese/anno):  
 Centro: Laboratory

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	70,48	23,63	75,20	123,49	µm/s
Md. Valore - VAP	37,22	10,06	37,28	74,32	µm/s
Velocità lineare - VSL	25,15	4,36	19,72	66,45	µm/s
Indice rettilineità - STR	56,22	44,15	49,30	89,09	%
Indice linearità - LIN	29,02	19,12	23,86	54,74	%
Indice oscillazione - WOB	49,06	43,48	47,12	61,26	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	1,84	2,03	2,70	µm
Frequenza battito - BCF	10,11	9,77	21,37	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	340	6,63	6,46	12,56	6,28
Mucous penetration	1.003	19,55	19,06	37,06	18,53



Tecnico: Administrator

Commenti: scongelamento ufficiale

Figura 17. Referto SCA post scongelamento dello stallone PSO Frodo di Ambelia.

Il prelievo del seme degli stalloni Panteschi è avvenuto nella struttura dell'I.I.I. della tenuta di Ambelia. Al momento del prelievo di seme il personale di stalla riferiva che tutti gli stalloni avevano montato durante la stagione, tuttavia diverse asine non erano gravide, in particolare quelle montate dagli stalloni Quasimodo e alcune montate da Jesolo. Dopo esser stato prelevato, il seme è stato valutato macroscopicamente annotando i dati di volume, colore e viscosità (tabella 4), e successivamente diluito 1:1 con mestruo di trasporto per procedere successivamente alla valutazione microscopica nel laboratorio di biotecnologie riproduttive dell'OVUD.

ID	VOL	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ	ANOMALIE
ELVIS	17 ml	BIANCO/ GRIGIASTRO	NORMALE	90%	10%
JESOLO	15 ml	BIANCO	BASSA	20%	30%
QUASIMODO	14 ml	BIANCO/ GRIGIASTRO	NORMALE	25%	15%

Tabella 4. Valutazione del seme degli asini Panteschi.

In laboratorio si procedeva alla valutazione della concentrazione (fotometro) e microscopica tramite sistema assistito SCA (Figure 18-19-20). I referti dell'analisi sono riportati di seguito.

Alla luce dell'anamnesi e dei risultati dello spermioγραμμα gli stalloni Jesolo e Quasimodo non si sono confermati dei soddisfacenti riproduttori, infatti lo stallone Jesolo, oltre ad avere una scarsa concentrazione di spermatozoi/ml, aveva una motilità ed una vitalità del 20%, una percentuale di anomalie terziarie del 30% ed assenza di spermatozoi progressivi. Lo stallone Quasimodo, aveva una concentrazione normale di circa 300 milioni di spermatozoi/ml, tuttavia la motilità era scarsa, del 27% circa, e la motilità progressiva del 1%. Lo stallone Elvis invece si è confermato un ottimo riproduttore. Va evidenziato che il volume degli eiaculati era al di sotto dei volumi medi per la specie. Questo dato potrebbe però essere correlato all'età avanzata dei riproduttori e ad uno scarso *management* con poche integrazioni di concentrati nella dieta, che potrebbe avere un'influenza negativa sulle *performance* dello stallone.

Referenza: 1



Data (giorno/mese/anno): 15/03/2022

Centro: FIV Laboratory

Codice: Elvis



Animale: 536449, pantesco

Ordinario (15/03/2022 18:19:13)

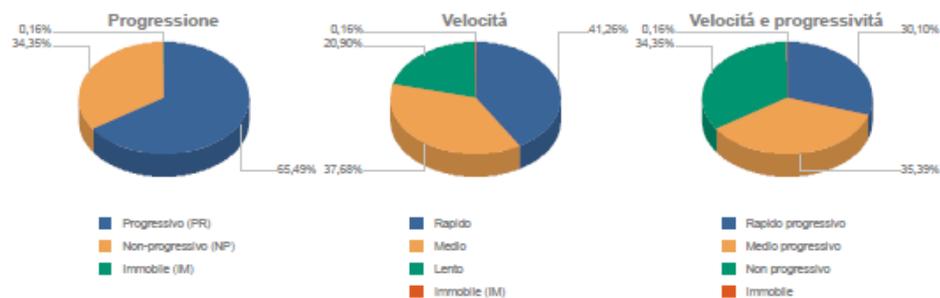
Concentrazione		
330,81 Milioni / ML	827,03 M/Campione	Volume (mL): 2,50

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	2065	65,49	216,66	541,65
Non-progressivo (NP)	1.083	34,35	113,63	284,07
Immobile (IM)	5	0,16	0,52	1,31

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	3148	99,84	330,29	825,72

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	1.301	41,26	136,50	341,25
Medio	1.188	37,68	124,64	311,61
Lento	659	20,90	69,14	172,86
Immobile (IM)	5	0,16	0,52	1,31

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	949	30,10	99,57	248,92
Medio progressivo	1.116	35,39	117,09	292,73
Non progressivo	1.083	34,35	113,63	284,07
Immobile	5	0,16	0,52	1,31



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	27,83	12,96	23,25	26,85	31,06	µm <sup>2</sup>

Referenza: 1  
[Barcode]

Codice: Elvis  
[Barcode]

Animale: 536449, pantesco  
Centro: FIV Laboratory

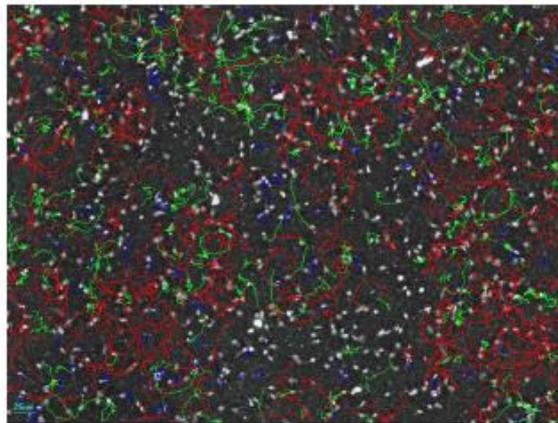
Data (giorno/mese/anno):  
[Barcode]

	Concentrazione		Totale	percentuale (%)
Cellule rotonde	3,56	Milioni / ML	2.382	74,91 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	79,37	33,43	65,52	115,13	µm/s
Velocità lineare - VSL	31,01	8,92	22,71	49,69	µm/s
Md. Valore - VAP	52,79	18,77	39,84	81,73	µm/s
Indice linearità - LIN	39,07	26,69	34,67	43,16	%
Indice rettilineità - STR	58,74	47,54	57,01	60,80	%
Indice oscillazione - WOB	66,52	56,15	60,81	70,99	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	3,61	2,98	4,14	µm
Frequenza battito - BCF	7,00	6,34	7,53	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	170	5,39	17,84	44,59



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 18. Referto SCA Elvis Pantesco

<b>Referenza:</b>	<b>Codice:</b> Jesolo
<b>Data (giorno/mese/anno):</b> 15/03/2022	
<b>Centro:</b> Ospedale Veterinario Universitario Didattico	<b>Animale:</b> 937486, Pantesco

Ordinario (15/03/2022 18:02:47)

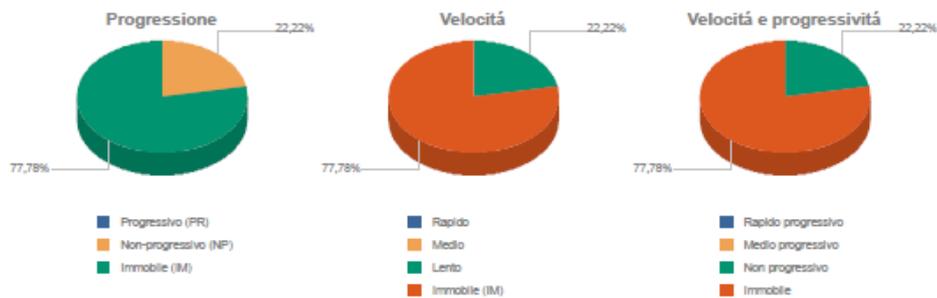
<b>Concentrazione</b>	7,89 Milioni / ML	153,80 M/Campione	Volume (mL): 20,00
-----------------------	-------------------	-------------------	--------------------

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	0	0,00	0,00	0,00
Non-progressivo (NP)	8	22,22	1,71	34,18
Immobile (IM)	28	77,78	5,98	119,62

Mobile	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	8	22,22	1,71	34,18

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	0	0,00	0,00	0,00
Medio	0	0,00	0,00	0,00
Lento	8	22,22	1,71	34,18
Immobile (IM)	28	77,78	5,98	119,62

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	0	0,00	0,00	0,00
Medio progressivo	0	0,00	0,00	0,00
Non progressivo	8	22,22	1,71	34,18
Immobile	28	77,78	5,98	119,62



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	13,45	14,92	8,30	0,00	0,00	µm <sup>2</sup>

Referenza: Codice: Jesolo Animale: 937486, Pantesco Data (giorno/mese/anno):  
 Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

	Concentrazione		Totale percentuale (%)	
Cellule rotonde	0,43	Milioni / ML	6	16,67 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	13,72	13,72	0,00	0,00	µm/s
Velocità lineare - VSL	4,43	4,43	0,00	0,00	µm/s
Md. Valore - VAP	5,90	5,90	0,00	0,00	µm/s
Indice linearità - LIN	32,27	32,27	0,00	0,00	%
Indice rettilineità - STR	75,11	75,11	0,00	0,00	%
Indice oscillazione - WOB	42,96	42,96	0,00	0,00	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	0,00	0,00	0,00	µm
Frequenza battito - BCF	0,00	0,00	0,00	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	0	0,00	0,00	0,00



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 19. Referto SCA Jesolo Pantesco

Referenza: 15.03.22



Data (giorno/mese/anno): 15/03/2022

Centro: FIV Laboratory

Codice: Quasimodo



Animale: 008801, Pantescio

Ordinario (15/03/2022 18:25:26)

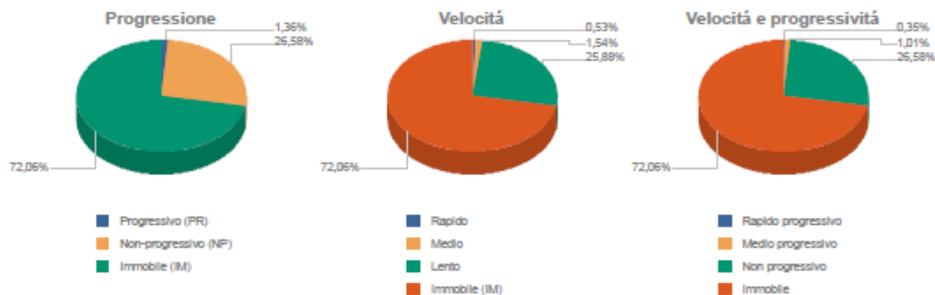
Concentrazione		
305,75 Milioni / ML	4.280,48 M/Campione	Volume (mL): 14,00

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	31	1,36	4,16	58,30
Non-progressivo (NP)	605	26,58	81,27	1.137,83
Immobile (IM)	1.640	72,06	220,31	3.084,35

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	636	27,94	85,44	1.196,13

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	12	0,53	1,61	22,57
Medio	35	1,54	4,70	65,82
Lento	589	25,88	79,12	1.107,73
Immobile (IM)	1.640	72,06	220,31	3.084,35

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	8	0,35	1,07	15,05
Medio progressivo	23	1,01	3,09	43,26
Non progressivo	605	26,58	81,27	1.137,83
Immobile	1.640	72,06	220,31	3.084,35



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	24,68	23,83	26,76	30,49	24,82	µm <sup>2</sup>

Referenza: 15.03.22

Codice: Quasimodo

Animale: 008801, Pantesco  
 Centro: FIV Laboratory

Data (giorno/mese/anno):

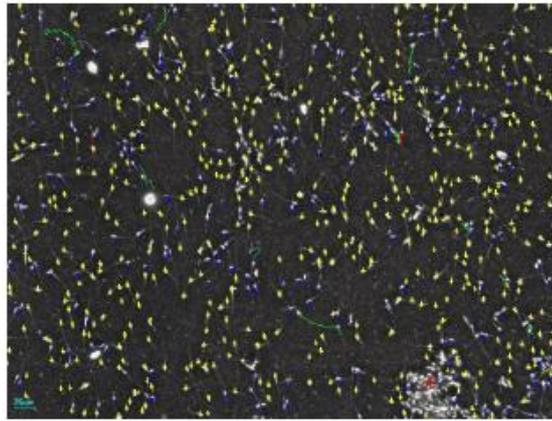


	Concentrazione		Totale	Percentuale (%)
Cellule rotonde	8,12	Milioni / ML	399	17,53 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	21,80	17,49	58,85	115,14	µm/s
Velocità lineare - VSL	8,30	6,76	21,78	42,99	µm/s
Md. Valore - VAP	13,18	10,74	36,88	61,49	µm/s
Indice linearità - LIN	38,44	38,66	37,01	37,34	%
Indice rettilineità - STR	63,03	62,95	59,06	69,92	%
Indice oscillazione - WOB	60,99	61,42	62,66	53,40	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	2,96	2,28	4,73	µm
Frequenza battito - BCF	5,30	5,39	4,72	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	3	0,13	0,40	5,64



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 20. Referto SCA Quasimodo Pantesco

La valutazione e l'analisi del seme dei riproduttori Ragusani rispecchiava perfettamente le *performance* e la libido dei soggetti durante il prelievo di seme. I due stalloni hanno dato eiaculati di ottima qualità e in termini di volume, colore, viscosità e anomalie molto simili tra loro (tabella 5).

ID	VOL	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ	ANOMALIE
MAX	80 ml	BIANCO/ GRIGIASTRO	NORMALE	90%	5%
PARIDE	75 ml	BIANCO/GRIGIASTRO	NORMALE	90%	1%

*Tabella 5. Valutazione del seme negli asini Ragusani.*

L'analisi microscopica pre-congelamento (figura 21 e 22) confermava le ottime aspettative degli stalloni. La concentrazione degli eiaculati era in media di 150 M/ml, la motilità totale superava il 99%, il numero di spermatozoi progressivi era dell'80% e del 98% rispettivamente per Max e Paride. Questo risultato indicativo delle caratteristiche della specie asinina (Quartuccio et al., 2011a; b) era propositivo di una buona riuscita del congelamento. Il seme di entrambi gli stalloni alla valutazione post congelamento conservava delle ottime caratteristiche. Infatti, per entrambi gli stalloni la motilità totale era superiore al 60% e con una motilità progressiva del 40%. Inoltre, i valori post congelamento sono perfettamente in linea con la letteratura (Contri et al., 2012).

Referenza: 39-3-21



Data (giorno/mese/anno): 24/02/2022

Centro: FIV Laboratory

Codice: max 2



Animale: cong 2, ragusano

Ordinario (24/02/2022 15:47:03)

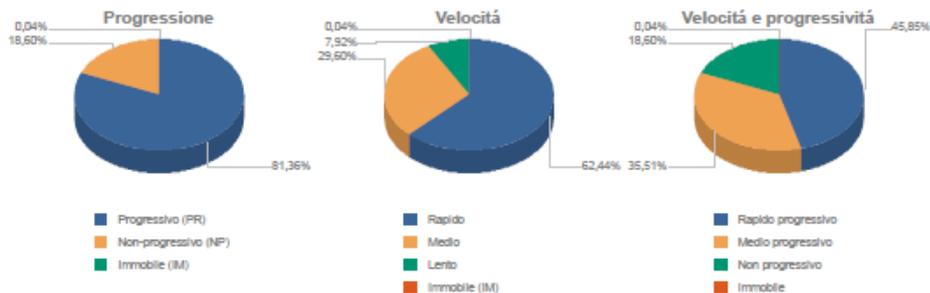
Concentrazione		
135,93 Milioni / ML	12.233,51 M/Campione	Volume (mL): 90,00

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	1982	81,36	110,59	9.953,54
Non-progressivo (NP)	453	18,60	25,28	2.274,95
Immobile (IM)	1	0,04	0,06	5,02

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	2435	99,96	135,87	12.228,49

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	1.521	62,44	84,87	7.638,41
Medio	721	29,60	40,23	3.620,84
Lento	193	7,92	10,77	969,24
Immobile (IM)	1	0,04	0,06	5,02

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	1.117	45,85	62,33	5.609,54
Medio progressivo	865	35,51	48,27	4.344,00
Non progressivo	453	18,60	25,28	2.274,95
Immobile	1	0,04	0,06	5,02



	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
Area Testa	43,23	1,39	26,97	38,06	48,14	µm <sup>2</sup>

Referenza: 39-3-21  
[Barcode]

Codice: max 2  
[Barcode]

Animale: cong 2, ragusano  
Centro: FIV Laboratory

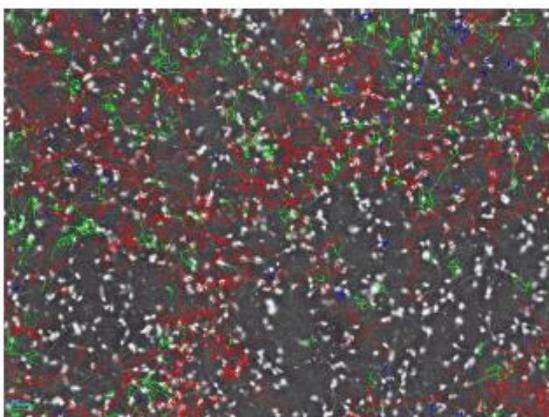
Data (giorno/mese/anno):  
[Barcode]

	Concentrazione			Totale	percentuale (%)
Cellule rotonde	18,16	Milioni / ML	Traiettorie circolari	1.648	67,85 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	101,24	33,40	68,31	125,57	µm/s
Velocità lineare - VSL	43,19	11,49	22,48	57,13	µm/s
Md. Valore - VAP	70,10	21,67	41,30	89,86	µm/s
Indice linearità - LIN	42,66	34,41	32,90	45,50	%
Indice rettilineità - STR	61,62	53,04	54,42	63,57	%
Indice oscillazione - WOB	69,24	64,87	60,45	71,57	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	3,87	3,06	4,21	µm
Frequenza battito - BCF	6,42	5,74	6,72	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	233	9,56	13,00	1.170,12



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 21. Referto SCA Max Ragusano

Referenza: 1096



Data (giorno/mese/anno): 30/11/2023  
Centro: OVUD

Codice: SCAtemp49



Animale: Paride

Nuovo (30/11/2023 17:47)

**Concentrazione**

164,41 Milioni / ML

12.330,75 M/Campione

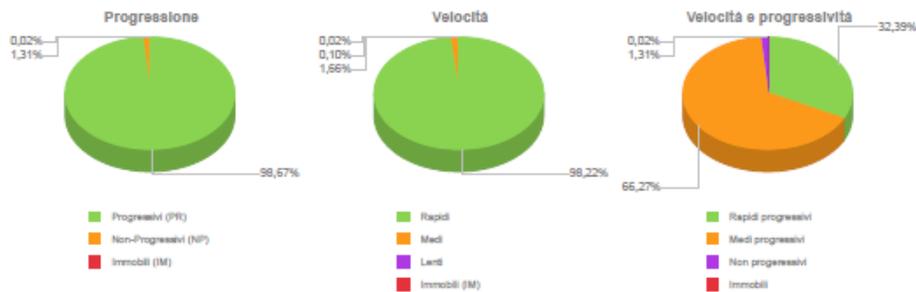
Volume (mL): 75,00  
Diluzione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	5111	98,67	162,22	12.166,50
Non-Progressivi (NP)	68	1,31	2,16	161,87
Immobili (IM)	1	0,02	0,03	2,38

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	5179	99,98	164,38	12.328,37

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	5.088	98,22	161,49	12.111,75
Medi	86	1,66	2,73	204,72
Lenti	5	0,10	0,16	11,90
Immobili (IM)	1	0,02	0,03	2,38

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	1.678	32,39	53,26	3.994,40
Medi progressivi	3.433	66,27	108,96	8.172,10
Non progressivi	68	1,31	2,16	161,87
Immobili	1	0,02	0,03	2,38



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	26,93	2,72	10,84	27,04	27,38	µm²

	Concentrazione		Traiettorie circolari	
			Totale	%
Cellule rotonde	0,03	Milioni / ML	3.130	60,42 %

Referenza: 1096  
████████████████████

Codice: SCAtemp49  
████████████████████

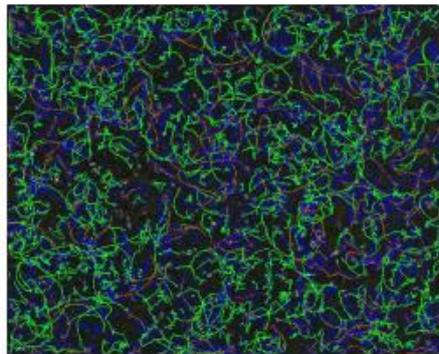
Animale: Paride  
Centro: OVUD

Data (giorno/mese/anno):  
-----

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	157,77	27,21	154,66	169,43	µm/s
Md. Valore - VAP	105,98	16,63	98,63	124,65	µm/s
Velocità lineare - VSL	70,92	8,88	51,97	112,20	µm/s
Indice rettilineità - STR	64,24	52,37	52,01	89,74	%
Indice linearità - LIN	43,83	34,30	33,02	66,33	%
Indice oscillazione - WOB	66,17	62,76	62,55	73,71	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	2,99	3,12	2,82	µm
Frequenza battito - BCF	17,96	16,32	21,82	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	1.147	22,15	22,14	36,41	2.730,38
Mucous penetration	1.632	31,51	31,51	51,80	3.884,90



Tecnico: Administrator  
Commenti:

Figura 22. Referto SCA Paride Ragusano

Concludendo possiamo dire che dall'esperienza condotta è emerso che gli stalloni il cui seme è stato congelato avevano delle migliori *performance* rispetto agli altri con eccezione dell'asino Elvis. Questo potrebbe essere associato anche al fatto che i primi, essendo animali di proprietà, godevano di un *management* superiore. Tuttavia, nell'ottica della salvaguardia della biodiversità sarebbe importante valorizzare questi soggetti e cercare di conservarne il germoplasma. Infatti, il congelamento è stato possibile solo in 3 soggetti di proprietà, previa autorizzazione del proprietario. Dal mese di ottobre 2023 l'ANAERAI dopo aver effettuato le opportune valutazioni genetiche e morfologiche secondo il Dlgs 52/18 ha autorizzato l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) di Messina al prelievo e la conservazione del materiale germinale di soggetti appartenenti alle razze autoctone siciliane (Sanfratellano, asino Ragusano e Pantesco), di proprietà della regione.

## I ruminanti

In Sicilia, l'allevamento e la pastorizia hanno una storia millenaria. Omero nel libro IX dell'Odissea ci restituisce uno spaccato di vita bucolica nell'antro del ciclope Polifemo, tradizionalmente collocato nel territorio etneo, nel quale vengono descritti i recinti per gli agnelli e i capretti, i secchi colmi di siero, le pecore, la mungitura, l'allattamento, la realizzazione del formaggio. Strabone, infine, nel I secolo d.C. riferisce che la maggior parte dei paesi interni della Sicilia sono abbandonati ai pastori e che la Sicilia aveva acquisito la fama di granaio di Roma e alla capitale era diretto tutto ciò che produceva (Ambrosoli, 1833). La Sicilia vanta una storia zootecnica importante, la sua posizione al centro del Mediterraneo, il suo territorio variegato, e il susseguirsi di dominazioni e scambi culturali, le ha permesso di avere una biodiversità zootecnica unica al mondo. La zootecnia dell'isola oggi vede quasi la scomparsa di razze uniche, che si sono adattate al clima e ai territori più difficili, che quindi bisogna salvaguardare per mantenere un prezioso patrimonio genetico.



Figura 23. Venditore di latte. Immagine dal web (<https://www.libreriadeglistudi.it/product/riproduzione-cartolina-antica-di-ragusa-inf-venditore-di-latte-sul-corso-giardino-pubblico/>).

## **I bovini: la Cinisara, la Modicana e la Siciliana**

La vacca **Cinisara** è una bovina appartenente al ceppo delle razze Podoliche. È originaria dell'areale della provincia di Palermo, dai monti di Cinisi, da cui prende il nome, alla valle dello Jato, fino ai piedi di Rocca Busambra (Corleone). Seppur in misura minore viene allevata anche nelle province di Trapani, Enna, Messina e Ragusa (Liotta e Chiofalo, 2007). Le sue origini sono remote, e diverse sono le ipotesi più o meno attendibili. Si pensa infatti che sia presente dai primi secoli del secondo millennio, e c'è chi sostiene, forse per le caratteristiche simili ai bovini spagnoli di razza Brava o Lidia, che abbia origini spagnole. Tra le ipotesi più accreditate sulla sua origine c'è quella che la vede giunta in Sicilia a causa del naufragio di una nave spagnola che trasportava dall'Africa animali destinati alle corride.

La Cinisara è una bovina particolarmente rustica e resistente alle malattie, è un'ottima pascolatrice, ben adattandosi alle condizioni dure e aspre del territorio, dove la vegetazione è scarsa e il clima è particolarmente avverso, con estati torride e inverni brevi ma rigidi, dove le precipitazioni sono scarse e i venti costanti, riuscendo a dare delle buone produzioni latte con quel poco che offre il territorio (Ciampolini et al., 2015). Questi bovini sono di taglia media, con un'altezza al garrese di 140-150 cm per i maschi e 130-140 cm per le femmine (Giaccone et al., 1988). Il mantello è nero uniforme o in alcuni casi con la tipica pezzatura *agghia* (nero con una fascia bianca che investe la testa, la linea dorsale, il perineo, la coda e la linea ventrale), tuttavia non è raro trovare nella mandria soggetti completamente rossi o con sfumature rossastre (fromentino) figli di animali neri, che però sono considerati fuori *standard*. La pelle è sottile con pelo corto e folto e lucente. La testa è leggera a profilo rettilineo con occhi grandi, scuri e vivaci, leggermente sporgenti, narici e musello nero, le corna sono a lira nella femmina e più tozze e grosse e di forma a semiluna nel maschio e di colore nero. Nel complesso resta una bovina leggera, con una solida struttura scheletrica, gli arti e piedi sono forti e robusti, con unghie robuste di colore nero tendente all'ardesia. La mammella di colore nero uniforme, leggermente pelosa, con base ampia attaccata alta posteriormente. I capezzoli tendenzialmente lunghi e grossi. La Cinisara è una bovina a duplice attitudine produttiva (latte e carne). Il latte, ha una

produzione media di circa 15/18 litri al giorno dal quale si ottengono essenzialmente o esclusivamente preziosi lingotti di caciocavallo di Cinisara, un tempo usati proprio come “moneta”.

Diversi sono stati i contributi scientifici in merito alla qualità del latte di questa bovina e sulle caratteristiche del caciocavallo (Altomonte et al., 2016; Di Gregorio et al., 2017; Maniaci et al., 2021) I vitelli, meno la rimonta, vengono indirizzati verso la produzione di carne. L'allevamento tradizionale di questa bovina è a stabulazione fissa, con animali al pascolo durante tutto l'anno, le bovine vengono legate solamente per la mungitura, dopodiché trascorrono il resto delle giornate al pascolo (Monteverde et al., 2015). I vitelloni destinati alla macellazione vengono allevati al pascolo per il primo anno di vita, per finire con un periodo di finissaggio in stalla dove i vitelli vengono alimentati con fave, orzo e frumento. Le carni, seppur poco apprezzate dal consumatore, hanno ottime qualità organolettiche. Negli ultimi anni queste carni sono state valorizzate con la produzione di salumi quali: salame e bresaola (Busambrina) (Liotta et al., 2015; Gaglio et al., 2016; Maniaci et al., 2020; Alabiso et al., 2021). Secondo le categorie di rischio della FAO questa razza è considerata in pericolo e dal 1985 è stata inserita nel Registro Anagrafico delle popolazioni bovine autoctone e gruppi etnici a limitata diffusione. Nel 1995 con un decreto del Ministero dell'agricoltura, (MiPAFF) la razza è stata ufficialmente riconosciuta e inserita nel libro genealogico delle razze bovine autoctone, attualmente detenuto dall'associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna (ANARB). Oggi questa bovina ha una consistenza di circa 7200 capi (BDN, 2023).

L'I.Z.S.S. d'intesa con ANARB è l'ente responsabile della conservazione *in situ* di questa razza bovina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: DUAL BREEDING, capofila ANAPRI (Associazione Nazionale Allevatori Pezzata Rossa Italiana), PNSR 2020/24 – Sottomisura 10.2; Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; ARCAS capofila Istituto zooprofilattico sperimentale per la Sicilia, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; COFAPS capofila I.Z.S.S, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; GenoModCinProLaC capofila Azienda Mezzasalma Daniela,

PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 16.1; GAL Cinisara, capofila GAL di Castellamare del Golfo, PSR Sicilia 2014-22; Cinisara's Chain capofila Consorzio di Tutela della Carne Bovina Cinisara e suoi derivati, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 16.1.



*Figura 24. Bovine di razza Cinisara. A destra una bovina cinisara con mantello rosso.*

Al polo opposto dell'isola, nell'altopiano ragusano, nel corso degli anni si sono definiti i caratteri di un'altra razza bovina, dalle caratteristiche completamente differenti. La vacca **Modicana** è una originaria dell'antica Contea di Modica, l'attuale provincia di Ragusa, tuttavia, si è in breve tempo diffusa in diverse aree dell'isola, giungendo alla fine del 1800 in Sardegna, dove incrociata con bovini locali ha dato origine alla Sardo-Modicana. Il dibattito del suo arrivo in Sicilia è ancora irrisolto: secondo alcuni è giunta dal Mediterraneo, secondo altri dall'Europa continentale, al seguito di Normanni e Angioini. Nel 1808, l'abate Paolo Balsamo nel suo "Giornale del viaggio fatto in Sicilia" sottolineò "la bontà dei bestiami di Modica"; nel 1877, il barone pisano Sidney Sonnino in "Contadini di Sicilia" ricordò la "bella specie bovina conosciuta come razza Modicana". Quando nel 1985 è stato istituito il Registro Anagrafico delle Popolazioni Bovine Autoctone e Gruppi Etnici a limitata diffusione, la razza Modicana è stata identificata come una delle razze da salvaguardare. Dagli anni '60 si registra un calo drastico dei capi. Le cause della diminuzione del numero di questi esemplari sono da ricercare principalmente nell'introduzione dei mezzi meccanici, ma anche nella scarsa resa sia del latte che al macello. Una variante della Modicana è la **Siciliana**, distinta in Montanina e Mezzalina, è una popolazione relitta di bovini rustici, longilinei, dal mantello rosso al rosso scuro quasi nero, ossatura possente, allevata al pascolo nelle aree montane e collinari dei Peloritani, Nebrodi e

198

Madonie. La vacca Modicana è caratterizzata da una pelle non molto spessa, elastica, facilmente sollevabile in pliche. Il pelo è folto è abbondante, il mantello va dal fromentino al rosso, al rosso scuro con accentuazioni fino al nero, le colorazioni più scure sono maggiormente frequenti nella varietà Siciliana e nei tori, o comunque persistono nei ceppi allevati nell'entroterra. La testa è leggera, il musello largo e le corna mediamente lunghe dirette verso l'alto. Il collo è lungo nelle vacche, mentre nei tori moderatamente più corto, largo e muscoloso, la giogaia è abbondante, con numerose pieghe, Il garrese è muscoloso nei tori, più sottile e rilevato nelle vacche. Le spalle sono ben aderenti al tronco. Gli arti robusti sono ed asciutti, con appiombi regolari e piedi robusti con unghioni di medio sviluppo di colore nero o ardesia. La mammella si presenta con un'ampia base, ben sostenuta, ma di scarso sviluppo, i quarti sono di medio sviluppo, ma spesso disomogenei, mentre capezzoli hanno un'attaccatura ridotta e spesso sono di dimensioni notevoli (ANARB; Giaccone, 1982) Attualmente appaiono insufficienti lo sviluppo e la conformazione della ghiandola, asimmetrici i quartieri, alquanto ridotta l'attaccatura e di eccessive dimensioni i capezzoli. La Modicana è una bovina a duplice attitudine, usata con buoni risultati nell'incrocio con tori Limousine e Charolaise per la produzione di vitelloni da carne e il latte prodotto è usato per la produzione locale del Ragusano D.O.P., che però può essere prodotto con latte di vacche di razza diversa, purché sia rispettato il disciplinare. Questa bovina è molto apprezzata per le spiccate attitudini materne e per la sua facilità d'adattamento alle diverse condizioni climatiche ed alimentari (Chiofalo et al., 2000). La sua produzione lattea è di circa 3000 Kg in 262 giorni di lattazione circa (Chiofalo et al., 2000). Il latte della Modicana è caratterizzato da un'alta percentuale di proteine ed un'alta frequenza di K caseina nella variante B . Sono state studiate la composizione del latte, il suo contenuto minerale e le proprietà coagulative (Micari et al., 1993; Chiofalo et al., 1997; Marletta et al., 1998; 2003. Il latte della Modicana è tecnologicamente molto più adatto alla caseificazione rispetto a quello delle Holstein. Per il processo di produzione del Ragusano DOP, queste caratteristiche possono essere un grande valore aggiunto e devono essere confermate da studi sulle caratteristiche dei formaggi stagionati (Chiofalo et al., 2000). Attualmente ha una consistenza di circa 6500 capi (BDN, 2023), tuttavia gli allevamenti sono esigui. Negli anni sono stati attivati diversi progetti di conservazione

e tutela della razza, dal 1994, infatti, l'ISZ Sicilia si è attivato per la conservazione e lo studio del germoplasma della razza Modicana: sono state prelevate 12000 dosi di seme che sono custodite presso il Centro Italiano Zootecnico (CIZ) (oggi Inseme) e a disposizione degli allevatori tramite l'AIA. Il 18 gennaio 2018 è stato approvato, dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, il progetto PNSR *DUAL BREEDING* (le razze bovine a duplice attitudine: un modello alternativo di zootecnia eco-sostenibile). Il programma è attualmente in corso e prevede il congelamento di dosi di seme di almeno 6 tori Modicani. Infine, un'indagine preliminare è stata infine svolta per la valutazione di protocolli di superovulazione in programmi di *embryo transfer* (La Spisa et al., 2018), i cui risultati sono proseguiti con questa trattazione.

L'I.Z.S.S. d'intesa con ANARB è l'ente responsabile della conservazione *in situ* di questa razza bovina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: DUAL BREEDING, capofila ANAPRI (Associazione Nazionale Allevatori Pezzata Rossa Italiana), PNSR 2020/24 – Sottomisura 10.2; Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; ARCAS capofila Istituto zooprofilattico sperimentale per la Sicilia, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; BIOSave capofila Consorzio di Ricerca Filiera Carni, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; COFAPS capofila I.S. Z.S, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; GenoModCinProLaC capofila Azienda Mezzasalma Daniela, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 16.1.



Figura 25. Toro Modicano nell'azienda Mezzasalma Daniela.

## **Ovini e Caprini: la Barbaresca, la Messinese e la Girgentana**

La pecora **Barbaresca Siciliana** (Orecchiuta, Siciliana migliorata) è una razza autoctona siciliana con buona produzione di carne e latte. Negli ultimi 20 anni la popolazione si è contratta del 70% ed oggi ha una consistenza di poco più di 1000 capi riproduttori, divenendo una razza a rischio di grave erosione genetica. La sofferenza genetica è stata purtroppo confermata da raffinate e recenti analisi genomiche (Tolone et al., 2012; Mastrangelo et al., 2017; 2018). Questa razza ha origini antiche, sembra che derivi dall'incrocio tra ovini di razza Barberin del Nord Africa e ovini di razza Pinzirita siciliana. A spiegazione di ciò, negli scritti arabi custoditi all'interno della biblioteca agrigentina di S. Spirito si legge che gli Arabi, insediatisi in Sicilia dall'827 al 1091, trasferirono molti ovini nell'entroterra siciliano ricco in pascoli (Liotta e Chiofalo, 2011). L'areale di diffusione sono le zone interne delle province di Agrigento e Caltanissetta, con qualche allevamento sul messinese. La Barbaresca è una pecora di taglia grande (80 cm di altezza al garrese per le femmine e 85 cm per i maschi), con groppa ben sviluppata in larghezza e con masse muscolari delineate. Gli arti sono alti e robusti, con unghielli evidenti grigio chiaro, rivestiti di peluria il cui colore ricorda quello della testa e delle orecchie. La testa, priva di corna in entrambi i sessi, è di colore bianco, irregolarmente picchiettata o puntiforme o macchiettata di nero. Le orecchie sono larghe, lunghe e pendenti, dello stesso colore della testa. Il vello, bianco, con eventuali macchie nerastre tollerabili alla zona del collo, è aperto, tendente, in alcuni soggetti, al chiuso. È una pecora utilizzata prevalentemente per la produzione di carne, anche se è in grado di produrre buoni quantitativi di latte. La lana, classificata come «da lavoro», cioè una via di mezzo tra quella da materasso e quella tessile, viene impiegata nei manufatti e tessuti di grana grossa, tipo coperte e tappeti. L'attitudine alla produzione di carne è testimoniata sia dal tasso di gemellarità, sia dal peso alla nascita degli agnelli. Gli agnelli nati da parto singolo hanno infatti in media un peso di circa 5 kg, quelli nati da parto gemellare di 3,8 kg. Gli incrementi di peso medi giornalieri degli agnelli sono elevati e permettono loro di raggiungere, all'età di 45 giorni, un peso di circa 14 kg (Liotta e Chiofalo, 2011). La lattazione ha una durata di circa 120 giorni per le primipare e di 210 giorni per le pluripare, con produzioni che arrivano fino ai 250 litri

di latte, con un tenore in grasso che si aggira sul 6-7% (Chiofalo e Micari, 1982). La conservazione di questa razza non può prescindere dalla valutazione del *management*, al miglioramento delle tecniche e modalità di tosatura (Piccione et al., 2002), al controllo delle malattie infettive trasmissibili conosciute ed emergenti, come la Visna-Maedi (Tumino et al., 2022). Non esistono lavori scientifici sulla caratterizzazione riproduttiva e la conservazione del germoplasma di questa razza ad oggi.

L'I.S.Z.S. d'intesa con ASSONAPA è l'ente responsabile della conservazione *in situ* di questa razza ovina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; CORIAL, capofila Università di Palermo, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; ARCAS capofila Istituto zooprofilattico sperimentale per la Sicilia, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



Figura 26. Ariete di razza Barbaresca presso l'azienda Scuderi.

La capra **Messinese** (Siciliana o Mascaruna) è una razza caprina autoctona siciliana allevata nelle catene montuose della costa settentrionale dell'isola. Il suo maggior areale di diffusione sono i Monti Peloritani e Nebrodi (ME). Ha una consistenza di poco più di 9000 capi riproduttori. È una razza molto rustica, spesso incrociata con altre razze e popolazioni. La capra Messinese è allevata allo stato brado e transumante, è una razza che si è perfettamente adattata a pascolare nel fitto sottobosco dei Nebrodi e dei Peloritani, i ricoveri per gli sono utilizzati solamente per la notte o per i periodi invernali, dove agli animali viene integrato del fieno e del concentrato. La Messinese

è una capra di taglia medio-piccola; la testa piccola e leggera, con profilo fronto-nasale rettilineo, a volte sono presenti folti peli nella zona frontale in entrambe i sessi, è provvista di corna, molto sviluppate nei maschi, aperte e tendenti alla torsione, le orecchie sono orizzontali o semipendenti portate lateralmente. Generalmente sono presenti barba e tette. Il torace e l'addome sono mediamente ampi, e l'apparato mammario di tipo pecorino. Gli arti sono di lunghezza media con unghie solidi, ardesia chiaro. Il mantello è di colore variabile uniforme, pezzato o screziato, nero, marrone o rosso con varie tonalità. Tipiche sono le maschere facciali, da qui il nome di "Mascaruna", sebbene sia in corso la caratterizzazione di questa popolazione mascherata per capire se abbia una sua identità genetica. Il pelo è lungo, la pelle fine ed elastica. L'altezza media al garrese è di 72 cm per i maschi e di 67 cm per le femmine, il peso in media è di 55 Kg per i maschi e di 38 Kg per le femmine (Finocchiaro et al., 2005). Questa capra è allevata principalmente per la produzione latte, ma anche per la carne, data la tradizione volta al consumo di carne caprina nel territorio d'allevamento. Il latte ottenuto viene utilizzato insieme ad altro latte solitamente ovino o bovino per la produzione tipica del Maiorchino. Non esistono lavori scientifici sulla caratterizzazione riproduttiva e la conservazione del germoplasma di questa razza ad oggi.

L'I.S.Z.S. d'intesa con ASSONAPA è l'ente responsabile della conservazione *in situ* di questa razza caprina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; CORIAL, capofila Università di Palermo, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; COFAPS capofila I.Z.S.S, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



*Figura 27. Capre e becchi di razza Messinese, azienda Manna.*

La capra **Girgentana** è una razza caprina autoctona siciliana originaria della provincia di Agrigento (Girgenti) da cui prende il nome. Le antiche origini di questa razza sono da ricercare nella capra Falconeri o Markor, proveniente dall'Asia Occidentale Afghanistan (Portolano, 1987) e l'importazione dei primi soggetti è attribuita agli Arabi nell'800 d.C., quando approdarono a Marsala per diffondersi in Sicilia. La Girgentana è una capra di taglia media, la testa si presenta piccola, fine e leggera con profilo fronto-nasale camuso per lo sviluppo pronunciato delle ossa frontali, mai tozza e grossolana; la barba è presente in entrambi i sessi; le orecchie sono medio piccole portate sempre erette; sulla fronte i maschi presentano un ciuffo di peli arruffate. Caratteristica unica di questa razza sono le corna, presente in entrambi i sessi, ma più sviluppate nel maschio sono elegantemente attorcigliate, erette e turrette, quasi verticali, mai eccessivamente divergenti, pressoché unite alla base. Nel complesso è una capra leggera ed elegante; l'apparato mammario è molto ampio con mammelle tipiche pecorine, pur non mancando il tipo piriforme con capezzoli molto sviluppati. Sono tollerati, ma costituiscono difetto i capezzoli accessori. Gli arti sono di media lunghezza piuttosto sottili, con unghioni solidi di colore marrone tendenti al giallo e raramente all'ardesia. Il mantello è bianco con la fronte ed i mascellari di colore fulvo tendenti al roano e raramente al grigio, spesso caratterizzato da una numerosa picchiettatura (soggetti piperini), la stessa colorazione è presente anche sulle orecchie

spesso interessando anche il garrese, raramente la si nota anche in altre parti del corpo. Il pelo è ruvido medio-lungo, tendente al lungo (agraria.org). L'allevamento un tempo avveniva generalmente nei centri urbani dove gli animali venivano tenuti nella casa dell'allevatore. Il valore economico della Girgentana è tradizionalmente determinato attraverso la vendita diretta al dettaglio (porta a porta) del latte per uso alimentare. Secondo i racconti di agricoltori più anziani nati in famiglie con una lunga storia di allevamento, il latte veniva utilizzato principalmente per l'alimentazione di neonati e anziani. Lo stato di pericolo della piccola popolazione di Girgentana è legato a queste peculiarità. L'imposizione di norme sanitarie vietava l'allevamento di questi animali all'interno dei centri urbani e comportava un divieto totale di vendita diretta del latte. Le statistiche mostrano che nel 1983 la popolazione era di 30.000 capre Girgentana (Associazione Nazionale della Pastorizia, 1984), e secondo Giaccone et al. (1994) ne sono rimaste circa 500 capre. Sono stati condotti diversi studi finalizzati alla salvaguardia e valorizzazione di questa razza (Portolano et al., 1998; Chianese et al., 2000; Todaro et al., 2000). Dal punto di vista economico, la produzione di latte è la caratteristica più importante della capra Girgentana, ma il reddito derivante dalla carne potrebbe eguagliare quello derivante dalla vendita di latte e prodotti lattiero-caseari. Il peso corporeo e il tasso di crescita sono, quindi, caratteristiche economicamente importanti, che richiedono particolare attenzione in qualsiasi programma di allevamento volto a migliorare la produttività complessiva della capra Girgentana.

L'I.S.Z.S. d'intesa con ASSONAPA è l'ente responsabile della conservazione *in situ* di questa razza caprina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; CORIAL, capofila Università di Palermo, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; ARCAS capofila Istituto zooprofilattico sperimentale per la Sicilia, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



*Figura 28. Becco di razza Girgentana.*

## **Esp 2. Prelievo e congelamento del materiale seminale nei ruminanti**

### **Introduzione**

Il congelamento del seme nei ruminanti al giorno d'oggi è una pratica di uso comune, in particolar modo nei bovini, dove l'IA (inseminazione artificiale) ha permesso di ottenere risultati importanti, soprattutto in ambito di selezione genetica. La raccolta del materiale seminale può essere fatta mediante l'utilizzo di diverse tecniche, tra cui l'utilizzo della vagina artificiale, l'elettroeiaculazione, l'aspirazione dalla vagina dopo il salto, il lavaggio epididimale (in caso di salvataggio genetico), il massaggio trans-rettale, alcune delle quali simili a quelle descritte per lo stallone da Love et al., (1992). Il prelievo mediante l'utilizzo di vagina artificiale è la metodica considerata ottimale. La procedura è simile per tutti i ruminanti, la vagina artificiale utilizzata è di tipo semi rigido, viene preparata con acqua a 43°C e vi viene deviato il pene al momento della monta (Leboeuf et al., 2000). La qualità del seme ottenuto con questa metodica è ottimale ed eticamente è la migliore; tuttavia, richiede un buon addestramento prima che il riproduttore possa dare il risultato sperato. Il massaggio trans-rettale è una tecnica che consiste nel massaggiare le ghiandole sessali accessorie fino ad ottenere l'eiaculazione (Palmer et al., 2005). L'elettroeiaculazione è una metodica molto usata nei ruminanti (Lincoln e Davidson, 1977; Chemineau et al., 2008) che trova il suo vantaggio soprattutto negli animali adulti che non sono stati addestrati alla vagina artificiale (Wulster-Radcliffe et al., 2001). Questa tecnica, a differenza dell'utilizzo della vagina artificiale, può essere applicata in quei soggetti che non sono stati addestrati, come i soggetti adulti. Tuttavia, la qualità dell'eiaculato ottenuto mediante elettroeiaculazione spesso è inferiore rispetto a quello ottenuto effettuando la raccolta con vagina artificiale. Infine, occorre precisare che, pur essendo una tecnica semplice e che trova ampio spazio di applicazione, vedi *Breeding soundness examination*, può essere causa di stress in alcuni soggetti su cui è usata, e quindi occorre prestare attenzione (Stafford et al., 1996; Bath, 1998; Orihuela et al., 2009). Infine, come per il maschio, in caso di salvataggio genetico si può optare per il *flushing* epididimale con le tecniche descritte (Garde et al., 1994; Sharma et al., 1997; Hewitt et al., 2001; Martinez-Pastor et al. 2006). Il seme una volta prelevato

può essere congelato e può essere stoccato in azoto liquido a vita. La crioconservazione degli spermatozoi fu introdotta per la prima volta nel 1600 (Sherman, 1964). Nel 1784, lo scienziato italiano Lazzaro Spallanzani inseminò artificialmente 3 cagne, dando vita a tre cuccioli (Ombelet e Robays, 2015). Cento anni dopo, nel 1899, uno scienziato russo di nome Ilya Ivanovich Ivanoff sviluppò efficaci tecniche di inseminazione artificiale per gli animali da allevamento. Nel 1940, Phillips e Lardy scoprirono che i tuorli d'uovo possono proteggere gli spermatozoi dallo shock da termico durante il raffreddamento; tuttavia, l'uso di questa tecnica non ebbe né diffusione né successo (Phillips e Lardy, 1940). Il glicerolo fu indicato come un ottimo crioprotettore durante tutto il processo di congelamento (Polge et al., 1949). Gli *extender* o mestruai diluitori più utilizzati per la conservazione del seme nelle specie domestiche devono avere un pH e una capacità tampone adeguati, un'osmolarità adeguata e devono proteggere gli spermatozoi da lesioni criogeniche (Salamon e Maxwell 2000). Generalmente gli *extender* includono un crioprotettore non permeante (latte o tuorlo d'uovo), un crioprotettore penetrante (glicerolo, glicole etilenico o dimetilsolfossido), un tampone (tris o test), uno o più zuccheri (glucosio, lattosio, raffinosio, saccarosio o trealosio), sali (citrato di sodio, acido citrico) e antibiotici (penicillina, streptomina) (Evans e Maxwell 1987). Negli *extender* per cervo e montone, vengono utilizzati frequentemente latte scremato in polvere o diluenti ipertonici a base di tris-glucosio (Evans e Maxwell 1987). I valori di pH vanno da 6,75 a 7, poiché lo sperma dei mammiferi ha un pH compreso tra 7,2 e 7,8.

Per la conservazione dei gameti possono essere utilizzati due metodiche: il congelamento lento e la vitrificazione. Il congelamento lento è un processo che vede l'utilizzo di basse concentrazioni di crioprotettori associati a tossicità chimica e osmotica. La vitrificazione, invece, prevede una discesa rapida di temperature, ma solitamente non viene utilizzata nella conservazione del seme, poiché il trasferimento di calore negli spermatozoi è troppo lento per permettere la vitrificazione senza che ci sia il rischio di cristallizzazione (Arav et al., 2002). Generalmente, i metodi di crioconservazione includono la riduzione della temperatura, la disidratazione cellulare, il congelamento e lo scongelamento (Medeiros et al. 2002). La discesa di temperatura dell'eiaculato a 4°C riduce l'attività metabolica cellulare e aumenta la

durata della vita degli spermatozoi. La crioconservazione arresta l'attività cellulare delle cellule, riavviando le sue normali funzioni dopo lo scongelamento (Mazur 1984). Nelle specie domestiche, il raffreddamento rapido tra 30 e 0°C provoca lesioni cellulari in alcuni spermatozoi, chiamate *cold shock*, che dipendono dalla velocità di raffreddamento e dall'intervallo di temperatura (Gilmore et al. 1998; Watson 2000). Il tasso di congelamento deve essere abbastanza lento da consentire all'acqua di lasciare le cellule per osmosi, impedendo la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare che provocherebbero danni irreversibili agli spermatozoi (Fisher e Fairfull 1986). Gli spermatozoi solitamente vengono congelati ad una velocità di 15-60°C/min (Byrne et al. 2000; Anel et al. 2003). Il congelamento del seme provoca sempre un danno agli spermatozoi per l'influenza di diversi fattori (cambiamenti di temperatura; stress osmotici e tossici; la formazione e la dissoluzione di ghiaccio) (Medeiros et al. 2002). Gli effetti dannosi del raffreddamento e del congelamento sulla membrana spermatica variano tra le specie domestiche e sono influenzati da diversi elementi (Medeiros et al. 2002). Il seme di verro è il più sensibile; il toro, l'ariete e lo stallone sono molto sensibili; cane e gatto sono un po' sensibili; Il coniglio, l'uomo e il gallo sono meno sensibili allo shock da freddo (Parks 1997). Nella metodologia convenzionale di congelamento, con l'utilizzo di mestruai ipertonici, il glicerolo viene spesso utilizzato nell'intervallo del 6-8%. Livelli superiori causano danni agli spermatozoi, abbassando la sopravvivenza degli spermatozoi nel post congelamento. I migliori risultati sono stati ottenuti con una percentuale di glicerolo tra 4-6% e una velocità di congelamento di 10-100°C/min (Byrne et al. 2000; Anel et al. 2003). Si è visto che l'aggiunta di tuorlo d'uovo al mestruo riduce gli effetti negativi del glicerolo. Nelle procedure di congelamento, il glicerolo può essere unito inizialmente o successivamente in una frazione separata, dopo la refrigerazione del seme. Nel primo caso, l'estensore completo viene unito subito dopo la raccolta del seme (metodo *one step*); nella seconda situazione una frazione dell'*extender* (senza glicerolo) viene unita dopo la raccolta dello sperma, e la parte rimanente (con glicerolo) viene unita dopo la refrigerazione e prima del congelamento del seme (metodo *two steps*) (Evans e Maxwell 1987). L'effetto crioprotettore del glicerolo è stato dimostrato già dopo un breve contatto (5-10 s). Questo è stato visto nel toro, nel verro e nell'ariete, il che dimostra che la penetrazione

del glicerolo nella cellula non è essenziale per la protezione degli spermatozoi (Barbas e Mascarenhas, 2009). I riproduttori possono essere classificati come “buoni” o “cattivi” congelabili, a seconda della capacità del loro seme di sopportare il congelamento. Alcune strutture di membrana, sensibili al congelamento, possono dipendere dalla variazione genetica individuale, consentendo una migliore resistenza degli spermatozoi alla crioconservazione (Shamsuddin e Larsson 1993; Watson, 2000). Sembra che la criosensibilità possa essere regolata da fattori genetici, suggeriti dal fatto che alcuni ceppi murini hanno una migliore motilità post-scongelo e fertilità *in vitro* rispetto ad altri (Tada et al. 1993). Di solito nelle specie domestiche, la motilità del seme post congelamento è circa del 50% rispetto al campione fresco dello stesso soggetto. Tuttavia, il numero di spermatozoi mobili per dose di inseminazione varia da specie a specie. Uno spermatozoo può essere mobile ma danneggiato, il che riduce la sua fertilità (Medeiros et al. 2002).

## **Materiali e Metodi**

Il prelievo del seme nei ruminanti ha richiesto uno sforzo non indifferente di interpretazione della normativa. Tenuto conto della deroga prevista dall'articolo 29 del DM 403/00 si è prelevato il seme di razze autoctone o gruppi etnici a limitata diffusione direttamente in azienda. Tuttavia, durante il triennio si è anche collaborato con l'ANAPRI per selezionare ed inviare alcuni torelli di razza Modicana al centro genetico ANAPRI (centro di produzione del seme) per la produzione di seme, seguendo alla lettera le prescrizioni del Reg Del 686/2020. Tale seme sarà utilizzabile normalmente dagli allevatori, sebbene sotto sorveglianza dell'ANARB e dell'I.S.Z.S., per evitare l'*inbreeding*, trattandosi di razza a limitata diffusione.

Nel nostro caso, trattandosi di conservazione *ex situ* di razze a rischio di estinzione, per fini scientifici e per depositare il seme in criobanca, si può applicare l'articolo 49 del Reg Del 686/2020, che prevede l'utilizzo dei donatori anche in deroga alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui al capo 1, fatto salvo alcune

raccomandazioni per scongiurare gravi malattie diffuse come l'afta epizootica e la peste bovina, fortunatamente eradicata da tempo in territorio siciliano.

Ciò nonostante, attraverso la collaborazione con l'I.Z.S.S. si è proceduto a visita clinica e *screening* infettivologico, ispirato al Reg Del UE 2020/686, attuando in azienda una sorta di isolamento, sfruttando i locali quarantena della stessa. I donatori venivano testati due volte a distanza di circa 30 giorni, durante il quale venivano isolati e non adibiti alla monta naturale.

Tutti i donatori erano nati e rimasti sin dalla nascita nell'Unione e provenivano da stabilimenti soggetti al controllo ufficiale dell'autorità competente e conformi alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui al Reg Del UE 2020/688, ossia allevamenti indenni da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, da infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*). Ovviamente negli stabilimenti non erano stati segnalati casi di infezione da virus della rabbia, da virus della malattia emorragica epizootica, da carbonchio ematico, da surra (*Trypanosoma evansi*). Per l'infezione da virus della febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24), trattandosi di zone non indenni, si è proceduto in accordo all'allegato V, parte II, capitolo 2, sezione 1, punti da 1 a 3, del Reg Del UE 2020/689. Per la rinotracheite infettiva bovina e la diarrea virale bovina gli stabilimenti erano indenni o, se non lo erano, i donatori non erano vaccinati. I donatori erano identificati conformemente alle prescrizioni di cui al Reg Del UE 2019/2035. I bovini per essere ammessi alla raccolta di materiale seminale, in particolare venivano testati all'inizio dell'isolamento e dopo almeno 21 giorni, con esito negativo, a una intradermotubercolizzazione per *Mycobacterium tuberculosis*, una prova sierologica per quanto riguarda l'infezione da brucellosi (*Brucella abortus*, *melitensis* e *suis*), la leucosi bovina enzootica, la febbre catarrale degli ovini. Per quanto riguarda la rinotracheite bovina veniva realizzata una prova sierologica (virus intero) effettuata su un campione di sangue, se gli animali non provenivano da uno stabilimento indenne da rinotracheite bovina infettiva/vulvovaginite pustolosa infettiva; per quanto riguarda la diarrea virale bovina, una prova sierologica per determinare la presenza o l'assenza di anticorpi. Durante l'isolamento e dopo almeno 21 giorni veniva fatta una

prova su campioni di liquido di lavaggio di materiale prepuziale prelevati in 3 occasioni, ad intervalli di almeno 7 giorni per escludere la tricomoniassi (*Trichomonas foetus*) e la campilobatteriosi genitale bovina (*Campylobacter fetus* spp *venerealis*).

Gli ovini e i caprini per essere ammessi alla raccolta di materiale seminale venivano testati prima della quarantena e dopo almeno 21 giorni, con esito negativo, a una prova sierologica per la ricerca dell'epididimite ovina (*Brucella ovis*); della brucellosi (*Brucella abortus, melitensis e suis*) e della febbre catarrale degli ovini. Inoltre, i soggetti ovini e caprini venivano sottoposti a genotipizzazione nei confronti della scrapie ai sensi del regolamento 2020/772 (Reg. UE 2020/772).

Il giorno della raccolta dello sperma i donatori non presentavano sintomi né segni clinici di nessuna delle malattie di categoria D e nessuna delle malattie emergenti. La raccolta del seme veniva effettuata nei mesi primaverili. La metodica utilizzata per la raccolta del materiale seminale era l'elettroeiaculazione. In questo studio è stato fatto un solo prelievo di seme per soggetto. Il giorno del prelievo i riproduttori, a seconda dell'indole del soggetto, venivano contenuti con una capezza o fatti passare dentro un corridoio (tori) per effettuare l'esame clinico. Effettuata una visita clinica, si procedeva con l'esame dell'apparato genitale, veniva valutato lo scroto, circonferenza scrotale, la mobilità testicolare, lo sfoderamento del pene. Quindi, si procedeva alla valutazione ecografica dei testicoli utilizzando un ecografo ultraportatile Draminski IScan 2 (Draminski, Poland) e infine alla palpazione digitale (ovini e caprini) o transrettale (toro), con valutazione ecografica e stimolazione, delle ghiandole sessuali accessorie. L'elettroeiaculazione per i tori veniva fatta utilizzando un elettroeiculatore Pulsator IV (Pulsator IV, electronic ejaculator, Lane manufacturing, Colorado, USA) usando una sonda rettale convenzionale da 75 mm e con 3 elettrodi posti ventralmente. Svuotato il retto, veniva posizionata la sonda inviando una sequenza standardizzata di impulsi elettrici di 60Hz: 30 brevi onde di 2-3 sec di intensità compresa tra 100 e 300 mA con un intervallo di 0,5 sec tra un'onda e l'altra. Per arieti e becchi, veniva utilizzato un elettroeiculatore (Lane Ram Ejaculator, Lane manufacturing, Colorado, USA) con sonda rettale convenzionale per piccoli ruminati con 2 elettrodi posti ventralmente. Il voltaggio iniziale era di 0.5 V, successivamente

veniva incrementato (separato da 2 pause) fino ad un massimo di 7 V. Dopo aver raggiunto i 7 V, il voltaggio degli impulsi rimaneva tale fino all'eiaculazione. Per eliminare stress o disagio, gli animali erano trattati con xylazina (0.2 mg/kg, Rompum 2%). A seguito dell'erezione e sfoderamento del pene, cominciava l'eiaculazione. L'eiaculato veniva raccolto con l'aiuto di un cestello in una provetta Falcon conica da 15 ml. Nel toro, tendenzialmente non si raccoglievano i primi getti (secreto ghiandolare), per raccogliere un eiaculato più ricco della frazione spermatica. Durante la raccolta del seme veniva valutato il grado di sfoderamento del pene, a cui veniva attribuito uno score seguendo la seguente scala: 0, nessuna protrusione; 1, 25% di protrusione; 2, 50% di protrusione; 3, 75% di protrusione; 4, 100% di protrusione.

Fatto il prelievo, la fase successiva prevedeva la valutazione dell'eiaculato ottenuto. Il seme veniva valutato sia macroscopicamente (volume, colore, viscosità), sia microscopicamente (concentrazione, motilità totale e progressiva, morfologia, vitalità). La concentrazione nemaspermatica veniva preliminarmente valutata in campo. Per i bovini si procedeva utilizzando una camera contaglobuli di Makler (*Makler sperm counting chamber*, Sefi-Medilcal Instruments Ltd., Israel); per gli ovini tramite fotometro (Fotometro ovini Accucell, IMV technologies, France), dove, dopo aver tarato il fotometro con una cuvette di soluzione di NaCl allo 0,9%, si preparava una cuvette con 10 $\mu$ l di seme a cui venivano aggiunti a 3990  $\mu$ l di soluzione di NaCl allo 0,9%, per procedere alla lettura e si avviava il fotometro. Sempre in campo, si allestivano preparati per la colorazione di Blom: un operatore prelevava una goccia (3 $\mu$ l) di seme dal campione, questa veniva messa in un vetrino ad orologio alla quale venivano aggiunte una goccia di eosina (3 $\mu$ l) e due gocce di nigrosina (6 $\mu$ l), successivamente veniva miscelato e strisciato su un vetrino portaoggetti, per essere montato e letto in seguito. La valutazione della motilità veniva fatta in campo con microscopio ottico, secondo la tecnica della goccia pendente e schiacciata, quest'ultima utilizzando una camera di Leja. Per la prima, si poneva una goccia di seme su un vetrino copri oggetto preriscaldato, si ribaltava il vetrino e si adagiava in apposito vetrino con incavo (riscaldato) lasciando la goccia sospesa. Si dava il seguente punteggio corrispondente alla percentuale di motilità: 0, 0-20%, assenza di movimento; 1, 20-40%, movimento scarso; 2, 40-60%, movimento vivace; 3, 60-

80%, onde poco evidenti; 4, 80-100%, onde tumultuose. In camera di Leja, invece si effettuava una valutazione più fine della motilità progressiva, dando un punteggio medio tra due operatori, dando un punteggio percentuale per multipli di 20 ossia: 0, 20, 40, 60, 80, 100%.

Dopo questa valutazione preliminare, il seme valutato veniva diluito con mestruo OptixCell 2 (IMV Technologies, France) in rapporto 1:1 a temperatura ambiente. Il mestruo si aggiungeva lentamente per evitare lo shock osmotico, e si mescolava lentamente. Diluito il seme si rivalutava la concentrazione e si aggiustava la diluizione fino ad ottenere una concentrazione finale di circa  $80-100 \times 10^6$  spermatozoi per ml. Gli eiaculati venivano riposti in un Equitainer (Equitainer I Shipper, Animal Reproduction Systems Inc., USA) a temperatura di 4°C. In questo modo il seme iniziava la fase di equilibratura, della durata di 3 ore. Giunti in laboratorio, il seme veniva trasferito in una cappa fredda (CoolingCastle), dove continuava la fase di equilibratura. Lo striscio di seme effettuato in precedenza veniva analizzato, effettuando il test di vitalità e una valutazione morfologica. Il vetrino, dopo esser stato montato con balsamo e vetrino copri-oggetti, veniva visto al microscopio ad un ingrandimento di 20x. Quindi si procedeva contando 100 spermatozoi e facendo il rapporto in percentuale tra vivi e morti. Contemporaneamente alla valutazione del seme un operatore si occupava della marcatura delle paillettes. Delle paillettes da 0,5 ml venivano stampate con una stampante dedicata (MultiCoder printer Minitube, USA). Le paillettes venivano identificate secondo l'articolo 10 del Reg UE 2020/686. Ciascuna paillette riportava la data di raccolta, la specie e l'identificazione degli animali donatori, il numero unico di riconoscimento dello stabilimento di materiale germinale ME0100C e ogni altra informazione pertinente. Il seme veniva caricato in paillettes da 0,5 ml precedentemente raffreddate a 4°C. Trascorsa la fase di equilibratura, seguiva la fase di congelamento effettuata in vapori d'azoto per 10 min (velocità stimata:  $-60^\circ\text{C}/\text{min}$  da  $+4$  a  $-140^\circ\text{C}$ ), ad un'altezza di 6 cm dal livello di azoto liquido, utilizzando una *freezing unit*. Trascorso il tempo di 10 min, le paillettes, venivano immerse in azoto liquido e successivamente stoccate in un bidone criogenico dedicato. Dopo 24 h si procedeva alla prova di scongelamento. Per ogni partita venivano scongelate 2 paillettes da 0,5 ml in acqua a 37°C per 1 minuto e

incubate alla stessa temperatura per 14 minuti; quindi, il materiale seminale in esse contenuto veniva miscelato in un'unica provetta. La valutazione della motilità e della concentrazione veniva fatta utilizzando il software SCA. 3 aliquote da 3 µl venivano poste su 3 diverse camere di Leja preriscaldate a 37°C, da ciascuna delle quali vengono videoregistrati 6 campi microscopici, tramite microscopio a contrasto di fase dotato di obiettivo 10x a contrasto di fase negativo e di tavolinetto termostato tarato a 37° C e analizzate dal software SCA. I parametri valutati erano: motilità totale, PR (progressivi), NP (non progressivi), IM (immobili), area della testa, numero di cellule rotonde, traiettorie circolari, VLC (velocità curvilinea), VSL (velocità lineare), VAP (velocità media), LIN (indice di linearità), STR (indice di rettilinearità), WOB (indice di oscillazione), AL (ampiezza del movimento laterale della testa) BFC (frequenza battito), MC (*Mucous penetration*), H (iperattivi).

## **Risultati e Discussioni**

Per questo studio sono stati selezionati 10 riproduttori bovini (6 Modicana e 4 Cinisara), 12 caprini (5 Messinese e 7 Girgentana) e 7 ovini (Barbaresca). La raccolta del materiale seminale veniva fatta mediante l'utilizzo dell'elettroeiaculatore, una tecnica sicura, efficace e idonea quando si lavora con soggetti non addestrati (Lincoln e Davidson, 1977; Chemineau et al., 2008). In una fase preliminare, si era tentato di prelevare il seme con vagina artificiale e femmina in calore, ottenendo il seme solo in un toro Modicano, in nessun toro Cinisaro, in nessun ovino e caprino. Contenuti gli animali veniva somministrata una dose di xylazina cloridrato (0,05 mg/Kg IM) per far rilassare e non stressare gli animali. Questa pratica è raccomandata in particolar modo per i piccoli ruminanti che rispondono all'elettroeiaculazione con importanti vocalizzazioni, per il disagio subito (Abril-Sánchez et al., 2018).

Visitato l'animale si procedeva al prelievo di seme. Tutti, i riproduttori hanno risposto molto bene alla metodica di prelievo, tuttavia, non in tutti vi era un'erezione completa ed evidente protrusione del pene. In particolare, i soggetti che non avevano un'erezione completa sono stati 3 arieti di razza Barbaresca (protrusione 0). I due tori

più giovani, Cesare e Paolino, di razza rispettivamente Cinisara e Modicana, al momento dell'elettroeiaculazione avevano una protrusione del pene di grado 2. In questi due tori il prelievo non era soddisfacente in termini di volume e di concentrazione e venivano esclusi dal congelamento.



Figura 29. Raccolta del seme con cestello durante l'elettroeiaculazione. A sinistra toro, a destra ariete.

Nei bovini, il volume medio dell'eiaculato raccolto era di circa 8 ml (escludendo Paolino e Cesare), la concentrazione di 200-400 milioni di spz/ml, le anomalie erano generalmente sotto al 20% e la vitalità circa il 90% (fig. 30; tabella 6-7).

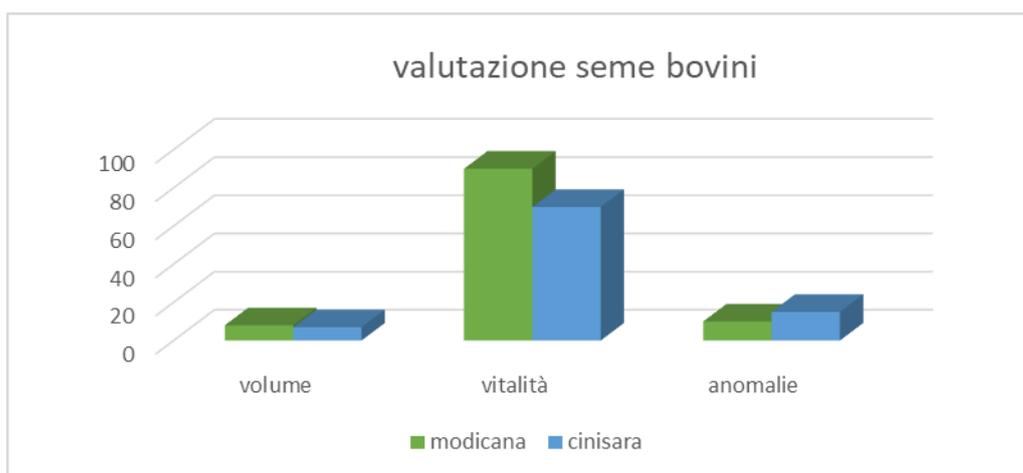


Figura 30. Grafico di confronto della valutazione del seme taurino.

ID	VOL	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ	ANOMALIE
ENRICO	10	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	90%	10%
PRINCIPE	6	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	90%	15%
OTELLO	8	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	90%	8%
NEARCO	8	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	90%	10%
PAOLINO	2	BIANCO TRASPARE NTE	BASSA	10%	30%
MOSCATO	8	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	50%	10%

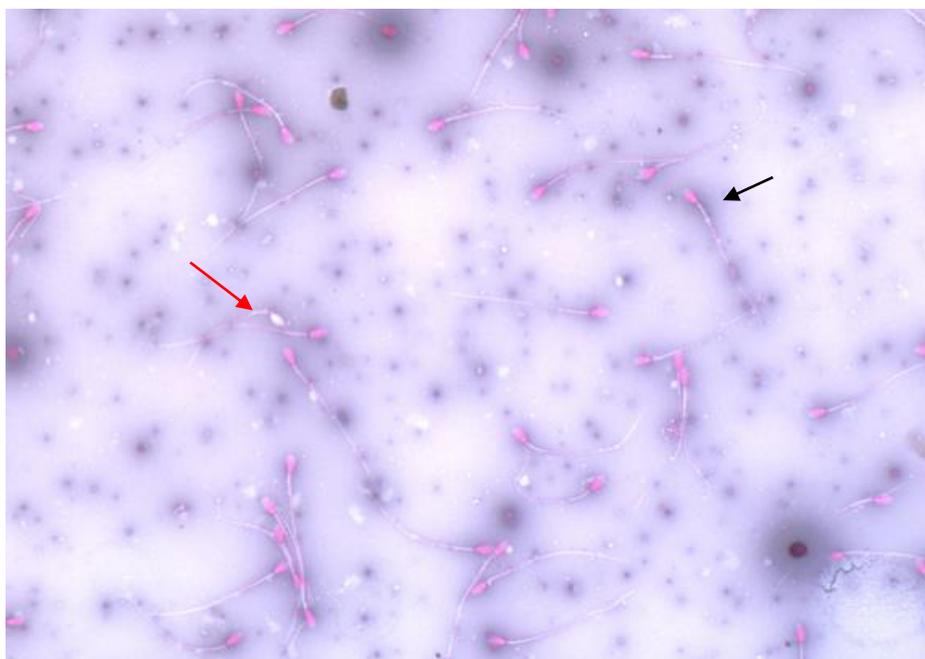
*Tabella 6. Dati del seme dei tori di razza Modicana.*

ID	VOL	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ	ANOMALIE
POLIZZI	6	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	90%	15%
CESARE	1	BIANCO SPORCO	NORMALE	10%	15%
BONOMO	8	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	50%	5%
GIULIO	8	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	90%	20%

*Tabella 7. Dati del seme dei tori di razza Cinisara.*

Come accennato, tra i tori Modicani, il toro Paolino veniva escluso dal congelamento in quanto appena pubere, con un eiaculato di 2 ml di volume, con bassa concentrazione, motilità del 20%, vitalità del 10% ed il 30% di anomalie terziarie. Il toro Cesare ha dato un eiaculato molto scarso, soprattutto in termini di volume. Questo era di appena 1 ml, indice di una difficoltà di prelievo. Per questo soggetto, dato il volume insufficiente, si procedeva alla diluizione in campo 1:1 con extender e trasportato in laboratorio, dove sono state fatte tutte le valutazioni del caso (fig. 31-32). Come si evince dal referto SCA, l'eiaculato aveva una buona concentrazione e

motilità, anche progressiva. Tuttavia, il test di vitalità (figura 31) era non soddisfacente. Infatti, si evidenziava una percentuale di spermatozoi con membrana citoplasmatica alterata del 90% (spermatozoi colorati, freccia nera), motivo per cui, oltre allo scarso volume, si preferiva scartare dal congelamento questo toro.



*Figura 31. Valutazione dell'eiaculato del toro Cesare: colorazione eosina-nigrosina. freccia rossa spermatozoi vivi, freccia nera spermatozoi alterati o morti.*

Referenza: 1085



Data (giorno/mese/anno): 29/06/2023  
Centro: OVUD

Codice: SCAtemp42



Animale: evola CESARE

**Dati Campione**

Dati raccolta: 29/06/2023 17:25	Metodo raccolta: OVUD
Volume (mL): 1,00	pH: 7,50
Temperatura (°C): 37	Ultima raccolta: 3
Difficoltà raccolta: No	Campione completo: Complete
Liquefazione: <80 min	Aggregazioni: None
Viscosità: Normal	Agglutinazioni: None
Aspetto: Normal	Elementi cellulari: None
Trattamento:	

Analisti	Risultati	Status	Valori di riferimento
Concentrazione	192,44 Milioni / ML	PASSED	≥0,00 Milioni / ML
Numero spermatozoi	192,44 M/Campione	PASSED	≥0,00 M/Campione
Progressivi (PR)	24,86 %	PASSED	≥0,00 %
Mobili	66,27 %	PASSED	≥0,00 %



**Diagnosi**

Asthenozoospermia  
Volume - Anormali

Nuovo (29/06/2023 18:32)

**Concentrazione**

192,44 Milioni / ML      192,44 M/Campione      Volume (mL): 1,00  
Diluzione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	227	24,86	47,85	47,85
Non-Progressivi (NP)	378	41,40	79,67	79,67
Immobili (IM)	308	33,73	64,92	64,92

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	605	66,27	127,52	127,52

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	114	12,49	24,03	24,03
Medi	398	43,59	83,89	83,89
Lenti	93	10,19	19,60	19,60
Immobili (IM)	308	33,73	64,92	64,92

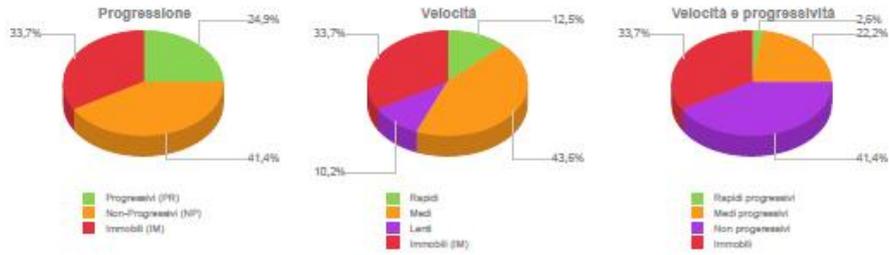
Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	24	2,63	5,06	5,06
Medi progressivi	203	22,23	42,79	42,79
Non progressivi	378	41,40	79,67	79,67
Immobili	308	33,73	64,92	64,92

Referenza: 1085  


Codice: SCAtemp42  


Animale: evola CESARE  
 Centro: OVUD

Data (giorno/mese/anno):  
 -----



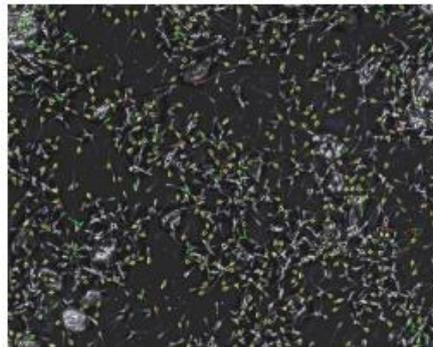
Area Testa	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
	22,85	23,39	23,27	20,74	19,59	µm²

Concentrazione		Totale	%
Cellule rotonde	5,73 Milioni / ML	576	63,09 %
Perossidasi-positivo			

Media. Valori di velocità	Media	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	30,11	21,04	44,33	52,71	µm/s
Velocità lineare - VSL	3,33	0,83	5,75	22,14	µm/s
Md. Valore - VAP	8,70	4,46	14,67	25,00	µm/s
Indice linearità - LIN	9,29	4,43	14,36	42,99	%
Indice rettilineità - STR	37,02	17,76	66,50	91,12	%
Indice oscillazione - WOB	24,75	22,05	27,01	48,23	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	1,00	1,35	1,63	µm
Frequenza battito - BCF	1,14	1,76	1,56	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	5	0,83	0,55	1,05	1,05
Mucous penetration	10	1,65	1,10	2,11	2,11



Tecnico: Administrator

Commenti:

Sperm Class Analyzer\*

2 / 3

Figura 32. Referto SCA. Cesare Toro Cinisara.

Tenendo in considerazione i dati della valutazione iniziale degli eiaculati, e in particolare del test di vitalità i propositi della valutazione post congelamento erano positivi (fig. 33). Il test della goccia pendente risultava poco efficace per la valutazione del seme dopo elettroeiaculazione, in quanto nessun seme superava punteggio 3, ossia presentava onde nemaspermatiche evidenti, pur possedendo alta motilità (80%). La presenza delle onde, infatti, è influenzata anche dalla concentrazione che al caso dell'elettroeiaculazione è sempre più bassa rispetto all'eiaculazione spontanea.

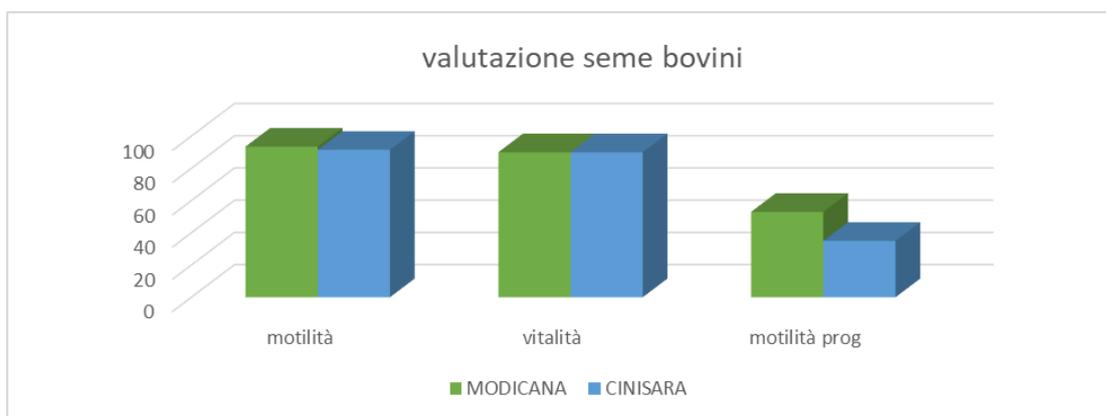


Figura 33. Valutazione della motilità del seme taurino.

Come si evince dai referti SCA allegati (fig. 34-41) il seme taurino nel complesso ha avuto una buona risposta alla metodica di congelamento applicata. Un parametro di cui si è tenuto molto in considerazione nella fase pre-congelamento è stato il test di vitalità. Dai dati risulta che i tori Modicani Enrico, Principe, Otello e Nearco avevano un'eiaculato di qualità migliore rispetto agli altri, questo può essere dovuto al *management* superiore che questi tori, provenienti dalla stessa azienda. Infatti, questi provenivano da un allevamento a stabulazione libera, con esclusiva razione *unifeed*, mentre gli altri tori provenivano da aziende estensive/semi-estensive, dove spesso l'integrazione fornita non è sufficiente a soddisfare appieno i fabbisogni energetici giornalieri. Sebbene limitati numericamente i casi presentati, rappresentano il primo studio sullo spermogramma di queste razze, con indicazioni incoraggianti sulla loro potenziale congelabilità.

Referenza: 1017



Data (giorno/mese/anno): 19/04/2023

Centro: Laboratory

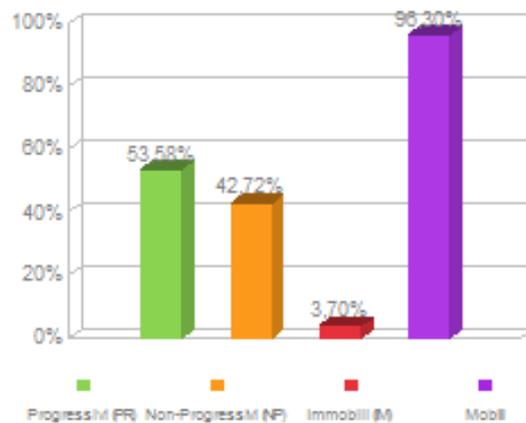
Codice: SCAtemp8



Animale: enrico modicano

Nuovo (19/04/2023 13:48)

Concentrazione	196,81 Milioni / ML 98,41 M/Campione
Progressivi (PR)	53,58 %
Non-Progressivi (NP)	42,72 %
Immobili (IM)	3,70 %
Mobili	96,30 %
Rapidi progressivi	7,62 %
Medi progressivi	45,96 %
Non progressivi	42,72 %
Immobili	3,70 %
Velocità curvilinea - VCL	48,20 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	14,16 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	26,00 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	25,98 %
Indice rettilineità - STR	49,02 %
Indice oscillazione - WOB	51,47 %
Ampiezza del movimento laterale	1,53 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	5,17 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 34. Referto SCA Enrico toro Modicana.

Referenza: 1019



Data (giorno/mese/anno): 19/04/2023

Centro: Laboratory

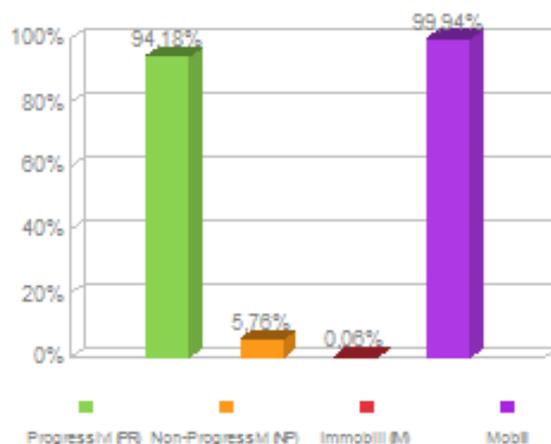
Codice: SCAtemp10



Animale: principe

Nuovo (19/04/2023 14:48)

Concentrazione	189,30 Milioni / ML 94,65 M/Campione
Progressivi (PR)	94,18 %
Non-Progressivi (NP)	5,76 %
Immobili (IM)	0,06 %
Mobili	99,94 %
Rapidi progressivi	16,06 %
Medi progressivi	78,12 %
Non progressivi	5,76 %
Immobili	0,06 %
Velocità curvilinea - VCL	98,48 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	31,30 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	54,54 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	30,96 %
Indice rettilineità - STR	54,16 %
Indice oscillazione - WOB	55,24 %
Ampiezza del movimento laterale	2,66 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	10,87 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 35. Referto SCA Principe toro Modicana.

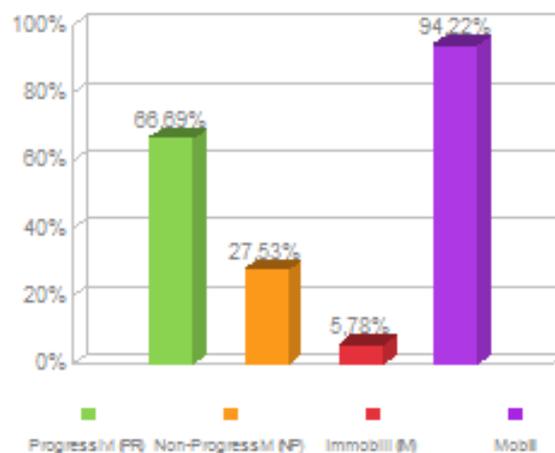
<b>Referenza: 1022</b>

<b>Data (giorno/mese/anno): 21/04/2023</b>
<b>Centro: OVUD</b>
<b>Codice: SCAtemp12</b>

<b>Animale: OTELLO</b>

Nuovo (21/04/2023 12:40)

Concentrazione	54,51 Milioni / ML 27,26 M/Campione
Progressivi (PR)	66,69 %
Non-Progressivi (NP)	27,53 %
Immobili (IM)	5,78 %
Mobili	94,22 %
Rapidi progressivi	29,41 %
Medi progressivi	37,28 %
Non progressivi	27,53 %
Immobili	5,78 %
Velocità curvilinea - VCL	83,84 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	33,26 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	46,38 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	33,17 %
Indice rettilineità - STR	60,37 %
Indice oscillazione - WOB	52,79 %
Ampiezza del movimento laterale	2,28 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	9,73 Hz



<b>Tecnico: Administrator</b>
<b>Commenti:</b>

Figura 36. Referto SCA Otello toro Modicana.

Referenza: 1016



Data (giorno/mese/anno): 19/04/2023

Centro: OVUD

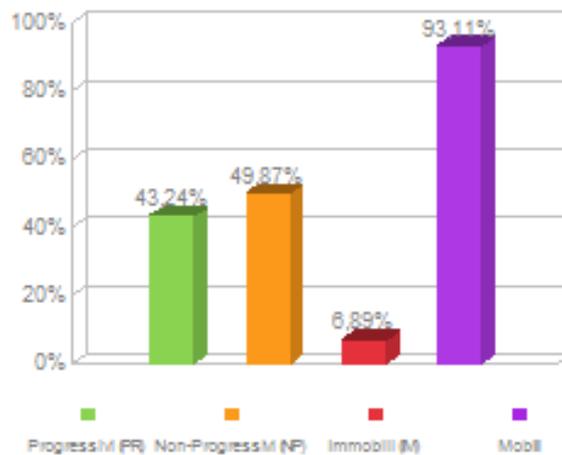
Codice: SCAtemp7



Animale: nearco modicano

Nuovo (19/04/2023 13:29)

Concentrazione	238,68 Milioni / ML 119,34 M/Campione
Progressivi (PR)	43,24 %
Non-Progressivi (NP)	49,87 %
Immobili (IM)	6,89 %
Mobili	93,11 %
Rapidi progressivi	6,04 %
Medi progressivi	37,20 %
Non progeressivi	49,87 %
Immobili	6,89 %
Velocità curvilinea - VCL	39,59 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	10,84 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	20,46 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	24,40 %
Indice rettilineità - STR	49,36 %
Indice oscillazione - WOB	48,73 %
Ampiezza del movimento laterale	1,37 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	3,65 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 37. Referto SCA Nearco toro Modicana.

Referenza: 1021



Data (giorno/mese/anno): 21/04/2023

Centro: OVUD

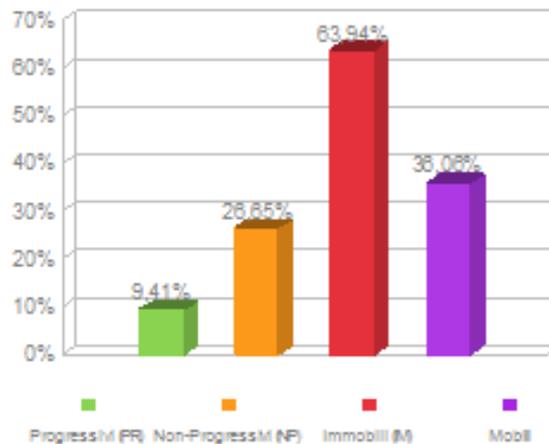
Codice: SCAtemp11



Animale: moscato

Nuovo (21/04/2023 12:17)

Concentrazione	84,24 Milioni / ML 42,12 M/Campione
Progressivi (PR)	9,41 %
Non-Progressivi (NP)	26,65 %
Immobili (IM)	63,94 %
Mobili	36,06 %
Rapidi progressivi	1,94 %
Medi progressivi	7,47 %
Non progressivi	26,65 %
Immobili	63,94 %
Velocità curvilinea - VCL	25,43 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	5,97 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	11,14 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	17,01 %
Indice rettilineità - STR	47,00 %
Indice oscillazione - WOB	37,42 %
Ampiezza del movimento laterale	0,88 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	2,16 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 38. Referto SCA Moscato toro Modicana.

Referenza: 1088



Data (giorno/mese/anno): 04/07/2023

Centro: OVUD

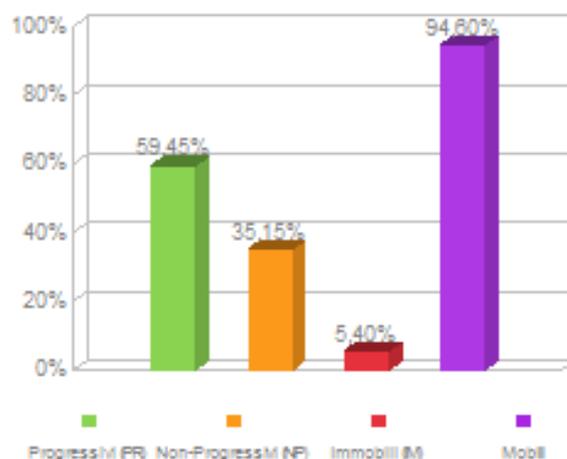
Codice: SCAtemp41



Animale: polizzi toro cinisara

Nuovo (04/07/2023 11:57)

Concentrazione	125,53 Milioni / ML 62,77 M/Campione
Progressivi (PR)	59,45 %
Non-Progressivi (NP)	35,15 %
Immobili (IM)	5,40 %
Mobili	94,60 %
Rapidi progressivi	11,95 %
Medi progressivi	47,50 %
Non progressivi	35,15 %
Immobili	5,40 %
Velocità curvilinea - VCL	59,25 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	18,35 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	30,73 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	23,83 %
Indice rettilineità - STR	48,91 %
Indice oscillazione - WOB	45,88 %
Ampiezza del movimento laterale	1,73 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	6,22 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 39. Referto SCA Polizzi toro Cinisara.

Referenza: 1089



Data (giorno/mese/anno): 04/07/2023

Centro: OVUD

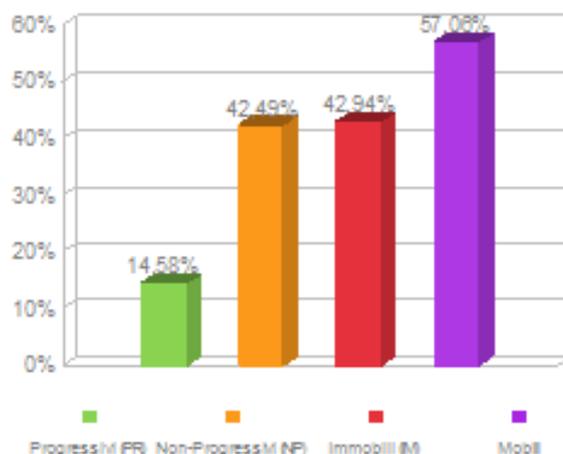
Codice: SCAtemp44



Animale: az bonomo scillato

Nuovo (04/07/2023 12:43)

Concentrazione	95,01 Milioni / ML 47,51 M/Campione
Progressivi (PR)	14,58 %
Non-Progressivi (NP)	42,49 %
Immobili (IM)	42,94 %
Mobili	57,06 %
Rapidi progressivi	2,03 %
Medi progressivi	12,54 %
Non progressivi	42,49 %
Immobili	42,94 %
Velocità curvilinea - VCL	26,11 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	3,64 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	7,94 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	10,25 %
Indice rettilineità - STR	39,43 %
Indice oscillazione - WOB	26,38 %
Ampiezza del movimento laterale	0,88 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	1,19 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 40. Referto SCA Bonomo toro Cinisara.

Referenza: 1087



Data (giorno/mese/anno): 04/07/2023

Centro: OVUD

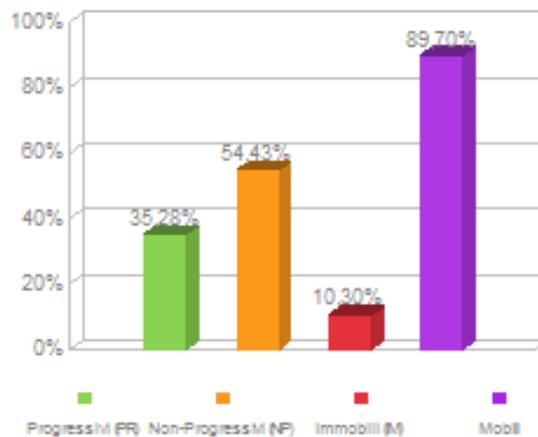
Codice: SCAtemp40



Animale: Giulio Cinisara

Nuovo (04/07/2023 11:37)

Concentrazione	185,82 Milioni / ML 92,91 M/Campione
Progressivi (PR)	35,28 %
Non-Progressivi (NP)	54,43 %
Immobili (IM)	10,30 %
Mobili	89,70 %
Rapidi progressivi	4,99 %
Medi progressivi	30,29 %
Non progressivi	54,43 %
Immobili	10,30 %
Velocità curvilinea - VCL	35,67 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	8,53 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	16,45 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	19,53 %
Indice rettilineità - STR	48,39 %
Indice oscillazione - WOB	40,47 %
Ampiezza del movimento laterale	1,22 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	2,82 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 41. Referto SCA Giulio toro Cinisara.

La valutazione pre-congelamento di ovini e caprini, come visto per i bovini, avveniva in campo. I risultati della valutazione dell'eiaculato dei piccoli ruminanti non mostravano grosse differenze né tra i soggetti della stessa razza né tra le due specie. Il volume di eiaculato era di circa 1 ml, la concentrazione media compresa tra 100-400 milioni di spz/ml, la motilità era compresa tra 40-80% e la motilità progressiva tra il 20-60%, le anomalie intorno al 20%, mentre la vitalità circa il 70% (tabelle 8-10).

ID	VOL (ML)	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ (%)	ANOMALIE (%)
IT083000565847	1	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	70	20
IT083000510533	0,75	BIANCO/ GIALLO	BASSA	35	15
IT083000510532	1,5	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	75	10
IT083000532632	1.25	BIANCO	NORMALE	55	5
IT083000464288	1	BIANCO	NORMALE	50	20
IT084000315353	1,5	BIANCO	NORMALE	80	25
IT084000315354	0,8	BIANCO	NORMALE	65	5

*Tabella 8. Valutazione del seme in arieti Barbaresca.*

ID	VOL (ML)	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ (%)	ANOMALIE (%)
IT083000435183	1	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	80	5
IT083000464313	1,5	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	90	15
IT083000520714	1,5	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	75	10
IT083000520717	1.25	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	85	5

IT083000564505	1	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	75	20
----------------	---	-------------------	---------	----	----

Tabella 9. Valutazione del seme in becchi Messinesi.

ID	VOL (ML)	COLORE	VISCOSITÀ	VITALITÀ (%)	ANOMALIE (%)
IT084000361474	1	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	55	5
IT084000385698	0,75	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	60	15
IT086000361486	1,	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	45	20
IT084000361385	1.25	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	60	5
IT084000391321	1	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	65	20
IT084000393400	1,5	BIANCO/ GIALLO	NORMALE	50	25
IT084000512087	0,8	BIANCO	NORMALE	65	5

Tabella 10. Valutazione del seme in becchi Girgentana.

Data l'importanza dei soggetti e l'esiguità nel numero di riproduttori, il seme di tutti i soggetti ovini e caprini è stato utilizzato per la crioconservazione, anche col fine di poterlo utilizzare per IVF (*in vitro fertilization*). La qualità degli eiaculati ottenuti non sempre era ottimale. In particolare, si notava come i maschi isolati dalle femmine per più mesi avessero una qualità migliore dell'eiaculato rispetto agli altri. Questo lo si notava nei becchi Messinesi e in un gruppo di arieti Barbareschi, mentre non si osservava nei becchi Girgentani, che per la modalità tradizionale d'allevamento venivano lasciati in maniera costante con le capre. In questi ultimi, la qualità dell'eiaculato ottenuto non era ottimale (tab.10). I risultati delle valutazioni post-congelamento (fig. 42-58) rispecchiano la valutazione precongelo. Tuttavia, bisogna sottolineare che a differenza del seme taurino, i soggetti caprini e ovini esaminati, ad oggi non erano mai stati sottoposti a conservazione del seme; inoltre,

appartenendo a razze autoctone a limitata diffusione, con caratteristiche talvolta uniche (Girgentana), i risultati ottenuti sono tanto preziosi quanto d'incoraggiamento per successivi studi.

Referenza: 1056



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: OVUD

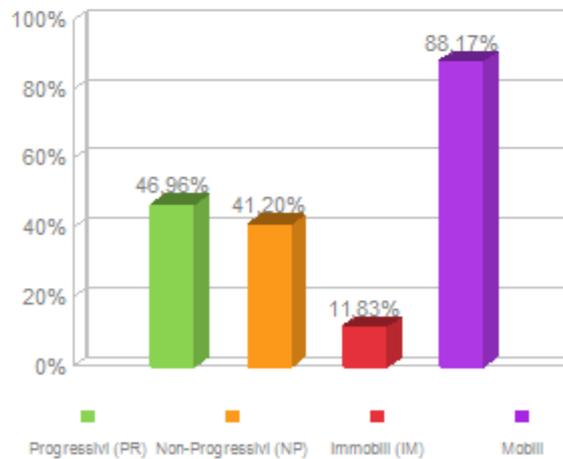
Codice: SCAtemp24



Animale: IT083000520714

Post trattamento (19/05/2023 13:00)

Concentrazione	207,94 Milioni / ML 103,97 M/Campione
Progressivi (PR)	46,96 %
Non-Progressivi (NP)	41,20 %
Immobili (IM)	11,83 %
Mobili	88,17 %
Rapidi progressivi	6,86 %
Medi progressivi	40,11 %
Non progeressivi	41,20 %
Immobili	11,83 %
Velocità curvilinea - VCL	48,63 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	13,04 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	23,92 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	21,78 %
Indice rettilineità - STR	45,09 %
Indice oscillazione - WOB	45,61 %
Ampiezza del movimento laterale	1,54 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	4,17 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 42. Referto SCA becco Messinese IT083000520714.

Referenza: 1058



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: OVUD

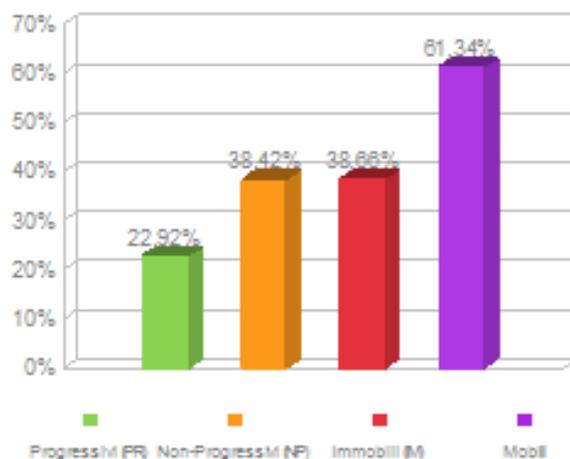
Codice: SCAtemp26



Animale: IT083000520717

Post trattamento (19/05/2023 13:09)

Concentrazione	156,75 Milioni / ML 78,38 M/Campione
Progressivi (PR)	22,92 %
Non-Progressivi (NP)	38,42 %
Immobili (IM)	38,66 %
Mobili	61,34 %
Rapidi progressivi	4,08 %
Medi progressivi	18,84 %
Non progressivi	38,42 %
Immobili	38,66 %
Velocità curvilinea - VCL	33,87 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	9,10 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	16,45 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	21,44 %
Indice rettilineità - STR	46,37 %
Indice oscillazione - WOB	43,23 %
Ampiezza del movimento laterale	1,17 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	2,95 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 43. Referto SCA becco Messinese IT083000520717.

Referenza: 1057



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: Laboratory

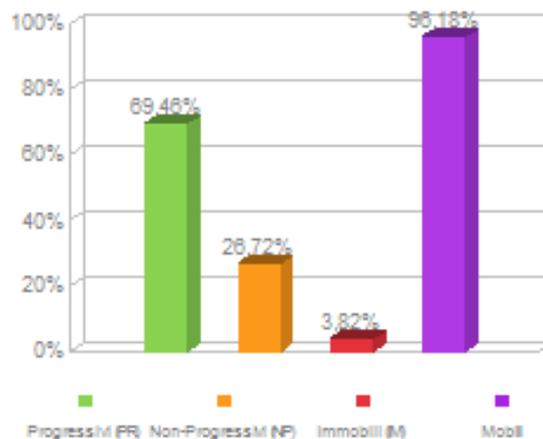
Codice: SCAtemp27



Animale: IT083000564505

Post trattamento (19/05/2023 13:03)

Concentrazione	226,37 Milioni / ML 113,19M/Campione
Progressivi (PR)	69,46 %
Non-Progressivi (NP)	26,72 %
Immobili (IM)	3,82 %
Mobili	96,18 %
Rapidi progressivi	10,20 %
Medi progressivi	59,26 %
Non progressivi	26,72 %
Immobili	3,82 %
Velocità curvilinea -VCL	65,29 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare -VSL	18,74 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore -VAP	34,17 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità -LIN	25,44 %
Indice rettilineità - STR	48,01 %
Indice oscillazione -WOB	50,54 %
Ampiezza del movimento laterale	1,94 $\mu\text{m}$
Frequenza battito -BCF	6,62 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 44. Referto SCA becco Messinese IT083000564505.

Referenza: 1059



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: Laboratory

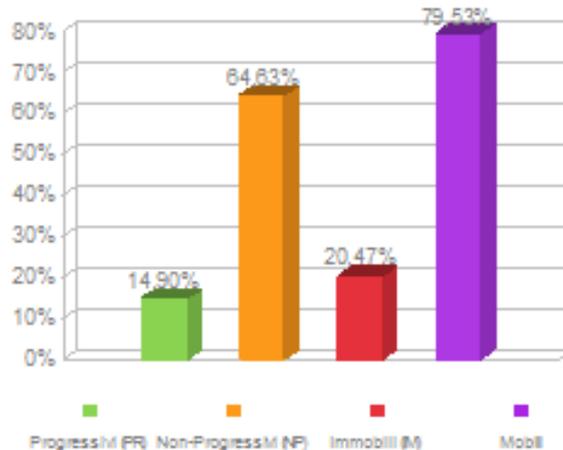
Codice: SCAtemp25



Animale: IT083000435138

Post trattamento (19/05/2023 13:12)

Concentrazione	64,23 Milioni / ML 32,12 M/Campione
Progressivi (PR)	14,90 %
Non-Progressivi (NP)	64,63 %
Immobili (IM)	20,47 %
Mobili	79,53 %
Rapidi progressivi	3,89 %
Medi progressivi	11,01 %
Non progressivi	64,63 %
Immobili	20,47 %
Velocità curvilinea - VCL	27,34 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	6,24 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	11,52 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	12,64 %
Indice rettilineità - STR	39,41 %
Indice oscillazione - WOB	33,99 %
Ampiezza del movimento laterale	1,05 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	2,17 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 45. Referto SCA becco Messinese IT083000435138.

Referenza: 1060



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: OVUD

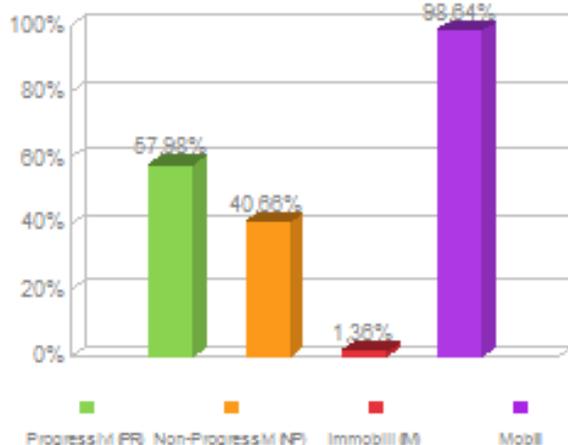
Codice: SCAtemp23



Animale: IT083000464313

Post trattamento (19/05/2023 13:16)

Concentrazione	253,87 Milioni / ML 126,94 M/Campione
Progressivi (PR)	57,98 %
Non-Progressivi (NP)	40,66 %
Immobili (IM)	1,36 %
Mobili	98,64 %
Rapidi progressivi	5,69 %
Medi progressivi	52,29 %
Non progressivi	40,66 %
Immobili	1,36 %
Velocità curvilinea - VCL	47,69 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	9,41 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	20,82 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	15,25 %
Indice rettilineità - STR	35,29 %
Indice oscillazione - WOB	39,24 %
Ampiezza del movimento laterale	1,53 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	3,54 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 46. Referto SCA becco Messinese IT083000464313.

Referenza: 1061



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: OVUD

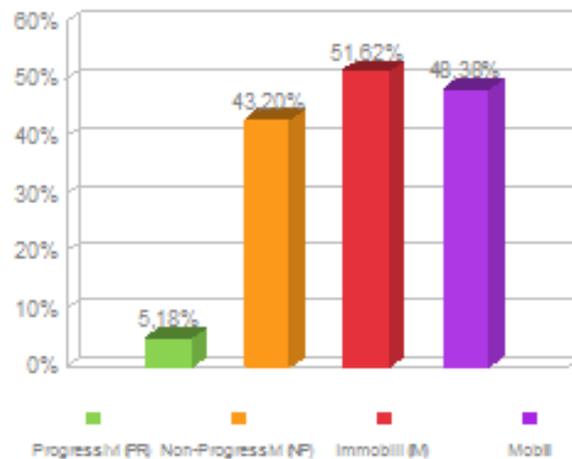
Codice: SCAtemp22



Animale: IT083000565847

Post trattamento (19/05/2023 14:05)

Concentrazione	40,37 Milioni / ML 20,19 M/Campione
Progressivi (PR)	5,18 %
Non-Progressivi (NP)	43,20 %
Immobili (IM)	51,62 %
Mobili	48,38 %
Rapidi progressivi	0,65 %
Medi progressivi	4,54 %
Non progressivi	43,20 %
Immobili	51,62 %
Velocità curvilinea - VCL	19,49 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	2,36 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	6,77 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	9,70 %
Indice rettilineità - STR	34,09 %
Indice oscillazione - WOB	32,85 %
Ampiezza del movimento laterale	0,83 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	0,83 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 47. Referto SCA ariete Barbaresca IT083000565847.

Referenza: 1063



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: OVUD

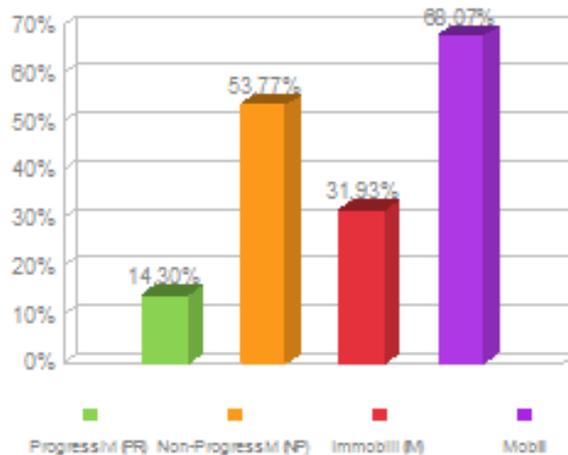
Codice: SCAtemp20



Animale: IT083000510532

Post trattamento (19/05/2023 14:14)

Concentrazione	37,11 Milioni / ML 18,56 M/Campione
Progressivi (PR)	14,30 %
Non-Progressivi (NP)	53,77 %
Immobili (IM)	31,93 %
Mobili	68,07 %
Rapidi progressivi	1,47 %
Medi progressivi	12,83 %
Non progressivi	53,77 %
Immobili	31,93 %
Velocità curvilinea - VCL	25,42 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	6,80 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	11,18 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	25,33 %
Indice rettilineità - STR	58,06 %
Indice oscillazione - WOB	41,97 %
Ampiezza del movimento laterale	0,98 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	1,69 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 48. Referto SCA ariete Barbaresca IT083000510532.

Referenza: 1064



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023  
Centro: OVUD

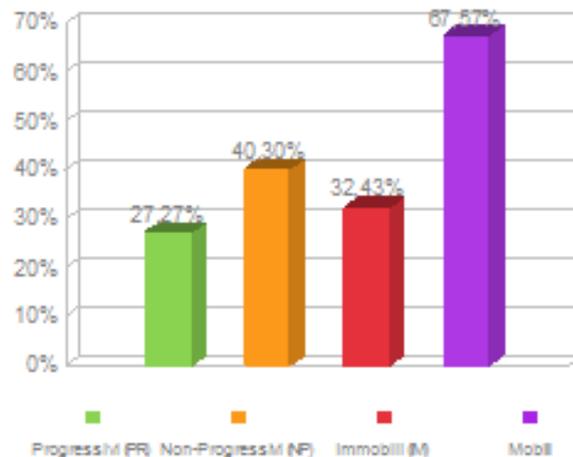
Codice: SCAtemp19



Animale: IT083000464288

Post trattamento (19/05/2023 14:19)

Concentrazione	84,18 Milioni / ML 42,09 M/Campione
Progressivi (PR)	27,27 %
Non-Progressivi (NP)	40,30 %
Immobili (IM)	32,43 %
Mobili	67,57 %
Rapidi progressivi	6,05 %
Medi progressivi	21,23 %
Non progressivi	40,30 %
Immobili	32,43 %
Velocità curvilinea - VCL	38,73 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	10,52 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	17,79 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	21,60 %
Indice rettilineità - STR	51,32 %
Indice oscillazione - WOB	40,40 %
Ampiezza del movimento laterale	1,26 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	4,09 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 49. Referto SCA ariete Barbaresca IT083000464288.

Referenza: 1065



Data (giorno/mese/anno): 19/05/2023

Centro: OVUD

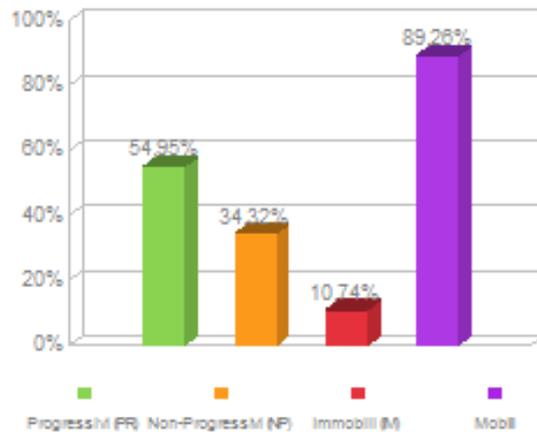
Codice: SCAtemp17



Animale: IT083000510533

Post trattamento (19/05/2023 14:40)

Concentrazione	213,05 Milioni / ML 106,53 M/Campione
Progressivi (PR)	54,95 %
Non-Progressivi (NP)	34,32 %
Immobili (IM)	10,74 %
Mobili	89,26 %
Rapidi progressivi	10,19 %
Medi progressivi	44,76 %
Non progressivi	34,32 %
Immobili	10,74 %
Velocità curvilinea - VCL	52,22 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	15,29 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	27,39 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	26,28 %
Indice rettilineità - STR	50,15 %
Indice oscillazione - WOB	49,81 %
Ampiezza del movimento laterale	1,66 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	5,04 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 50. Referto SCA ariete Barbaresca IT083000510533.

Referenza: 1073



Data (giorno/mese/anno): 06/06/2023

Centro: OVUD

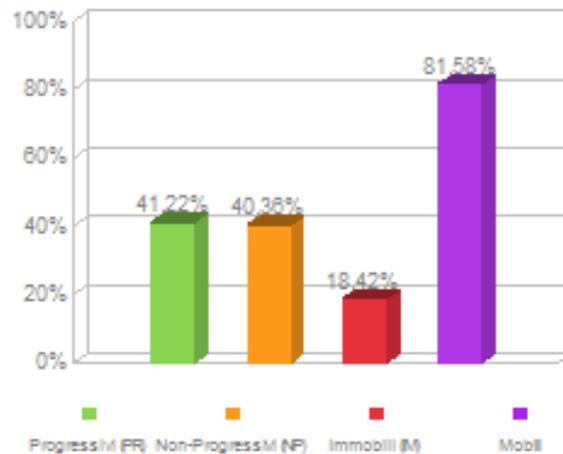
Codice: SCAtemp31



Animale: 315354

Nuovo (06/06/2023 18:10)

Concentrazione	174,22 Milioni / ML 87,11 M/Campione
Progressivi (PR)	41,22 %
Non-Progressivi (NP)	40,36 %
Immobili (IM)	18,42 %
Mobili	81,58 %
Rapidi progressivi	8,09 %
Medi progressivi	33,13 %
Non progressivi	40,36 %
Immobili	18,42 %
Velocità curvilinea - VCL	43,60 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	12,59 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	22,04 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	22,97 %
Indice rettilineità - STR	48,58 %
Indice oscillazione - WOB	44,97 %
Ampiezza del movimento laterale	1,37 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	4,06 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 51. Referto SCA ariete Barbaresca IT084000315354.

Referenza: 1077



Data (giorno/mese/anno): 06/06/2023

Centro: OVUD

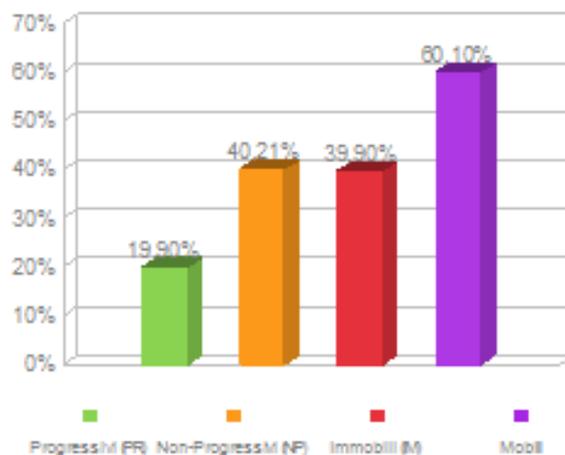
Codice: SCAtemp30



Animale: 3153

Nuovo (06/06/2023 19:08)

Concentrazione	161,04 Milioni / ML 80,52 M/Campione
Progressivi (PR)	19,90 %
Non-Progressivi (NP)	40,21 %
Immobili (IM)	39,90 %
Mobili	60,10 %
Rapidi progressivi	3,38 %
Medi progressivi	16,52 %
Non progressivi	40,21 %
Immobili	39,90 %
Velocità curvilinea - VCL	28,87 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	6,73 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	12,94 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	18,11 %
Indice rettilineità - STR	47,55 %
Indice oscillazione - WOB	38,71 %
Ampiezza del movimento laterale	1,01 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	2,07 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 12. Referto SCA ariete Barbaresca IT084000315353.

Referenza: 1074



Data (giorno/mese/anno): 06/06/2023

Centro: OVUD

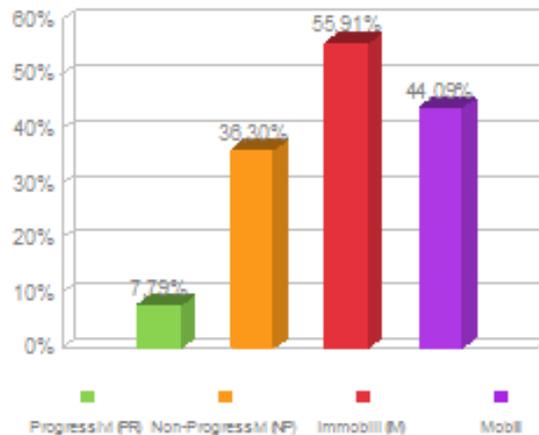
Codice: SCAtemp34



Animale: 391321

Nuovo (06/06/2023 18.28)

Concentrazione	159,25 Milioni / ML 79,63 M/Campione
Progressivi (PR)	7,79 %
Non-Progressivi (NP)	36,30 %
Immobili (IM)	55,91 %
Mobili	44,09 %
Rapidi progressivi	0,35 %
Medi progressivi	7,43 %
Non progressivi	36,30 %
Immobili	55,91 %
Velocità curvilinea - VCL	20,78 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	2,29 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	6,50 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	9,16 %
Indice rettilineità - STR	30,77 %
Indice oscillazione - WOB	27,81 %
Ampiezza del movimento laterale	0,85 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	0,73 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 53. Referto SCA becco Girgentana IT084000391321.

Referenza: 1076



Data (giorno/mese/anno): 06/06/2023

Centro: OVUD

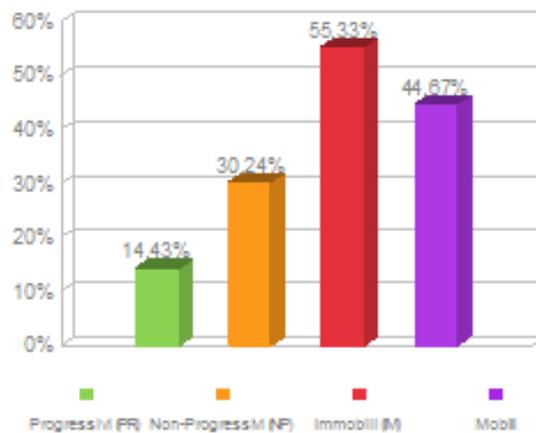
Codice: SCAtemp33



Animale: 393400

Nuovo (06/06/2023 18:57)

Concentrazione	64,40 Milioni / ML 32,20 M/Campione
Progressivi (PR)	14,43 %
Non-Progressivi (NP)	30,24 %
Immobili (IM)	55,33 %
Mobili	44,67 %
Rapidi progressivi	4,31 %
Medi progressivi	10,12 %
Non progressivi	30,24 %
Immobili	55,33 %
Velocità curvilinea - VCL	34,65 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	12,21 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	16,57 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	21,48 %
Indice rettilineità - STR	52,40 %
Indice oscillazione - WOB	36,38 %
Ampiezza del movimento laterale	1,01 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	3,84 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 54. Referto SCA becco Girgentana IT084000393400.

Referenza: 1079



Data (giorno/mese/anno): 27/06/2023

Centro: OVUD

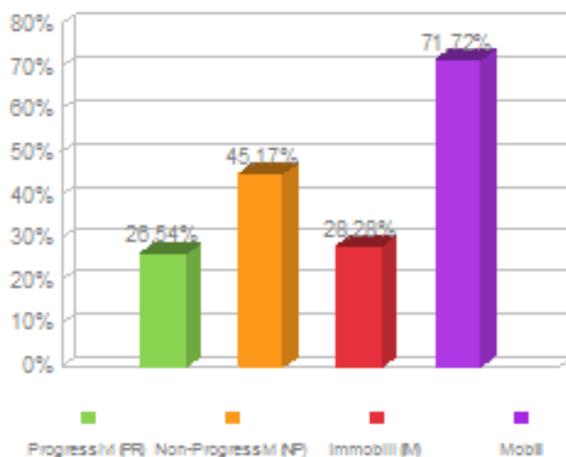
Codice: SCAtemp36



Animale: becco girgentana 24 baroni

Nuovo (27/06/2023 10:17)

Concentrazione	107,14 Milioni / ML 53,57 M/Campione
Progressivi (PR)	26,54 %
Non-Progressivi (NP)	45,17 %
Immobili (IM)	28,28 %
Mobili	71,72 %
Rapidi progressivi	4,03 %
Medi progressivi	22,51 %
Non progressivi	45,17 %
Immobili	28,28 %
Velocità curvilinea - VCL	29,62 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	8,80 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	13,39 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	26,19 %
Indice rettilineità - STR	58,82 %
Indice oscillazione - WOB	40,88 %
Ampiezza del movimento laterale	0,96 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	2,72 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 55. Referto SCA becco Girgentana IT084000361474.

Referenza: 1080



Data (giorno/mese/anno): 27/06/2023

Centro: OVUD

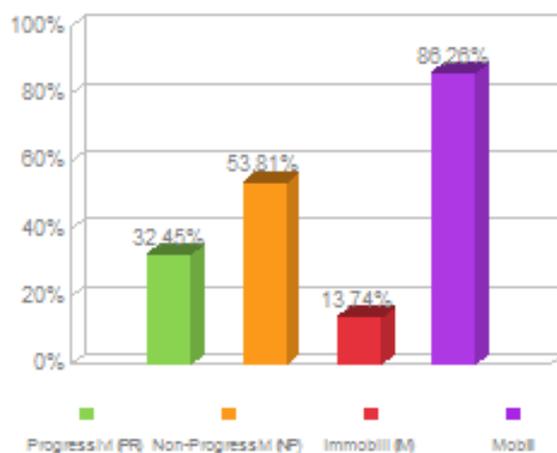
Codice: SCAtemp37



Animale: it084000385698

Nuovo (27/06/2023 10:49)

Concentrazione	190,20 Milioni / ML
	95,10 M/Campione
Progressivi (PR)	32,45 %
Non-Progressivi (NP)	53,81 %
Immobili (IM)	13,74 %
Mobili	86,26 %
Rapidi progressivi	1,77 %
Medi progressivi	30,68 %
Non progressivi	53,81 %
Immobili	13,74 %
Velocità curvilinea - VCL	25,14 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	2,46 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	6,33 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	8,07 %
Indice rettilineità - STR	43,93 %
Indice oscillazione - WOB	22,75 %
Ampiezza del movimento laterale	0,93 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	0,90 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 56. Referto SCA becco Girgentana IT084000385698.

Referenza: 1081



Data (giorno/mese/anno): 27/06/2023

Centro: OVUD

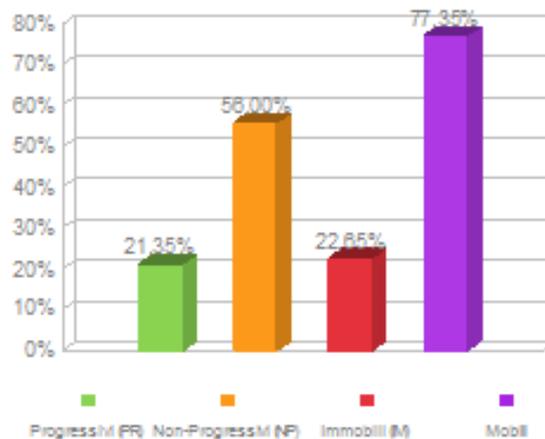
Codice: SCAtemp38



Animale: IT086000361385

Nuovo (27/06/2023 12:48)

Concentrazione	60,69 Milioni / ML 30,35 M/Campione
Progressivi (PR)	21,35 %
Non-Progressivi (NP)	56,00 %
Immobili (IM)	22,65 %
Mobili	77,35 %
Rapidi progressivi	1,94 %
Medi progressivi	19,41 %
Non progressivi	56,00 %
Immobili	22,65 %
Velocità curvilinea - VCL	23,94 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	3,84 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	7,31 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	15,40 %
Indice rettilineità - STR	49,32 %
Indice oscillazione - WOB	30,48 %
Ampiezza del movimento laterale	0,83 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	1,44 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 57. Referto SCA becco Girgentana IT084000361385.

Referenza: 1082



Data (giorno/mese/anno): 27/06/2023

Centro: OVUD

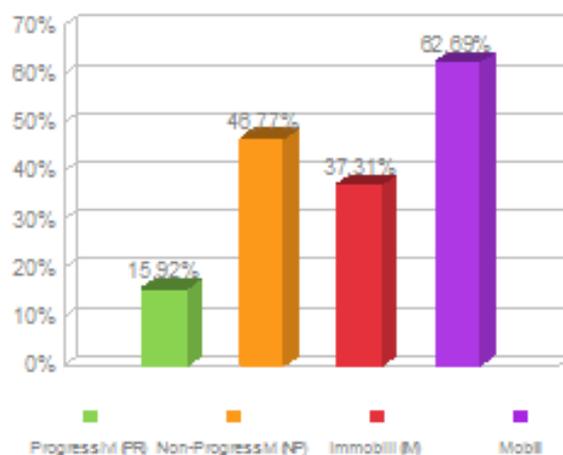
Codice: SCAtemp39



Animale: IT086000361486

Nuovo (27/06/2023 13:00)

Concentrazione	56,31 Milioni / ML
	28,16 M/Campione
Progressivi (PR)	15,92 %
Non-Progressivi (NP)	46,77 %
Immobili (IM)	37,31 %
Mobili	62,69 %
Rapidi progressivi	2,38 %
Medi progressivi	13,54 %
Non progressivi	46,77 %
Immobili	37,31 %
Velocità curvilinea - VCL	25,89 $\mu\text{m/s}$
Velocità lineare - VSL	3,37 $\mu\text{m/s}$
Md. Valore - VAP	8,04 $\mu\text{m/s}$
Indice linearità - LIN	5,65 %
Indice rettilineità - STR	31,63 %
Indice oscillazione - WOB	27,61 %
Ampiezza del movimento laterale	0,92 $\mu\text{m}$
Frequenza battito - BCF	1,33 Hz



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura 58. Referto SCA becco Girgentana IT086000361486.

### **Esp 3. Raccolta embrioni nella bovina Modicana**

#### **Introduzione**

Le biotecnologie riproduttive riguardano tutti quei processi volti alla manipolazione dei gameti. La loro applicazione in ambito zootecnico ha trovato un ampio approccio soprattutto in tecniche come l'inseminazione artificiale, largamente utilizzata, il criocongelamento dei gameti, l'*embryo transfer*. Uno dei pionieri in campo della fecondazione artificiale fu l'italiano Lazzaro Spallanzani. Egli, tra il 1770 e il 1780, intraprese una serie di esperimenti su anfibi e cani (Spallanzani, 1780; 1781). Le prime applicazioni sulla bovina risalgono ai primi del 900 in Russia e Danimarca (Ivanoff, 1922; Perry, 1945). La nascita del primo vitello, nato da FA con seme congelato (Polge e Rowson, 1952) e del primo vitello nato da trasferimento embrionale (Wilmut e Rowson, 1973) risalgono alla seconda metà del secolo scorso ed hanno rappresentato un'importante svolta nel settore. Oggi la maggior parte delle inseminazioni e dei trapianti embrionali viene fatta con seme ed embrioni congelati (Vishwanath, 2003; Hasler, 2014). Tra il 1940 e il 1950 è stata sviluppata la tecnica della MOET (*multiple ovulation embryo transfer*) nella bovina (Casida et al., 1943; Rowson, 1951; Willett et al., 1951; Dziuk et al., 1958). Gli studi condotti tra gli anni 70 e 80 sulla maturazione degli oociti, capacitazione degli spermatozoi, e fecondazione e coltura embrionale *in vitro*, hanno portato alla nascita dei primi vitelli da IVF (*in vitro fertilization*) nel 1987 (Lu et al., 1987). L'*ovum pick-up* (OPU), ovvero la metodica per prelevare gli oociti da una donatrice *in vivo* è stata sviluppata durante la fine degli anni 80 da Pieterse et al. (1988). I protocolli per la produzione di embrioni *in vitro* (IVP) sono stati ulteriormente sviluppati negli anni '90 come alternativa alla superovulazione e all'ET combinando OPU, fecondazione *in vitro* (IVF) e ET (Looney et al., 1994). Le tecniche di clonazione per la produzione di pecore identiche sono iniziate negli anni '70, prima con la scissione embrionale (Willadsen, 1979) e successivamente sostituite dal trasferimento nucleare (Willadsen, 1986; Prather et al., 1987). Una tecnologia molto più importante, tuttavia, ha coinvolto quello che viene definito trasferimento nucleare di cellule somatiche (SCNT), consentendo la clonazione di un animale di cui la genetica e la morfologia erano già

note. La pecora Dolly è stato il primo esempio di successo con SCNT (Wilmut et al., 1997). La tecnica è stata applicata anche alla produzione di bovini transgenici (Cibelli et al., 1998) e finora ha trovato il suo maggior impiego nella produzione di animali transgenici e geneticamente modificati per uso di ricerca o farmaceutico. Esempi includono la creazione di bovini con resistenza alla mastite (Liu et al., 2014) e di bovini *polled* (senza corna) (Carlson et al., 2016). La produzione di vitelle femmine è stata a lungo ricercata dagli allevatori. Mediante citometria a flusso sin fin dagli anni 80 si cercò di separare gli spermatozoi X da quelli Y (Garner et al., 1983), ma le procedure all'inizio uccidevano gli spermatozoi. Nel 1989 nacque la prima progenie (conigli) da seme sessato (Johnson et al., 1989), e fu solo nel 1993 che nacque il primo vitello da seme sessuato (Cran et al., 1993).

La MOET (superovulazione ed *embryo transfer*) è una biotecnologia riproduttiva che permette di ottenere rapidamente ottimi risultati in termini di miglioramento genetico e anche conservazione della specie. Questa tecnica applicata alla bovina vede numerosi vantaggi, primo tra tutti quello di poter un elevato numero di vitelli, di un alto valore genetico, figli di una sola bovina, rispetto a quelli che potrebbe dare naturalmente. Uno dei pionieri dell'*embryo transfer* fu Walter Heape, che nel 1890 trasferì due embrioni prelevati da una coniglia di razza Angora in una coniglia belga che era stata inseminata, questa partorì 4 coniglietti Belga e 2 Angora (Heape, 1891). La sequenza di eventi che precedono il transfer inizia con la superovulazione. Questa consiste nello stimolare la bovina ad avere più ovulazioni nello stesso ciclo. Le prime superovulazioni nei bovini furono eseguite da Casida et al. (1943). Successivamente, Rowson e colleghi dell'Agricultural Research Council Unit of Animal Reproduction di Cambridge, Inghilterra, svilupparono metodi per indurre la stimolazione dei follicoli e la produzione di ovociti utilizzando gonadotropine sieriche di cavalla gravida/gonadotropine corioniche equine(eCG) (Rowson, 1951). A causa della lunga emivita, veniva somministrata una singola dose di eCG per indurre la superovulazione. Il risultato era piuttosto variabile, tuttavia, con follicoli non ovulati ed embrioni di scarsa qualità spesso recuperati. Altre metodiche di superovulazione con FSH sono state riportate da Dziuk et al. (1958), ed Elsdon et al. (1978) ottenne ottimi risultati utilizzando, iper la superovulazione FSH suino somministrato due

volte al giorno per 4 giorni. Per molti anni, i programmi commerciali di ET prevedevano la somministrazione di FSH in qualsiasi giorno a partire dal giorno 8-13 del ciclo estrale (Hasler et al., 1983). Questo richiedeva di conoscere il giorno dell'estro precedente. I protocolli di sincronizzazione dell'estro hanno reso l'avvio della superovulazione più semplice e conveniente. Recentemente, la superovulazione con 1 o 2 iniezioni di FSH utilizzando acido ialuronico come diluente si è dimostrata paragonabile a iniezioni multiple con soluzione salina come diluente (Tríbulo et al., 2011; 2012). Una caratteristica sorprendente della superovulazione è la variabilità nella risposta tra gli animali al trattamento con gonadotropine. Utilizzando protocolli di superovulazione simili, le risposte all'interno delle razze bovine variavano da 0 a più di 100 ovociti recuperati, di cui da 0 a più di 60 erano embrioni di buona qualità. Il numero medio di embrioni raccolti da bovini è cambiato solo modestamente, se non per nulla, negli ultimi 25 anni. L'*American Embryo Transfer Association* (AETA) ha riferito che le bovine da carne hanno prodotto in media leggermente più embrioni (7,1) rispetto a quelle da latte (6,2) nel periodo 1998-2010. Queste medie sono praticamente invariate rispetto alla media di 6,2 riportata da Looney (1986) per più di 2.000 donatrici da carne e la media di 6,4 riportata da Hasler et al. (1983) per più di 600 Holstein, ciascuna alla prima superovulazione.

Le prime raccolte di embrioni furono fatte per via chirurgica. La procedura era invasiva, costosa, dispendiosa in termini di tempo e di lavoro. Richiedeva strutture chirurgiche e non poteva essere eseguita in azienda. Le tecniche non chirurgiche, invece, sono più facili e vantaggiose da applicare sia per i professionisti che più rispettose per gli animali. Le prime raccolte di embrioni non chirurgiche furono sviluppate da Rowson et al. (1949) a Cambridge. Loro svilupparono uno strumento per il prelievo degli embrioni; era un catetere con una cuffia gonfiabile che poteva essere fatto passare attraverso la cervice per "flushare" (lavare) i corni uterini. Contributi sul miglioramento delle tecniche di prelievo non chirurgico sono stati dati anche da Dziuk et al. (1958) presso l'Università del Minnesota e da Sugie (1965, 1968) in Giappone. Sviluppi sull'uso dei cateteri Foley sono stati riportati da Drost et al. (1976), Elsdon et al. (1976) e Rowe et al. (1976), tutti pubblicati contemporaneamente sulla rivista *Theriogenology*. Successivamente, seguì di

conseguenza un rapido aumento del numero di operazioni di ET (Hasler, 2014). Il recupero non chirurgico di embrioni bovini generalmente comporta l'utilizzo di un volume relativamente grande (500–2000 ml) di mezzo di lavaggio che viene introdotto dentro e fuori dall'utero. Agli albori dell'industria, questo mezzo veniva spesso raccolto in un cilindro graduato da 1 litro e gli embrioni venivano lasciati depositare sul fondo per 30 minuti o più. La maggior parte del terreno veniva quindi aspirata e scartata, 100 ml circa venivano utilizzati per cercare gli embrioni. A metà degli anni '80 fu reso disponibile in commercio il primo di numerosi modelli di filtri per embrioni. I filtri potevano essere collegati in linea al tubo di deflusso dell'attrezzatura di lavaggio e gli embrioni venivano quindi intrappolati in una tazza di plastica da uno schermo di acciaio inossidabile o nylon che consentiva il passaggio del mezzo di lavaggio. Ciò si è rivelato conveniente e ha ridotto il tempo impiegato nella ricerca di ovuli ed embrioni al termine del lavaggio. Prima della disponibilità dei prodotti commerciali, la maggior parte dei professionisti creava i propri *medium* (Moore e Hasler, 2017). Il PBS di Dulbecco modificato con l'1% di siero di vitello neonato trattato termicamente veniva generalmente utilizzato per il *flushing* e il 10% di siero di vitello neonato veniva utilizzato per mantenere gli embrioni (Hasler, 2014). Oggi, diverse aziende producono e vendono terreni specifici per il lavaggio, la manipolazione, il trasferimento e la crioconservazione di embrioni bovini. Nella maggior parte dei casi questi terreni non contengono più siero, ma solo l'albumina sierica bovina (BSA). Si sono dimostrati efficaci anche i *medium* sintetici, che non contengono componenti di origine biologica e non richiedono refrigerazione (Hasler, 2010). Gli embrioni bovini vengono normalmente raccolti da 6 a 8 giorni dopo l'estro, sebbene sia preferibile a 7,5 giorni dopo l'estro quando si prevede la crioconservazione. In quei giorni lo sviluppo degli embrioni varia solitamente dalle morule tardive alle blastocisti espanse. La valutazione microscopica degli embrioni comprende la determinazione dello stadio di sviluppo, con particolare riferimento al giorno del prelievo, all'organizzazione dell'embrione, all'aspetto morfologico dei blastomeri, al grado di frammentazione e ad altri segni di degenerazione. Le definizioni descrittive della qualità dell'embrione sono state originariamente fornite da Elsdon et al. (1978) e sono ancora citate come base per la valutazione della qualità degli embrioni. Gli embrioni sono stati classificati in quattro gruppi: eccellenti, buoni,

253

discreti e scadenti. Si ritenne che gli embrioni eccellenti fossero al normale stadio di sviluppo al momento dell'esame (Betteridge, 1977), fossero simmetrici e i blastomeri fossero di forma poligonale formando una massa compatta allo stadio di morula. Gli embrioni classificati come buoni erano simili agli eccellenti ma erano asimmetrici, contenevano blastomeri esclusi dalla massa della morula principale o erano leggermente in ritardo rispetto ad altri embrioni recuperati dallo stesso donatore. Gli embrioni discreti erano in ritardo di 1 o 2 giorni nello sviluppo (Betteridge, 1977), avevano blastomeri sferici anziché poligonali allo stadio di morula, contenevano blastomeri di varie dimensioni, presentavano segni di degenerazione come grandi vescicole nelle cellule e/o erano più scuri o più leggero del normale. Gli embrioni scarsi erano indietro di 2 o più giorni nello sviluppo, avevano membrane cellulari indistinte e/o presentavano difetti più gravi rispetto agli embrioni giusti. La valutazione della qualità degli embrioni bovini è ora riconosciuta a livello internazionale della IETS (*International Embryo Technology Society*); si basa sulla morfologia ed è descritta in modo approfondito da Robertson e Nelson (1998). Negli anni '70 gli embrioni bovini venivano trasferiti quasi esclusivamente chirurgicamente e come per il recupero chirurgico degli embrioni, questo approccio richiedeva strutture chirurgiche specializzate. Una procedura chirurgica di trasferimento al fianco relativamente semplice, sviluppata da Baker presso la McGill University di Montréal, Québec, Canada, è stata rapidamente applicata ai trasferimenti in azienda. Successivamente, questa si è rivelata di grande successo nei programmi ET su larga scala negli Stati Uniti, con tassi di gravidanza superiori al 70% (Coleman et al., 1987; Hasler et al., 1987). Anche i trasferimenti sul fianco, tuttavia, non erano ideali perché includevano il taglio e la preparazione chirurgica della regione paralombare, l'iniezione di un anestetico locale, l'apertura chirurgica del fianco, l'esteriorizzazione del corno uterino in condizioni asettiche, il trasferimento dell'embrione attraverso una puntura del corno uterino, e infine la sutura dell'incisione. Una caratteristica interessante di questo metodo di trasferimento è che la maggior parte dei veterinari lo ha imparato rapidamente e ha raggiunto tassi di concepimento elevati senza avere molta esperienza precedente. Successivamente, il successo del trasferimento non chirurgico ha richiesto in realtà molta più esperienza, in particolare nella palpazione transrettale, rispetto all'approccio chirurgico (Hasler, 2014). Non vi è stata alcuna

evidente perdita di tasso di gravidanza con il passaggio dal trasferimento chirurgico a quello non chirurgico degli embrioni in un programma ET commerciale (Hasler, 2001). Lo sviluppo dell'ET non chirurgico nei bovini ha beneficiato dello sviluppo di protocolli di inseminazione artificiale temporizzata. Quest'ultimo ha permesso ai donatori e al numero desiderato di riceventi di embrioni di sincronizzare il loro ciclo estrale, cosa importante per un programma ET di successo. Ciò ha ridotto la dimensione della mandria ricevente necessaria. Se un gruppo di mucche donatrici all'interno di una mandria fosse sincronizzato, potrebbero essere tutte inseminate in modo efficiente contemporaneamente e gli embrioni potrebbero essere raccolti successivamente nello stesso momento. In uno studio (Hasler et al., 1987), il tasso di gravidanza era leggermente ma significativamente maggiore nelle riceventi indotte all'estro con prostaglandine rispetto a quelle che presentavano un estro naturale. L'asincronia dell'estro ha influenzato i tassi di gravidanza degli embrioni freschi e congelati-scongelati in modo simile, senza alcun effetto evidente quando la sincronia era entro 24 ore (Hasler, 2001). Uno dei primi problemi con l'ET non chirurgico era che non veniva utilizzata alcuna attrezzatura specifica. La situazione è cambiata nel 1984 e nel 1985, quando IMV Technologies ha introdotto apparecchiature specifiche per l'ET non chirurgico (Hasler, 2014). Successivamente, i tassi di gravidanza erano simili tra i metodi di trasferimento quando venivano utilizzati embrioni freschi. Tuttavia, i tassi di gravidanza erano ancora più bassi quando gli embrioni congelati venivano trasferiti senza intervento chirurgico (Hasler, 2001).

Nonostante il successo della crioconservazione dello sperma riportato per la prima volta nel 1949 (Polge et al., 1949), la crioconservazione di piccole cellule somatiche ha provocato la morte del 100% degli embrioni. Le cellule embrionali contengono molta più acqua rispetto agli spermatozoi e un'efficace disidratazione di queste cellule per prevenire danni causati dal ghiaccio è fondamentale per la sopravvivenza. Il successo con embrioni di mammiferi non è stato riportato fino al 1972 (Whittingham et al., 1972), utilizzando embrioni di topo. Il successo con la crioconservazione di embrioni bovini fu segnalato per la prima volta nel 1973 (Wilmut e Rowson, 1973). Come per la crioconservazione dello sperma, anche per la crioconservazione degli embrioni si applica una velocità di raffreddamento ottimale. La velocità di

raffreddamento ottimale dipende dalla quantità di acqua nelle cellule e dalla facilità con cui può lasciare le cellule. La velocità di raffreddamento ottimale deve essere molto lenta ( $<1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) perché le cellule degli embrioni precoci sono molto grandi (Wilmot e Rowson, 1973). Sono stati effettuati confronti sistematici sull'effetto della velocità di raffreddamento, della velocità di riscaldamento e dell'uso di diversi agenti crioprotettivi. Il protocollo principale che ha reso possibile il successo è stato il raffreddamento dell'embrione da circa  $-5$  a  $-7^{\circ}\text{C}$  a circa da  $-30$  a  $-35^{\circ}\text{C}$  a una velocità di  $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Questa velocità di raffreddamento dava all'acqua tempo sufficiente per uscire osmoticamente dalle cellule in modo che non si formassero dannosi cristalli di ghiaccio intracellulari. Il perfezionamento successivo è stato quello di immergere gli embrioni raffreddati (da  $-30$  a  $-35^{\circ}\text{C}$ ) nell'azoto liquido prima che le cellule diventassero troppo disidratate. Un terzo requisito essenziale era rimuovere il crioprotettore dalle cellule dopo lo scongelamento in modo da ridurre al minimo il gonfiore osmotico (Seidel, 2015). Il valore potenziale della crioconservazione degli embrioni per lo scambio internazionale di prezioso materiale genetico è stato dimostrato quando embrioni di bovino congelati furono esportati dall'Inghilterra alla Nuova Zelanda nel 1976 (Polge, 2000). Un contributo storico sulla crioconservazione degli embrioni è quello di Maurer (1978).

Oggi la crioconservazione degli embrioni costituisce una componente molto importante dei programmi ET. Infatti, circa il 70% degli embrioni di bovini negli Stati Uniti vengono congelati anziché trasferiti immediatamente dopo la raccolta (AETA). Gli embrioni possono essere raccolti in un determinato momento e luogo e utilizzati secondo necessità con l'esatto numero di riceventi richiesti in un altro momento e luogo. Il dimetilsolfossido era il crioprotettore più spesso utilizzato per il congelamento degli embrioni fino a quando non fu sostituito dal glicerolo all'inizio degli anni '80. L'industria ha rapidamente e ampiamente accettato lo sviluppo di una procedura di trasferimento diretto che utilizzava il glicole etilenico come crioprotettore (Voelkel e Hu, 1992). Il trasferimento diretto ha consentito di scongelare le cannuce e di inserirle nella pistola da ET. Prima di ciò, la *paillette* è stata scongelata e l'embrione è stato reidratato con saccarosio e ricaricato nelle *paillette* per il trasferimento nella ricevente. L'adozione del trasferimento diretto con

glicole etilenico è stata rapida e ha avuto un effetto positivo sul settore ET. Il processo di scongelamento e caricamento è stato molto più rapido e dopo lo scongelamento non è stato più necessario che un embriologo con un microscopio cercasse e localizzasse gli embrioni per la reidratazione dopo lo scongelamento. Con il passaggio da embrione fresco a quello congelato-scongelato, si è verificata una perdita nel tasso di gravidanza da 10 a 13 punti percentuali (Hasler, 2001). È stato dimostrato che lo stadio di sviluppo dell'embrione influenza anche i tassi di gravidanza dopo il trasferimento di embrioni congelati-scongelati (Hasler, 2011). Questo studio, basato su quasi 73.000 trasferimenti, ha riportato i seguenti tassi di gravidanza relativi allo stadio embrionale: stadio 4 (morula tardiva) = 53,7%, stadio 5 (blastocisti precoce) = 55,3%, stadio 6 (blastocisti) = 52,1% e stadio 7 (blastocisti espansa) = 43,8%. Le fasi 6 e 7 hanno prodotto tassi di gravidanza significativamente più bassi rispetto alle fasi 4 e 5. Questo è un esempio di come è possibile utilizzare campioni di grandi dimensioni per determinare differenze significative, ma anche di come differenze piccole ma significative nei tassi di gravidanza possano tradursi in opportunità di successo perse.

## **Materiali e Metodi**

Gli embrioni sono stati raccolti dal gruppo raccolta embrioni di Messina (ME0100S); responsabile del gruppo, autorizzato ai sensi dell'art. 3 del Reg Del UE 2020/686, è il prof. Gabriele Marino.

Tutte le bovine donatrici erano di razza Modicana, nate e rimaste sin dalla nascita nell'Unione e provenivano da stabilimenti soggetti al controllo ufficiale dell'autorità competente e conformi alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui al Reg Del UE 2020/688, ossia allevamenti indenni da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, da infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*). Ovviamente negli stabilimenti non erano stati segnalati casi di infezione da virus della rabbia, da virus della malattia emorragica epizootica, da carbonchio ematico, da surra (*Trypanosoma evansi*). Per l'infezione da virus della

febbre catarrale degli ovini (sierotipi 1-24), trattandosi di zone non indenni, si è proceduto in accordo all'allegato V, parte II, capitolo 2, sezione 1, punti da 1 a 3, del Reg Del UE 2020/689. Per la rinotracheite infettiva bovina e la diarrea virale bovina gli stabilimenti erano indenni o, se non lo erano, i donatori non erano vaccinati. I donatori erano identificati conformemente alle prescrizioni di cui al Reg Del UE 2019/2035. Come citato nel capitolo 2 dell'allegato II del Reg Del UE 2020/686, le bovine donatrici prima della raccolta erano sottoposte a esame clinico da parte del veterinario che ne certificava l'esenzione da sintomi o segni di malattie di categoria D per gli animali della specie bovina. Inoltre, anche il seme utilizzato per fecondare la bovina donatrice doveva esser stato raccolto, trasformato e immagazzinato conformemente alle prescrizioni dell'allegato II, parte 1, capitolo I, e dell'allegato III, parte 1.

Ciascuna potenziale donatrice veniva visitata circa 10 giorni dopo un calore manifesto. Si procedeva con una visita clinica generale dello stato di salute e benessere dell'animale, venivano valutati BCS, produzione di latte, che avesse avuto almeno 2-3 calori regolari dopo a 80-90 giorni dal parto, veniva fatta un'anamnesi delle patologie post-parto. L'esame dell'apparato genitale veniva fatto in maniera scrupoloso sia tramite palpazione sia ecograficamente, con ecografo portatile con sonda endocavitaria lineare da 7 Mhz (Iskan 2, Draminski, Poland), si escludevano eventuali alterazioni del tratto genitale, in particolare eventuali endometriti, mucometra o piometra. Veniva valutata la conformazione delle corna uterine, per la scelta successiva del catetere da *flushing*, in termini di lunghezza e diametro. A carico delle ovaie si valutava l'eventuale presenza di un corpo luteo, venivano contati i follicoli antrali di 2-3 mm per stimare la risposta super ovulatoria. Se fossero stati presenti 1 o 2 follicoli dominanti, questi sarebbero stati aspirati. Dopo 2 giorni, si iniziava il protocollo di superovulazione dal giorno 12 al giorno 16, somministrando 9 dosi decrescenti di FSH (Pluset, Calier), per raggiungere una dose totale di 500 UI. Il giorno 15 si effettuava una doppia somministrazione di cloprostenolo (Estrumate, MSD Animal Health) distanziata di 12h in concomitanza delle punture di FSH del 4° giorno, per indurre un calore la mattina del giorno 17. Dodici ore dopo l'estro, si effettuava la fecondazione artificiale; in totale, si effettuavano 3 fecondazioni con

seme congelato di tipo convenzionale, di cui la prima 12h dopo la comparsa del calore e a seguire la seconda dopo 6-8h e la terza dopo altre 6-8h. La raccolta degli embrioni avveniva dopo 7,5 giorni dalla prima fecondazione.

Effettuata la visita clinica si procedeva a preparare la bovina per il *flushing*. Parallelamente venivano preparate le riceventi, sincronizzandole con una sola somministrazione di closprostenolo alla cieca il giorno 14 del protocollo (un giorno prima della donatrice), per cercare di avere le manze in calore lo stesso giorno della donatrice (giorno 17). Le riceventi che non mostravano il calore venivano escluse. Eventuali altre riceventi in calore spontaneo giorno 17 venivano aggiunte al gruppo. Il giorno del *flushing* (giorno 24), le riceventi venivano visitate, si valutavano le dimensioni e la tonicità dell'utero, la presenza di eventuali fluidi patologici nel lume, le dimensioni della cervice, la presenza del corpo luteo e la sua qualità (dimensione, vascolarizzazione). Le manze senza corpo luteo venivano scartate. Su una scheda e con un marcatore per animali, veniva annotato quale fosse l'ovaio con il corpo luteo, al fine di facilitare le successive operazioni di trapianto.

GIORNO	DONATRICE	RICEVENTI
0	Calore rilevato	
10	Verificare presenza CL + conta follicoli antrali + aspirazione follicoli dominanti > 8 mm	
12	ore 7 -FSH 3,5 ml IM	
	ore 19 -FSH 3 ml IM	
13	ore 7 - FSH 2,5 ml IM	
	ore 19 - FSH 2,5 ml IM	
14	ore 7 - FSH 2 ml IM	
	ore 19 - FSH 2 ml IM	PgF 2 $\alpha$ 2 ml IM
15	FSH ore 7 - 1,5 ml IM+	
	PgF2 $\alpha$ 2 ml IM	
	FSH ore 19- 1,5 ml IM  + PgF2 $\alpha$ 2 ml IM	

16	ore 7 – FSH 1,5 ml IM	
17	Calore previsto mattina	Calore
	12h dopo 1° FA	
18	8h dopo 2° FA	
	8h dopo 3° FA	
23	Valutazione numero CL	
24	Pomeriggio <i>flushing</i>	Controllo e valutazione CL; trapianto

Tabella 11. Protocollo della MOET in donatrici e riceventi.

Per il *flushing*, la donatrice veniva posta in un travaglio o catturata in una posta, in un ambiente abbastanza pulito, riparato, tranquillo e privo di stress, al fine di facilitare la manipolazione della stessa. La lettiera veniva mantenuta pulita ed una pedana era in genere posizionata dietro la bovina per mantenere l'operatore sollevato da terra, al fine di agevolare le operazioni di raccolta embrionale. L'operatore, quindi, procedeva ad una esplorazione della bovina per valutare manualmente la presenza di corpi lutei. A questo punto si procedeva con un'anestesia epidurale bassa; dopo aver effettuato una tricotomia si effettuava con disinfezione della zona dove sarebbe stato inserito l'ago con alcool e soluzione iodata al 10%; disinfettata la zona si inseriva un ago spinale da 18 G x 75 mm a 45° nello spazio sacro-coccigeo (C1-C2). Lo spazio intervertebrale veniva individuato effettuando dei movimenti dorsoventrali della coda e palpando contestualmente l'area di depressione tra le vertebre sacrali e coccigee (dove la coda sollevata sembra che si spezzi). Per essere certi che l'ago fosse stato inserito nello spazio epidurale (oltre alla minima resistenza all'inoculazione), una goccia di anestetico era posizionata sul cono dell'ago e se questa fosse stata aspirata dalla pressione negativa presente nel canale, si avrebbe avuta la certezza del corretto inserimento. Accertati di essere nello spazio epidurale, 7,5 ml/capo di procaina/adrenalina (Aticain, Ati) venivano inoculati per l'anestesia epidurale. La procedura effettuata in maniera corretta causava la paralisi della coda dopo 1,5 minuti circa. Lo scopo dell'anestesia epidurale era quello di evitare oltre al dolore durante la manipolazione, oltre a ridurre le contrazioni uterine, la minzione e il defecamento. Effettuata l'anestesia, l'operatore procedeva all'esplorazione rettale, posizionando

l'utero nel migliore dei modi per il lavaggio; da questa fase in poi per evitare l'ingresso di aria il braccio non veniva tolto dal retto. Quindi, si procedeva con lo svotamento dell'ampolla rettale, e una pulizia del perineo e della vulva. La pulizia veniva fatta con acqua tiepida, avendo cura di dare un passaggio finale con iodio al 7,5% (LH iodio 7.5, Lombarda H S.r.l). Effettuata la detersione si poteva procedere all'inserimento del catetere sterile da *flushing*. Il catetere era scelto in base alle dimensioni dell'utero della bovina, venivano utilizzati dei cateteri da *flushing* a due vie con palloncino in silicone modello (Silicone ET catheter CH 16-18, Foley, 2-way, balloon 5-30 ml, minitube, USA) o un catetere in caucciù a due vie (catetere a 2 vie Woerlein CH18, IMV technologies, France), dotati di mandrino. Il catetere veniva poi rivestito con una guaina sanitaria trasparente morbida per IA a cui veniva aggiunto del liquido di lavaggio per favorire lo scivolamento in utero. Si dilatavano le labbra vulvari e si inseriva il catetere. La camicia sanitaria veniva perforata all'ingresso della cervice e, una volta inserito il catetere in utero, si estraeva del tutto. Se la cervice fosse stata particolarmente difficile da attraversare, si sarebbe proceduto a dilatarla con un dilatatore cervicale sterile in acciaio. Inserito il catetere si portava a circa metà del corno. Il mandrino veniva estratto gradualmente con movimenti rotatori, cercando di far fare al catetere qualche centimetro per seguire l'andamento del corno uterino. Il mandrino, una volta estratto, veniva posizionato in un guanto da esplorazione pulito con qualche ml di tampone. Un assistente innestava alla valvola di gonfiaggio del palloncino una siringa vuota da 20 ml (con stantuffo tirato indietro fino a 15 ml) insufflando gradualmente 5 ml di aria per volta, contemporaneamente, l'operatore monitorava il grado di insufflazione per via transrettale. L'obiettivo era quello di ottenere una dilatazione tale da garantire la perfetta adesione del palloncino con le pareti del corno uterino; pertanto, tirando indietro il catetere si verificava che questo era ben aderente e che non tendeva a retrocedere; nel caso in cui questo indietreggiava si procedeva con l'insufflazione di 1-2 ml di aria fino all'ottenimento di una perfetta adesione. La via del palloncino, se non provvista di valvola (catetere in caucciù), veniva chiusa con una pinza atraumatica (in genere protetta da due tubicini di gomma per non danneggiare il catetere). Attraverso la via principale (quella del mandrino) si collegava un raccordo per siringa e un aiuto sotto indicazioni dell'operatore mandava con una siringa da 50 ml riempita con 30/40 ml di tampone preriscaldato a 37°C

(Euroflush, IMV Technologies, France) effettuava il primo lavaggio, seguito dal primo recupero. L'instillazione era delicata mentre il recupero era energico, al fine di liberare gli embrioni intrappolati nel muco. Generalmente, il primo lavaggio non consentiva di recuperare molto liquido, in quanto questo si distribuiva nel corno; tuttavia, in un buon *flushing*, per ogni lavaggio, la quantità di liquido instillata doveva essere recuperata. La fase di instillazione e scarico del fluido di lavaggio veniva attentamente monitorata dall'operatore, in modo tale da garantire un'espansione costante dell'intero corno, durante il riempimento; non appena il corno era sufficientemente teso e tonico alla palpazione, si procedeva con il recupero del liquido di lavaggio. Il recupero era facilitato dal massaggio del corno dall'apice alla base, prendendo come punto di riferimento la posizione del palloncino insufflato. Il ripristino di una consistenza flaccida del corno indicava che il corno era sufficientemente svuotato. Si effettuavano circa 8-10 lavaggi (max 500 ml di tampone per corno) avendo cura, quando si sostituiva la siringa, di sigillare a monte il catetere con una pinza atraumatica. Un aiuto operatore riempiva col tampone 3-4 siringhe che dopo aver recuperato, svuotava in un filtro conico per embrioni, poggiando l'apice della siringa sulla parete del filtro per non creare schiuma. Il filtro, preparato in precedenza con circa 1 cm di tampone di raccolta, non doveva mai andare a secco mentre, quando il volume era elevato, veniva svuotato attraverso un'apposita valvola posta sotto al filtro. Durante il *flushing* si si procedeva a lavare le corna uterine singolarmente. Lavato il primo corno, si estraeva il catetere, per l'estrazione, si sgonfiava il palloncino, si collegava la via principale con una siringa da 50 ml e si estraeva il catetere aspirando con la siringa il liquido residuo (sporco di muco), che veniva poi raccolto e osservato separatamente dal contenuto del filtro. Il catetere, se imbrattato di muco, veniva lavato con tampone e rimontato con mandrino e camicia sanitaria, per essere inserito nell'altro corno. terminate le operazioni, la donatrice veniva lasciata nel travaglio, per essere sottoposta ad un eventuale nuovo *flushing* in caso di mancato recupero di embrioni; viceversa veniva trattata con cloprostenolo più volte. Il filtro con il liquido di raccolta, proveniente dal lavaggio di entrambi i corni, veniva poi trasportato in laboratorio per la ricerca e la classificazione degli embrioni. Il laboratorio (fisso o mobile) veniva allestito in un ambiente adiacente al luogo del *flushing* e al suo interno era mantenuta una temperatura di 20-22°C, verificata con un

termometro ambientale. Ciò, soprattutto nei mesi freddi, richiedeva l'utilizzo di un sistema di riscaldamento. Il laboratorio era fornito di uno stereomicroscopio (Optika SZM2, optika microscopes, Italy), una piastra riscaldante a 37°C (Minitube, Germany) su cui venivano poste piastre, capsule, liquidi di lavaggio, puntali e di una camera di congelamento (CL 8800, CryoLogic, Australia). Il filtro conico veniva aperto e le pareti lavate con PBS; quindi, il liquido di lavaggio veniva versato su una piastra di ricerca grigliata quadrata. Dopo l'attesa, necessaria alla sedimentazione degli embrioni, si procedeva con l'osservazione diretta dell'intera piastra, soffermandosi su ciascun campo della stessa. Al fine di facilitare la ricerca, frustoli di muco e bolle d'aria erano prima spostati e poi eliminati con l'ausilio di una siringa sterile. Le piastre si osservavano allo stereomicroscopio; l'ingrandimento ottimale era quello che consentiva di inquadrare un quadrato della griglia sotto il campo. Lo stereomicroscopio era stato adattato all'uso con l'utilizzo di luce fredda a LED ed un sistema di riflessione della luce, realizzato con uno specchietto inclinato a 45°. Ciò consentiva del giusto contrasto per vedere gli embrioni scuri e leggermente tridimensionali. Gli embrioni venivano raccolti con una pipetta automatica (10-20 microlitri) e trasferiti in capsule preriscaldate contenenti il medium di mantenimento, holding (IMV Technologies, France). Gli embrioni venivano lavati 10 volte e trattati con tripsina, ma non venivano tenuti più di 30-45' in holding per evitare la disidratazione. La classificazione veniva effettuata impostando lo stereomicroscopio al massimo ingrandimento e consisteva nell'assegnazione di un punteggio allo stadio di sviluppo (S) e al grado di qualità (G) per esempio sviluppo 5, qualità 1 (5.1), secondo le linee guida IETS. Gli embrioni qualità di grado 4 venivano scartati e processati per la ricerca di agenti patogeni; invece, gli embrioni di ottima qualità (6.1 o 5.1) di preferenza erano avviati al processo di congelamento e stoccaggio in azoto liquido. I restanti venivano preferibilmente trasferiti a fresco. Gli embrioni da trapiantare a fresco venivano prontamente confezionati in paillettes trasparenti, per convenzione internazionale. Con apposito micropipettatore (Micro classic, IMV Technologies, France) si creava una prima colonna di *holding*, poi una bolla d'aria, una seconda colonna di *holding* contenente l'embrione, una bolla d'aria ed infine una terza colonna contenente *holding*. Gli embrioni migliori venivano invece processati per il congelamento. Per prima cosa si avviava il cricongelatore, nel *cryobath* veniva

versato dell'azoto liquido e inserita la camera di congelamento, si impostava un programma per il congelamento in glicole etilenico e si faceva partire la camera. Avviato il programma la temperatura saliva per poi stabilizzarsi a  $-7^{\circ}\text{C}$  e il programma veniva messo in pausa. A questo punto si trasferivano gli embrioni dall'*holding* al glicole etilenico, facendo attenzione a trasportare una quantità minima di *holding* (2-3  $\mu\text{l}$ ). A temperatura ambiente (TA) gli embrioni non dovevano superare un tempo di esposizione al glicole di 4-6 min. Se  $\text{TA} < 20^{\circ}\text{C}$ , il tempo di esposizione poteva essere esteso a 5-10 min. Questi passaggi venivano effettuati sotto il controllo di un *timer*. Considerando i tempi così stretti, il confezionamento degli embrioni cominciava subito dopo e non venivano processati più di 5-6 embrioni per volta, lasciando eventuali altri in *holding*. Il confezionamento avveniva, per convenzione internazionale, in paillettes gialle che riportavano la sigla DT da 0,25 ml, mediante aspirazione di colonne di *holding*, aria, glicole, aria, glicole con l'embrione, aria, glicole, *holding*. Ogni paillette veniva chiusa con il *jonc* precompilato e posta in un portapenne al contrario con il *jonc* verso il basso (in modo da far salire l'embrione nella colonna centrale). Nel caso in cui gli embrioni fossero stati più di 5, si procedeva al trasferimento degli embrioni, così confezionati e posti al contrario, a temperatura di refrigerazione ( $4^{\circ}\text{C}$ ) passando a confezionare un secondo o terzo gruppo. Tutti i gruppi venivano raccolti in un *dewar*, avendo cura di asciugare l'eventuale condensa creata sulle pareti delle paillettes messe in frigo. Se il numero di *paillettes* lo consentiva, prima di caricare la camera del criocongelatore, allo stereomicroscopio si verificava la posizione degli embrioni nella colonna centrale e, se necessario, si spostava l'embrione dai menischi, dando dei colpetti dal lato opposto. Se l'embrione fosse rimasto troppo alto, il *seeding* si sarebbe potuto fare in basso. In caso di numerose *paillettes*, una volta messe al contrario, si presupponeva che, dopo averle caricate nella camera in posizione normale (*jonc* in alto), l'embrione cadesse dalla parte superiore alla parte centrale o bassa della colonna centrale, senza tuttavia raggiungere il menisco della stessa. Questi accorgimenti erano necessari per evitare il contatto dell'embrione con i menischi (aria) e per effettuare il *seeding* nella posizione più lontana dall'embrione. Le *paillettes* venivano caricate in camera con i *jonc* in alto, e, dopo circa 2 minuti, si procedeva con il *seeding*, ovvero con uno stiletto in acciaio, immerso in precedenza in azoto liquido, si toccava la *paillette* e da lì partiva il

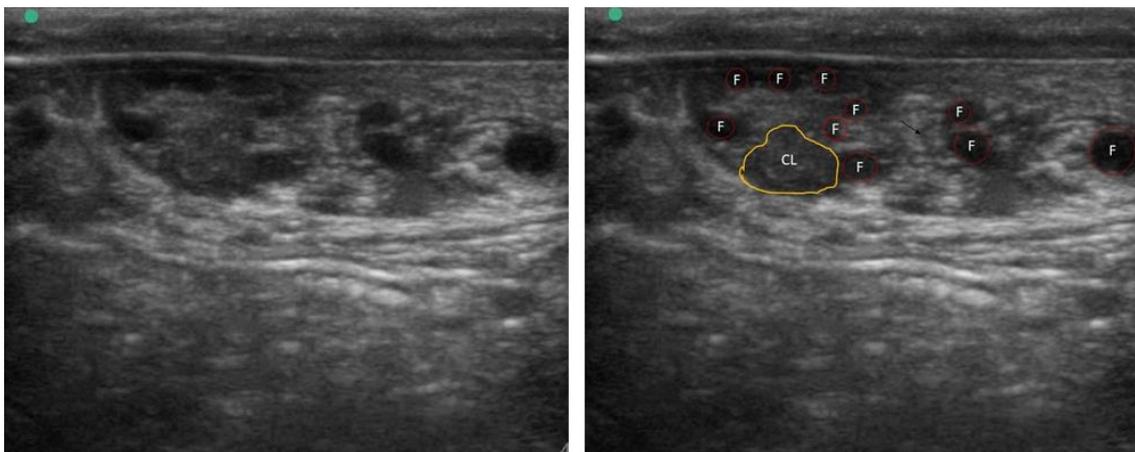
congelamento. La sede del *seeding* era la colonna dell'*holding* più alta (sotto il *jonc*) o, eventualmente, quella più lontana rispetto alla posizione dell'embrione. Sollevando le *paillettes*, una per volta, dal *jonc* e posizionando una luce dietro, si toccava la colonna dell'*holding* per circa 3 secondi, con il mandrino in acciaio stazionato qualche secondo in azoto liquido, fino a visualizzare una zona di cristallizzazione a becco di clarino della lunghezza di circa 5 mm. Completato il *seeding*, si attendevano 3-5 minuti e si risollevarono, una alla volta, le *paillettes* per verificare che il *seeding* avesse avviato la cristallizzazione; in caso contrario, si ripeteva il *seeding*. Gli embrioni stavano così alla temperatura a  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 5 min, mantenendo il programma di congelamento in pausa (tasto *Hold*). Solo dopo aver completato l'operazione, si avviava il programma di congelamento. Il programma di congelamento aveva una curva di discesa della temperatura di  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  fino al raggiungimento di una temperatura pari a  $-35^{\circ}\text{C}$ . In base alla temperatura ambiente, era spesso necessario aggiungere dell'azoto liquido nella camera, avendo cura di non bagnare internamente gli alloggi delle *paillettes*. Dopo aver raggiunto la temperatura finale, gli embrioni si equilibravano a  $-35^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti; quindi, si estraevano le *paillettes* e si immergevano in un ampio *dewar* o un contenitore di polistirolo con azoto liquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Dopo stabilizzazione della temperatura, si inserivano negli appositi contenitori (cani o *globet*) del bidone criogenico.

La tecnica di scongelamento prevedeva invece: estrazione della *paillette*, asciugatura, permanenza per 5 secondi in aria dopo 30 secondi in acqua a  $30^{\circ}\text{C}$ , e il trasferimento doveva avvenire entro 3 minuti. La *paillette*, sia confezionata a fresco che congelata e scongelata, veniva caricata su una *pistolette* da embrioni (più lunga e più sottile rispetto a quelle da IA). Veniva impiegata una guaina da embrioni (IMV Technologies, France) e il tutto rivestito con una camicia sanitaria. Gli embrioni venivano trasferiti in manze Modicane, preventivamente selezionate in base alla qualità del corpo luteo. La tecnica del trapianto era sovrapponibile a quella della FA, ma l'embrione veniva deposto distalmente sul corno omolaterale al corpo luteo. Anche per il trasferimento, come per il *flushing* veniva fatta un'anestesia epidurale, che agevolava le manipolazioni sulle riceventi. Un dilatacervice in acciaio era

impiegato nelle manze con cervice più stretta. L'igiene era massimizzata con una buona pulizia del perineo e, come detto, dall'utilizzo della camicia sanitaria.

## Risultati e Discussioni

Nell'ottica della conservazione del germoplasma di animali appartenenti a razze autoctone a limitata diffusione, 10 bovine di razza Modicana sono state scelte come candidate per un programma di MOET. Le bovine selezionate per quest'esperienza sono state scelte in base ai loro parametri produttivi (produzione latte, qualità del latte). Le bovine nella fase di selezione venivano visitate, ed attraverso un esame ecografico (fig. 59), venivano contati i follicoli antrali di 2-3 mm all'emergenza della seconda ondata follicolare, che erano in media  $15 \pm 5$ .



*Figura 59. Conta ecografica dei follicoli antrali in bovina Modicana donatrice.*

Il protocollo di superovulazione applicato prevedeva la somministrazione di 500 U.I di FSH, seguendo le indicazioni del precedente contributo di La Spisa et al. (2018). Nonostante il protocollo a basso dosaggio di FSH (500UI) si otteneva una buona stimolazione delle ovaie con risultati sovrapponibili alla letteratura (Mikkola e Taponen 2017). Da un punto di vista pratico la dose dimezzata ha un grande vantaggio

economico poiché consente di effettuare due *flushing*, anche in tempi diversi con un'unica confezione, considerato anche l'importante costo del farmaco (220 euro).

Il giorno prima del *flushing*, l'esame ecografico veniva ripetuto per valutare il numero di corpi lutei, che risultava  $12 \pm 3$ .

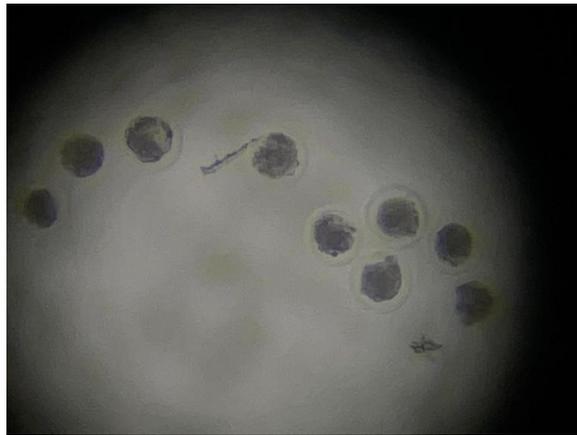


Figura 60. Embrioni bovini di razza Modicana.

Dai *flushing* sono stati raccolti in totale 60 embrioni, di cui 45 trasferibili (76%). Di questi, n. 15 sono stati trasferiti come freschi e n. 30 sono stati congelati in criobanca. Il numero di embrioni recuperati e trasferibili per vacca era di  $10 \pm 2$ . Le blastocisti di primo grado e le morule erano gli embrioni più rappresentati (30 e 32%). Tra gli embrioni non trasferibili (24%) molti erano gli ovociti non fecondati (70%). I tassi di gravidanza (42 giorni) delle riceventi erano del 50% per quelle trapiantate con embrioni freschi e del 48% per quelle trapiantate con embrioni congelati.

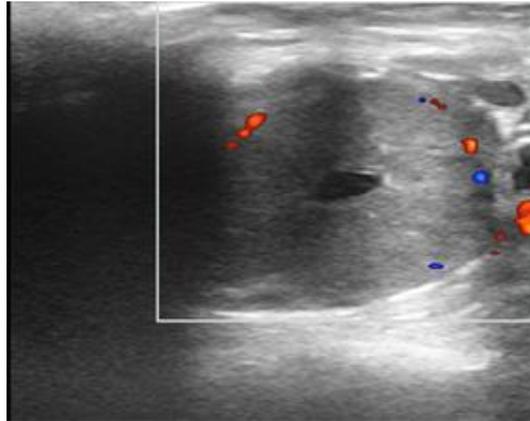


Figura 60. Valutazione ecografica del corpo luteo delle riceventi.

La bovina Modicana, così come la Cinisara, dovrebbero essere oggetto di studi più approfonditi, soprattutto in termini di dinamica follicolare. Riteniamo fondamentale valutare lo stato di *management* delle bovine prima di avviarle ad un programma di MOET. Non a caso i pochi tentativi di MOET fatti nella bovina Cinisara non hanno determinato alcun recupero di embrioni. Lo scarso *management*, l'alimentazione non equilibrata, l'assenza del seme congelato e la difficoltà di realizzare programmi di sincronizzazione e superovulazione, sono le cause probabili di tale insuccesso. Queste esperienze sono, tuttavia, molto importanti per la conservazione delle razze autoctone siciliane e per l'applicazione delle biotecnologie riproduttive avanzate.

## I suini

### Il suino Nero Siciliano

Il suino Nero Siciliano, detto anche Nero dei Nebrodi, Nero delle Madonie o Nero Ibleo è una razza suina autoctona italiana originaria della Sicilia (DAD-IS, 2023). Le sue origini sono molto antiche, tracce storiche, come resti fossili e testi scritti, ne rivelano la presenza fin dai periodi greco e cartaginese (VII-VI secolo a.C.). Già Omero nei suoi racconti menzionava l'esistenza di un maiale nero altamente rustico, quasi selvatico, e completamente libero nei boschi (Chicoli, 1870). In Sicilia durante tutto il Medioevo era diffuso l'allevamento brado, che subì una contrazione solamente durante la dominazione araba per le note motivazioni di ordine religioso (Chicoli, 1870). Già ai primi del Novecento si era diffuso l'incrocio con altre razze nordiche migliorate, selezionate per vivere in ambienti chiusi e crescere in fretta, che avevano provocato una forte riduzione del suino nero e una diffusione di soggetti con pezzature bianche o completamente bianchi. Un altro fattore che ha determinato la riduzione del suino Nero Siciliano è stato la graduale scomparsa dei boschi che anticamente coprivano buona parte dei rilievi siciliani, cosicché il suo allevamento si è col tempo ritirato e concentrato nelle aree più interne dove persistevano ancora i boschi di quercia, di cerro e faggio. Il suino Nero Siciliano è caratterizzato da un mantello nero uniforme con pelle nero ardesia molto spessa che presenta grossi peli neri, oltre a dei peli neri corti sul collo che creano una criniera. Alcuni soggetti sono chiamati *Faccioli* per via di una lista bianca sulla faccia e le estremità degli arti bianche. La testa mostra uno sviluppo notevole, un profilo lungo e diritto, ed un muso stretto ed inclinato, mentre il profilo nasale della fronte mostra una tendenza ad essere dritto. Le orecchie sono piccole e rivolte obliquamente verso l'alto, con le punte portate orizzontalmente in avanti. Gli arti sono di media lunghezza e robusti e presentano articolazioni secche e unghie forti. L'altezza al garrese è di circa 62-67 cm (ANAS, 2023). Il suino Nero è un ottimo pascolatore, che ben si adatta a condizioni climatiche difficili, quali quelle dei territori montuosi della Sicilia settentrionale e orientale, inoltre è molto apprezzato per la sua resistenza, prestazioni riproduttive e la qualità delle carni (Matassino e Grasso, 1996; Russo et al., 2004; D'Alessandro et al., 2019). Esistono 3 varianti

territoriali o ecotipi (Nebrodi orientali, occidentali e Madonie) che necessitano di ulteriori approfondimenti. Il suino Nero Siciliano è attualmente una razza ufficialmente riconosciuta e dotata di Registro anagrafico, gestito dall'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS) e appartiene alle 6 razze di maiale nero italiano (Apulo-calabrese, Cinta Senese, Nero Siciliano, Casertano, Moro Romagnolo e Sardo), ottenendo il riconoscimento ufficiale nel 2001 (ANAS, 2023). Nel 2003 è stato costituito il Consorzio di Tutela Suino Nero dei Nebrodi, sostenuto dall'Associazione Regionale Allevatori della Sicilia in provincia di Messina. Nel 2005 è stata rilasciata ufficialmente al Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali la richiesta ufficiale di riconoscere alla carne fresca nera siciliana la Denominazione di Origine Protetta (DOP). Nel 2011 è stata avviata una richiesta ufficiale di DOP anche per il prosciutto crudo Nero Siciliano (Zumbo et al., 2020). Oggi la razza ha una consistenza di circa 1300 capi riproduttori. È una razza precoce e longeva, caratterizzata da una fertilità elevata. Le prestazioni riproduttive sono in accordo con quelle precedentemente descritte da Matassino e Grasso (1996). L'età media al primo concepimento per le scrofe di questa razza è di 8-9 mesi, che risulta però molto inferiore negli animali allevati allo stato brado, dove il primo accoppiamento avviene in coincidenza del primo calore, che si verifica all'età di circa 6 mesi. Le scrofe partoriscono in media 1,1 figliate all'anno (Zumbo et al., 2003) composte da  $6,2 \pm 1,71-9 \pm 1,98$  suinetti su 180 nati (Leenhouders e Merks, 2003), presentando alla nascita circa 1,4 kg di peso vivo (Gallo e Buttazzoni, 2007; Bonanzinga et al., 2010). La percentuale di suinetti nati morti (circa 0,4% e 4,8%) e il loro tasso di mortalità fino allo svezzamento (circa 1,3% e 8,9%) sono relativamente bassi. Tuttavia, nei sistemi estensivi, l'intervallo tra i parti è esteso a 332 giorni (Leenhouders e Merks, 2003). Generalmente i parti avvengono in zone boschive, dove gli allevatori preparano delle "gabbie parto", dette "zimme", adatte alla nidificazione e al parto. Infatti, la tipologia tipica di allevamento è al pascolo brado o semibrado, è consentito l'allevamento con tipologia *elevage en plein air* per le scrofe con i suinetti (Matassino e Grasso, 1996; Chiofalo, 2007). Gli animali allevati in condizioni estensive hanno un peso di macellazione a 250 giorni di età di 70/88 kg, mentre quelli allevati *en plein air* hanno un peso di macellazione di circa 80 kg a 160 giorni di età (Liotta et al., 2001). Le carni di Suino Nero sono riconosciute come

eccellenze da cui si ricavano prodotti di altissima qualità, sia lavorati ed insaccati che tagli freschi. L'alimentazione ricca di ghiande conferisce alla carne del Suino Nero un'alta concentrazione di acidi grassi essenziali Omega 3 e Omega 6 che hanno una forte azione antiossidante ed antiinfiammatoria per il nostro organismo. È una carne ricca anche di vitamine B e sali minerali e la presenza abbondante di grasso "buono" la rende morbida e gustosa, dal sapore unico, con una forte intensità aromatica e un'attitudine alle lunghe stagionature (Pugliese et al., 2003; 2004; D'Alessandro et al., 2007; Di Rosa et al., 2007b; Porcu et al., 2007). Le proprietà organolettiche intense e molto aromatiche ricordano un sentore di nocciola e rimandano ad eleganti note selvatiche. Dal maiale Nero Siciliano si ottengono prodotti d'eccellenza grazie alla concomitanza unica e non replicabile altrove del microclima in cui i suini sono liberi di crescere e l'esperienza locale nelle tecniche di allevamento e trasformazione. I tagli sono molto vari ed adatti ad un'alimentazione sana e bilanciata.

L'I.S.Z.S. d'intesa con ANAS è l'ente responsabile della conservazione *in situ* di questa razza suina. Attualmente esistono diversi progetti di valorizzazione: SUIS-2, capofila ANAS, PNSR 2020/24 – Sottomisura 10.2; Sicilgermobank, capofila Dipartimento di Scienze veterinarie, Università di Messina, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; ARCAS capofila Istituto zooprofilattico sperimentale per la Sicilia, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b; COFAPS capofila I.S.Z.S, PSR Sicilia 2014-22 – Sottomisura 10.2b.



*Figura 61. Suini neri siciliani al pascolo.*

## **Esp 4. Prelievo e congelamento del materiale seminale**

### **Introduzione**

La crioconservazione per la conservazione a lungo termine del seme di verro è da molti considerato un metodo efficace per mantenere materiale genetico di importante valore economico, preservare la diversità genica, fornire tecniche d'allevamento più efficienti e controllare la trasmissione di patogeni (Guthrie e Welsh, 2005). La crioconservazione del seme suino è stata messa a punto negli anni '60, ma solo nel 1971 sono stati ottenuti i primi risultati, con la nascita dei primi suinetti. I risultati ad oggi ottenuti, in termini di fertilità, con il seme di verro congelato sono piuttosto incoraggianti (Thilmant 1997; Eriksson et al., 2002).

Il seme viene ottenuto mediante prelievo, i verri selezionati per la riproduzione all'età di 7 mesi vengono addestrati per la raccolta del seme, alla monta del manichino; generalmente questo addestramento si completa in circa 2 settimane, il prelievo viene effettuato, con la tecnica della mano guantata, 2 volte alla settimana, a distanza di 4-5 giorni per ottimizzare la qualità e la dose di seme (Colenbrander et al., 1993, Strzezek et al., 1995). Scartando la 1° e la 3° frazione, viene prelevata quella spermatica (100-150ml) che viene filtrata per rimuovere eventuale gel e sottoposta alla valutazione della motilità (che deve essere >60%), della concentrazione (n. totale di spermatozoi) e della morfologia nemaspermatica (max 10% per le anomalie primarie e 20% per quelle secondarie) prima della diluizione per ottimizzare il n di dosi ottenibili per la IA (Flowers, 1997). Con un buon management un verro può fornire fino a 2000 dosi/anno. Oggi i verri possono essere utilizzati per la produzione di 20-40 dosi per la IA tradizionale con  $2.3-3 \times 10^9$  di spermatozoi mobili in 70-100 ml di diluente o 40-60 dosi con  $1.5-2 \times 10^9$  spermatozoi con volumi simili o minori per la IA intrauterina (Knox, 2016). Un'altra metodica per la raccolta del seme è mediante l'utilizzo del sistema Collectis, della IMV, che prevede un sistema automatizzato per il prelievo del seme suino.

Circa il 99% delle IA nella suina sono realizzate con seme fresco (Johnson et al., 2000) e con mestruai diluitori idonei a mantenere il seme a temperatura ambiente, nota 273

l'elevata sensibilità allo shock termico degli spermatozoi suini, la cui attività deve essere bloccata per garantire un periodo adeguato di vitalità. Gli *extender* utilizzati a temperatura ambiente sono l'IVT (1960-1970) (Paquignon, 1984) e poi i diluenti Guelph (Kiev), BTS (*Beltsville Thawing Solution*) che è il più usato in USA (Johnson et al., 2000), Zorlesco, il più complicato nella preparazione ma che sembra garantire una fertilità fino a 12 gg (Gottardi et al., 1980); più di recente sono ampiamente utilizzati i diluitori Zorpva, Reading e Androhep, che mantengono la fertilità per periodi lunghi, oltre 5 gg (Almond et al., 1998). Con l'aggiunta di antiossidanti, tamponi e antibiotici si ottiene una maggiore sopravvivenza del seme (Knox, 2016). Ormoni quali estrogeni o prostaglandine (presenti nel plasma seminale) o ossitocina (liberata dall'utero) se aggiunti al seme, possono influenzare positivamente le contrazioni uterine ed il trasporto del seme (Weiler e Claus, 1991; Kirkwood et al., 2008). Fattori limitanti che possono ridurre la fertilità sono l'età del seme, il numero di spermatozoi o la stagione dell'anno (Peña et al., 1998; Parrilla et al., 2009).

Nella suina il volume della dose di seme, compreso tra 70 e 100 ml (Watson e Behan, 2002) è importante in quanto può influenzare la percentuale di concepimento; grandi volumi sono necessari in questa specie per stimolare la motilità uterina e garantire che un adeguato numero di spermatozoi raggiunga il sito di fertilizzazione. Nella IA intrauterina, con la riduzione del n. delle cellule spermatiche, il volume può essere diminuito a 60 ml (Bennemann et al., 2004), 30ml (Diehl et al., 2006) o persino 20ml (Wolken et al., 2002; Mezalira et al., 2005). Tuttavia, una eccessiva riduzione del volume può interferire con la *performance* riproduttiva; una significativa riduzione delle percentuali di parto e delle dimensioni della nidiata sono registrate nella IA intrauterina quando il volume è ridotto da 50 a 25ml con una concentrazione di  $1.5 \times 10^9$  spz (Behan e Watson, 2004). La concentrazione minima di una dose è di  $1 \times 10^9$  se il seme deve essere utilizzato il giorno del prelievo con un incremento numerico se utilizzato nei gg successivi alla raccolta; la dose commerciale è di  $2.3 \times 10^9$  spz (Maes et al., 2011). Se la concentrazione non può essere determinata accuratamente, per l'uso del seme in azienda, è sufficiente una diluizione di 1:4-1:7 per ottenere dosi di circa  $2-4.5 \times 10^9$  spz/dose (Almond et al., 1998). Le dosi di seme devono essere mantenute al di sopra dei 15°C. Inoltre, nella suina il seme di 2 verri

può essere utilizzato per 2 IA consecutive oppure può essere mescolato all'interno di una dose; pare che questo seme "eterospermico" migliori la fertilità (Almond et al., 1998). La IA eterospermica è utilizzata per produrre suini destinati alla macellazione.

La crioconservazione ancora oggi non dà buoni risultati; c'è una elevata variabilità tra i verri e la fertilità massima (70-80%) ottenuta con la doppia IA è più bassa rispetto al seme liquido (80-90%). Anche le dimensioni della nidata sono inferiori col seme congelato rispetto al seme refrigerato (Alm et al., 2006; Roca et al 2006), con 1-2 suinetti in meno. Le difficoltà nel congelamento del seme suino sono legate all'elevata sensibilità allo *shock* termico e alla mancata o scarsa protezione da parte del tuorlo d'uovo o del latte rispetto ad altre specie. Il glicerolo, che è il migliore crioprotettore, ha comunque effetti tossici più pronunciati rispetto ad altre specie (Wilmot e Polge, 1974). Per tali motivi la concentrazione di una dose di seme congelato è di  $5-6 \times 10^9$  spermatozoi (Paquignon, 1984) e da un eiaculato si possono inseminare soltanto 5 animali, a differenza del bovino per il quale si parla persino di 500-600 dosi. Questo limita l'uso del seme congelato che viene inizialmente impiegato solo per scambi internazionali in allevamenti di selezione. Successivamente il congelamento del seme è stato realizzato in *paillettes* da 0,5 ml, ciascuna con  $500 \times 10^6$  spermatozoi; per la IA venivano utilizzate 8 *paillettes* in 60 ml di diluente per avere allo scongelamento circa  $2 \times 10^9$  spermatozoi mobili (Didion et al 2013). Gli Autori su oltre 2600 IA ottengono il 78,7% di parti con una media di suinetti di  $12,5 \pm 3,9$ . L'effetto protettivo del tuorlo d'uovo sembra essere potenziato con l'aggiunta al diluente di un detergente, OrvusEs Paste (OEP) che disperde i globuli di grasso consentendo una migliore interazione dei fosfolipidi del tuorlo d'uovo con le membrane citoplasmatiche. L'aggiunta di antiossidanti, quali la vitamina E, il glutatione e il superossido dismutasi previene la perossidazione lipidica durante il congelamento e lo scongelamento. Sembra inoltre che l'aggiunta di plasma seminale agli spermatozoi scongelati possa neutralizzare i disordini lipidici che insorgono durante il processo di crioconservazione (Torres et al., 2016). Un recente studio retrospettivo sul seme di suino congelato in *paillettes* da 0,5 ml e valutato dopo 2, 4 e 8 anni riporta una ridotta motilità nemaspermatica dopo 4 anni di congelamento (Li et al 2018).

Un'altra procedura è l'*harvesting* epididimale, una tecnica che prevede la raccolta del materiale seminale dalla coda dell'epididimo post-castrazione, con successiva crioconservazione. Questa è stata utilizzata per la prima volta nel da Holtz e Smidt (1976), per questo studio erano stati castrati suini sessualmente maturi, di età compresa tra i 7 e i 24 mesi e il seme ottenuto era stato utilizzato entro 4-6 ore dalla castrazione per inseminare le scrofe, dando risultati soddisfacenti riguardo il tasso di fecondità. Matás et al., (2010) nel loro studio hanno messo a confronto il seme ottenuto da prelievo con la tecnica della mano guantata ed il seme ottenuto dall'epididimo, entrambi sono stati sottoposti a 3 trattamenti differenti per la crioconservazione, ma in termini generali gli spermatozoi dell'epididimo sembravano essere più "stabili" di quelli eiaculati, in quanto subiscono meno interferenze ai trattamenti, rispetto a quelli eiaculati. Il disturbo lipidico, la generazione di ROS, l'assorbimento di calcio, e la reazione acrosomiale spontanea, erano significativamente inferiori negli spermatozoi dell'epididimo, rispetto a quelli dell'eiaculato. Pertanto, ottenere il materiale seminale post castrazione, potrebbe risultare il metodo più efficace per crioconservare il seme e per effettuare la fecondazione *in vivo* ed *in vitro*.

Un'altra biotecnologia applicata al materiale seminale del suino è rappresentata dalla possibilità anche per questa specie di separare gli spermatozoi X dagli Y. L'uso del seme sessato rappresenta oggi un metodo vantaggioso per la programmazione delle nascite, per ottenere scrofe da rimonta o verri, o scrofette destinate alla produzione di carne e/o salumi, superando così le problematiche della castrazione, prevenendo il cosiddetto "odore di verro" che rendono le carni dei soggetti adulti maschi non edibili. Attualmente il seme sessato viene prodotto utilizzando la citofluorometria a flusso, dopo fluorocromatizzazione degli spermatozoi e loro *sorting* in base alla quantità di DNA posseduto (Balduzzi, 2007). Tale procedura, in questa specie, permette una limitata produzioni di spermatozoi che rende necessaria una tecnica di inseminazione che utilizzi un numero basso, o addirittura molto basso di cellule spermatiche affinché questa tecnologia possa avere un'applicazione, visto che gli spermatozoi ottenuti dal processo di *sorting* vengono notevolmente indeboliti dalla procedura, limitando la loro sopravvivenza e la loro capacità fecondante. I primi suinetti nati dall'utilizzo di

spermatozoi sessati sono stati ottenuti mediante l'inseminazione intra-tubarica laparotomica, utilizzando  $3 \times 10^5$  spermatozoi (Johnson, 1991). La tecnica attualmente utilizzata è l'inseminazione intra-tubarica per via laparoscopica (Vázquez et al., 2006), tuttavia questa tecnica ha scarsa applicazione in campo, dato l'esiguo numero di spermatozoi ottenibili, i costi elevati per la loro produzione e il basso indice di fecondità.

## **Materiali e Metodi**

Il seme del suino Nero Siciliano è stato conservato in deroga ai requisiti sanitari esclusivamente per fini scientifici ai sensi dell'articolo 49 del Reg Del UE 686/2020, che prevede l'utilizzo dei donatori anche in deroga alle prescrizioni in materia di sanità animale di cui al capo 1. Tuttavia, i donatori provenivano da aziende indenni dalla malattia di Aujeszky, e in assenza di sintomi di brucellosi (la *B. suis* non è segnalata in Sicilia) e dalla sindrome riproduttiva e respiratoria porcina; e non erano adibiti alla monta da almeno 30 giorni. In ogni caso, attualmente l'ANAS non consente l'utilizzo del seme congelato di questa razza sulle scrofe, confermando lo scopo solo scientifico della sperimentazione.

Data l'indole diffidente dei verri adulti, la tipologia di allevamento e gli scarsi risultati ottenuti nell'addestramento di verretti al prelievo del seme, il protocollo utilizzato è stato quello del lavaggio epididimale. Gli animali selezionati erano 6 verri Nero Siciliano, che avendo superato più di 2 cicli riproduttivi all'interno della stessa azienda, venivano, su richiesta dell'allevatore, castrati per la successiva macellazione. Intercettando questa richiesta, abbiamo potuto realizzare il nostro studio.

Il giorno della chirurgia, gli animali al mattino venivano lasciati a digiuno. Giunti in azienda veniva preparato il campo operatorio, contemporaneamente gli animali venivano visitati e pesati. Grazie ad un contenimento minimo (gabbia, pannello) si procedeva con la sedazione, utilizzando una miscela di ketamina 5 mg/Kg (Ketavet 100, Intervet Production Srl) e xilaxina 2,5 mg/Kg (Rompum, Elanco Italia Spa)

somministrati per via intramuscolare. Quando l'animale era sedato veniva inserito un catetere venoso a livello della vena auricolare da 20G e indotta l'anestesia generale con tiopentale sodico al dosaggio di 0,14 mg/Kg (Pentothal Sodium, Intervet Production Srl), se necessario, boli di tiopentale venivano somministrati durante la chirurgia per mantenere l'anestesia; durante la chirurgia, per non alterare gli spermatozoi, non era prevista anestesia locale. Sedato l'animale, veniva posto in decubito dorsale, veniva fatta un'abbondante detersione del campo operatorio con acqua e soluzione iodata saponosa, per poi finire con soluzione iodata al 10% e alcol. Preparato il campo operatorio si procedeva con la chirurgia.

La castrazione dei soggetti adulti è stata eseguita mediante tecnica pre-scrotale a testicolo coperto. È stata applicata una pressione a livello del testicolo, che veniva spinto cranialmente e medialmente rispetto allo scroto, successivamente si effettuava un'incisione di circa 10 cm, dopo dissezione dei tessuti connettivi sottocutanei e rimozione della fascia spermatica dal testicolo e dal funicolo spermatico, si esteriorizzava la gonade. Mediante l'utilizzo di due pinze emostatiche posizionate sul funicolo spermatico, si eseguiva una legatura mediante nodo di Miller. Il funicolo spermatico veniva reciso mediante una pinza Sonicision™ curved Jaw, un disseettore ad ultrasuoni senza fili, con il fine di produrre sintesi e dissezione dei vasi. La stessa procedura si eseguiva per la gonade controlaterale, attraverso la stessa incisione chirurgica. Cute e sottocute venivano poi suturate con materiale da sutura assorbibile polyglactin 910, 1 UPS (Vycril, Ethichon).



Figura 62. Castrazione del suino Nero Siciliano per il prelievo degli epididimi.

L'animale finita la chirurgia veniva sottoposto a terapia antibiotica e antinfiammatoria e monitorato fino al risveglio. Dopo la castrazione il testicolo veniva capovolto per far drenare il sangue e il funicolo spermatico veniva legato per non perdere materiale seminale e veniva trasportato in laboratorio immerso in soluzione salina allo 0,9% e alla temperatura di 4°C. In laboratorio, preparato l'*extender*, si procedeva all'isolamento dell'epididimo dal testicolo. Una volta isolati e asciugati dal sangue epididimo e dotto deferente, un catetere venoso da 16G veniva inserito in quest'ultimo. Il *flushing* veniva fatto mandando 1 ml di *extender* e 1 ml di aria nel dotto, successivamente all'inoculazione il materiale seminale veniva recuperato, aspirando dal deferente, e trasferito in una provetta Falcon. In tal modo si otteneva un prelievo senza tracce ematiche e di soli spermatozoi.



Figura 63. Testicolo di suino.

Ciascun campione prelevato è stato analizzato mediante il sistema SCA. Il sistema dalle registrazioni fatte calcolava la concentrazione degli spermatozoi per ml riportando anche il numero totale degli spermatozoi per campione di seme. Dopodiché, passava alla valutazione della motilità totale, calcolando i PR (progressivi), NP (non progressivi), IM (immobili); misurava l'area delle testa, il numero di cellule rotonde, le traiettorie circolari, la VLC (velocità curvilinea), la VSL (velocità lineare), la VAP (velocità media), la LIN (indice di linearità), la STR (indice di rettilinearità), la WOB (indice di oscillazione), la AL (ampiezza del movimento laterale della testa), la BFC (frequenza battito), la MC (*Mucous penetration*) e gli H (iperattivi). Per la valutazione della vitalità e della morfologia un operatore prelevava una goccia (3 $\mu$ l) di seme dal campione, che veniva messa in un vetrino ad orologio alla quale venivano aggiunte una goccia di eosina e due gocce di nigrosina (tecnica di Blom), successivamente veniva miscelato e strisciato su un vetrino portaoggetti, per essere montato e letto in seguito.

Successivamente il seme veniva diluito fino ad ottenere una concentrazione di  $100 \times 10^6$  spermatozoi/ml. Quindi in base al protocollo di congelamento scelto si procedeva con la fase successiva. Per questo studio sono stati scelti due differenti

280

protocolli di congelamento. Per il primo veniva utilizzato un *extender* senza proteine animali, mentre per l'altro uno con l'aggiunta di tuorlo d'uovo.

Protocollo 1 OptixCell 2 (IMV technologies). Effettuato il lavaggio epididimale, valutato e diluito il seme si procedeva con il congelamento. Il congelamento in questo caso era di tipo *one step*. Il seme diluito veniva posto per la fase di equilibratura a 4°C per 3 ore. Dopo la fase di equilibratura il seme era pronto per la fase di congelamento, che era la stessa per entrambi i protocolli.

Protocollo 2 CryoGuard (Minitube, USA). Questa è una metodica a 3 *step*. Modificata da noi per l'*harvesting*. Il primo *step* era la diluizione dell'eiaculato 1:1,5 in volume con Androstar Plus (Minitube, USA) a 4°C, poiché l'eiaculato e l'*extender* devono avere la stessa temperatura durante la diluizione. Dopo una fase di equilibratura di 90 min, il seme era centrifugato a 4°C, 800 g per 15-20 minuti, in provette Falcon coniche da centrifuga da 50 ml. Dopo la centrifuga il surnatante veniva aspirato e il seme risospeso con l'*extender* di raffreddamento CryoGuard Parte A (Minitube, USA) a 4°C. Il CryoGuard Parte A veniva aggiunto al *pellet* di seme risospeso, fino a raggiungere il 50% del volume finale. Dopo il materiale seminale veniva mantenuto per 1,5 h a +4°C, quindi veniva aggiunto l'*extender* CryoGuard Parte B (Minitube, USA). Il congelamento avveniva entro i 45 min dall'ultima diluizione.

In entrambi i protocolli, il seme veniva caricato in *paillettes* da 0,5 ml precedentemente raffreddate, queste operazioni venivano fatte utilizzando un CoolingCastle. Il seme veniva congelato in vapori d'azoto per 10 min, per poi essere immerso in azoto a -196°C, utilizzando una *freezing unit* (Minitube, USA).

Dopo 24h si procedeva alla prova di scongelamento, per ogni partita venivano scongelate 2 *paillettes* medie in acqua a 37° C per 14', quindi il materiale seminale in esse contenuto era miscelato in un'unica provetta. Come per la fase pre-congelamento veniva fatta una valutazione della motilità. Per la valutazione della motilità 3 aliquote da 3µl venivano poste su 3 diverse camere di Leja preriscaldate a 37°C, da ciascuna delle quali vengono videoregistrati 6 campi microscopici, tramite microscopio a

contrasto di fase dotato di obiettivo 10x a contrasto di fase negativo e di tavolino  
termostato tarato a 37° C e analizzate dal software SCA.

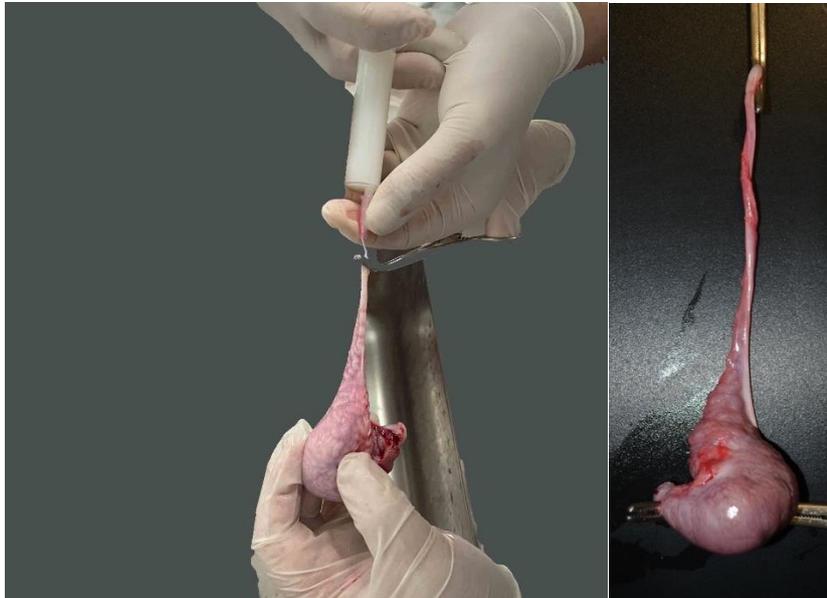


Figura 64. A sinistra fase di lavaggio epididimale. A destra coda dell'epididimo separata dal testicolo.

## Risultati e Discussioni

Per la conservazione del seme di suino Nero Siciliano è stata utilizzata una tecnica di lavaggio epididimale post-castrazione. La tecnica è utilizzabile anche su animali morti o al macello e prevede un lasso di tempo tra il prelievo della gonade e la lavorazione degli epididimi, che può superare anche le 24h (Martinez-Pastor et al., 2005). Il prelievo può essere fatto con tecniche combinate di spremitura, lavaggio e aspirazione e vengono ricavate in genere grandi quantità di sperma. La tecnica da noi proposta (inoculazione del mestruo e immediata aspirazione dal deferente) ha prodotto un materiale spermatico poco inquinato da sangue, più corrispondente alla frazione eiaculabile *in vitam*, ed ha prodotto meno materiale spermatico, ma molto concentrato e quindi sufficiente a ricavarne delle dosi congelabili.

Dei 6 verri selezionati, 2 sono stati esclusi in quanto azoospermici. In altri 2, sono sorti alcuni problemi tecnici, legati principalmente ad un errore di preparazione del mestruo. I dati completi sono pertanto disponibili solo per n. 2 verri.

Gli spermatozoi epididimali, di verro ma non solo, hanno almeno 3 caratteristiche: grande concentrazione, immobilità e immaturità per la presenza di numerose gocce citoplasmatiche distali.

La motilità è dovuta alla condizione di anaerobiosi presente nella coda dell'epididimo e alla refrigerazione durante il trasporto al laboratorio. La riattivazione si otteneva dopo incubazione di una piccola aliquota a 38°C dopo 30 minuti. La maggior parte dei parametri relativi alla motilità miglioravano dopo tale periodo (Fig. 65).

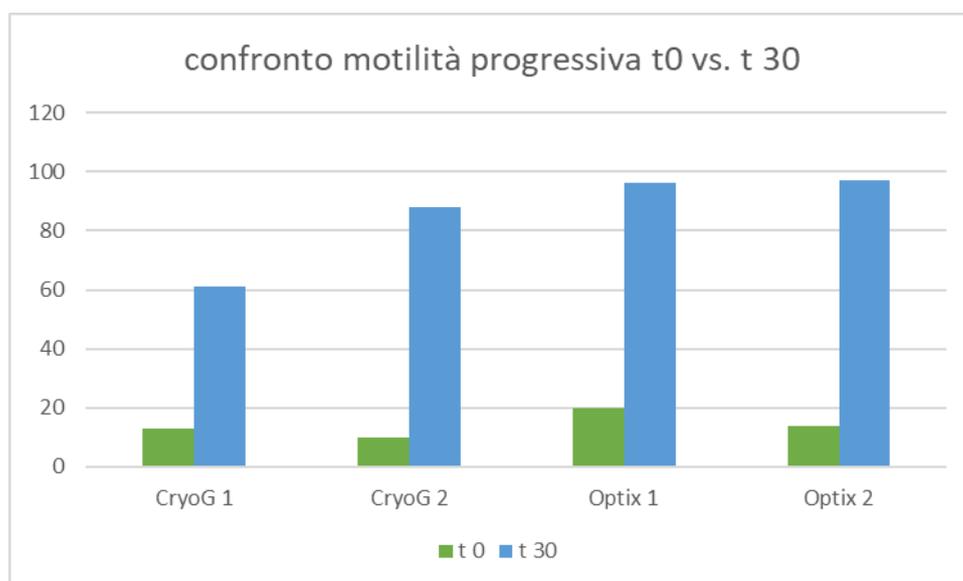


Figura 65. Grafico di confronto motilità progressiva seme suino Nero Siciliano a T0 (verde) e T30 (blu), con entrambi i protocolli utilizzati.

I parametri di motilità registrati a tempo 0 erano bassi; infatti, dopo il tempo d'incubazione si avevano dei valori di motilità ottimale. Infatti, in tutti i soggetti la motilità totale tra t0 e t30 quasi raddoppiava, mentre la motilità progressiva a t30 era da 4 a 8 volte superiore. Di seguito in tabella 12 sono riportati i principali risultati di motilità mettendo a confronto i 2 soggetti ed i 2 protocolli.

	T0		T30		POST CONG	
	MOT TOT	PROG	MOT TOT	PROG	MOT TOT	PROG
CryoG V1	46	13	92	61	20	5
CryoG V2	38	10	99	88	52	17
Optix V1	55	20	99	96	65	21
Optix V2	58	14	99	97	93	66

Tabella 12. Dati valutazione motilità totale e progressiva nei verri Neri Siciliani a T0; T30; Post congelamento

Durante questa incubazione o durante il lungo periodo di equilibratura, la maggior parte degli spermatozoi epididimali perdeva la goccia citoplasmatica, che potrebbe interferire con la successiva criocongelazione.

I dati relativi ai parametri mediante valutazione SCA sono riportati di seguito (Fig. 66-77). Dalla valutazione post congelamento, invece, emergeva la maggior sensibilità alla crioconservazione di un soggetto (verro 1) rispetto all'altro. Inoltre, apparentemente, il protocollo più efficace è risultato il Protocollo 1 (OptixCell). Tuttavia, da una prima analisi statistica, risultava che entrambi i protocolli avevano una media della motilità progressiva del 21,45 % e una deviazione standard del 20,76 %. Tali risultati, confrontati con i dati già presenti in letteratura, confermano che i protocolli utilizzati in questo studio, sono entrambi validi.

Il materiale genetico crioconservato è oggi stoccato in criobanca e, sebbene non utilizzabile per programmi di IA ad oggi, in caso di un accidentale rischio di estinzione della razza potrà essere utilizzato per la fecondazione *in vivo* o *in vitro*. Questa preziosa esperienza è il primo tentativo di criocongelamento di seme di Suino Nero siciliano con una tecnica di lavaggio epididimale.

Referenza: 1024  
  
 Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
 Centro: OVUD

Codice: SCAtemp14  
  
 Animale: verro 1 di franco

Nuovo (24/04/2023 15:37)

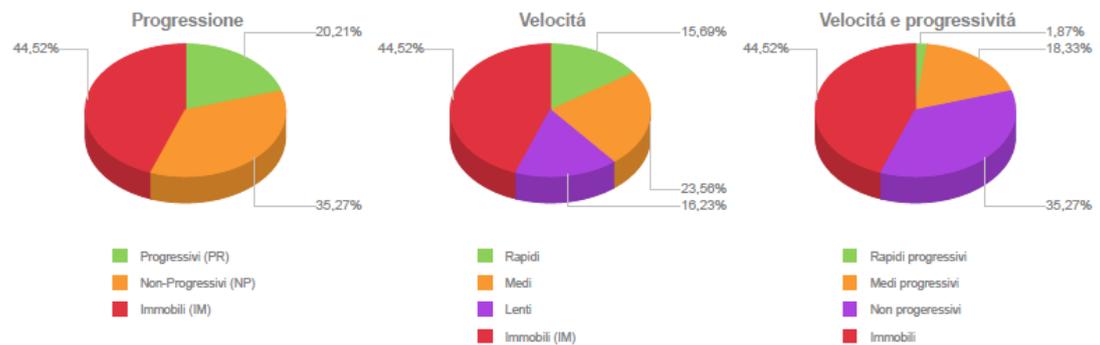
Concentrazione		
300,67 Milioni / ML	4.510,05 M/Campione	Volume (mL): 15,00 Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	1488	20,21	60,76	911,44
Non-Progressivi (NP)	2.597	35,27	106,05	1.590,74
Immobili (IM)	3.278	44,52	133,86	2.007,87

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	4085	55,48	166,81	2.502,18

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	1.155	15,69	47,16	707,47
Medi	1.735	23,56	70,85	1.062,74
Lenti	1.195	16,23	48,80	731,97
Immobili (IM)	3.278	44,52	133,86	2.007,87

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	138	1,87	5,64	84,53
Medi progressivi	1.350	18,33	55,13	826,91
Non progeressivi	2.597	35,27	106,05	1.590,74
Immobili	3.278	44,52	133,86	2.007,87



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	19,73	18,14	20,75	21,78	18,48	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione
Cellule rotonde	7,81 Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	3.564	48,40 %

Referenza: 1024

Codice: SCATemp14

Animale: verro 1 di franco

Data (giorno/mese/anno):



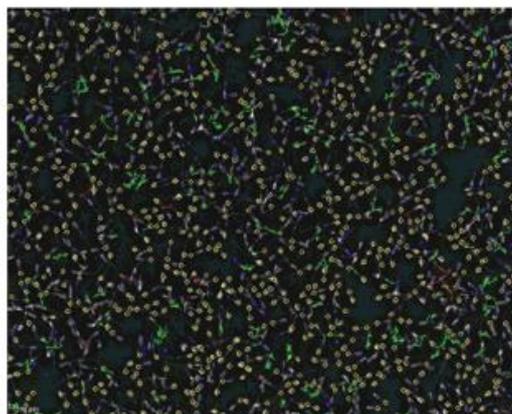
Centro: OVUD

-----

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	29,24	17,95	48,77	50,80	µm/s
Md. Valore - VAP	15,80	8,44	27,93	35,62	µm/s
Velocità lineare - VSL	7,34	2,98	13,24	31,72	µm/s
Indice rettilineità - STR	43,60	36,37	52,87	88,85	%
Indice linearità - LIN	22,48	15,66	31,49	62,63	%
Indice oscillazione - WOB	50,41	45,38	58,05	70,29	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- AL	1,11	1,67	1,76	µm
Frequenza battito - BCF	2,24	4,05	2,65	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	5	0,12	0,07	0,20	3,06
Mucous penetration	116	2,84	1,58	4,74	71,05



Tecnico: Administrator

Commenti: optixcell t0

Figura 66. Referto SCA del verro 1 a t0 protocollo 1 (Optixcell).



Referenza: 1027



Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
Centro: OVUD

Codice: SCAtemp15



Animale: verro 2 di franco

Nuovo (24/04/2023 18:18)

**Concentrazione**

231,14 Milioni / ML

6.934,20 M/Campione

Volume (mL): 30,00

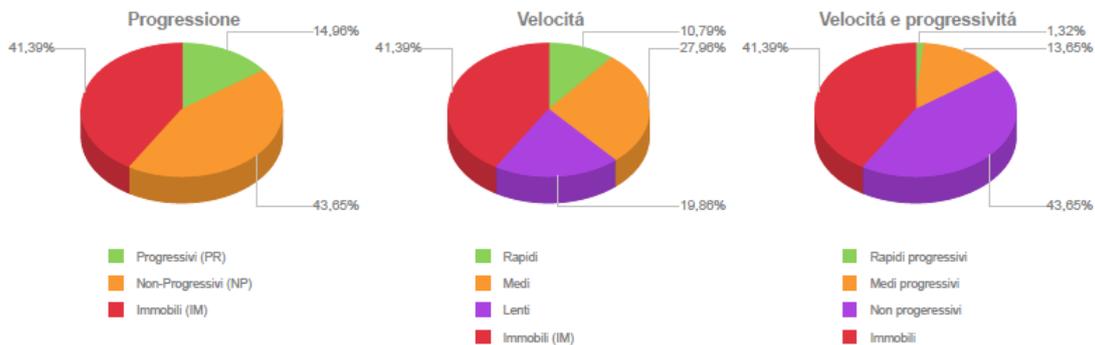
Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	828	14,96	34,59	1.037,69
Non-Progressivi (NP)	2.415	43,65	100,89	3.026,58
Immobili (IM)	2.290	41,39	95,66	2.869,93

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	3243	58,61	135,48	4.064,27

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	597	10,79	24,94	748,19
Medi	1.547	27,96	64,63	1.938,77
Lenti	1.099	19,86	45,91	1.377,32
Immobili (IM)	2.290	41,39	95,66	2.869,93

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	73	1,32	3,05	91,49
Medi progressivi	755	13,65	31,54	946,20
Non progeressivi	2.415	43,65	100,89	3.026,58
Immobili	2.290	41,39	95,66	2.869,93



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	19,47	18,11	20,35	21,30	14,25	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione
Cellule rotonde	5,09 Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	2.927	52,90 %

Referenza: 1027

Codice: SCAtemp15

Animale: verro 2 di franco

Data (giorno/mese/anno):

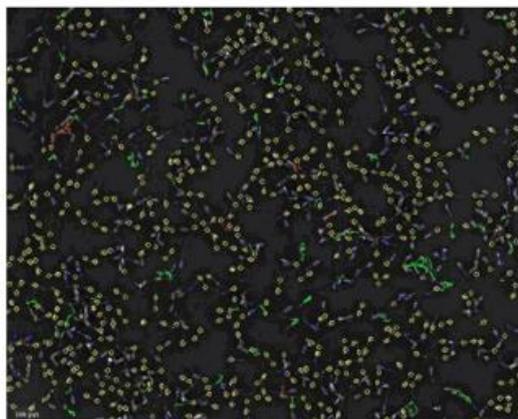


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progeressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	25,45	17,32	48,22	59,01	µm/s
Md. Valore - VAP	13,00	7,50	28,10	38,68	µm/s
Velocità lineare - VSL	5,35	2,37	12,03	34,71	µm/s
Indice rettilineità - STR	38,02	31,74	53,13	89,30	%
Indice linearità - LIN	18,06	13,03	29,67	64,08	%
Indice oscillazione - WOB	46,00	41,58	57,68	71,61	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- AL	0,99	1,62	1,90	µm
Frequenza battito - BCF	1,76	3,69	3,60	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	9	0,28	0,16	0,38	11,28
Mucous penetration	57	1,76	1,03	2,38	71,43



Tecnico: Administrator

Commenti: verro 2 t0

Figura 67. Referto SCA del verro 2 a t0 protocollo 1 (Optixcell).



Referenza: 1025  
 Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
 Centro: OVUD

Codice: SCAtemp14  
 Animale: verro 1 di franco

Nuovo (24/04/2023 16:18)

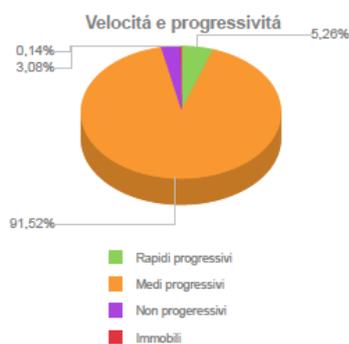
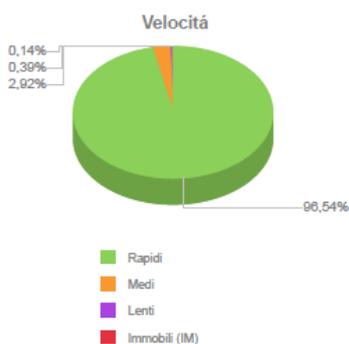
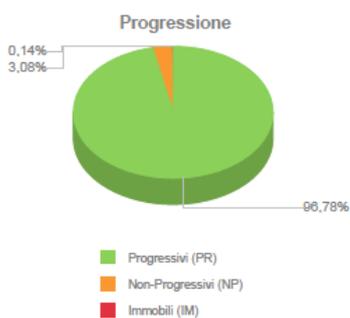
Concentrazione		
270,20 Milioni / ML	4.053,00 M/Campione	Volume (mL): 15,00 Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	8117	96,78	261,50	3.922,52
Non-Progressivi (NP)	258	3,08	8,31	124,68
Immobili (IM)	12	0,14	0,39	5,80

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	8375	99,86	269,81	4.047,20

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	8.097	96,54	260,86	3.912,86
Medi	245	2,92	7,89	118,40
Lenti	33	0,39	1,06	15,95
Immobili (IM)	12	0,14	0,39	5,80

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	441	5,26	14,21	213,11
Medi progressivi	7.676	91,52	247,29	3.709,41
Non progressivi	258	3,08	8,31	124,68
Immobili	12	0,14	0,39	5,80



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	27,03	18,64	20,71	27,45	23,60	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione
Cellule rotonde	0,03 Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	8.013	95,54 %

Referenza: 1025

Codice: SCAtemp14

Animale: verro 1 di franco

Data (giorno/mese/anno):

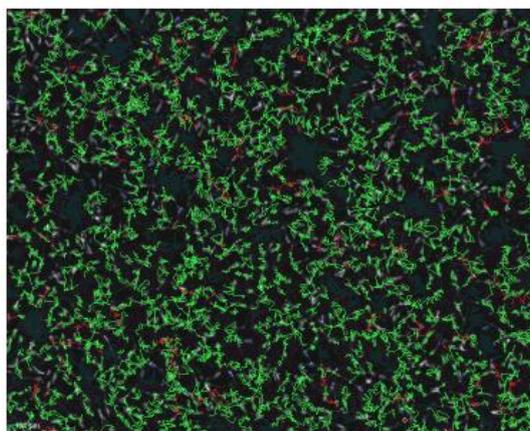


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progeressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	110,65	24,00	113,75	107,38	µm/s
Md. Valore - VAP	56,17	10,99	57,28	63,26	µm/s
Velocità lineare - VSL	27,13	3,97	26,34	54,50	µm/s
Indice rettilineità - STR	47,96	35,39	46,21	85,79	%
Indice linearità - LIN	24,72	16,42	23,51	50,63	%
Indice oscillazione - WOB	50,53	45,76	50,22	58,79	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	3,00	3,09	2,78	µm
Frequenza battito - BCF	10,42	10,68	10,62	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	1.441	17,21	17,18	46,42	696,36
Mucous penetration	414	4,94	4,94	13,34	200,06



Tecnico: Administrator

Commenti: verro 1 optix t 30

Figura 68. Referto SCA del verro 1 a t30 protocollo 1 (Optixcell).

Referenza: 1029



Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
Centro: OVUD

Codice: SCAtemp15



Animale: verro 2 di franco

Nuovo (24/04/2023 19:03)

**Concentrazione**

216,34 Milioni / ML

108,17 M/Campione

Volume (mL): 0,50

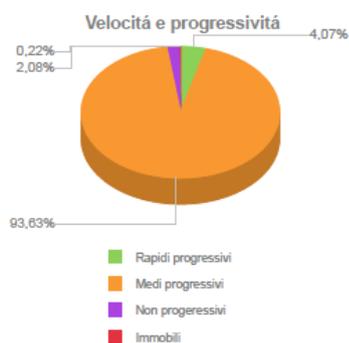
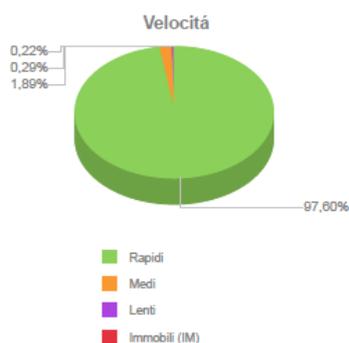
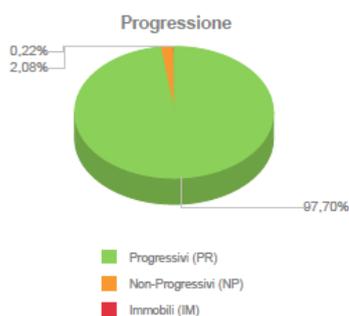
Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	6704	97,70	211,36	105,68
Non-Progressivi (NP)	143	2,08	4,51	2,25
Immobili (IM)	15	0,22	0,47	0,24

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	6847	99,78	215,87	107,93

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	6.697	97,60	211,14	105,57
Medi	130	1,89	4,10	2,05
Lenti	20	0,29	0,63	0,32
Immobili (IM)	15	0,22	0,47	0,24

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	279	4,07	8,80	4,40
Medi progressivi	6.425	93,63	202,56	101,28
Non progeressivi	143	2,08	4,51	2,25
Immobili	15	0,22	0,47	0,24



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	28,92	22,83	20,52	29,36	23,35	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione	
Cellule rotonde	0,03	Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	6.517	94,97 %

Referenza: 1029

Codice: SCAtemp15

Animale: verro 2 di franco

Data (giorno/mese/anno):

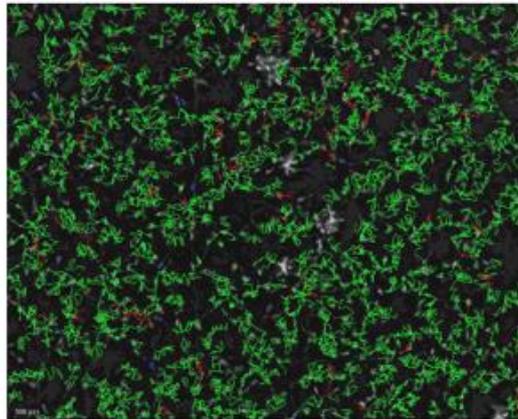


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	137,20	24,73	139,93	131,96	µm/s
Md. Valore - VAP	74,57	14,84	75,55	82,64	µm/s
Velocità lineare - VSL	33,58	6,55	32,55	71,12	µm/s
Indice rettilineità - STR	44,67	42,99	42,91	86,01	%
Indice linearità - LIN	24,94	26,20	23,61	54,92	%
Indice oscillazione - WOB	54,75	59,97	54,24	63,64	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- AL	3,54	3,61	3,21	µm
Frequenza battito - BCF	10,05	10,16	11,03	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	2.697	39,39	39,30	85,03	42,51
Mucous penetration	278	4,06	4,05	8,76	4,38



Tecnico: Administrator

Commenti: optix t 30

Figura 69. Referto SCA del verro 2 a t30 protocollo 1 (Optixcell).



Referenza: 1030



Data (giorno/mese/anno): 27/04/2023  
 Centro: OVUD

Codice: SCAtemp14



Animale: verro 1 di franco

Post trattamento (27/04/2023 10:41)

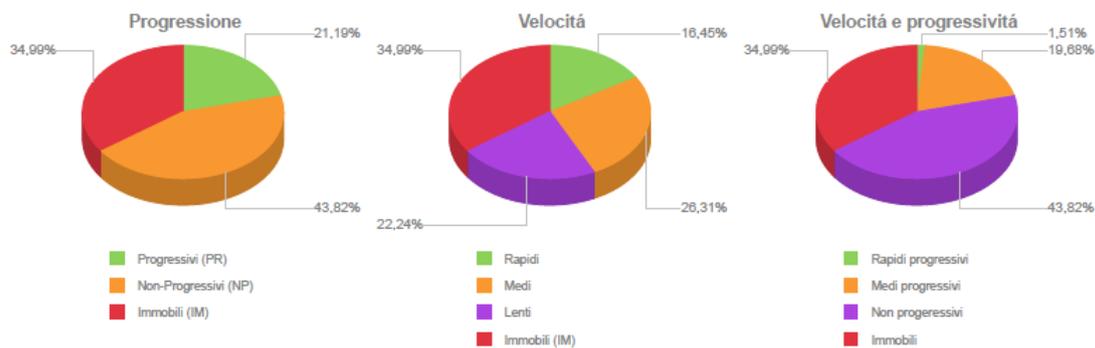
Concentrazione		
195,81 Milioni / ML	97,91 M/Campione	Volume (mL): 0,50 Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	984	21,19	41,49	20,74
Non-Progressivi (NP)	2.035	43,82	85,80	42,90
Immobili (IM)	1.625	34,99	68,52	34,26

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	3019	65,01	127,29	63,65

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	764	16,45	32,21	16,11
Medi	1.222	26,31	51,52	25,76
Lenti	1.033	22,24	43,56	21,78
Immobili (IM)	1.625	34,99	68,52	34,26

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	70	1,51	2,95	1,48
Medi progressivi	914	19,68	38,54	19,27
Non progressivi	2.035	43,82	85,80	42,90
Immobili	1.625	34,99	68,52	34,26



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	20,15	19,33	19,77	22,58	18,94	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione		Traiettorie circolari	
	Totale	%	Totale	%
Cellule rotonde	3,13	Milioni / ML	2.883	62,08 %

Referenza: 1030

Codice: SCAtemp14

Animale: verro 1 di franco

Data (giorno/mese/anno):

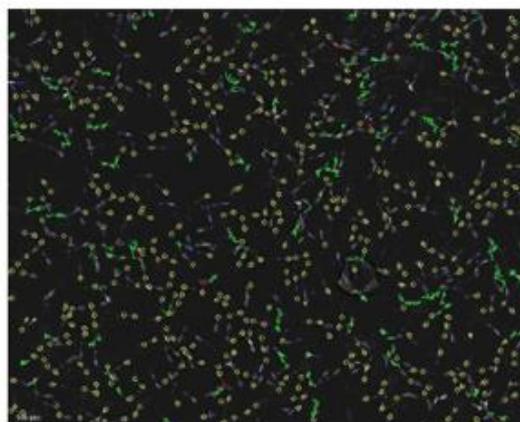


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progeressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	28,17	16,76	51,80	51,58	µm/s
Md. Valore - VAP	12,07	5,53	25,04	32,89	µm/s
Velocità lineare - VSL	5,35	1,43	12,20	29,68	µm/s
Indice rettilineità - STR	39,86	30,09	57,77	89,96	%
Indice linearità - LIN	14,10	8,35	23,58	57,66	%
Indice oscillazione - WOB	36,74	32,28	44,58	63,78	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	1,06	1,68	1,72	µm
Frequenza battito - BCF	2,17	5,02	3,27	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	3	0,10	0,06	0,13	0,06
Mucous penetration	40	1,32	0,86	1,69	0,84



Tecnico: Administrator

Commenti: scongelamento ufficiale optixcell

Figura 70. Referto SCA del verro 1 post congelamento protocollo 1 (Optixcell).

Referenza: 1031

Codice: SCAtemp15



Data (giorno/mese/anno): 27/04/2023  
Centro: OVUD

Animale: verro 2 di franco

Post trattamento (27/04/2023 10:50)

**Concentrazione**

228,03 Milioni / ML

114,02 M/Campione

Volume (mL): 0,50  
Diluizione 1:0

**Progressione**

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	4093	66,21	150,97	75,49
Non-Progressivi (NP)	1.676	27,11	61,82	30,91
Immobili (IM)	413	6,68	15,23	7,62

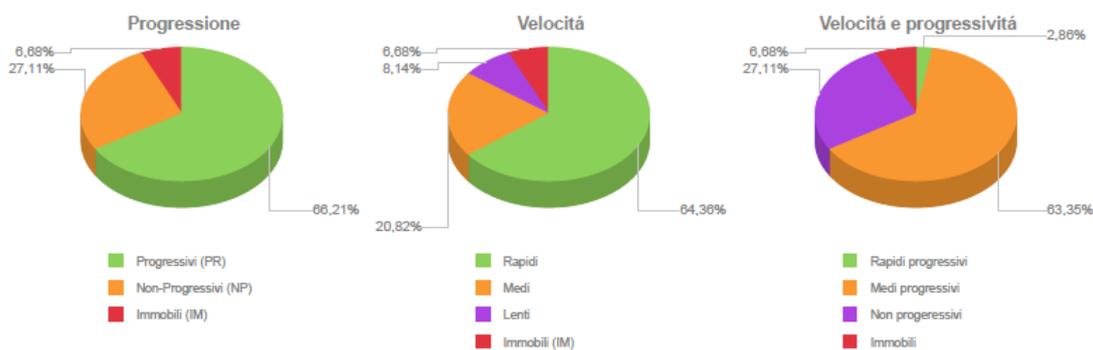
	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	5769	93,32	212,80	106,40

**Velocità**

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	3.979	64,36	146,77	73,38
Medi	1.287	20,82	47,47	23,74
Lenti	503	8,14	18,55	9,28
Immobili (IM)	413	6,68	15,23	7,62

**Velocità e progressività**

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	177	2,86	6,53	3,26
Medi progressivi	3.916	63,35	144,45	72,22
Non progressivi	1.676	27,11	61,82	30,91
Immobili	413	6,68	15,23	7,62



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	22,82	18,29	19,35	25,02	17,74	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione	Totale	%
Cellule rotonde	0,47 Milioni / ML	5.339	86,36 %
Traiettorie circolari			

Referenza: 1031

Codice: SCAtemp15

Animale: verro 2 di franco

Data (giorno/mese/anno):

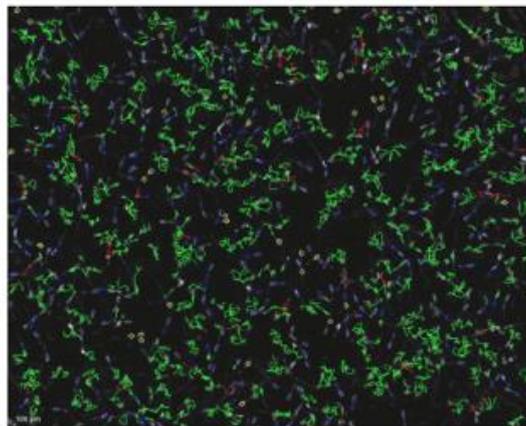


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	62,41	20,18	80,10	70,83	µm/s
Md. Valore - VAP	37,18	10,92	47,85	49,88	µm/s
Velocità lineare - VSL	15,71	4,17	19,41	43,29	µm/s
Indice rettilineità - STR	42,21	38,31	41,85	87,38	%
Indice linearità - LIN	24,67	20,02	24,97	62,17	%
Indice oscillazione - WOB	57,95	53,33	59,34	71,00	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	1,87	2,28	2,07	µm
Frequenza battito - BCF	6,32	8,14	5,96	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	103	1,79	1,67	3,80	1,90
Mucous penetration	156	2,70	2,52	5,75	2,88



Tecnico: Administrator

Commenti: scongelamento ufficiale

Figura71. Referto SCA del verro 2 post congelamento protocollo 1 (Optixcell).



Referenza: 1023



Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
 Centro: OVUD

Codice: SCAtemp13



Animale: verro 1 di franco

Nuovo (24/04/2023 15:13)

**Concentrazione**

260,61 Milioni / ML

5.212,20 M/Campione

Volume (mL): 20,00

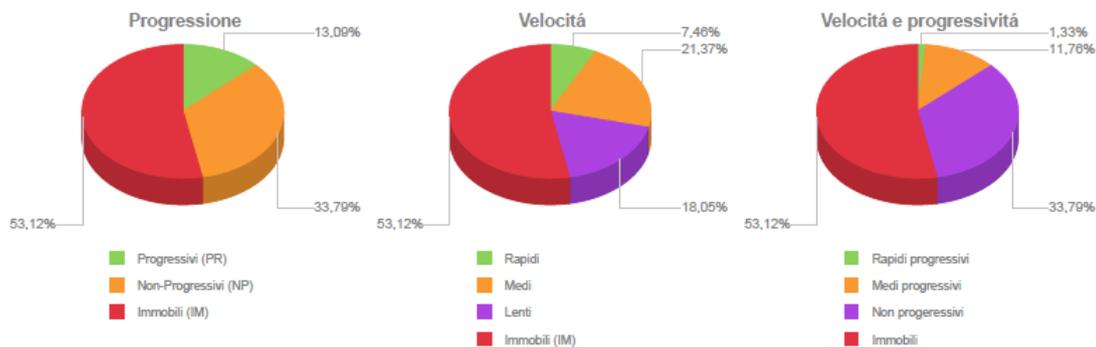
Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	819	13,09	34,12	682,35
Non-Progressivi (NP)	2.114	33,79	88,06	1.761,28
Immobili (IM)	3.323	53,12	138,43	2.768,56

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	2933	46,88	122,18	2.443,64

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	467	7,46	19,45	389,08
Medi	1.337	21,37	55,70	1.113,92
Lenti	1.129	18,05	47,03	940,63
Immobili (IM)	3.323	53,12	138,43	2.768,56

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	83	1,33	3,46	69,15
Medi progressivi	736	11,76	30,66	613,20
Non progressivi	2.114	33,79	88,06	1.761,28
Immobili	3.323	53,12	138,43	2.768,56



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	19,64	18,73	20,24	22,33	16,90	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione	
Cellule rotonde	13,03	Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	2.554	40,82 %

Referenza: 1023

Codice: SCAtemp13

Animale: verro 1 di franco

Data (giorno/mese/anno):

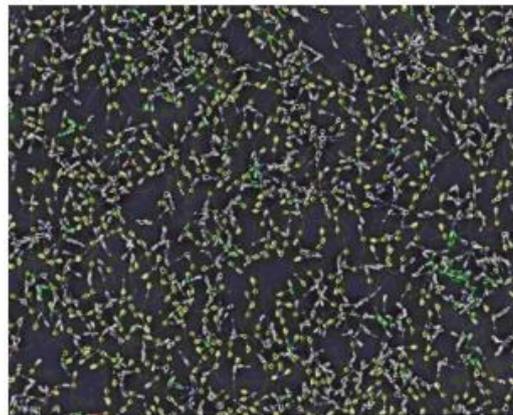


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	23,44	16,62	40,23	48,40	µm/s
Md. Valore - VAP	11,63	6,89	22,47	36,12	µm/s
Velocità lineare - VSL	5,67	2,74	11,00	32,92	µm/s
Indice rettilineità - STR	49,05	42,06	64,34	91,48	%
Indice linearità - LIN	21,42	16,03	31,68	67,68	%
Indice oscillazione - WOB	44,09	40,04	52,32	74,17	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	0,89	1,39	1,54	µm
Frequenza battito - BCF	1,22	2,22	2,02	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	0	0,00	0,00	0,00	0,00
Mucous penetration	71	2,42	1,13	2,96	59,15



Tecnico: Administrator

Commenti:

Figura72. Referto SCA del verro 1 a t0, protocollo 2 (CryoGuard).

Referenza: 1026

Codice: SCAtemp15



Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
Centro: OVUD

Animale: verro 2 di franco

Nuovo (24/04/2023 17:33)

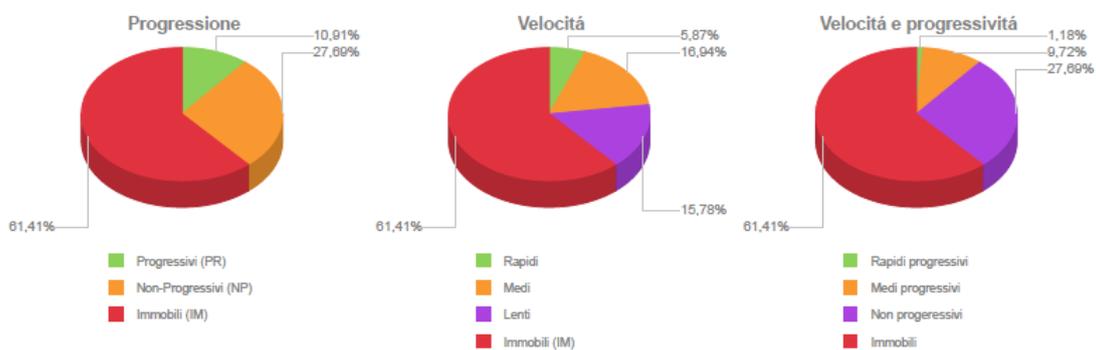
Concentrazione		
180,88 Milioni / ML	9.044,00 M/Campione	Volume (mL): 50,00 Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	470	10,91	19,73	986,47
Non-Progressivi (NP)	1.193	27,69	50,08	2.503,94
Immobili (IM)	2.646	61,41	111,07	5.553,59

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	1663	38,59	69,81	3.490,41

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	253	5,87	10,62	531,01
Medi	730	16,94	30,64	1.532,17
Lenti	680	15,78	28,54	1.427,23
Immobili (IM)	2.646	61,41	111,07	5.553,59

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	51	1,18	2,14	107,04
Medi progressivi	419	9,72	17,59	879,42
Non progeressivi	1.193	27,69	50,08	2.503,94
Immobili	2.646	61,41	111,07	5.553,59



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	18,59	18,17	19,73	18,12	17,72	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione		Totale		%
Cellule rotonde	9,16	Milioni / ML	Traiettorie circolari	1.366	31,70 %

Referenza: 1026

Codice: SCAtemp15

Animale: verro 2 di franco

Data (giorno/mese/anno):

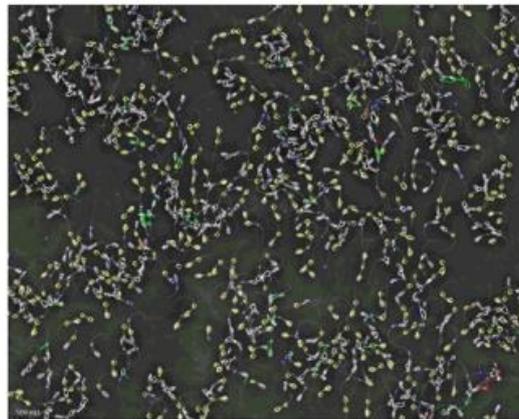


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	23,58	16,26	41,39	48,56	µm/s
Md. Valore - VAP	12,52	7,39	24,01	38,20	µm/s
Velocità lineare - VSL	6,39	3,04	12,56	34,03	µm/s
Indice rettilineità - STR	49,64	43,06	63,49	89,67	%
Indice linearità - LIN	25,01	18,47	38,13	70,26	%
Indice oscillazione - WOB	48,53	43,66	58,76	78,28	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- AL	0,88	1,40	1,61	µm
Frequenza battito - BCF	1,40	2,64	3,11	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	1	0,06	0,02	0,04	2,10
Mucous penetration	44	2,65	1,02	1,85	92,35



Tecnico: Administrator

Commenti: verro 2 androstar t0

Figura 73. Referto SCA del verro 2 a t0, protocollo 2 (CryoGuard).



Referenza: 1024  
  
 Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
 Centro: OVUD

Codice: SCAtemp14  
  
 Animale: verro 1 di franco

Nuovo (24/04/2023 15:56)

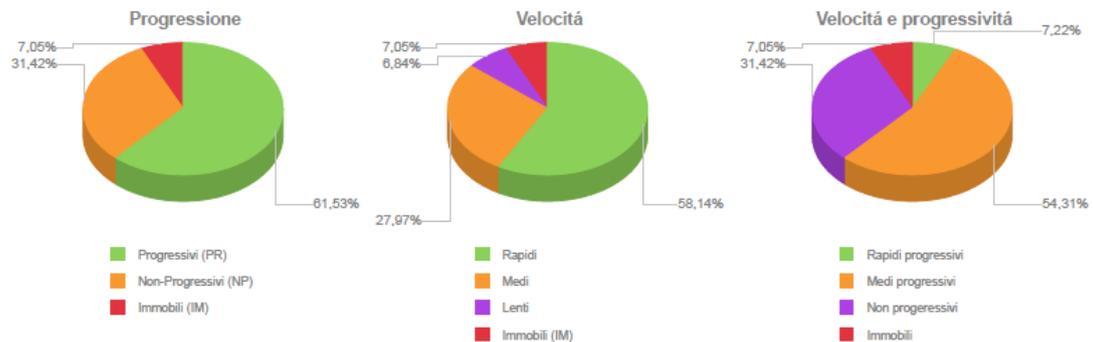
Concentrazione		
291,83 Milioni / ML	4.377,45 M/Campione	Volume (mL): 15,00 Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	4031	61,53	179,57	2.693,56
Non-Progressivi (NP)	2.058	31,42	91,68	1.375,18
Immobili (IM)	462	7,05	20,58	308,71

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	6089	92,95	271,25	4.068,74

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	3.809	58,14	169,68	2.545,22
Medi	1.832	27,97	81,61	1.224,16
Lenti	448	6,84	19,96	299,36
Immobili (IM)	462	7,05	20,58	308,71

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	473	7,22	21,07	316,06
Medi progressivi	3.558	54,31	158,50	2.377,49
Non progressivi	2.058	31,42	91,68	1.375,18
Immobili	462	7,05	20,58	308,71



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	18,98	15,05	17,50	20,70	16,29	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione
Cellule rotonde	1,52 Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	5.345	81,59 %

Referenza: 1024

Codice: SCAtemp14

Animale: verro 1 di franco

Data (giorno/mese/anno):

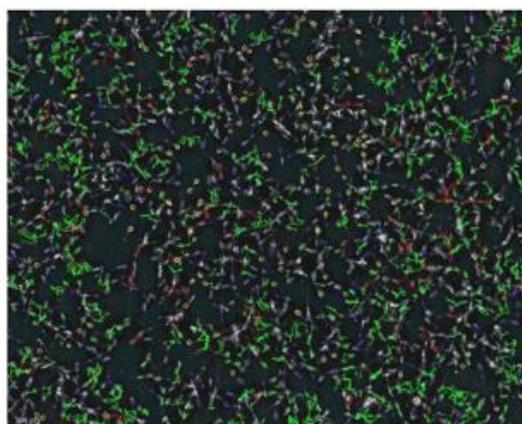


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	56,34	21,74	74,44	70,73	µm/s
Md. Valore - VAP	29,23	10,13	38,26	44,37	µm/s
Velocità lineare - VSL	15,04	4,09	18,15	39,36	µm/s
Indice rettilineità - STR	48,43	40,05	47,94	88,59	%
Indice linearità - LIN	25,85	18,63	25,92	56,74	%
Indice oscillazione - WOB	51,18	46,77	52,06	63,79	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	1,76	2,22	2,08	µm
Frequenza battito - BCF	5,03	6,64	5,66	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	199	3,27	3,04	8,86	132,97
Mucous penetration	378	6,21	5,77	16,84	252,58



Tecnico: Administrator

Commenti: androstar t30

Figura 74. Referto SCA del verro 1 a t30, protocollo 2 (CryoGuard)..

Referenza: 1028



Data (giorno/mese/anno): 24/04/2023  
Centro: OVUD

Codice: SCAtemp15



Animale: verro 2 di franco

Nuovo (24/04/2023 18:26)

**Concentrazione**

207,15 Milioni / ML

103,58 M/Campione

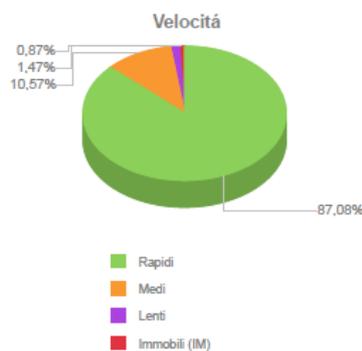
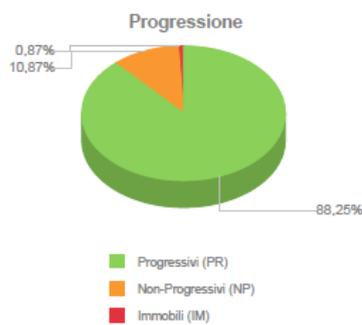
Volume (mL): 0,50  
Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	5350	88,25	182,82	91,41
Non-Progressivi (NP)	659	10,87	22,52	11,26
Immobili (IM)	53	0,87	1,81	0,91

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	6009	99,13	205,34	102,67

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	5.279	87,08	180,39	90,20
Medi	641	10,57	21,90	10,95
Lenti	89	1,47	3,04	1,52
Immobili (IM)	53	0,87	1,81	0,91

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	561	9,25	19,17	9,59
Medi progressivi	4.789	79,00	163,65	81,82
Non progeressivi	659	10,87	22,52	11,26
Immobili	53	0,87	1,81	0,91



Area Testa	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
	22,85	18,38	16,40	23,88	22,07	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione	
Cellule rotonde	0,03	Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	5.460	90,07 %

Referenza: 1028

Codice: SCAtemp15

Animale: verro 2 di franco

Data (giorno/mese/anno):

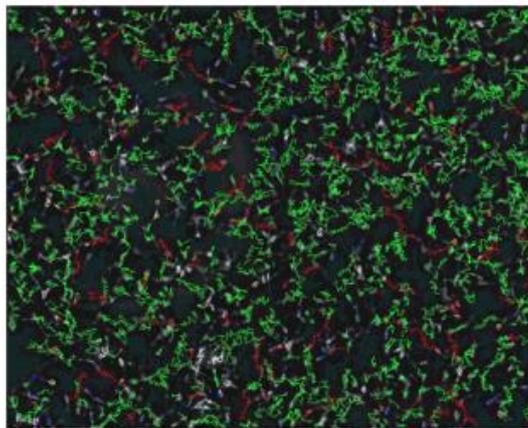


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	98,03	24,21	107,41	104,68	µm/s
Md. Valore - VAP	50,89	11,76	54,84	63,08	µm/s
Velocità lineare - VSL	26,85	5,07	26,62	54,38	µm/s
Indice rettilineità - STR	50,54	41,36	47,63	86,17	%
Indice linearità - LIN	27,30	20,68	25,20	52,92	%
Indice oscillazione - WOB	52,33	48,67	51,78	61,27	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	2,71	2,96	2,69	µm
Frequenza battito - BCF	9,28	9,92	11,38	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	967	16,09	15,95	33,04	16,52
Mucous penetration	507	8,44	8,36	17,33	8,66



Tecnico: Administrator

Commenti: androstar t 30

Figura 75. Referto SCA del verro 2 a t30, protocollo 2 (CryoGuard).

Referenza: 1032

Codice: SCAtemp14



Data (giorno/mese/anno): 27/04/2023

Animale: verro 1 di franco

Centro: OVUD

Post trattamento (27/04/2023 11:28)

**Concentrazione**

22,22 Milioni / ML

177,76 M/Campione

Volume (mL): 8,00

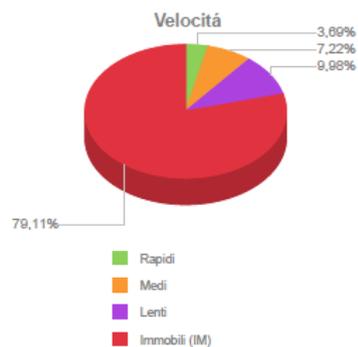
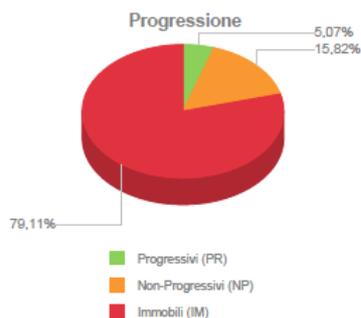
Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	33	5,07	1,13	9,01
Non-Progressivi (NP)	103	15,82	3,52	28,12
Immobili (IM)	515	79,11	17,58	140,62

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	136	20,89	4,64	37,14

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	24	3,69	0,82	6,55
Medi	47	7,22	1,60	12,83
Lenti	65	9,98	2,22	17,75
Immobili (IM)	515	79,11	17,58	140,62

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	7	1,08	0,24	1,91
Medi progressivi	26	3,99	0,89	7,10
Non progressivi	103	15,82	3,52	28,12
Immobili	515	79,11	17,58	140,62



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	18,60	18,09	18,95	22,99	34,57	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione
Cellule rotonde	0,14 Milioni / ML

	Totale	%
Traiettorie circolari	126	19,35 %

Referenza: 1032  
████████████████████

Codice: SCAtemp14  
████████████████████

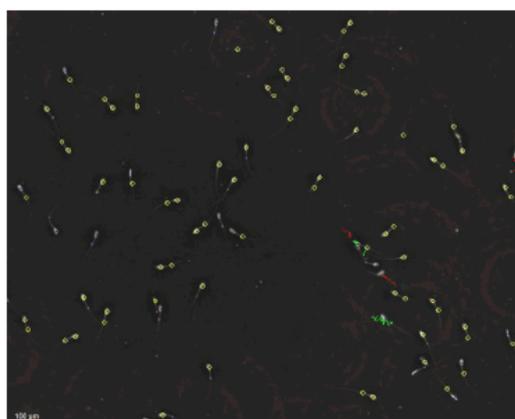
Animale: verro 1 di franco  
Centro: OVUD

Data (giorno/mese/anno):  
-----

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	24,11	14,66	48,60	72,18	µm/s
Md. Valore - VAP	10,82	4,44	25,55	50,12	µm/s
Velocità lineare - VSL	6,11	1,20	14,85	45,76	µm/s
Indice rettilineità - STR	42,67	33,62	65,45	91,37	%
Indice linearità - LIN	15,00	8,25	28,83	62,95	%
Indice oscillazione - WOB	35,23	29,98	47,00	68,89	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	0,84	1,46	1,56	µm
Frequenza battito - BCF	2,67	7,29	16,43	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	0	0,00	0,00	0,00	0,00
Mucous penetration	6	4,41	0,92	0,20	1,64



Tecnico: Administrator  
Commenti: androstar post congelamento

Figura 76. Referto SCA del verro 1 post congelamento protocollo 2 (CryoGuard).



Referenza: 1033

Codice: SCAtemp15



Data (giorno/mese/anno): 27/04/2023  
Centro: OVUD

Animale: verro 2 di franco

Post trattamento (27/04/2023 11:34)

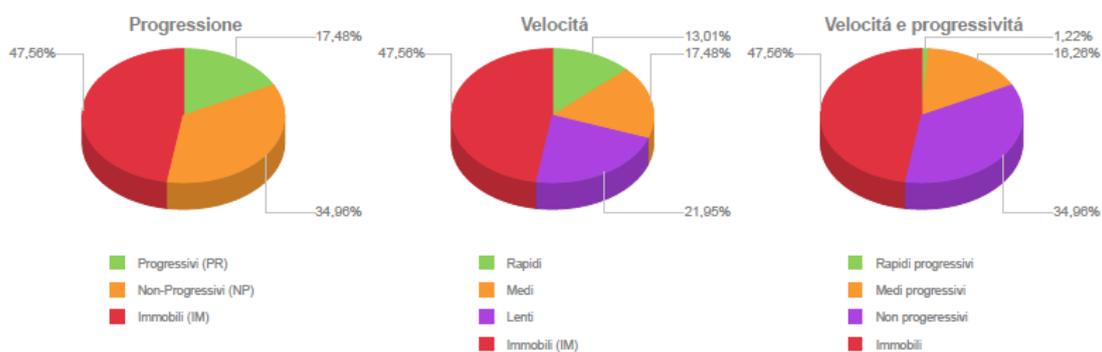
Concentrazione		
10,51 Milioni / ML	84,08 M/Campione	Volume (mL): 8,00 Diluizione 1:0

Progressione	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Progressivi (PR)	43	17,48	1,84	14,70
Non-Progressivi (NP)	86	34,96	3,67	29,39
Immobili (IM)	117	47,56	5,00	39,99

	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Mobili	129	52,44	5,51	44,09

Velocità	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi	32	13,01	1,37	10,94
Medi	43	17,48	1,84	14,70
Lenti	54	21,95	2,31	18,46
Immobili (IM)	117	47,56	5,00	39,99

Velocità e progressività	Totale	%	Milioni / ML	M/Campione
Rapidi progressivi	3	1,22	0,13	1,03
Medi progressivi	40	16,26	1,71	13,67
Non progressivi	86	34,96	3,67	29,39
Immobili	117	47,56	5,00	39,99



	Media	Immobili (IM)	Lenti	Medi	Rapidi	Unità
Area Testa	15,30	14,71	14,05	18,96	25,20	µm <sup>2</sup>

	Concentrazione		Totale		%
Cellule rotonde	0,17	Milioni / ML	107	43,50	%
Traiettorie circolari					

Referenza: 1033

Codice: SCAtemp15

Animale: verro 2 di franco

Data (giorno/mese/anno):

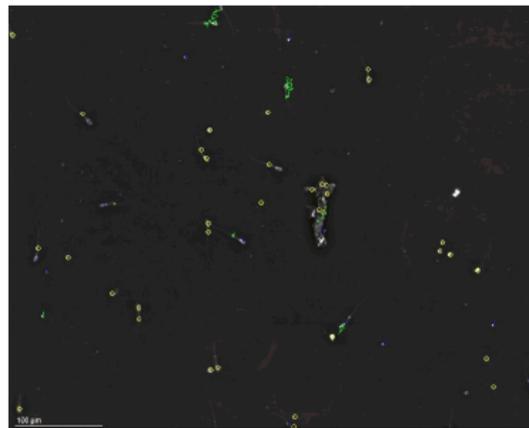


Centro: OVUD

Media. Valori di velocità	Mobili	Non progeressivi	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Velocità curvilinea - VCL	32,15	15,49	63,83	87,59	µm/s
Md. Valore - VAP	15,43	6,93	31,59	43,38	µm/s
Velocità lineare - VSL	9,13	4,47	17,02	37,52	µm/s
Indice rettilineità - STR	62,69	62,17	62,04	86,50	%
Indice linearità - LIN	30,13	31,33	26,42	45,03	%
Indice oscillazione - WOB	46,13	46,37	45,16	52,02	%

Media. Valori di altri parametri	Mobili	Medi progressivi	Rapidi progressivi	Unità
Ampiezza del movimento laterale della testa- ALI	1,13	1,86	2,56	µm
Frequenza battito - BCF	3,46	8,35	5,81	Hz

	Totale	% (Mobili)	% (Totale)	Milioni / ML	M/Campione
Iperattivi	1	0,78	0,41	0,04	0,34
Mucous penetration	4	3,10	1,63	0,17	1,37



Tecnico: Administrator

Commenti: androstar post cong

Figura 77. Referto SCA del verro 2 post congelamento. protocollo 2 (CryoGuard).

## I Cani

### Il Cirneco dell'Etna

Il Cirneco dell'Etna è la più antica delle 16 razze canine italiane ufficialmente riconosciute dall'Ente Nazionale Cinofila Italiana (ENCI), con definizione standard di razza che risale al 1939. La razza è riconosciuta anche a livello internazionale dalla *Federation Cynologique Internationale* (FCI) con numero standard di razza 199, classificata nel Gruppo 5 - Sezione 7 (Spitz e tipi primitivi – Cani da caccia di tipo primitivo) con prova di lavoro in Italia. Il Cirneco è una razza mediterranea, descritto come eccellente cacciatore. Le sue origini sono molto antiche, probabilmente discende dai cani da caccia dei faraoni dell'antico Egitto. Ipoteticamente questi cani potrebbero essere stati dispersi dall'Egitto e diffusi in tutto il bacino del Mediterraneo dai Fenici durante i loro viaggi esplorativi. I reperti archeologici rinvenuti in Sicilia raffiguranti immagini simili al Cirneco includono monete, incisioni e mosaici del periodo avanti Cristo (Cortellari et al., 2021).



*Figura 78. Monete antiche raffiguranti cani simili al cirneco attuale. Immagine dal web <https://www.ragusaneews.com/attualita-il-cirneco-dell-etna-cane-millenario-138024/>.*

Le forme eleganti e slanciate del cirneco non devono intendersi in contrasto con una costruzione comunque robusta, che deve far trasparire quella sana vigoria e forza fisica tipica del cane da lavoro. Le caratteristiche fisiche generali della razza, riportate dall'ENCI, includono gli elementi che seguono: la testa asciutta e ben cesellata con orecchie perfettamente dritte (emblema del cirneco), la canna nasale rettilinea con assi cranio facciali paralleli o quasi e tartufo allineato; muso a punta e preferibilmente di

lunghezza pari a quella del cranio, occhi in posizione semilaterale con rime ovali; la costruzione quadrata, il garrese alto con linea dorsale dritta in leggera pendenza e la groppa scoscesa; la coda grossa all'attaccatura ed uniforme per quasi l'intera lunghezza, il pelo corto e ben fitto sulle orecchie, sulla testa e sugli arti, semi lungo ma ben liscio ed aderente alla cute sul tronco ed alla coda, di tessitura vitrea; il piede compatto e di forma rotondeggiante. La conformazione generale è quella di un sub-dolicomorfo con indice toracico di valore ideale 57%. L'altezza del torace (47.5% dell'altezza al garrese) leggermente inferiore all'altezza dal gomito a terra (52.5%) è dovuta alla costruzione del cirneco che deve essere alto sugli arti; tale peculiarità è dovuta essenzialmente alla brevità del braccio rispetto alla spalla e all'avambraccio. Il cirneco deve essere un cane monocromatico: pelo, pelle, mucose, soles, unghie, tartufo e iride più presentano lo stesso tono cromatico più il cane è pregiato. Il colore è fulvo in tutte le sue gradazioni, è ammessa la presenza di bianco nelle zone di elezione (lista bianca in testa, nel petto, nel ventre, nei piedi e nella punta della coda). I colori frumentino o mielato-dorato sono quelli più pregiati, il fulvo intenso, tendente quasi al mogano, è tollerato. Secondo quanto riportato dall'ENCI, il cirneco non deve mostrare paura ingiustificata verso persone o cose che viceversa deve essere imputabile a tare ereditarie, mancanza di riferimenti sociali ed a una non corretta socializzazione. L'andatura è assai caratteristica: il trotto è di tipo ordinario saltellante e rapido; è da penalizzare un movimento radente o allungato. A caccia, ove il terreno lo consente, alterna un trotto rapido a tempi di galoppo non spinto. Particolarmente indicato per la caccia al coniglio selvatico, che cerca e scova in qualsiasi ambiente. Essenzialmente è un cane da cerca e può essere utilizzato anche per la caccia ad altri tipi di selvaggina (ENCI, 2023).



*Figura79. Caio del Gelso Bianco Cirneco dell'Etna. Proprietario Taorminenis Kennel.*

## **Esp. 5 raccolta e congelamento del materiale seminale nel Cirneco dell'Etna.**

### **Introduzione**

L'inseminazione artificiale (IA) nella specie canina col passare degli anni è diventata sempre più di uso comune, tuttavia, la pratica dell'IA in questa specie risale a qualche secolo fa. Un importante contributo si deve all'italiano Lazzaro Spallanzani, che durante i suoi esperimenti sulla fecondazione artificiale, nel 1781 inseminò con successo 3 cagne dando vita a 3 cuccioli (Spallanzani, 1781). L'IA nella specie canina trova largo uso sia a causa della presenza di possibili anomalie vaginali nella cagna (stenosi vaginale-vestibolare, setto vaginale, iperplasia vaginale), sia per eventuale incompatibilità comportamentale tra cani maschi e femmine. Tuttavia, l'IA trova il suo maggior impiego quando i riproduttori si trovano in luoghi distanti ed il trasporto del materiale germinale risulta meno costoso e stressante rispetto alla spedizione dei riproduttori. Inoltre, come per le altre specie, anche per il cane è possibile raccogliere il seme per la crioconservazione (Eilts, 2005), consentendo ai proprietari di preservarne la genetica e la riproduzione anche dopo che il maschio non è più fertile, non è disponibile per la riproduzione o è deceduto.

Un importante contributo sulla normativa riguardante le movimentazioni di materiale germinale è stato dato da Pugliese et al (2022), evidenziandone i punti di forza e le carenze. Infatti, con il crescente movimento di materiale germinale di cani e gatti tra gli Stati membri, l'UE con il Reg Del 2020/686 ha stabilito e armonizzato le norme sulla marcatura delle paillettes e di altri imballaggi contenenti materiale germinale. Dato che lo spostamento del materiale germinale può aumentare il rischio di diffusione di malattie infettive, i requisiti in materia di salute animale sono stati rivisti concentrandosi sul controllo della rabbia e dell'echinococcosi, sebbene esistano nuove malattie emergenti che potrebbero richiedere, anche a livello locale, requisiti specifici.

Prima della raccolta dello sperma è bene fare un'attenta anamnesi delle precedenti esperienze di salute e di allevamento del cane. Inoltre, informazioni riguardanti i farmaci o gli integratori somministrati negli ultimi 6 mesi (come minimo) e sul *background* genetico o familiare sono importanti (Johnson, 2006). Inoltre, dovrebbero essere raccolte informazioni sullo stato delle vaccinazioni e sui trattamenti antiparassitari (Freshman, 2002; Ettinger e Feldman, 2010). Molti fattori influenzano la qualità dello sperma, tra cui l'età dell'animale, la dimensione dei testicoli, il grado di eccitazione sessuale, la frequenza dell'eiaculazione, la procedura di raccolta e la quantità di liquido seminale raccolto (Kutzler, 2005; Johnson, 2006). Le tecniche utilizzate per raccogliere lo sperma nel cane sono diverse e includono l'uso dell'elettroeiaculatore, della vagina artificiale e del massaggio del pene (Ortega-Pacheco et al., 2006).

Il volume totale dell'eiaculato di un cane può variare da 1,0 ml fino a 30,0 ml (England e Heimendahl, 2010; Ettinger e Feldman, 2010). L'eiaculato canino è composto da 3 frazioni distinte (Johnston et al., 2001; Kustritz, 2007). La prima frazione o pre-sperma è composta da plasma seminale limpido, privo di spermatozoi, ha origine dalla ghiandola prostatica e la sua funzione principale è quella di irrigare l'uretra (England et al., 2006; Ettinger e Feldman, 2010). Il volume della frazione pre-sperma varia solitamente tra 0,5 e 2,0 ml (Freshman, 2001). La seconda frazione, denominata anche frazione ricca di spermatozoi, ha un aspetto torbido e opalescente con consistenza opaca, di volume variabile tra 0,5 e 5,0 ml, a seconda delle dimensioni testicolari e di variazioni individuali; inoltre, nella sua composizione non dovrebbero essere presenti componenti cellulari oltre agli spermatozoi (England, 1999). Il cane può impiegare fino a 2 minuti per ottenere l'emissione della frazione ricca di spermatozoi (Kutzler, 2005). La terza frazione di roigine prostatica, ha un volume notevole estremamente variabile da 2,5 a 80 ml, ed è nuovamente di colore trasparente.

Una conservazione efficace del seme canino è quindi importante per migliorare i risultati delle principali tecnologie di riproduzione assistita nei cani (Luvoni, 2006). Nell'allevamento l'uso del seme canino congelato è molto richiesto, ma ci sono una serie di sfide in termini di efficienza. È stato riportato che il processo di

crioconservazione diminuisce la capacità degli spermatozoi di fecondare (Bilodeau et al., 2000; Cerolini et al., 2001), riducendo l'equilibrio degli enzimi antiossidanti degli spermatozoi canini e le sue proprietà biologiche generali (Strzezek et al., 2012). Le alterazioni ossidative provocano disfunzioni spermatiche, come la perdita di motilità e vitalità e la compromissione della fusione sperma-ovocita (Aitken et al., 1993). Pertanto, gli antiossidanti possono svolgere un ruolo cruciale nella protezione delle cellule germinali maschili dai danni ossidativi (Fraga et al., 1991), prevenendo la perdita di motilità e la ridotta capacità di fecondare (Aitken et al., 1993; Kokcam e Naziroglu, 2002). La vitamina E (Vit E) è uno dei principali antiossidanti del corpo e svolge un ruolo importante nella protezione di diversi organi dallo stress ossidativo e nella stabilizzazione delle membrane spermatiche (Zhu et al., 2010; Raederstorff et al., 2015). Questa vitamina protegge il testicolo dai danni ossidativi e migliora la qualità dello sperma anche in caprini (Yue et al., 2010), ovini (Yousef et al., 2003) e conigli (Agarwal e Saleh, 2002; Aydilek et al., 2004). Inoltre, diversi oligoelementi agiscono nel processo riproduttivo maschile grazie alla loro elevata attività a livello molecolare. La disponibilità di Zinco (Zn) e Selenio (Se) svolge un ruolo benefico nell'organismo in quanto influenzano la corrispondente attività enzimatica che porta protezione dello sperma contro i danni ossidativi (De Lamirande e Lamothe, 2010; Nenkova et al., 2017). Nei tessuti corporei, lo Zinco rappresenta il secondo elemento più abbondante dopo il Ferro. Nella riproduzione, lo Zinco ha numerose funzioni importanti ed è essenziale per il concepimento, l'impianto e un esito favorevole della gravidanza (Chvapil, 1973; Foresta et al., 2014). Lo Zinco è disponibile in alte concentrazioni nel liquido seminale e potrebbe avere un ruolo nelle proprietà funzionali dello sperma (influenzando la fluidità dei lipidi), nella stabilità delle membrane biologiche, nell'integrità della cromatina dello sperma, nella produzione di radicali di ossigeno libero e nei processi di capacità e reazione acrosomiale (Sunde e Hoekstra, 1980; Gavella e Lipovac 1998; Björndahl e Kvist, 2010; Michailov et al., 2014).

## Materiali e Metodi

Per quest'esperienza si ha avuto parere positivo dal Comitato Etico di Dipartimento con Istanza codice 066/2021. La raccolta e la conservazione del materiale seminale dei Cirnechi è avvenuta nella primavera del 2022 presso i locali dell'OVUD di Messina ed è stata inserita in una piccola prova per la valutazione di un integratore alimentare fornito dall'azienda Aurora Biofarma. Per la crioconservazione dei riproduttori canini sono state seguite le indicazioni sanitarie secondo l'Articolo 36 del Reg Del UE 2020/686. Tuttavia, ad oggi l'articolo 36 risulta sospeso dall'articolo 1 del Reg Del UE 2023/647. Per quanto riguarda le modifiche e le sospensioni degli articoli 39-41, riguardanti gli spostamenti di materiale germinale di cani e gatti tra Stati membri, non sono da tenersi in considerazione in quanto il materiale seminale ottenuta sarà esclusivamente stoccato presso la criobanca Sicilgermobank.

Sono state effettuate 3 raccolte e 2 congelamenti di materiale seminale per singolo soggetto. Ogni Cirneco è stato visitato 30 giorni prima della raccolta, durante la visita clinica, si faceva una valutazione approfondita dell'anamnesi, nonché una valutazione clinica e ultrasonografica dell'apparato genitale, si valutava l'assenza di patologie metaboliche e infettive in grado di influenzare la sfera riproduttiva, accertandosi che il soggetto fosse esente da brucellosi (*Brucella canis*), leptospirosi (*Leptospira interrogans*) e leishmaniosi (*Leishmania infantum*). Inoltre, per evitare l'astinenza e standardizzare la riserva extragonadale nelle indagini successive si procedeva ad un prelievo di seme, esclusivamente per "svuotare" il soggetto (T-30), quindi l'eiaculato ottenuto veniva eliminato. La metodica utilizzata per il prelievo, sia in questo caso sia successivamente, è stata quella manuale descritta da Kutzler (2005). Per la raccolta si utilizzava una cagna *teaser*. Questa si poneva davanti al maschio, in modo tale da favorire l'eccitazione. L'operatore, inizialmente, massaggiava il pene del cane attraverso il prepuzio a livello del bulbo del glande fino a quando non si sviluppa un'erezione parziale. Per favorire l'eccitazione veniva concesso ai soggetti di montare la cagna. Successivamente il prepuzio veniva represso caudalmente oltre il bulbo del glande, stringendolo tra indice e pollice e applicando una pressione con le dita. La manipolazione avanti e indietro del pene in questa fase non era necessaria in quanto

poteva comportare la perdita dell'erezione (detumescenza). Durante questa fase il soggetto poteva dare delle spinte pelviche, favorendo l'erezione completa. Il pene eretto veniva ruotato caudalmente di 180°, mantenendo il dorso del pene dorsalmente. Durante questa fase l'operatore continuava ad applicare una pressione alla base del glande. Ruotato il pene iniziava la fase eiaculatoria. L'eiaculato veniva raccolto in delle provette Falcon da 50 ml; per le procedure venivano raccolte solamente la prima e la seconda frazione. Il rilascio della frazione ricca di spermatozoi richiedeva solitamente meno di 2 minuti. Nei 30 giorni successivi i soggetti venivano tenuti a riposo sessuale ed isolati da altri soggetti di stato sanitario inferiore. In questo periodo si uniformava la dieta alimentare, attraverso un prodotto secco di mantenimento al pesce, fornito dalla ditta Aurora Biofarma.

Trenta giorni dopo lo svuotamento (T0) si procedeva alla prima vera raccolta. La procedura di raccolta era la stessa, l'eiaculato ottenuto, veniva portato in laboratorio cercando di mantenerlo tra la temperatura corporea (37 °C) e la temperatura ambiente (20 °C). In laboratorio il seme veniva valutato per colore, volume, motilità, concentrazione, morfologia. La fase successiva era quella di valutazione dell'eiaculato ottenuto. Il seme veniva valutato sia macroscopicamente (volume, colore, viscosità), sia microscopicamente (concentrazione, motilità totale e progressiva, morfologia, vitalità). La concentrazione veniva valutata utilizzando una camera di Makler e confrontando i dati con la valutazione elettronica SCA. Per la valutazione della vitalità e della morfologia un operatore prelevava una goccia (3µl) di seme dal campione, che veniva messa in un vetrino ad orologio alla quale venivano aggiunte una goccia di eosina e due gocce di nigrosina (tecnica di Blom), successivamente veniva miscelato e strisciato su un vetrino portaoggetti, per essere montato e letto in seguito.

Contemporaneamente un altro operatore prelevava una goccia (3µl) di seme dal campione che poneva in una camera di Leja per la valutazione del seme, posta su un microscopio ottico con tavolinetto riscaldato a 37°C, con telecamera collegata a un computer con sistema SCA. Si procedeva quindi con l'analisi; l'eiaculato veniva valutato ad un ingrandimento di 10x a contrasto di fase. Messo a fuoco il campione e

dopo aver dato una prima valutazione visiva, si procedeva con la valutazione della motilità attraverso il sistema SCA. Avviato il programma SCA Evolution, si procedeva alla registrazione dell'animale e del campione, inserendo, in particolare, i dati relativi al volume o di eventuali diluizioni del campione, in modo tale da permettere successivamente al software l'elaborazione dei dati. Avviata l'analisi e messo a fuoco il campione, venivano acquisite 5 o più videoregistrazioni di campi diversi, scegliendo dei campi privi di aggregati o elementi estranei, attraverso le quali il sistema calcolava in automatico una serie di parametri, dai quali elabora alla fine un referto. Il sistema dalle registrazioni fatte calcolava la concentrazione degli spermatozoi per ml riportando anche il numero totale degli spermatozoi per campione di seme. Dopodiché, passava alla valutazione della motilità totale, calcolando i PR (progressivi), NP (non progressivi), IM (immobili); misurava l'area delle testa, il numero di cellule rotonde, le traiettorie circolari, la VLC (velocità curvilinea), la VSL (velocità lineare), la VAP (velocità media), la LIN (indice di linearità), la STR (indice di rettilinearità), la WOB (indice di oscillazione), la AL (ampiezza del movimento laterale della testa), la BFC (frequenza battito), la MC (*Mucous penetration*) e gli H (iperattivi). Tuttavia, nella fase pre-congelamento si tenevano in considerazione principalmente i valori di motilità totale e progressiva.

Effettuata la valutazione preliminare si procedeva al congelamento del seme utilizzando il metodo Uppsala. Questa metodica è una metodica *two steps*, che prevede due fasi di diluizione prima del congelamento (CONG 1 e CONG 2) e nell'aggiunta di mestruo di scongelamento (THAW) (Linde-Forsberg, 2022). Il seme veniva centrifugato ad una velocità 700 x g per 6 minuti e il plasma seminale (surnatante) rimosso dopo la centrifuga. Dopo di che si procedeva alla prima diluizione, aggiungendo l'*extender* CONG 1 a temperatura ambiente, si aggiungeva una quantità di mestruo pari a quella necessaria per ottenere una concentrazione di  $400 \times 10^6$  spermatozoi/ml. Successivamente la procedura prevedeva una fase di equilibratura a 4°C della durata di 75 min. Passata la fase di equilibratura si aggiungeva al seme diluito un volume di CONG 2, refrigerato a 4°C, pari a quello precedente appena prima del congelamento miscelando accuratamente i campioni; la concentrazione finale era di circa  $200 \times 10^6$  spermatozoi/ml. Il seme, quindi, veniva

caricato in paillettes da 0,5 ml precedentemente marcate con i dati relativi all'animale e allo stabilimento secondo l'articolo 11 del Reg Del UE 2020/686. Il congelamento avveniva in vapori d'azoto per 10 min, ad un'altezza di 6 cm dal livello di azoto liquido (velocità stimata:  $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$  da  $+4$  a  $-140^{\circ}\text{C}$ ). Trascorso il tempo, le *paillettes*, venivano immerse in azoto liquido e successivamente stoccate in un bidone criogenico dedicato.

Nei 30 giorni successivi si aggiungeva alla dieta dei soggetti un integratore alimentare a base di zinco, echinacea, DL-metionina, L-lisina, L-arginina, vitamine gruppo B, vitamina E, Selenio, Taurina (VISVIT®, Aurora Biofarma, Italia), il cui numero di compresse giornaliere suggerito dall'azienda dipende dal peso del cane; inoltre, per standardizzare le assunzioni giornaliere i cani seguivano la stessa alimentazione. Alla scadenza dei 30 giorni di integrazione, si procedeva nuovamente con prelievo, valutazione e congelamento del materiale seminale (T 30).

Dopo 48 ore dal congelamento, un'aliquota per ciascuna partita veniva scongelata per la valutazione finale. Lo scongelamento avveniva a  $37^{\circ}\text{C}$  per 1 minuto e incubate alla stessa temperatura per 14 minuti al seme veniva aggiunto 1 ml di *extender* di scongelamento THAW; quindi, il materiale seminale in esse contenuto veniva miscelato in un'unica provetta. Per la valutazione della motilità 3 aliquote da  $3\mu\text{l}$  venivano poste su 3 diverse camere di Leja preriscaldate a  $37^{\circ}\text{C}$ , da ciascuna delle quali vengono videoregistrati 6 campi microscopici, tramite microscopio a contrasto di fase dotato di obiettivo 10x a contrasto di fase negativo e di tavolinetto termostato tarato a  $37^{\circ}\text{C}$  e analizzate dal software SCA.

## **Risultati e Discussioni**

Per questa esperienza sono stati arruolati 2 soggetti maschi sessualmente maturi di razza Cirneco dell'Etna, Caio del Gelso Bianco di 7 anni e Taominensis Pirro di 18 mesi. I soggetti erano nati e sono rimasti sin dalla nascita in UE. Inoltre, il giorno della raccolta del seme non presentavano sintomi di malattie. Entrambi i Cirnechi

erano marcati mediante l'impianto di un microchip in accordo all'articolo 17, paragrafo 1, del regolamento UE 576/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio.

Il Cirneco è una razza canina dall'indole molto particolare, sono animali molto diffidenti, che si legano molto al padrone e spesso non tollerano le manualità. Per ottimizzare le procedure l'operatore ha preferito che la prima fase (T -30) si svolgesse in un luogo familiare agli animali. In questa fase l'operatore familiarizzava con i 2 soggetti, in particolare col più giovane e diffidente. Trenta giorni dopo (T 0) le operazioni avvenivano nei locali dell'OVUD, in locale tranquillo, in modo tale da non inibire i riproduttori.



*Figura 80. Raccolta manuale del seme canino nel Cirneco dell'Etna.*

Alla prima raccolta (T 0) entrambi i soggetti hanno dato eiaculati soddisfacenti.

Il Cirneco Caio ha dato un eiaculato di 2 ml di volume, di colore bianco/trasparente con una concentrazione di  $180 \times 10^6$  spermatozoi/ml. La motilità totale era del 50%, mentre quella progressiva del 15%. Al test di vitalità (Blom) si riscontrava che il 48 % degli spermatozoi erano vivi e il 52 % morti o con membrana citoplasmatica danneggiata; di questi il 90% presentava caratteristiche normali. Il Cirneco Pirro ha dato un eiaculato di 5 ml di volume, di colore bianco/trasparente con una concentrazione di  $220 \times 10^6$  spermatozoi/ml. La motilità totale era del 100%, mentre quella progressiva del 88%. Al test di vitalità (Blom) si riscontrava che il 95% degli spermatozoi erano vivi e il 5% morti o con membrana citoplasmatica danneggiata; di questi il 95% presentava caratteristiche normali.

Il Cirneco Caio a T 30 ha dato un eiaculato di 1,5 ml di volume, di colore bianco/trasparente con una concentrazione di  $240 \times 10^6$  spermatozoi/ml. La motilità totale era del 100%, mentre quella progressiva del 90%. Al test di vitalità (Blom) si riscontrava che il 95 % degli spermatozoi erano vivi e il 5 % morti o con membrana citoplasmatica danneggiata; di questi il 90% presentava caratteristiche normali. Il Cirneco Pirro ha dato un eiaculato di 5 ml di volume, di colore bianco/trasparente con una concentrazione di  $220 \times 10^6$  spermatozoi/ml. La motilità totale era del 100%, mentre quella progressiva del 84%. Al test di vitalità (Blom) si riscontrava che il 90% degli spermatozoi erano vivi e il 10% morti o con membrana citoplasmatica danneggiata; di questi il 95% presentava caratteristiche normali. Da una prima analisi dei dati pre-congelamento si può vedere come l'integrazione alimentare abbia avuto un effetto positivo sul soggetto più anziano (Caio), mentre sull'altro non ha avuto alcun effetto.

Confrontando i risultati SCA post congelamento (fig. 83-86) vi è una netta differenza tra i due soggetti. Il soggetto Caio, come già si osservava nella fase pre-congelamento, ha avuto una risposta positiva dopo l'integrazione con VISVITT. Infatti, i valori di motilità totale e progressiva sono raddoppiati tra T 0 e T30 (fig. 81). Mentre, l'integratore alimentare, non ha avuto alcun effetto sul soggetto Pirro (fig. 82), i cui parametri erano ottimali già in partenza.

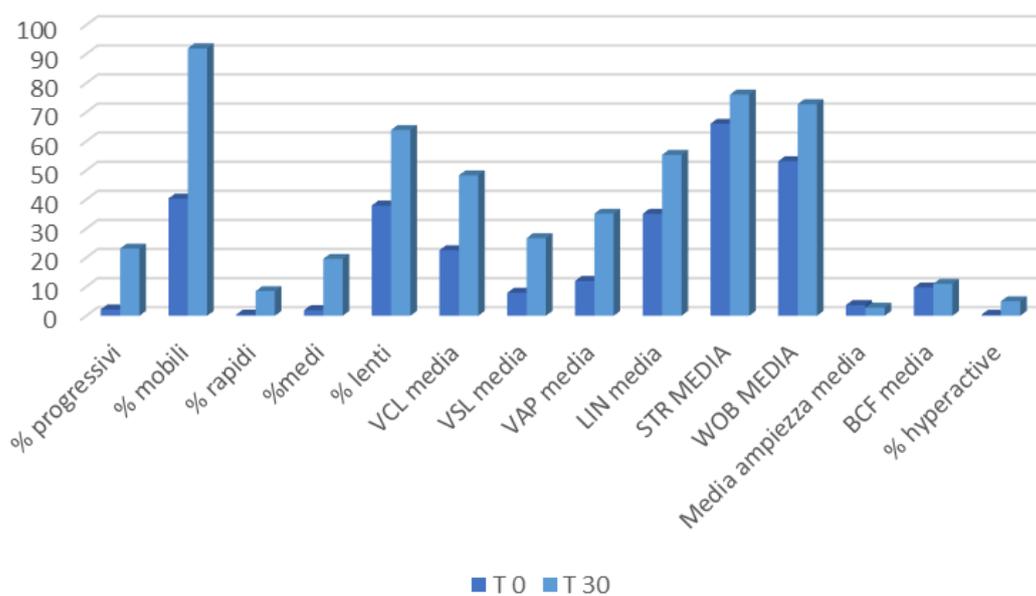


Figura 81. Grafico di confronto della valutazione post congelamento del soggetto Caio a T0 e T30.

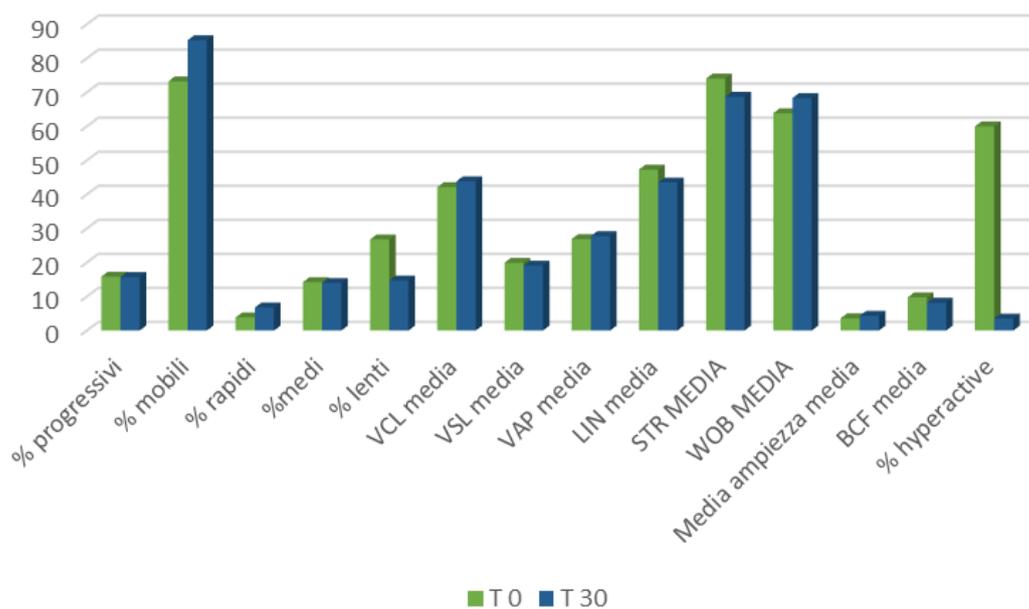


Figura 82. Grafico di confronto della valutazione post congelamento del soggetto Pirro a T0 e T30.

I dati preliminari ottenuti suggeriscono le potenzialità dell'utilizzo di un'integrazione a base di oligoelementi e antiossidanti nei soggetti riproduttori. Gli effetti sembrano essere più evidenti in soggetti che partono con parametri seminali non ottimali,

potenzialmente ipofertili. Tuttavia, data l'esiguità del numero di soggetti quest'esperienza può essere considerata il punto di partenza per studi più approfonditi.

Questa esperienza ci ha consentito, tuttavia, di prelevare e conservare in criobanca il materiale seminale del Cirneco dell'Etna, la razza canina autoctona probabilmente più antica e interessante della Sicilia.

Referenza: 1503378



Data (giorno/mese/anno): 11/05/2022

Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

Codice: aa154 valutazione post 1°congelamento

Animale: cirneco dell'etna, caio del gelso bianco

Ordinario (11/05/2022 15:16:04)

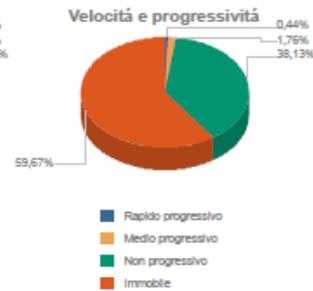
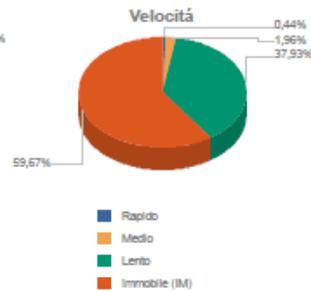
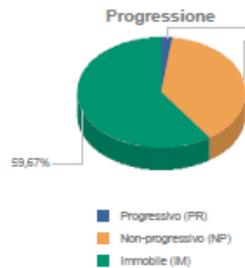
Concentrazione		
103,12 Milioni / ML	51,56 M/Campione	Volume (mL): 0,50

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	45	2,20	2,27	1,14
Non-progressivo (NP)	779	38,13	39,32	19,86
Immobile (IM)	1.219	59,67	61,53	30,76

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	824	40,33	41,59	20,80

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	9	0,44	0,45	0,23
Medio	40	1,98	2,02	1,01
Lento	775	37,93	39,12	19,56
Immobile (IM)	1.219	59,67	61,53	30,76

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	9	0,44	0,45	0,23
Medio progressivo	38	1,78	1,82	0,91
Non progressivo	779	38,13	39,32	19,86
Immobile	1.219	59,67	61,53	30,76



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	18,75	18,51	19,05	18,76	18,63	µm <sup>2</sup>

Referenza: 1503376

Codice: aa154 valutazione post

Animale: cimeco dell'etra, caio del

Data (giorno/mese/anno):



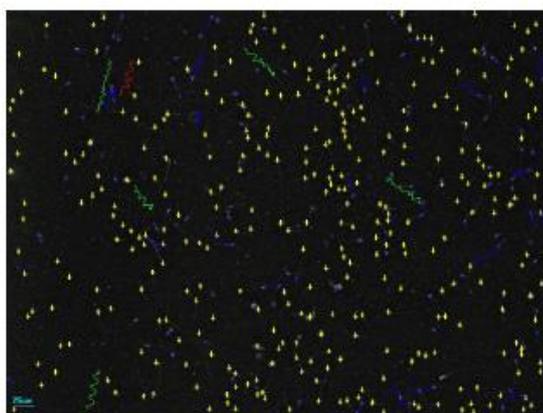
Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

	Concentrazione		Totale		percentuale (%)
Cellule rotonde	0,69	Milioni / ML	Traiettorie circolari	688	33,68 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	22,58	18,40	84,31	107,02	µm/s
Velocità lineare - VSL	7,93	4,94	52,67	67,05	µm/s
Md. Valore - VAP	12,00	8,86	58,91	73,11	µm/s
Indice linearità - LIN	35,10	26,86	62,47	62,65	%
Indice rettilineità - STR	66,05	55,77	89,41	91,71	%
Indice oscillazione - WOB	53,15	48,16	69,87	68,31	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	3,71	3,53	4,47	µm
Frequenza battito - BCF	9,76	9,72	9,90	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	8	0,39	0,40	0,20



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 83. Referto SCA di Caio del Gelso Bianco. Valutazione post-congelamento a T0.

Referenza: 1503380



Data (giorno/mese/anno): 09/06/2022

Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

Codice: 8626



Animale: cimeco, caio del gelso bianco

Ordinario (09/06/2022 11:22:18)

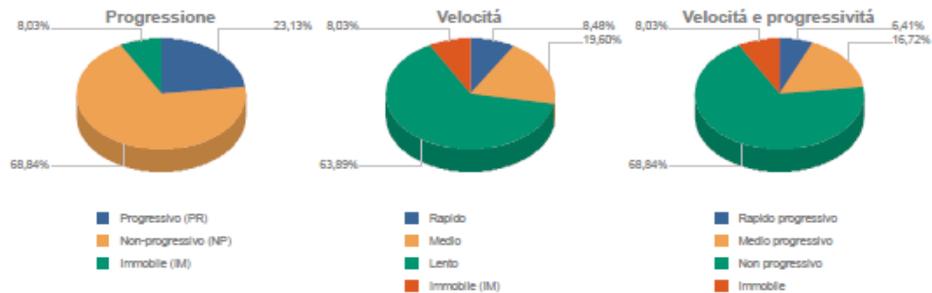
Concentrazione		
116,42 Milioni / ML	58,21 M/Campione	Volume (mL): 0,50

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	458	23,13	26,93	13,48
Non-progressivo (NP)	1.363	68,84	80,14	40,07
Immobile (IM)	159	8,03	9,35	4,67

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	1821	91,97	107,07	53,53

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	168	8,48	9,88	4,94
Medio	388	19,60	22,81	11,41
Lento	1.265	63,89	74,38	37,19
Immobile (IM)	159	8,03	9,35	4,67

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	127	6,41	7,47	3,73
Medio progressivo	331	16,72	19,46	9,73
Non progressivo	1.363	68,84	80,14	40,07
Immobile	159	8,03	9,35	4,67



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	23,16	19,10	23,37	24,03	23,31	µm <sup>2</sup>

Referenza: 1503380

Codice: 6626

Animale: dimeo, caio del gelso

Data (giorno/mese/anno):



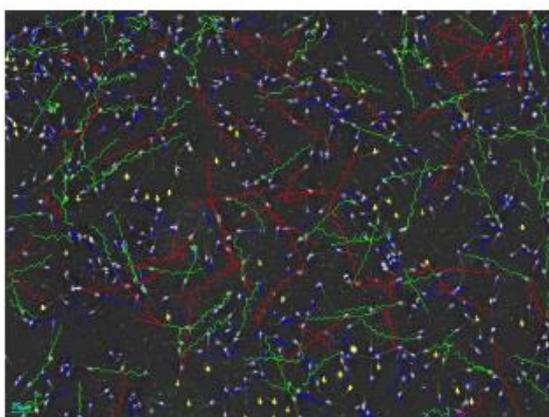
Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

	Concentrazione			Totale	Percentuale (%)
Cellule rotonde	0,14	Milioni / ML	Traiettorie circolari	1.081	53,59 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	48,29	29,08	83,53	111,36	µm/s
Velocità lineare - VSL	28,73	11,63	55,87	72,67	µm/s
Md. Valore - VAP	35,14	18,86	65,67	86,96	µm/s
Indice linearità - LIN	55,36	40,00	66,89	65,26	%
Indice rettilineità - STR	76,07	61,67	85,09	83,56	%
Indice oscillazione - WOB	72,77	64,85	78,61	78,09	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	2,84	2,62	3,33	µm
Frequenza battito - BCF	10,99	10,56	11,88	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	101	5,10	5,94	2,97



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura84. Referto SCA di Caio del Gelso Bianco. Valutazione post-congelamento a T30.

Referenza: 1503377



Data (giorno/mese/anno): 11/05/2022

Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

Codice: aa155 valutazione post 1°congelamento

Animale: cimeco dell'Etna, Pirro Taominensis

Ordinario (11/05/2022 15:29:24)

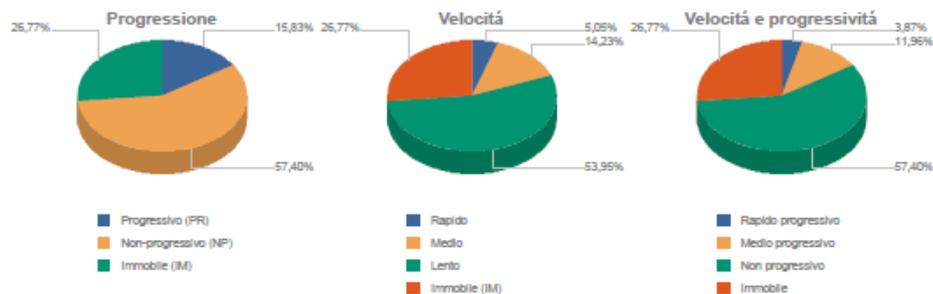
Concentrazione		
93,03 Milioni / ML	46,51 M/Campione	Volume (mL): 0,50

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	307	15,83	14,73	7,36
Non-progressivo (NP)	1.113	57,40	53,40	26,70
Immobile (IM)	519	26,77	24,90	12,45

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	1420	73,23	68,13	34,06

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	98	5,05	4,70	2,35
Medio	276	14,23	13,24	6,62
Lento	1.046	53,95	50,18	25,09
Immobile (IM)	519	26,77	24,90	12,45

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	75	3,87	3,60	1,80
Medio progressivo	232	11,96	11,13	5,57
Non progressivo	1.113	57,40	53,40	26,70
Immobile	519	26,77	24,90	12,45



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità µm <sup>2</sup>
	20,94	19,24	21,19	22,71	22,58	

Referenza: 1503377

Codice: aa155 valutazione post

Animale: cimeco dell'Etna, Pirro

Data (giorno/mese/anno):



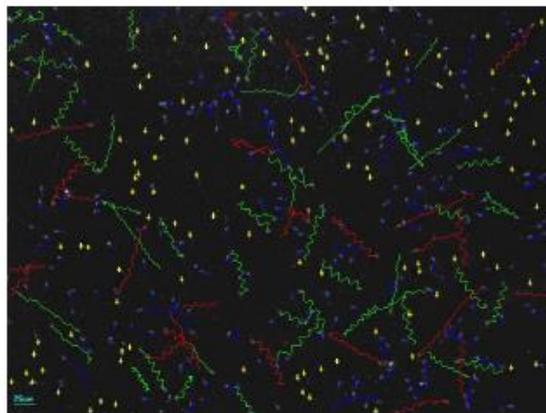
Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

	Concentrazione		Traiettorie circolari	
Cellule rotonde	0,16	Milioni / ML	982	50,64 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	42,13	24,29	85,44	110,18	µm/s
Velocità lineare - VSL	19,93	7,84	50,52	62,81	µm/s
Md. Valore - VAP	26,91	13,54	60,11	78,01	µm/s
Indice linearità - LIN	47,30	32,28	59,13	57,01	%
Indice rettilineità - STR	74,06	57,88	84,03	82,63	%
Indice oscillazione - WOB	63,87	55,76	70,36	68,98	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	3,60	3,37	4,22	µm
Frequenza battito - BCF	9,78	9,42	10,81	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	60	3,09	2,88	1,44



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 85. Referto SCA di Taorminensis Pirro. Valutazione post-congelamento a T0.

Referenza: 1503381



Data (giorno/mese/anno): 09/06/2022

Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

Codice: 0627



Animale: cirneco , taorminensis piro

Ordinario (09/06/2022 11:37:46)

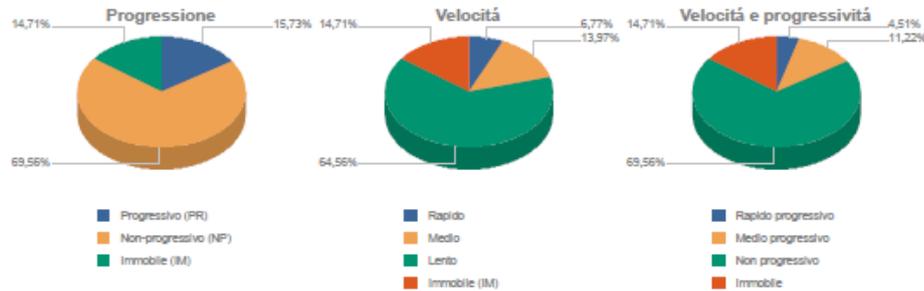
Concentrazione		
137,51 Milioni / ML	68,76 M/Campione	Volume (mL): 0,50

Progressione	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Progressivo (PR)	509	15,73	21,63	10,81
Non-progressivo (NP)	2.251	69,56	95,66	47,83
Immobile (IM)	476	14,71	20,23	10,11

	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Mobile	2760	85,29	117,28	58,64

Velocità	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido	219	6,77	9,31	4,65
Medio	452	13,97	19,21	9,60
Lento	2.089	64,56	88,77	44,39
Immobile (IM)	476	14,71	20,23	10,11

Velocità e progressività	Totale	Percentuale (%)	Concentrazione	
			Milioni / ML	M/Campione
Rapido progressivo	146	4,51	6,20	3,10
Medio progressivo	363	11,22	15,43	7,71
Non progressivo	2.251	69,56	95,66	47,83
Immobile	476	14,71	20,23	10,11



Area Testa	Media	Immobile (IM)	Lento	Medio	Rapido	Unità
	22,57	19,82	22,84	24,02	17,29	µm <sup>2</sup>

Referenza: 1503361

Codice: 6627

Animale: cimeco, taorminensis

Data (giorno/mese/anno):



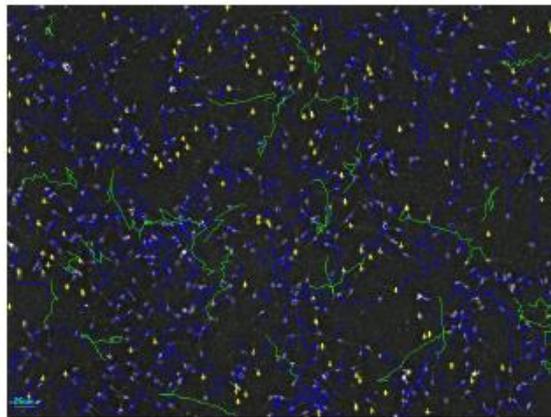
Centro: Ospedale Veterinario Universitario Didattico

	Concentrazione		Totale	percentuale (%)
Cellule rotonde	0,59	Milioni / ML	1.966	60,75 %

Media. Valori di velocità	Media	Lento	Medio	Rapido	Unità
Velocità curvilinea - VCL	43,87	28,06	81,05	84,28	µm/s
Velocità lineare - VSL	19,09	9,22	43,23	42,71	µm/s
Md. Valore - VAP	27,78	16,33	55,96	54,64	µm/s
Indice linearità - LIN	43,50	32,86	53,34	50,67	%
Indice rettilineità - STR	68,71	56,47	77,26	78,17	%
Indice oscillazione - WOB	63,32	58,18	69,05	64,82	%

Media. Valori di altri parametri	Media	Medio	Rapido progressivo	Unità
Media. Ampiezza del movimento laterale de	4,35	4,09	3,29	µm
Frequenza battito - BCF	8,19	7,71	8,10	Hz

	Totale	Percentuale (%)	Milioni / ML	M/Campione
Hyperactive	113	3,49	4,80	2,40



Commenti:

Tecnico: Catone, Giuseppe

Figura 86. Referto SCA di Taorminensis Pirro. Valutazione post-congelamento a T30.

## Ringraziamenti

Si ringraziano tutti coloro che hanno collaborato alla realizzazione di questa tesi dottorale. In particolare, si ringrazia:

- il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina; per il supporto tecnico e amministrativo;
- il tutor, nella figura del professor Gabriele Marino, docente di riproduzione animale, responsabile del gruppo di raccolta embrioni messinese;
- il co-tutor, professoressa Annamaria Passantino, docente di legislazione veterinaria, per la preziosa guida nel percorso dottorale;
- l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Messina, attraverso il Direttore Sanitario Prof. Giuseppe Catone;
- il professor Michele Panzera, docente di etologia e benessere animale, responsabile scientifico del Progetto Sicilgermobank;
- l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", attraverso il dott. Antonio Lastra, per la proficua collaborazione nella valutazione sanitaria dei donatori;
- Il Dottor Michelangelo La Spisa, medico veterinario buiatra, componente del gruppo di raccolta embrioni messinese;
- il Dottor Vincenzo Firrincieli, medico veterinario buiatra, esperto di riproduzione e benessere animale;
- tutti i collaboratori del Progetto Sicilgermobank.

Questo lavoro è stato supportato dal Progetto Sicilgemobank, FEASR-PSR Sicilia 2014–2020, Misura 10, Sottomisura 10.2 b, CUP G49J21003940009.



**Sicil  
Germo  
Bank**



## Bibliografia

1. Abril-Sánchez S, Crosignani N, Freitas-de-Melo A, Terrazas A, Damián JP, Beracochea F, Silveira P, Ungerfeld R (2018). Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 12: 2598-608.
2. Agarwal A, Saleh RA (2002). Role of oxidants in male infertility: Rationale, significance, and treatment. *Urologic Clinics of North America*, 29:817-27.
3. Agraria.org. Atlante delle razze ovine e caprine. <https://www.agraria.org/caprini/girgentana.htm>
4. AIA (1996). Bollettino dei controlli della produttività del latte, Vol. IV, ATEL S.p.A., Roma.
5. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D (1993). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97:441-50.
6. Alabiso M, Maniaci G, Giosuè C, Di Grigoli A, Bonanno A (2021). Fatty acid composition of salami made by meat from different commercial categories of indigenous dairy cattle. *Animals (Basel)*, 11:1060.
7. Alberghina D, Fazio F, Arfuso F, Scianò S, Zumbo A, Piccione G (2013). Reference intervals of serum protein concentrations from clinically healthy female Ragusana donkeys (*Equus asinus*) determined by cellulose acetate electrophoresis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33:433-36.
8. Alm K, Peltoniemi OA, Koskinen E, Andersson M (2006). Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 41:210-3.
9. Almond G, Britt J, Flowers B, Glossop C, Levis D, Morrow M, See T (1998). *The Swine AI Book. A field and technicians' guide to artificial insemination in swine.* Gronie R (Ed), 2nd ed, Morgan Morrow, North Carolina (USA)
10. Altomonte I, Salari F, Neglia A, Martini (2016). Milk yield and quality characteristics of Cinisara and Modicana cows reared on a farm in the province of Palermo (Sicily-Italy). *Large Animal Review*, 22:251-4.

11. Alvarenga MA, Papa FO, Ramires Neto C (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32:521-30.
12. Ambrosoli F (1833). *Della geografia di Strabone*. Paolo Andrea Molina, Milano (Italia). Volume 3, Libri XVII.
13. ANARB, Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna, gestione dei Libri genealogici delle razze autoctone DM 38687 del 04/12/2019. Standard di razza della Modicana.
14. ANAS (2023). Associazione Nazionale Allevatori Suini. Schede tecniche razze – Nero Siciliano. <https://www.anas.it/html/suis/schedet/NS.html>.
15. Anel L, De Paz P, Álvarez M, Chamorro C, Boixo J, Manso A, González M, Kaabi M, Anel E (2003). Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, 60:1293-308.
16. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel Y, Gacitua H (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187:77-81.
17. Associazione Nazionale della Pastorizia (1984). *Libro Genealogico Nazionale della Specie Caprina*. Roma (Italia). P. 69.
18. Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C (1996). Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, 46:791-7.
19. Aydılek N, Aksakal M, Karakilçik AZ (2004). Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. *Andrology*, 36:277-81.
20. Balbo SM (1995). L'influenza dell'arabo-orientale sul cavallo siciliano. In M. Savier M (Ed.). *L'Asil Arabo – Il cavallo nobile d'Arabia*. R & R Editrice. Spoleto (Italia).
21. Balduzzi (2007). Seme bovino sessato in Italia. *Il controllo ufficiale del Seme, 2007*, pp. 99-100
22. Banca dati nazionale (BDN) (2023). Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, G. Caporale, Centro Servizi Nazionale. [https://www.vetinfo.it/j6\\_statistiche/#/report-pbi/11](https://www.vetinfo.it/j6_statistiche/#/report-pbi/11).
23. Barbas JP, Mascarenhas RD (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 10:49-62.
24. Barker CA, Gandier JC (1957). Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 21:47-51.
25. Baroncini R (1987). *L'asino, il mulo e il bardotto*. Edagricole, Bologna (Italia).

26. Bath GF (1998). Management of pain in production animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 59:147-6.
27. Bazzano M, Marchegiani A, Laus F (2022°). Effects of dietary, supplement containing *Lepidyum Meyenii*, *Laminaria* and *Equisetum* extracts on equine frozen semen. 19<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction (ICAR). 26-30 giugno. Bologna (Italia).
28. Bazzano M, Bonfili, Eleuteri AM, Serri E, Scollo C, Yaosen Y, Tesei B, Laus F (2022b). Assessment of serum amyloid A concentrations and biochemical profiles in lactating jennies and newborn Ragusano donkey foals around parturition and one month after foaling in Sicily. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 57:262-68.
29. Behan JR, Watson PF (2004). A commercially based field trial to investigate trans-cervical insemination at reduced volume and sperm concentration in sows. In: França LR, Godinho HP, Henry M, Melo MIV (eds), *Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal Porto Seguro*, pp. 573.
30. Beja-Pereira A, England PR, Ferrand N, Jordan S, Bakhiet AO, Abdalla MA, Mashkour M, Jordana J, Taberlet P, Luikart G (2004). African origins of the domestic donkey. *Science*, 304:1781.
31. Bennemann PE, Milbradt E, Diehl GN, Weber D, Schimidt ACT, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP (2004). Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination at different preovulatory intervals. *Animal Reproduction*, 1:106-10.
32. Berliner VR (1940). An improved artificial vagina for the collection of stallion and jack semen. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 96:667-70.
33. Bertolini F, Scimone C, Geraci C, Schiavo G, Utzeri VJ, Chiofalo V, Fontanesi L (2015). Next generation semiconductor-based sequencing of the donkey (*Equus asinus*) genome provided comparative sequence data against the horse genome and a few millions of single nucleotide polymorphisms. *PLOS One*, 10, e0131925.
34. Betteridge K J (1977). Summary of factors affecting success rates in surgical embryo transfer. In: *Embryo Transfer in Farm Animals*. Canada Department of Agriculture. Research Branch. Monograph, 16:29-31.
35. Bliss SB, Voge JL, Hayden SS, Teague SR, Brinsko SP, Love CC, Varner DD (2012). The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*, 77:1232-9.

36. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55: 282-8.
37. Björndahl L, Kvist U (2010). Human sperm chromatin stabilization: A proposed model including zinc bridges. *Molecular Human Reproduction*, 16:23-9.
38. Bonanzinga M, Franci O, Cappè F, Sirtori F, Crovetto A, Esposito S, Pugliese C (2010). The breeding of the main local pig breeds in Mediterranean Europe. *Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens*, 101:117-24.
39. Bordonaro S, Guastella AM, Criscione A, Zuccaro A, Marletta D (2012). Genetic diversity and variability in endangered Pantesco and two other Sicilian donkey breeds assessed by microsatellite markers. *The Scientific World Journal*, 648427:6.
40. Bordonaro S, Dimauro C, Criscione A, Marletta D, Macciotta NP (2013). The mathematical modelling of the lactation curve for dairy traits of the donkey (*Equus asinus*). *Journal of Dairy Science*, 96:4005-14.
41. Brumini D, Furlund D, Comi I, Devold TG, Marletta D, Vegarud GE, Jonassen CM (2013). Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echovirus type 5. *International Dairy Journal*, 28:109-11.
42. Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Sciences*, 62:265-75.
43. C 1032/S-287/A. Circolare 21 settembre 2000, n. 1032/S-287/A. Riproduzione animale. GURS Parte I n. 53 del 2000 (regione.sicilia.it).
44. Caldin M, Furlanello T, Solano-Gallego L, De Lorenzi D, Carli E, Tasca S, Lubas G (2005). Reference ranges for haematology, biochemical profile and electrophoresis in a single herd of Ragusana donkeys from Sicily (Italy). *Comparative Clinical Pathology*, 14:5-12.
45. Camillo F, Panzani D, Scollo C, Rota A, Crisci A, Vannozzi I, Balbo S (2010). Embryo recovery rate and recipients' pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys. *Theriogenology*, 73:959-65.
46. Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D, Seabury C, Sonstegard TS, Fahrenkrug SC (2016). Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nature Biotechnology*, 34:479-81.

47. Casida LE, Meyer RK, McShan WH, Wisnicky W (1943). Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 4:21-7.
48. Cavalero TMS, Papa FO, Schmith RA, Scheeren VFC, Canuto LEF, Gobato MLM, Rodrigues LT, Freitas-Dell'Aqua CP (2019). Protocols using detomidine and oxytocin induce ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*, 140:93-8.
49. Cavalero TMS, Segabinazzi LGTM, Scheeren VFC, Canuto LEF, Gobato MLM, Papa FF (2020). Alternative protocol using imipramine, detomidine, and oxytocin for semen collection in stallion with ejaculatory dysfunction. *Journal of Equine Veterinary Science*, 93:103205.
50. CED (1992). United Nations Conference on Environment and Development, Rio de Janeiro, Brazil, 3-14 June 1992. <https://www.un.org/en/conferences/environment/rio1992>.
51. Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121: 395-401.
52. Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpoux B (2008). Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reproduction in Domestic Animals*, 43:40-7.
53. Chianese L, Portolano B, Troncone E, Pizzolongo F, Ferranti P, Addeo F, Alicata ML, Pilla F, Calagna G (2000). The quality of Girgentana goat milk. 7<sup>th</sup> International Conference on Goats. 15-18 Maggio. Tours (France).
54. Chiari E (1901). *Trattato di Ippologia*. UTET, Torino (Italia).
55. Chicoli N (1870). *Riproduzione, allevamento e miglioramento degli animali domestici in Sicilia*. Stamperia di G. Lorusnaider, Palermo (Italia).
56. Chiofalo L (2007). Nero Siciliano pig. 6th International Symposium on the Mediterranean Pig. 11-13 ottobre. Capo d'Orlando (Italia).
57. Chiofalo L, Micari P (1982). Proteins of the milk and genetic variants in certain sheep populations of Sicily (Barbaresca-Siciliana). In *Annales de génétique et de Sélection Animale*. EDP Sciences, 14:109.
58. Chiofalo L, Portolano B, Liotta L, Rundo Sotera A, Finocchiaro R (2003). Demographic characterization, inbreeding and genetic variability within Sanfratellano population horse from genealogical data. *Italian Journal of Animal Science*, 2: 592–94.

59. Chiofalo V, Zumbo A, Chiofalo L (1997). Milk fatty acids of Modicana, Italian Frisian and Brown Swiss cows reared in Sicily. 48<sup>th</sup> Annual meeting of the European Association for Animal Production (EAAP). 25-28 agosto. Vienna (Austria).
60. Chiofalo V, Maldonato R, Martin B, Dupont D, Coulon JB (2000). Chemical composition and coagulation properties of Modicana and Holstein cows' milk. *Annales de Zootechnie*, 49: 497-3.
61. Chiofalo V, Zumbo A, Liotta L, Chiofalo B (2004). In vitam performances and carcass traits of "Nero Siciliano" pigs reared outdoor and plein air. In Proceedings of the 5th International Symposium of the Mediterranean Pig. 16-19 November, Tarbes (France).
62. Chiofalo B, Piccolo D, Liotta L (2005). L'asino Grigio Siciliano: aspetti morfologici e produttivi. 7° convegno nazionale sulla biodiversità, 30 marzo – 2 aprile. Catania (Italia).
63. Chvapil M (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Science*, 13:1041-9.
64. Ciampolini R, Casu S, Mastrangelo S, Flori L, Moazami Goudarzi K, Sechi T, Laloë D (2015). Genetic diversity of Mediterranean cattle breeds related to geography and climate. *Italian Journal of Animal Science*, 14:65-6.
65. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM (1998). Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-8.
66. Coleman DA, Dailey RA, Leffel RE, Baker RD (1987). Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *Journal of Dairy Science*, 70:858-66.
67. Colenbrander B, Feitsma H, Grooten HJ (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*, 48: 207-15.
68. Colli L, Perrotta G, Negrini R, Bomba L, Bigi D, Zambonelli P, Verini Supplizi A, Liotta L, Ajmone-Marsan P (2013). Detecting population structure and recent demographic history in endangered livestock breeds: the case of the Italian autochthonous donkeys. *Animal Genetics*, 44:69-78.
69. Contri A, Gloria A, Robbe D, Sfirro M P, Carluccio A (2012). Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Animal Reproduction Science*, 136:74-80.

70. Cortellari M, Bionda A, Talenti A, Ceccobelli S, Attard G, Lasagna E, Crepaldi P, Liotta L (2021). Genomic variability of Cirneco dell'Etna and the genetic distance with other dog breeds. *Italian Journal of Animal Science*, 20: 204-14.
71. Cosenza G, Ciampolini R, Iannaccone M, Gallo D, Auzino B, Pauciuolo A (2018). Sequence variation and detection of a functional promoter polymorphism in the lysozyme c-type gene from Ragusano and Grigio Siciliano donkeys. *Animal Genetics*, 49:270-1.
72. CPB (2000). Cartagena Protocol on Biosafety to the convention on biological diversity. Montreal, 29 January 2000. Ch\_XXVII\_08\_ap.pdf (un.org).
73. CPSRS (2023). Piano strategico della PAC 2023-2027 complemento di programmazione regionale per lo sviluppo rurale disposizioni attuative e procedurali generali per gli interventi di sviluppo rurale "non-sigc" (sistema integrato di gestione e controllo). All. A al DDG 3933/2023 del 31/08/2023. <https://www.psr Sicilia.it/notizie/psp-2023-2027-piano-strategico-della-pac/>
74. Cran DG, Johnson LA, Miller NG (1993). Production of bovine calves following separation of X-and Y-chromosome bearing sperm and in vitro. *The Bovine Practitioner*, 143:4.
75. Criscione A, Mastrangelo S, D'Alessandro E, Tumino S, Di Gerlando R, Zumbo A, Marletta D, Bordonaro S (2022). Genome-wide survey on three local horse populations with a focus on runs of homozygosity pattern. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 139:540-55.
76. Crump J, Crump J (1989). Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis. *Theriogenology*, 31:41-6.
77. Cunsolo V, Saletti R, Muccilli V, Foti S (2007). Characterization of the protein profile of donkey's milk whey fraction. *Journal of Mass Spectrometry*, 42:1162-74.
78. Cunsolo V, Cairone E, Fontanini D, Criscione A, Muccilli V, Saletti R, Foti S (2009). Sequence determination of  $\alpha$ s1-casein isoforms from donkey by mass spectrometric methods. *Journal of Mass Spectrometry*, 44:1742-53.
79. Cunsolo V, Saletti R, Muccilli V, Gallina S, Di Francesco A, Foti S (2017). Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. *Food Research International*, 99:41-57.
80. D'Alessandro E, Liotta L, Pagliaro M, Chiofalo V (2007). Influence of the feeding system on in vitam and post mortem performances of Nero Siciliano pigs. *Italian Journal of Animal Science*, 6:683.

81. D'Alessandro E, Giosa D, Sapienza I, Giuffrè L, Aiese CR, Romeo O, Zumbo A (2019). Whole genome SNPs discovery in Nero Siciliano pig. *Genetics and Molecular Biology*, 42:594-02.
82. DAD-IS (2023). Domestic Animal Diversity Information System. <https://www.fao.org/dad-is/en/>.
83. De Lamirande E, Lamothe G (2010). Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: Involvement of reactive oxygen species and zinc. *Human Reproduction*, 25:1619-30.
84. Dell'Aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS (2001). Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 68:324-5.
85. Di Gregorio P, Di Grigoli A, Di Trana A, Alabiso M, Maniaci G, Rando A, Valluzzi C, Finizio D, Bonanno A (2017). Effects of different genotypes at the CSN3 and LGB loci on milk and cheese-making characteristics of the bovine Cinisara breed. *International Dairy Journal*, 71:1-5.
86. Di Rosa AR, Amato C, Zumbo A (2007a). Morphological traits of the "Pantesco" donkey. *Italian Journal of Animal Science*, 6:646.
87. Di Rosa AR, Ordile R, Di Marco V, Pagliaro M, Sanzarello L, Zumbo A (2007b). Physical and chemical traits of meat of "Nero Siciliano" fattening pigs fed with different diets. In 6th International Symposium on the Mediterranean Pig (p. 228).
88. Didion BA, Braun GD, Duggan MV (2013). Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Animal reproduction science*, 137:189-96.
89. Diehl GN, Amaral Filha WS, Kummer R, Koller F, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP (2006). Nova pipeta para inseminação intra-uterina em suínos. *Ciência Rural*, 36:179-85.
90. Diffloth P (1923). *Italie: Races Italiennes*. In: *Encyclopedie Agricole zootechnie: Races Chavalines*. 5<sup>th</sup> ed. Parigi (Francia). Librairie J.B. Bailliere et Fils.
91. Dlgs 2016/50. Dlgs 50/2016. Decreto Legislativo 18 aprile 2016, n. 50 Attuazione delle direttive 2014/23/UE, 2014/24/UE e 2014/25/UE sull'aggiudicazione dei contratti di concessione, sugli appalti pubblici e sulle procedure d'appalto degli enti erogatori nei settori dell'acqua, dell'energia, dei trasporti e dei servizi postali, nonché per il riordino della disciplina vigente in materia di contratti pubblici relativi a lavori, servizi e forniture. (16G00062) (GU Serie Generale n.91 del 19-

- 04-2016 – Suppl. Ordinario n. 10).  
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2016/04/19/16G00062/sg>.
92. Dlgs 2022/134. Decreto legislativo 5 agosto 2022, n. 134. Disposizioni in materia di sistema di identificazione e registrazione degli operatori, degli stabilimenti e degli animali per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/429, ai sensi dell'articolo 14, comma 2, lettere a), b), g), h), i) e p), della legge 22 aprile 2021, n. 53.
93. Dlgs 52/18. Decreto Legislativo 11 maggio 2018, n. 52 Disciplina della riproduzione animale in attuazione dell'articolo 15 della legge 28 luglio 2016, n. 154. (18G00076) (GU Serie Generale n.120 del 25-05-2018).  
[https://www.gazzettaufficiale.it/atto/stampa/serie\\_generale/originario](https://www.gazzettaufficiale.it/atto/stampa/serie_generale/originario).
94. DM 172/94. Decreto 13 gennaio 1994, n. 172 Regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991, n. 30, recante: "Disciplina della riproduzione animale". (GU Serie Generale n.59 del 12-03-1994).  
[https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=1994-03-12&atto.codiceRedazionale=094G0195](https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=1994-03-12&atto.codiceRedazionale=094G0195)
95. DM 1996/317. Decreto Del Presidente Della Repubblica 30 aprile 1996, n. 317 Regolamento recante norme per l'attuazione della direttiva 92/102/CEE relativa all'identificazione e alla registrazione degli animali. (GU Serie Generale n.138 del 14-06-1996) <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1996/06/14/096G0335/sg>
96. DM 2015/25. Decreto 25 novembre 2015 Misure di prevenzione su base genetica per l'eradicazione della scrapie ovina classica, finalizzate all'incremento dell'allele di resistenza della proteina prionica (ARR) nell'intero patrimonio ovino nazionale. (16°00566) <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2016/01/27/16°00566/sg>.
97. DM 31294/16. DM 31294 del 21/12/2016 di approvazione dell'Avviso pubblico per la presentazione e selezione dei progetti per il periodo 2016-2019 inerenti la sottomisura  
10.2.<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/10866>
98. DM 403/00. Decreto 19 luglio 2000, n. 403. Approvazione del nuovo regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991, n. 30, concernente disciplina della riproduzione animale. (GU n.5 del 08-01-2001).  
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2001/01/08/000G0447/sg>.

99. DM 41184/19. DM n. 41184 del 20/12/2019 di approvazione del II Avviso pubblico per la presentazione e selezione dei progetti per il periodo 2020-2023 Sottomisura 10.2  
<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/14978>
100. DP 11/00. Decreto Presidenziale 6 marzo 2000, n. 11. Regolamento concernente la disciplina della riproduzione animale. (GU 3° Serie Speciale – Regioni n.2 del 20-01-2001).  
<https://www.gazzettaufficiale.it/atto/regioni/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2001-01-20&atto.codiceRedazionale=000R0561>
101. Drost M, Brand A, Aarts MH (1976). A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*, 6:503-7.
102. Dziuk PJ, Donker JD, Nichols JR, Petersen WE (1958). Problems associated with the transfer of ova between cattle. Minnesota Agricultural Experiment Station. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy.
103. Eckert J, Niemann H (1995). In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology*, 43:1211-25.
104. Eilts BE (2005). Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 64: 692-7.
105. Elsdon RP, Hasler JF, Seidel Jr GE, (1976). Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 6:523-32.
106. Elsdon RP, Nelson LD, Seidel Jr GE, (1978). Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9:17-26.
107. ENCI (2020). Cirneco dell'Etna. <https://www.enci.it/libro-genealogico/razze/cirneco-dell-etna>.
108. England GCW (1999). Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52: 981-6.
109. England GCW, Heimendahl A (2010). BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology In: Book BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology. BSAVA Library, Gloucester (UK). pp18-22;70-78.
110. England GCW, Burgess CM, Freeman SL, Smith SC, Pacey AA (2006). Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenology*, 66:1410-8.

111. Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H (2002). Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 58:1065-79.
112. Ettinger SJ, Feldman EC (2010). Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat. In: Book Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat, Editor. 7th ed., Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri (USA)
113. Evans G, Maxwell W (1987). Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworth, Sydney, p 194.
114. FAO (1998). Secondary guidelines for development of national farm genetic resource management plans: management of small populations at risk. FAO, Rome, Italy, p. 215.
115. Fazio E, Ferlazzo A, Cristarella S, Medica P, Marino G, Quartuccio M (2017). The stress response of Ragusano donkey (*Equus asinus*) to different semen collection techniques. *Polish Journal of Veterinary Science*, 20:669-76.
116. Finocchiaro R, Zumbo A, Rundo Sotera A, Sardina MT, van Kaam J, Portolano B (2005). La Messinese risorsa autoctona tutta siciliana. *Informatore Zootecnico*, 10: 74-6.
117. Fisher PS, Fairfull RW (1986). The effects of rapid cooling, cold shock of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23:599-7.
118. Flowers WL (1997) Artificial insemination in swine. In Youngquist RS: Current therapy in large animal theriogenology. WB Saunders, Philadelphia (USA).
119. Fogliata G (1910). Tipi e razze equine in rapporto con la produzione equina in Italia, con l'aggiunta della produzione del mulo. Pisa (Italia). Tipografia Editrice Cav. F. Mariotti.
120. Foresta C, Garolla A, Cosci I, Menegazzo M, Ferigo M, Gandin V, De Toni L (2014). Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm. *Human Reproduction*, 29:1134-45.
121. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN (1991). Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America*, 88:11003-6.
122. Freshman JL (2001). Clinical management of the subfertile stud dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31: 259-69.

123. Freshman JL (2002). Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 17:104-7.
124. Gaglio R, Francesca N, Maniaci G, Corona O, Alfonso A, Di Noto AM, Caldamore C, Sardina MT, Portolano B, Alabiso M (2016). Valorization of indigenous dairy cattle breed through salami production. *Meat Science*, 114:58-68.
125. Gallo M, Buttazzoni L (2007). Ruolo del registro anagrafico per la conservazione dei tipi genetici autoctoni. 6th International Symposium on the Mediterranean Pig. 11-13 ottobre. Capo d'Orlando (ME) (Italia).
126. Garde J, Aguado M, Perez S, Garrido D, Pérez-Guzmán M, Montoro V (1994). Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology*, 41:203.
127. Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, Johnson LA (1983). Quantification of the X-and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 1:312-21.
128. Gavella M, Lipovac V (1998). In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. *Andrology*. 30:317-23.
129. Giaccone P, Tortorici M (1982). Udder morphology in Modicana cows. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 8: 281-7.
130. Giaccone P, Bonanno A, Alabiso M, Leto G (1988). Indagine sulla morfologia della bovina Cinisara. *Tecnica. Agricola*; 60:33-5.
131. Giaccone P, Portolano B, Bonanno A, Leto G (1994). Aspetti quantitativi della produzione lattea ed analisi della variabilità ambientale in caprini di razza Girgentana. *Tecniche Agricole*, 46:3-18.
132. Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK (1998). Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 58:28-36.
133. Gottardi L, Brunel L, Zanelli L (1980). New dilution average artificial for insemination in the pig. *Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. AI Madrid* 5:49-53.
134. Granemann LC (2006). Comparative evaluation of stallion semen collected by artificial vagina and intraluminal epididymal flush after castration. MSc Thesis. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 48.
135. Guastella AM, Zuccaro A, Criscione A, Marletta D, Bordonaro S (2011). Genetic analysis of Sicilian autochthonous horse breeds using nuclear and mitochondrial DNA markers. *The Journal of Heredity*, 102:753-8.

136. Guthrie H D, Welch G R (2005). Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, 63: 396-410.
137. Hasler JF (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56:1401-15.
138. Hasler JF, (2010). Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 22:119-25.
139. Hasler JF (2011). Effect of embryo stage on pregnancy rate following direct transfer of bovine embryos frozen in ethylene glycol. *Reproduction, Fertility and Development*, 24:131.
140. Hasler JF (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81:152-69.
141. Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19: 83-99.
142. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH (1987). Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27:139-68.
143. Heape W (1891). III. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proceedings of the Royal Society of London*, 48:457-8.
144. Hendricks BL (1995). *International encyclopedia of horse breeds*. Oklahoma (USA). University of Oklahoma Press.
145. Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GC (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*; 3:101-11.
146. I.I.I. (2017). *Regolamento stalloneria privata*. Istituto Incremento Ippico per la Sicilia.  
[https://www.cavallisicilia.it/30/images/stalloneria\\_privata\\_2017/2022/0\\_Regolamento\\_2022.pdf](https://www.cavallisicilia.it/30/images/stalloneria_privata_2017/2022/0_Regolamento_2022.pdf).
147. Holtz W, Smidt D (1976). The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46: 227-9.
148. Ivanoff EI (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science*, 12:244-56.
149. Johnson C (2006). Current concepts on infertility in the dog. *Waltham focus*, 16.

150. Johnson LA (1991). Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted x- and y-bearing sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 26: 309-14.
151. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of reproduction*, 41:199-203.
152. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000): Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62:143-72.
153. Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS (2001). Semen collection, evaluation, and preservation. *Canine and Feline Theriogenology*. W.B. Saunders, Philadelphia (USA), pp 287-306, 2001.
154. Kirkwood RN, Vadnais ML, Abad M (2008). Practical application of seminal plasma. *Theriogenology*, 70:1364-7.
155. Knox RV (2016). Artificial insemination in in pigs today. *Theriogenology*, 85:83-93.
156. Kokcam I, Naziroglu M (2002). Effects of vitamin E supplementation on blood antioxidants levels in patients with Behçet's disease. *Clinical Biochemistry*, 35:633-9.
157. Kustritz MVR (2007). The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, 68: 329-7.
158. Kutzler MA (2005). Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64: 747-54.
159. L 1981/689. Legge 24 novembre 1981, n. 689 Modifiche al sistema penale (GU Serie Generale n.329 del 30-11-1981 – Suppl. Ordinario). <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1981/11/30/081U0689/sg>.
160. L 1991/30. Legge 15 gennaio 1991, n. 30 Disciplina della riproduzione animale (GU Serie Generale n. 24 del 29-01-1991). <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1991/01/29/091G0052/sg>.
161. L 2015/194. Legge 1° dicembre 2015, n. 194. Disposizioni per la tutela e la valorizzazione della biodiversità d'interesse agricolo e alimentare (GU n. 288 del 11-12-2015). <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2015/12/11/15G00210/sg>.
162. L 2021/53. Legge 22 aprile 2021, n. 53 Delega al Governo per il recepimento delle direttive europee e l'attuazione di altri atti dell'Unione europea – Legge di

- delegazione europea 2019-2020(21G00063) (GU Serie Generale n.97 del 23-04-2021) <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2021/04/23/21G00063/SG>.
163. La Spisa M, Marino G, Zanghì A, Chiofalo V (2018). First data of multiple ovulation and embryo transfer in Modicana cows. 72° Congress of the Italian Society of Veterinary Sciences (SISVet) & 16° Congress of the Italian Society of Animal Reproduction (SIRA). 20-22 giugno. Torino (Italia).
  164. Lanza M, Landi C, Scerra M, Galofaro V, Pennisi P (2009). Meat quality and intramuscular fatty acid composition of Sanfratellano and Haflinger foals. *Meat Science*, 81:142-7.
  165. Leboeuf B, Restall B, Salamon S (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Sciences*, 62:113-1.
  166. Leenhouders JI, Merks JW M (2013). Suitability of traditional and conventional pig breeds in organic and low-input production systems in Europe: Survey results and a review of literature. *Animal Genetic Resources*, 53:169-84.
  167. Li H, Zhang XG, Fang Q, Liu Q, Du RR, Yang GS, Wang LQ, Hu JH (2017). Supplemental effect of different levels of taurine in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. *Animal Science Journal*, 88:1692-9.
  168. Lincoln GA, Davidson W (1977). The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49:267-76.
  169. Linde-Forsberg C (2022). Hints on dog semen freezing, cryoextenders, and frozen semen artificial insemination. In *Proceedings of Society for Theriogenology Meeting Aug* (pp. 303-320).
  170. Liotta L, Chiofalo L (2004). Evoluzione morfo-biometrica della popolazione cavallina Sanfratellana. 68° convegno Società Italiana di Ippologia. "New findings in equine practices". 7-9 luglio. Campobasso (Italia).
  171. Liotta L, Chiofalo L (2007). Carne e caciocavallo dalla bovina Cinisara. *Informatore Zootecnico. Edagricole*, 12:33-6.
  172. Liotta L, Chiofalo V (2011). Razze zootecniche in pericolo di estinzione: pecora Barbaresca Siciliana. *Vita in campagna, Associazione rare*, 10.
  173. Liotta L, Chiofalo B, Zumbo A, Chiofalo V (2001). In vitam parameters and energetic metabolism of Nero dei Nebrodi Pigs living in extensive condition.

- Preliminary remarks. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie. 19-22 settembre, Rimini (Italia).
174. Liotta L, Chiofalo B, Chiofalo L (2005). Caratterizzazione demografica e fenotipica dell'asino Grigio Siciliano. 7° Convegno Nuove acquisizioni in materia di Ippologia. 22-23 giugno Lodi (Italia).
  175. Liotta L, Trentacoste F, Magazzù G, D'Angelo G, Chiofalo V (2015). Technological and quality characteristics of bresaola from Cinisara cattle breed. 21° ASPA Congress. 9-12 giugno. Milano (Italia).
  176. Lipovac M, Bodner F, Imhof M, Chedraui P (2016). Comparison of the effect of a combination of eight micronutrients versus a standard mono preparation on sperm parameters. *Reproductive Biology and Endocrinology*.4:84.
  177. Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G, Su F, Pan S, Luo Y, Guo Z, Quan F (2014). Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to  $\beta$ -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281:3368.
  178. Loomis PR (2006). Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22:663-76.
  179. Looney CR (1986). Superovulation in beef females. 5<sup>th</sup> Annual Convention of AETA, Fort Worth, Texas (USA).
  180. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-2.
  181. Love CC (1992). Semen Collection Techniques. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8:111-28.
  182. Love CC (2016). Modern techniques for semen evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32:531-46.
  183. Love CC, McDonnell SM, Kenney RM (1992). Manually assisted ejaculation in a stallion with erectile dysfunction subsequent to paraphimosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200:1357-9.
  184. Lu KH, Gordon I, Chen HB, McGovern H (1987). In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular ovocytes matured in vitro. 3° Colloque Scientifique de l'Association Européenne de Transfert Embryonnaire, Lyon (France).
  185. Luvoni GC (2006). Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66:101-11.

186. Macháčová T, Bártová E, Di Loria A, Sedlák K, Guccione J, Fulgione D, Veneziano V (2013). Seroprevalence and risk factors of *Neospora* spp. In donkeys from Southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 198:201-4.
187. Maes D, Lopez Rodriguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soom A (2011). Artificial insemination in pigs. In: *Artificial insemination in farm animals*. Miland Manafi. Rijeka (Croatia). pp 79-94.
188. Malacarne M, Criscione A, Franceschi P, Tumino S, Bordonaro S, Di Frangia F, Marletta D, Summer A (2017). Distribution of Ca, P and Mg and casein micelle mineralisation in donkey milk from the second to ninth month of lactation. *International Dairy Journal*, 66: 1-5.
189. Malacarne M, Criscione A, Franceschi P, Bordonaro S, Formaggioni P, Marletta D, Summer A (2019). New insights into chemical and mineral composition of donkey milk throughout nine months of lactation. *Animals (Basel)*, 9:1161.
190. Maniaci G, Alabiso M, Francesca N, Giosuè C, Di Grigoli A, Corona O, Bonanno A (2020). Bresaola made from Cinisara cattle: Effect of muscle type and animal category on physicochemical and sensory traits. *CyTA-Journal of Food*, 18:383-91.
191. Maniaci G, Di Grigoli A, Bonanno A, Giosuè C, Ilardi V, Alabiso M (2021). Fatty acids as biomarkers of the production season of Caciocavallo Palermitano cheese. *Animals (Basel)*, 11:2675.
192. Marletta D, Summer A, Bordonaro S, Mariani P, D'Urso G (1998). Composizione chimica, ripartizione percentuale delle caseine e caratteristiche di coagulazione del latte di massa di bovine di razza Modicana e Frisona italiana allevate in provincia di Ragusa. *Zootecnia e nutrizione animale*, 24: 185-92.
193. Marletta D, Bordonaro S, Budelli E, Tirella G, Guastella AM, D'Urso G (2003). Genetic polymorphism of milk proteins in some *Bos* genus populations. *Italian Journal of Animal Science* 2, 1:106-8.
194. Martinez-Pastor F, Diaz-Corujo AR, Anel E, Herraes P, Anel L, de Paz P (2005). Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*, 64: 958-74.
195. Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, de Paz P, Anel L (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 65:471-85.
196. Mascheroni E (1929). Vol. 1 Equini. *Nuova enciclopedia agraria italiana*. Unione Tipografico-Editrice Torinese, Torino (Italia).

197. Mastrangelo S, Portolano B, Di Gerlando R, Ciampolini R, Tolone M, Sardina MT, International Sheep Genomics Consortium (2017). Genome-wide analysis in endangered populations: a case study in Barbaresca sheep. *Animal*, 11:1107-16.
198. Mastrangelo S, Moioli B, Ahbara A, Latairish S, Portolano B, Pilla F, Ciani E (2018). Genome-wide scan of fat-tail sheep identifies signals of selection for fat deposition and adaptation. *Animal Production Science*, 59: 835-48.
199. Matás C, Sansegundo M, Ruiz S, García-Vázquez FA, Gadea J, Romar R, Coy P (2010). Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology*, 74:1327-40.
200. Matassino D, Grasso F (1996). Salvate quei suini, sono autoctoni. *Rivista di suinicoltura*, 37:69-76.
201. Maurer RR (1978). Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. *Theriogenology*, 9:45-68.
202. Mazur P (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247:C125-42.
203. Mazzatenta A, Vignoli M, Caputo M, Vignola G, Tamburro R, De Sanctis F, Roig JM, Bucci R, Robbe D, Carluccio A (2021). Maternal phylogenetic relationships and genetic variation among rare, phenotypically similar donkey breeds. *Genes (Basel)*, 12:1109.
204. McDonnell S M (1992). Ejaculation: Physiology and Dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8:57-70.
205. McDonnell S, Love C (1990). Manual stimulation collection of semen from stallions: Training time, sexual behaviour and semen. *Theriogenology*, 33:1201-10.
206. McDonnell SM, Love CC (1991) Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*, 36:73-6.
207. McDonnell SM, Odian MJ (1994). Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*, 41:1005-10.
208. McDonnell SM, Oristaglio Turner RM (1994). Post-thaw motility and longevity of motility of imipramine-induced ejaculates of pony stallions. *Theriogenology*, 42:475-81.
209. McDonnell SM, Garcia MC, Kenney RM, Van Arsdalen KN (1987). Imipramine-induced erection, masturbation, and ejaculation in male horses. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 27:187-91.
210. Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology*, 57:327-44.

211. Memon M, Usenik E, Varner D, Meyers P (1988). Penile paralysis and paraphimosis associated with reserpine administration in a stallion. *Theriogenology*, 30:411-9.
212. Mezalira A, Dallanora D, Bernardi M, Wentz I, Bortolozzo FP (2005). Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. *Reproduction in Domestic Animals*, 40:1-5.
213. Micari P, Zumbo A, Chiofalo L (1993). Coagulazione presamica e composizione chimica del latte di bovine di razza modicana nei vari mesi della lattazione. 42° congresso nazionale SISVET. 29 settembre – 2 ottobre. Riccione (Italia).
214. Michailov Y, Ickowick D, Breitbart H (2014). Zn<sup>2+</sup> -stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation. *Developmental Biology*, 396:246-55.
215. Mikkola M, Taponen J (2017). Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*, 88:84-8.
216. Mira F, Canuti M, Di Bella S, Puleio R, Lavazza A, Lelli D, Vicari D, Purpari G, Cannella V, Chiaramonte G, Schirò G, Castronovo C, Guercio A (2021). Detection and molecular characterization of two gamma herpesviruses from Pantesco breed donkeys during an outbreak of mild respiratory disease. *Viruses*, 13:1527.
217. Monteverde V, Tropia E, Casella S, Piccione G, Vazzana I, Vullo S, Dara S (2015). Identification and utilization of some physiological parameters for the evaluation of welfare conditions in Cinisara cows: autochthonous species in danger of extinction and to be protected. XVI Congresso Nazionale SIDi.LV (Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria), 30 settembre – 2 ottobre. Montesilvano (Italia).
218. Moore S, Hasler J (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100:10314-31.
219. Morris L, Tiplady C, Allen WR (2002). The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, 58 643-6.
220. Muradás PR, Weiss RR, Kozicki LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT (2006). Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*, 11:69-74.
221. Neild D, Miragaya M, Chaves G, Pinto M, Alonso A, Gambarotta M, Losinno L, Aguero A (2006). Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from

- slaughterhouse testicles 24 h after ground transportation. *Animal Reproduction Science*, 94:92-5.
222. Nenkova G, Petrov L, Alexandrova A (2017). Role of trace elements for oxidative status and quality of human sperm. *Balkan Medical Journal*, 34:343-8.
223. Nishikawa Y (1959). Semen properties and artificial insemination in horses. In *Studies on Reproduction in Horses*. Kyoto, Japan, Koei, 208.
224. NP (2010). Nagoya Protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the convention on biological diversity. Nagoya, 29 October 2010. <https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/351agoya-protocol-en.pdf>.
225. Oddo P (2013). *L'asino e la Sicilia svelata*. CESIM, Palermo (Italia).
226. Ombelet W, Van Robays J (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts, views vis. Obstetrics and Gynaecology*, 7:137-43.
227. Orihuela A, Aguirre V, Hernandez C, Flores-Perez I, Vazquez R (2009). Breaking down the effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response, heart and respiratory rates in hair sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8:1968-72.
228. Ortega-Pacheco A, Segura-Correa JC, BolioGonzalez ME, Jiménez-Coello M, Linde-Forsberg C (2006). Reproductive patterns of stray male dogs in the tropics. *Theriogenology*, 66:2084-90.
229. Palmer CW, Brito LFC, Arteaga AA, Söderquist L, Persson Y, Barth AD (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls, *Animal Reproduction Science*, 87:25-31.
230. Papa F, Melo C, Fioratti E, Dell'Aqua J, Zahn F, Alvarenga M (2008). Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 107:293-1.
231. Paquignon M (1984). In: Couror M (ed) *The Male in Farm Animal Reproduction* Dordrecht: Martinus Nijhoff, 2002-218.
232. Parks JE (1997). Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow AM, Critser JK (eds) *Reproductive tissue banking*. Academic Press, San Diego, 229-61.
233. Parrilla I, Vazquez JM, Caballero I, Gil MA, Hernandez M, Roca J (2009). Optimal characteristics of spermatozoa for semen technologies in pigs. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 66:37-50.
234. Peña FJ, Domínguez JC, Carbajo M, Anel L, Alegre B (1998). Treatment of swine summer infertility syndrome by means of oxytocin under field conditions. *Theriogenology*, 49:829-36.

235. Perry EJ (1960). The artificial insemination of farm animals. New Brunswick, Rutgers University Press. New Jersey (USA).
236. Phillips PH, Lardy HA (1940). A yolk-buffer pabulum for the preservation of Yak semen. *Journal of Dairy Sciences*, 23:399-4.
237. Piccione G, Caola G, Refinetti R (2002). Effect of shearing on the core body temperature of three breeds of Mediterranean sheep. *Small Ruminant Research*, 46:211-5.
238. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-62.
239. Pino N (1947). Il patrimonio suino della Sicilia e la sua etnologia alla luce di ricerche biometriche su alcuni caratteri razziali. *Zootecnica e Veterinaria. La fecondazione artificiale II*, 1:1-15.
240. Porcu S, Madonia G, Liotta L, Margiotta S, Chiofalo V, Ligios S (2007). Physical characteristics of Longissimus lumborum muscle of “Sarda” and “Nero Siciliano” pigs reared outdoor. Preliminary results. *Italian Journal of Animal Science*, 6:710.
241. Polge C (2000). Lionel Edward Aston Rowson, O.B.E 28 May 1914—26 July 1989: Elected FRS 1973.
242. Polge C, Rowson LE (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at  $-79^{\circ}$  C. *Nature*, 169:626-7.
243. Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164:666.
244. Polidori P, Vincenzetti S (2019). The therapeutic, nutritional and cosmetic properties of donkey milk. Cambridge Scholars Publishing, Newcastle, (UK).
245. Portolano N (1987). Pecore e capre italiane. Bologna (Italia). Edagricole.
246. Portolano B, Calagna G, Todaro M, Console A, Giaccone P, Genna G (1998). Milk production and quality in the Girgentana breed goat. 4° Congresso Nazionale sulla Biodiversità e Germoplasma locale e sua valorizzazione. 8-11 settembre. Alghero (Italia).
247. Portolano B, Todaro M, Finocchiaro R, Van Kaam J H B C M (2002). Estimation of the genetic and phenotypic variance of several growth traits of the Sicilian Girgentana goat. *Small Ruminant Research*, 45:247-53.
248. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL (1987). Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of reproduction*, 37: 859-6.

249. Pugliese C, Madonia G, Chiofalo V, Margiotta S, Acciaioli A, Gandini G (2003). Comparison of the performances of Nero Siciliano pigs reared indoors and outdoors. 1. Growth and carcass composition. *Meat Science*, 65: 825-31.
250. Pugliese C, Calagna G, Chiofalo V, Moretti VM, Margiotta S, Franci O, Gandini G (2004). Comparison of the performances of Nero Siciliano pigs reared indoors and outdoors: 2. Joints composition, meat and fat traits. *Meat Science*, 68: 523-8.
251. Pugliese M, Monti S, Biondi V, Marino G, Passantino A (2022). Flashing lights, dark shadows, and future prospects of the current European legislation for a better traceability and animal health requirements for movements of small animal germinal products. *Frontiers in Veterinary Science*, 9:852894.
252. Quartuccio M, Marino G, Taormina A, Zanghì A, Cristarella S (2011°). Caratteristiche seminali e comportamento sessuale nell'asino Ragusano (*Equus asinus*) durante la raccolta del seme con vagina artificiale in stazione quadrupedale. *Large Animal Review*, 17:151-5.
253. Quartuccio M, Marino G, Zanghì A, Garufi G, Cristarella S (2011b). Testicular volume and daily sperm output in Ragusano donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31:143-6.
254. Raederstorff D, Wyss A, Calder PC, Weber P, Eggersdorfer M (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*, 114:1113-22.
255. Randazzo C, Restuccia C, Mancini A, Muccilli S, Gatti M, Caggia C (2016). Ragusana donkey milk as a source of lactic acid bacteria and yeast strains of dairy technological interest *International Journal of Dairy Science & Processing*, 3:38-6.
256. Reg CE 2007/834. Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio, del 28 giugno 2007, relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CEE) n. 2092/91. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32007R0834>.
257. Reg CE 2009/1069. Regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/LSU/?uri=CELEX:32009R1069>.
258. Reg Del UE 2018/1629. Regolamento delegato (UE) 2018/1629 della Commissione, del 25 luglio 2018, che modifica l'elenco delle malattie figuranti

- all'allegato II del regolamento 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale»). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32018R1629>.
259. Reg Del UE 2019/2035. Regolamento delegato (UE) 2019/2035 della Commissione del 28 giugno 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative agli stabilimenti che detengono animali terrestri e agli incubatoi nonché alla tracciabilità di determinati animali terrestri detenuti e delle uova da cova (Testo rilevante ai fini del SEE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32019R2035>.
260. Reg Del UE 2020/686. Regolamento delegato (UE) 2020/686 della Commissione, del 17 dicembre 2019, che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda il riconoscimento degli stabilimenti di materiale germinale e le prescrizioni in materia di tracciabilità e di sanità animale per i movimenti all'interno dell'Unione di materiale germinale di determinati animali terrestri detenuti. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32020R0686>.
261. Reg Del UE 2020/687. Regolamento delegato (UE) 2020/687 della Commissione, del 17 dicembre 2019, che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative alla prevenzione e al controllo di determinate malattie elencate. [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_del/2020/687/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2020/687/oj).
262. Reg Del UE 2020/688. Regolamento delegato (UE) 2020/688 della Commissione, del 17 dicembre 2019, che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in materia di sanità animale per i movimenti all'interno dell'Unione di animali terrestri e di uova da cova (testo rilevante ai fini del SEE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32020R0688>.
263. Reg Del UE 2020/689. Regolamento delegato (UE) 2020/689 della Commissione, del 17 dicembre 2019, che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative alla sorveglianza, ai programmi di eradicazione e allo status di indenne da malattia per determinate malattie elencate ed emergenti. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32020R0689>.

264. Reg Del UE 2020/692. Regolamento delegato (UE) 2020/692 della Commissione, del 30 gennaio 2020, che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme per l'ingresso nell'Unione, e per i movimenti e la manipolazione dopo l'ingresso, di partite di determinati animali, materiale germinale e prodotti di origine animale. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32020R0692>.
265. Reg Del UE 2021/1140. Regolamento delegato (UE) 2021/1140 della Commissione del 5 maggio 2021 recante modifica del regolamento delegato (UE) 2020/687 che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative alla prevenzione e al controllo di determinate malattie elencate. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32021R1140>.
266. Reg Del UE 2022/126. Regolamento delegato (UE) 2022/126 della Commissione del 7 dicembre 2021 che integra il regolamento (UE) 2021/2115 del Parlamento europeo e del Consiglio con requisiti aggiuntivi per taluni tipi di intervento specificati dagli Stati membri nei rispettivi piani strategici della PAC per il periodo dal 2023 al 2027 a norma di tale regolamento, nonché per le norme relative alla percentuale per la norma 1 in materia di buone condizioni agronomiche e ambientali (BCAA). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%32022R0126>.
267. Reg Del UE 2023/647. Regolamento delegato (UE) 2023/647 della Commissione del 13 gennaio 2023 recante modifica del regolamento delegato (UE) 2020/686 che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda il riconoscimento degli stabilimenti di materiale germinale e le prescrizioni in materia di tracciabilità e di sanità animale per i movimenti all'interno dell'Unione di materiale germinale di determinati animali terrestri detenuti. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32023R0647>.
268. Reg Ese UE 2018/1882. Regolamento di esecuzione (UE) 2018/1882 della Commissione, del 3 dicembre 2018, relativo all'applicazione di determinate norme di prevenzione e controllo delle malattie alle categorie di malattie elencate e che stabilisce un elenco di specie e gruppi di specie che comportano un notevole rischio di diffusione di tali malattie elencate (Testo rilevante ai fini del SEE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32018R1882>.
269. Reg Ese UE 2020/2002. Regolamento di esecuzione (UE) 2020/2002 della Commissione del 7 dicembre 2020 recante modalità di applicazione del

regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la notifica nell'Unione e la comunicazione nell'Unione delle malattie elencate, i formati e le procedure per la presentazione e la comunicazione dei programmi di sorveglianza dell'Unione e dei programmi di eradicazione nonché per le domande di riconoscimento dello status di indenne da malattia, e il sistema informatico per il trattamento delle informazioni. [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_impl/2020/2002/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2020/2002/oj).

270. Reg Ese UE 2020/690. Regolamento di esecuzione (UE) 2020/690 della Commissione, del 17 dicembre 2019, recante modalità di applicazione del regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le malattie elencate oggetto di programmi di sorveglianza dell'Unione, l'ambito geografico di applicazione di tali programmi e le malattie elencate per le quali può essere stabilito lo status di indenne da malattia dei compartimenti. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32020R0690>
271. Reg Ese UE 2020/999. Regolamento di esecuzione (UE) 2020/999 della Commissione del 9 luglio 2020 recante modalità di applicazione del regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda il riconoscimento degli stabilimenti di materiale germinale e la tracciabilità del materiale germinale di bovini, suini, ovini, caprini ed equini. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%32020R0999>.
272. Reg Ese UE 2021/404. Regolamento di esecuzione (UE) 2021/404 della Commissione del 24 marzo 2021 che stabilisce gli elenchi di paesi terzi, territori o loro zone da cui è autorizzato l'ingresso nell'Unione di animali, materiale germinale e prodotti di origine animale conformemente al regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32021R0404>.
273. Reg Ese UE 2022/1345. Regolamento di esecuzione (UE) 2022/1345 della Commissione del 1° agosto 2022 recante modalità di applicazione del regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la registrazione e il riconoscimento degli stabilimenti che detengono animali terrestri e che raccolgono, producono, trasformano o stoccano materiale germinale. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32022R1345>.
274. Reg UE 2013/576. Regolamento (UE) n. 576/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 giugno 2013, sui movimenti a carattere non commerciale di animali da compagnia e che abroga il regolamento (CE) n. 998/2003 (testo rilevante

- ai fini del SEE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX%3D32013R0576>.
275. Reg UE 2016/1012. Regolamento (UE) 2016/1012 del Parlamento europeo e del Consiglio, dell'8 giugno 2016, relativo alle condizioni zootecniche e genealogiche applicabili alla riproduzione, agli scambi commerciali e all'ingresso nell'Unione di animali riproduttori di razza pura, di suini ibridi riproduttori e del loro materiale germinale, che modifica il regolamento (UE) n. 652/2014, le direttive 89/608/CEE e 90/425/CEE del Consiglio, e che abroga taluni atti in materia di riproduzione animale («regolamento sulla riproduzione degli animali»). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32016R1012>.
276. Reg UE 2016/429. Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016, relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale»). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0429>.
277. Reg UE 2017/625. Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017, relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex%3D32017R0625>.
278. Reg UE 2021/2115. Regolamento (UE) 2021/2115 del Parlamento europeo e del Consiglio del 2 dicembre 2021 recante norme sul sostegno ai piani strategici che gli Stati membri devono redigere nell'ambito della politica agricola comune (piani strategici della PAC) e finanziati dal Fondo europeo agricolo di garanzia (FEAGA) e dal Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR) e che abroga i

- regolamenti (UE) n. 1305/2013 e (UE) n. 1307/2013. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32021R2115>.
279. Reg. Del. UE 2018/772. Regolamento delegato (UE) 2018/772 della Commissione, del 21 novembre 2017, che integra il regolamento (UE) n. 576/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure sanitarie preventive necessarie alla lotta contro l'infezione da *Echinococcus multilocularis* nei cani e che abroga il regolamento delegato (UE) n. 1152/2011. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX:32018R0772>.
280. Reg. Ese. UE 2018/878. Regolamento di esecuzione (UE) 2018/878 della Commissione, del 18 giugno 2018, che adotta un elenco degli Stati membri, o delle parti del loro territorio, che rispettano le norme di classificazione di cui all'articolo 2, paragrafi 2 e 3, del regolamento delegato (UE) 2018/772 relativo all'applicazione di misure sanitarie preventive per la lotta contro l'infezione da *Echinococcus multilocularis* nei cani. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3D32018R0878>.
281. Reg. UE 2018/848. Regolamento (UE) 2018/848 del parlamento europeo e del consiglio del 30 maggio 2018 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0848>.
282. Reg. UE 2020/772. Regolamento (UE) 2020/772 della commissione dell'11 giugno 2020 che modifica gli allegati i, vii e viii del regolamento (ce) n. 999/2001 del parlamento europeo e del consiglio per quanto riguarda le misure di eradicazione delle encefalopatie spongiformi trasmissibili nei caprini e nelle razze a rischio di estinzione. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R0772>
283. Reg. UE 576/2013. Regolamento (UE) n. 576/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 giugno 2013, sui movimenti a carattere non commerciale di animali da compagnia e che abroga il regolamento (CE) n. 998/2003. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3D32013R0576>.
284. Robertson I, Nelson RE (1998). Certification and identification of the embryo. Manual of the international embryo transfer society. International Embryo Transfer Society. Champaign (USA), 103-16.
285. Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martínez EA (2006). Challenges in pig artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41:43-53.

286. Rossel S, Marshall F, Peters J, Pilgram T, Adams MD, O'Connor D (2008). Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105:3715-20.
287. Rowe R, Del Campo MR, Eilts CL, French LR, Winch RP, Ginther OJ (1976). A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. *Theriogenology*, 6:471-83.
288. Rowley DD, Lock TF, Shipley CF (1999). Fertility of detomidine HCl-induced ex copula-ejaculated stallion semen. *American Association of Equine Practitioners*, 45:221-3.
289. Rowson LE (1951). Methods of inducing multiple ovulation in cattle. *Journal of Endocrinology*, 7:260-70.
290. Rowson LE, Dowling A, Dowling DF (1949) An apparatus for the extraction of fertilized eggs from the living cow. *Veterinary Record*, 61:191.
291. Russo V, Fontanesi L, Davoli R, Chiofalo L, Liotta L, Zumbo A (2004). Analysis of single nucleotide polymorphisms in major and candidate genes for production traits in Nero Siciliano pig breed. *Italian Journal of Animal Science*, 3:19-29.
292. Salamon S, Maxwell WM (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Sciences*, 62:77-111.
293. Saletti R, Muccilli V, Cunsolo V, Fontanini D, Capocchi A, Foti S (2012). MS-based characterization of  $\alpha$ s2-casein isoforms in donkey's milk. *Journal of Mass Spectrometry*, 47:1150-9.
294. Seager SWJ (1986). Artificial insemination in dogs. In: Burke, T.J. (ed), *Small Animal Reproduction and Infertility*. Lea & Febiger, Philadelphia (USA). 207-217.
295. Seidel Jr GE (2015). Lessons from reproductive technology research. *Annual Review of Animal Biosciences*, 3:467-87.
296. Shamsuddin M, Larsson B (1993). In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reproduction in Domestic Animals*, 28:77-84.
297. Sharma RK, Padron OF, Thomas AJ Jr, Agarwal A (1997). Factors associated with the quality before freezing and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *Fertility and Sterility*, 68:626-31.
298. Sherman J (1964). Low temperature research on spermatozoa and eggs. *Cryobiology*, 1:103-29.
299. Spallanzani L (1780). *Dissertazioni di fisica animale e vegetabile* (Vol. 2). Società tipografica. Modena (Italia).

300. Spallanzani L (1781). Fecondazione artificiale d'una cagna. Opuse scelti di Milan. Milano (Italia).
301. Stafford KJ, Spoorenberg J, West DM, Vermunt JJ, Petrie N, Lawoko CR (1996). The effect of electro-ejaculation on aversive behaviour and plasma cortisol concentration in rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 44:95-8.
302. Starkey P (2000). The origins and development of African livestock: archaeology, genetics, linguistics and ethnography. McDonald KC, Blench RM, Eds. University College London Press, London (UK). 478–502.
303. Strzezek J, Kordan W, Glogowski J, Wysocki P, Borkowski K (1995). Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reproduction in Domestic Animals*, 30:85-94.
304. Strzezek R, Kozirowska-Gilun M, Stawiszyńska M (2012). Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15: 721-6.
305. Sugie T (1965). Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *Reproduction*, 10:197-1.
306. Sugie T (1968). Non-surgical ova collection in cattle. *Annual Report of National Institute of Animal Nutrition and Physiology of India*, Chiba-shi, Japan, 55.
307. Sunde RA, Hoekstra WG (1980). Structure, synthesis and function of glutathione Peroxidase. *Nutrition Reviews*, 38:265-73.
308. Swire PW (1962). Artificial insemination in the horse. In Maule JP: *The semen of animals and artificial insemination*. Tech. Comm. No. 15, Commonwealth Agri. Buraux, Farnham Royal, Bucks (England).
309. Tada N, Sato M, Amann E, Ogawa S (1993) Effect of prefreezing equilibration and postthawing centrifugation on the fertilizing capacity of frozen mouse epididymal spermatozoa. *Cryo Letters*, 14:195–206.
310. Thilmant P (1997). Congelation du sperme de verrat en paillettes de 0.5 ml. Resultats sur le terrain. *Annales des Medicine Veterinaire*, 141:457-62.
311. Tidona F, Criscione A, Devold TG, Bordonaro S, Marletta D, Vegarud GE (2014). Protein composition and micelle size of donkey milk with different protein patterns: Effects on digestibility. *International Dairy Journal*, 35:57-62.
312. Tiplady CA, Morris LA, Allen WR (2002). Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*, 58:225-8.

313. TIT (2009). The International Treaty on plant genetic resources for food and agriculture 2009. <https://www.fao.org/3/i0510e/i0510e.pdf>.
314. Todaro M, Madonna G, Montalbano L, Genna G, Giaccone P (2000). A nonlinear modification of the Wood model to estimate lactation curves of Girgentana goats. Seventh International Conference on Goats. 15-18 May. Tours (France).
315. Tolone M, Mastrangelo S, Rosa A J M, Portolano B (2012). Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 102:18-25.
316. Torres MA, Ravagnani GM, Leal DF, Martins SM, Muro BB, Meirelles FV, Papa FO, Dell'aqua JA, Alvarenga MA, Moretti AS, De Andrade AF (2016). Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. *Journal of Animal Science*, 94:1906-12.
317. Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA (2011). Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Animal Reproduction Science*, 129:7-13.
318. Tríbulo A, Rogan D, Tríbulo H, Tríbulo R, Mapletoft RJ, Bó GA (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77:1679-85.
319. Tumino S, Tolone M, Galluzzo P, Migliore S, Sechi T, Bordonaro S, Puleio R, Carta A, Loria GR (2022). Alternative molecular tools for the fight against infectious diseases of small ruminants: native Sicilian sheep breeds and Maedi-Visna genetic susceptibility. *Animals*, 12:1630.
320. Umbaugh RE (1949). Superovulation and ovum transfer in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 10:295-305.
321. Valle E, Raspa F, Giribaldi M, Barbero R, Bergagna S, Antoniazzi S, Mc Lean AK, Minero M, Cavallarin L (2017). A functional approach to the body condition assessment of lactating donkeys as a tool for welfare evaluation. *PeerJ*, 5:e3001.
322. Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, García EM, Caballero I, Almiñana C, Roca J, Vazquez JL (2006). Improving the efficiency of laparoscopic intraoviductal insemination with sex-sorted boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 18: 283.
323. Veronesi M, Gloria A, Panzani S, Sfirro M, Carluccio A, Contri A (2014). Blood analysis in newborn donkeys: Hematology, biochemistry, and blood gases analysis. *Theriogenology*, 82: 294-303.

324. Vishwanath R (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, 59:571-84.
325. Voelkel SA, Hu YX (1992). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37:23-37.
326. Watson PF (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60:481-92.
327. Watson PF, Behan JR (2002). Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 57:1683-93.
328. Weiler U, Claus R (1991). Endocrine aspects of testicular function, especially hormones in the seminal plasma and their fate in the female reproductive tract: testicular steroids and their relevance for male and female reproductive functions. *Reproduction in Domestic Animal*, 1:41-61.
329. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C. *Science*, 178:411-4.
330. Willadsen SM (1979). A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298-300.
331. Willadsen SM (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63-5.
332. Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ (1951). Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113:247.
333. Wilmut I, Rowson LE (1973). Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record*, 30:686-90.
334. Wilmut I, Polge C (1974). The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79 degrees. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38:105-13.
335. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-3.
336. Wolken A, Rath D, Bortolozzo F, Wentz I, Marchetti A (2002). Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. In: Wheeler M, Smith L (eds), *Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*. *Theriogenology*, 57:392.
337. Wulster-Radcliffe MC, Williams MA, Stellflug JN, Lewis GS (2001). Technical note: artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Sciences*, 79: 2964-7.

338. Yates DJ, Whitacre MD (1988). Equine artificial insemination. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 4:291-304.
339. Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI (2003). Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, 76:99-111.
340. Yue D, Yan L, Luo H, Xu X, Jin X (2010). Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science*, 118: 217-22.
341. Zema E, Monti S, Biondi V, Faraz A, Pugliese M, Marino G, Passantino A (2022). European regulations on camel germplasm movement within the European Union: a current framework based on safety. *Animals*, 12:2255.
342. Zhu H, Luo H, Meng H, Zhang G, Yan L, Yue D (2010). Effect of vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in Boer goat. *Animal Reproduction Science*, 117:90-4.
343. Zuccaro A, Bordonaro S, Criscione A, Guastella AM, Perrotta G, Blasi M, D'Urso G, Marletta D (2008). Genetic diversity and admixture analysis of Sanfratellano and three other Italian horse breeds assessed by microsatellite markers. *Animal*, 2: 991-98.
344. Zumbo A, Chiofalo B, Piccolo D, Chiofalo L (2003). Chemical composition of the meat of "Nero Siciliano" pigs reared outdoor and plein air. *Italian Journal of Animal Science*, 2:379-81.
345. Zumbo A, Di Rosa A, Rundo Sotera A, Portolano B (2004). Caratterizzazione demografica, morfologica e genetica dell'asino di Pantelleria. *Archivio Veterinario Italiano*, 55:6.
346. Zumbo A, Sutura AM, Tardiolo G, D'Alessandro E (2020). Sicilian Black Pig: an overview. *Animals*, 10:2326.