

## Ricerca corrente anno finanziario 2008

### **Anemia infettiva degli equini:**

- **valutazione di un nuovo protocollo di screening nell'attuazione del Piano di sorveglianza nazionale e verifica della concordanza fra metodiche disponibili.**
- **studio dei principali fattori di rischio nei cluster geografici di infezione .**
- **valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti**

**Responsabile Scientifico: Dr. Riccardo Forletta**

**Durata del progetto: 24 mesi**

### **Elenco delle Unità Operative (U.O.) impegnate nel progetto:**

- 1) Dr. Riccardo Forletta - IZSLT Sezione di Pisa, Centro di Referenza Nazionale dell'Anemia Infettiva degli Equini (CRAIE)
- 2) Dr. Marcello Sala - IZSLT, Osservatorio Epidemiologico Veterinario (OEVR)
- 3) Dr. Goffredo Grifoni - IZSLT Sezione di Rieti
- 4) Dr. Ilaria Maria Ciabatti - Ufficio di Staff Biotecnologie IZSLT
- 5) Dr. Gian Luca Autorino - D.O. Diagnosi delle Malattie Virali IZSLT, Centro di Referenza delle Malattie degli Equini (CERME)
- 6) Prof. Pistello Mauro - Università di Pisa
- 7) Dr. Angelo Toni - Servizio Veterinario ASL Rieti
- 8) Dr. Gian Carlo Micarelli - Servizio Veterinario ASL RM/G
- 9) Dr. Antonio Messori, Servizio Veterinario ASL Frosinone
- 10) Dr. Charles J. Issel, Gluck Equine Research Center – Lexington Kentucky
- 11) Dr. Renato Ugo Condoleo - IZSLT Sezione di Latina

### **Razionale del progetto**

#### **Anemia Infettiva Equina. Valutazione di un nuovo protocollo di screening nell'attuazione del Piano di sorveglianza nazionale e verifica della concordanza fra metodiche disponibili.**

Dal 1994 in Italia è decaduto l'obbligo di attestazione sanitaria basata sull'esito al Coggins test per Anemia Infettiva Equina (AIE). Nel 2006 sono comparsi focolai inattesi di AIE caratterizzati dalla presenza di sintomatologia clinica. In seguito all'emergenza, l'O.M. 14/11/2006 disponeva per la prima volta l'obbligo di testare sierologicamente tutta la popolazione nazionale di equidi, al fine di valutare la prevalenza dell'infezione. La prosecuzione dell'attività anche nel biennio 2008-2009 (OM 18.12.07), ha determinato un notevole incremento dell'attività diagnostica svolta dai singoli II.ZZ.SS. La prova di laboratorio usata in precedenza si basa su una tecnica di Immunodiffusione in gel di Agar (AGID), la quale secondo la procedura descritta dal manuale OIE, rappresenta ancora il test di riferimento sul territorio nazionale. I principali vantaggi dell'AGID sono semplicità di esecuzione e soprattutto elevata specificità, caratteristica per la quale è ancora oggi considerato come valido test di conferma. Tuttavia tale metodo risulta essere poco sensibile e l'interpretazione dei risultati soggettiva e non standardizzabile. Tali caratteristiche rendono l'AGID poco adatto ad

una applicazione negli screening di massa. Nelle attuali condizioni di bassa prevalenza dell'infezione sul territorio nazionale e stante la necessità di assicurare il reclutamento di tutti i casi di infezione sancita dalle norme, il "sistema diagnostico" dovrebbe prediligere l'utilizzo di metodi di screening più sensibili. L'esperienza maturata nel 2007 dall'IZSLT su circa 35.000 campioni del PNS ha evidenziato che utilizzando l'AGID come screening si sarebbe "persa" una frazione pari a circa 10% di "veri positivi", invece individuati da un in-house ELISA test validato nel 2000 e confermati mediante Immunoblotting (IB), anch'esso raccomandato dal manuale OIE 2008. Come primo obiettivo specifico, si intende quindi migliorare la sensibilità complessiva del Piano di Sorveglianza nazionale (PSN) applicando e valutando un nuovo protocollo per lo screening e la conferma dei casi, attraverso un uso estensivo del test ELISA di screening nell'ambito del PNS 2009 e la conferma dei positivi mediante interpretazione in parallelo dei risultati forniti da AGID e IB. A fronte di questo nuovo possibile scenario e della derivante necessità da parte della rete nazionale degli IZSLT di introdurre ed implementare l'impiego di test ELISA in fase di screening è importante effettuare una verifica delle performance diagnostiche fornite dai kit Elisa attualmente in commercio. Ciò anche la fine di fornire indicazioni oggettive sulle prestazioni dei Kit nell'ambito di possibile loro utilizzo nell'ambito del PNS. Secondo obiettivo specifico è la valutazione della concordanza dei risultati forniti da diversi Kit ELISA commerciali nei confronti di un panel di sieri di controllo positivi e negativi ottenuti nel corso dell'attività del PNS. Anche l'impiego di saggi molecolari sensibili in grado di svelare precocemente l'infezione ed aumentare la sensibilità del sistema mediante il loro impiego come test complementari alla diagnosi sierologica. L'obiettivo in questo caso è la sperimentazione di protocolli di biologia molecolare come strumento di ausilio nelle aziende sede di focolaio.

#### **Anemia Infettiva Equina. Studio dei principali fattori di rischio nei cluster geografici di infezione**

La prevalenza di equidi positivi per AIE nel 2007 è risultata pari a 0,28% (IC 95% 0,26-0,30) a livello nazionale con presenza di cluster geografici di infezione caratterizzati da prevalenze fino a 16 volte superiori al dato nazionale. Più in generale la prevalenza più elevata è stata riscontrata tra gli equidi detenuti in strutture ricreative o rurali rispetto a quella osservata fra i cavalli sportivi. Lo studio dei fattori di rischio associati all'infezione negli equidi è poco indagata ma assume notevole rilevanza, sia per individuare interventi in grado di prevenire l'introduzione e/o la diffusione del virus, sia ai fini del controllo dell'infezione e della gestione dei focolai. Terzo Obiettivo specifico è quindi quello di studiare, tramite studi osservazionali e tecniche classiche dell'epidemiologia analitica, le variabili associate alla presenza dell'infezione operando una raccolta sistematica di informazioni sui fattori di rischio potenziali all'interno dei focolai di AIE ed in aziende di controllo negative. Tale obiettivo va perseguito anche considerando che il rischio per AIE nei muli è risultato circa 50 volte superiore rispetto ai cavalli. Tale situazione è particolarmente evidente nelle regioni dell'Italia Centrale. Le cause di una apparente maggiore diffusione del virus nei muli devono essere indagate al pari del possibile ruolo di questa specie quale serbatoio dell'infezione sul territorio nazionale.

**Anemia Infettiva Equina. valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti.** Le informazioni epidemiologiche evidenziate dallo studio dei fattori di rischio necessitano di un ulteriore livello di integrazione attraverso la caratterizzazione degli stipiti presenti nei focolai, con particolare riferimento alla caratteristiche di patogenicità ed alla origine dei ceppi virali circolanti. Mentre la letteratura è esaustiva relativamente all'AIE nelle specie equina e asinina, non sono sufficientemente indagati e descritti i quadri clinici, immunologici e virologici dell'infezione nei muli. Gli obiettivi specifici in questa sezione del progetto sono l'attuazione di uno studio filogenetico sugli stipiti circolanti nei cluster di infezione e la valutazione delle

caratteristiche e della dinamica dell'infezione nei equidi naturalmente infetti, anche per contribuire a chiarirne il potenziale ruolo epidemiologico.

#### ***Bibliografia di riferimento essenziale:***

- Issel C.J., Cook R.F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet Diagn Invest* 5:137-141 (1993)-
- Parè J., Simard C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Can. J. of Vet Res.* 68: 254-258 (2004)
- Veysel Soydal Ataseven, Handan Hilal Arslan. Equine infectious anemia in mules, donkeys, and horses: Epidemiologic studies in the different geographic regions of Turkey. *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 25, Issue 10, , October 2005, Pages 439-441-
- V. Spyrou, M. Papanastassopoulou, V. Psychas, Ch. Billinis, M. Koumbati, J. Vlemmas, G. Koptopoulos. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology*, Volume 95, Issues 1-2, , 29 August 2003, Pages 49-59-
- M.M. Nagarajan, C. Simard. Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia (EIAV) in naturally infected horses in Canada. *Virus Research*, 129 (2007): 228-335

#### **Descrizione complessiva del progetto**

##### **Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento**

Esperienze condotte dall'IZSLT hanno dimostrato che impiegando come Golden standard l'IB, l'AGID non è stato in grado di rilevare circa 10% di campioni di campo "veri positivi". Il sistema di sorveglianza attuale presenta problemi di sensibilità, verosimilmente tali da determinare una sensibile perdita di casi reali nella popolazione. Presso il Centro Nazionale di Referenza delle Malattie degli Equini è in uso un in-house Elisa Test validato nel 2000 dotato di alte performance in termini di sensibilità e specificità. Le performance diagnostiche dei diversi test sierologici disponibili sono già note. Il test Elisa, in quanto facilmente standardizzabile ed automatizzabile è da preferirsi per l'esecuzione di screening di massa superando i problemi di specificità mediante esami di conferma quali AGID e/o IB come peraltro avviene in attuazione di altri piani di sorveglianza per infezioni di altre specie animali (BT, MVS, PSC, etc). In previsione di un loro possibile impiego, non sono ad oggi disponibili conoscenze sul grado di concordanza dei diversi test Elisa in commercio su campioni provenienti dal PNS. I saggi molecolari, ancora poco utilizzati nella pratica corrente, potrebbero inoltre trovare utile impiego come test complementari alla diagnosi sierologica nelle situazioni di particolare rischio dove è richiesta una diagnosi precoce.

L'attività di sorveglianza 2007 ha evidenziato la presenza di cluster di infezione in alcune regioni dell'Italia centrale caratterizzati da elevata prevalenza di equidi positivi rispetto alla situazione nazionale. Ad oggi, in assenza di dati relativi a studi osservazionali sia a livello nazionale che internazionale, non è possibile determinare i specifici fattori di rischio diretti ed indiretti connessi alla diffusione del virus nelle popolazioni di equidi. Il mulo inoltre si è dimostrato a rischio elevato per AIE su tutto il territorio nazionale mentre rimane da chiarire se i tassi di prevalenza osservati siano riconducibili ad una effettiva maggiore sensibilità di questo ibrido nei confronti dell'infezione oppure ad un differente grado di esposizione ai fattori di rischio connessi al tipo di impiego e/o a fattori ecologici anche in riferimento ai vettori dell'infezione. In questo senso, risulta necessario approfondire le conoscenze relative alle specie di insetti vettori potenzialmente coinvolte nella trasmissione del virus. Il quadro epidemiologico dell'AIE nel mulo è pressochè ignoto, in conseguenza del fatto che le precedenti disposizioni in materia di controllo della malattia (D.M. 1976) erano indirizzate alla verifica dello stato sanitario in altre categorie di equidi, con particolare riferimento a quelli soggetti a movimentazione. Nello stesso contesto, di fatto, un vero e proprio

controllo dell'infezione nella popolazione mulina nazionale non è mai stato condotto su base sistematica. Tale situazione potrebbe aver determinato una "libera" e progressiva circolazione del virus nel mulo. Per questi motivi la definizione del ruolo epidemiologico di questo ibrido, anche attraverso studi patogenetici e filogenetici, riveste notevole interesse ai fini del controllo della malattia sul territorio nonché per individuare adeguate e specifiche misure di gestione del rischio nella popolazione generale di Equidi. A tale riguardo lo studio si rende necessario poiché in letteratura è descritto un solo studio sull'infezione sperimentale condotta su un numero estremamente limitato di soggetti (N=2) e per un periodo di follow-up insufficiente a chiarire gli aspetti patogenetici di un'infezione da retrovirus (periodo di osservazione = 22-25 gg. post inoculazione).

### **Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre**

Misurare le performance di un test Elisa utilizzato per lo screening di massa dell'AIE nell'ambito delle attività previste dal PNS, ai fini del miglioramento della sensibilità complessiva del Sistema di sorveglianza e valutare i vantaggi dell'immunoblotting ai fini della conferma diagnostica rispetto ai test di riferimento precedentemente impiegati (AGID).

Valutare il grado di concordanza dei test sierologici del commercio ai fini di una loro utilizzazione nell'ambito del Piano di Sorveglianza, sia dai laboratori di prima istanza, sia dal Centro di Riferenza. Ridefinizione della strategia diagnostica relativamente all'AIE mediante metodi tradizionali ed innovativi.

Definire oggettivamente i fattori di esposizione correlati alla presenza dell'infezione all'interno dei cluster geografici ai fini della gestione del rischio nonché chiarire il ruolo delle diverse specie di equidi nel mantenimento e nella diffusione dell'AIE nelle diverse condizioni ambientali, gestionali ed ecologiche. Ciò anche in relazione agli stipiti virali circolanti ed ai specifici meccanismi eziopatogenetici.

### **Metodologia**

#### **WP 1. Anemia Infettiva Equina. Valutazione di un nuovo protocollo di screening nell'attuazione del Piano di sorveglianza nazionale e verifica della concordanza fra metodiche disponibili.**

Distribuzione della procedura e dei reagenti per l'esecuzione del in-house ELISA test ai laboratori degli II.ZZ.SS., in particolare quelli operanti nelle aree a maggior prevalenza di AIE, per l'esecuzione dello screening di massa degli equidi nell'ambito del PNS del territorio di competenza. I campioni risultati positivi allo screening saranno sottoposti a conferma mediante AGID ed IB da parte del Centro Nazionale di Riferenza. I campioni confermati positivi mediante AGID e IB saranno considerati come campioni "VERI" positivi (controllo positivo). Sarà operata una valutazione della "sensibilità relativa" della in-house ELISA e dell'AGID rispetto ai campioni di controllo positivi, provenienti dal PNS. Sarà operata una selezione di campioni di campo negativi confermati mediante in-house ELISA, AGID, IB, considerati come campioni "VERI" negativi (controllo negativo).

Verranno successivamente reclutati i test Elisa commerciali per la valutazione del grado di concordanza su un campione di sieri di controllo positivi e negativi come sopra definiti, distribuendo all'interno del panel sieri a diverso livello di positività in linea con quanto raccomandato da OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases (2003). Sullo stesso panel verrà valutata la concordanza dei risultati ottenuti mediante in-house ELISA, AGID, IB. In entrambi i casi, saranno valutate precisione e accuratezza nonché la concordanza depurata dell'effetto del caso applicando la Statistica K di Cohen e altri indici statistici appropriati.

Verranno inoltre sperimentati protocolli di RT-nested-PCR e Nested-PCR per la diagnosi diretta di AIE di tipo qualitativo e Real-Time Taq-Man PCR quantitativa su campioni di sangue e tessuti prelevati da equidi positivi da focolai di AIE.

### **WP 2. Anemia Infettiva Equina. Studio dei principali fattori di rischio nei cluster geografici di infezione**

Verrà realizzata una scheda strutturata (modello informativo) per la raccolta di informazioni relative ai possibili fattori di rischio per AIE e relativi all'anamnesi aziendale. Sarà operato un pre-test dei modelli informativi per la raccolta dati in alcuni allevamenti campione, con la finalità di individuare i quesiti incompleti o mal formulati, gli argomenti degni di maggior approfondimento, ecc. Utilizzazione dei modelli informativi per la raccolta dei dati epidemiologici nell'ambito dei focolai individuati nell'ambito del PNS. Selezione di aziende di controllo indenni da AIE ma simili ai focolai per localizzazione geografica, indirizzo produttivo, specie di equidi presenti. Organizzazione di catture di insetti vettori mediante impiego di trappole collocate nelle aziende focolaio e controllo. Messa a punto di sistemi informatizzati per l'archiviazione ed elaborazione dei dati. Raccolta, archiviazione su supporto informatico, elaborazione ed analisi dei dati con i classici metodi della epidemiologia descrittiva ed analitica al fine di individuare possibili variabili di rischio associate alla insorgenza, persistenza e diffusione dell'infezione.

### **WP 3. Anemia Infettiva Equina. Valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti.**

Reclutamento di muli positivi ed eventuali altri equidi positivi presenti nell'ambito del medesimo focolaio, provenienti sia da focolai reclutati per lo studio dei fattori di rischio in diversi cluster geografici, sia da altri focolai diagnosticati nell'ambito del PNS. Costituzione di gruppi di soggetti detenuti in una struttura autorizzata ed osservazione per un periodo minimo di 120 giorni/gruppo nel corso del quale gli equidi saranno sottoposti ad immunosoppressione farmacologica al fine di riprodurre eventuali quadri sindromici conseguenti a riacutizzazione dell'infezione naturale. Durante il periodo di follow-up si procederà alla raccolta periodica di dati clinici e campioni biologici per le analisi immunologiche e virologiche condotte mediante metodi diagnostici tradizionali ed innovativi. I parametri relativi a insorgenza e durata dei rilievi clinici, dinamica anticorpale e attività virale post-intervento saranno analizzati in funzione degli stipiti virali e dell'ospite. Indagini virologiche e sierologiche saranno effettuate su equidi provenienti dai focolai reclutati per lo studio dei fattori di rischio e/o altri focolai diagnosticati attraverso il PNS, nell'ambito delle procedure di abbattimento. Ciò al fine di operare una adeguata integrazione tra studio epidemiologico e caratterizzazione degli stipiti presenti nei focolai.

### **Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire**

L'adozione di metodi diagnostici innovativi, validi, di rapida esecuzione e soprattutto dotati di maggiore sensibilità, consentendo l'individuazione di un maggior numero di soggetti portatori dell'infezione, costituirà un supporto indispensabile per migliorare l'efficienza del PNS., Secondo quanto previsto dall'art. 2 del Decreto ministeriale 4 ottobre 1999 il Centro di Referenza Nazionale ha il compito di trasferire alla della rete nazionale dei Laboratori Ufficiali i metodi sviluppati e standardizzati con la presente ricerca esprimendo valutazioni relative alla sensibilità e specificità dei test disponibili.

I risultati delle attività di sorveglianza, di analisi dei fattori di rischio e degli studi patogenetici saranno pubblicati su riviste scientifiche, saranno oggetto di presentazione a diverso livello al fine di migliorare la conoscenza della malattia. I risultati di tali studi potrebbero fornire le evidenze scientifiche necessarie alla modifica/revisione delle attuali norme sul controllo dell'infezione e sulle misure di biosicurezza e prevenzione necessarie a ridurre la diffusione.

## **Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto**

Le UUOO partecipanti al progetto si integrano comprendendo competenze in termini di epidemiologia, laboratori diagnostici e di ricerca e servizi territoriali in grado di apportare specifici contributi per la realizzazione del progetto attraverso un approccio multidisciplinare. Presso la sezione di Pisa dell'IZS LT opera dal 1976 il Centro di referenza per l'Anemia infettiva equina. Tra i compiti istituzionali vi è quello di definire le procedure diagnostiche valide sul territorio nazionale, confermare i casi di positività, e collaborare con il Ministero della Salute per la programmazione delle azioni di sorveglianza. La collaborazione con il Gluck Equine Research Center – Lexington Kentucky (USA) è punto particolarmente significativo per le opportunità di collaborazione scientifica, la vasta competenza in materia sotto il profilo tecnico-diagnostico e la rilevanza internazionale dell'expertise. Ciò porterà importanti ricadute anche pratiche ed applicate sul territorio nazionale ed il coinvolgimento nelle linee di ricerca internazionali.

La collaborazione con l'Osservatorio epidemiologico di Roma permetterà una oggettiva valutazione di test diagnostici oggetto del presente progetto. Inoltre, la collaborazione con la stessa struttura, permetterà di valutare con uno studio ad hoc i fattori di rischio nei cluster d'infezione.

Le Aziende UU.SS.LL. e le Sezioni provinciali dell'Istituto collaboreranno alla realizzazione delle fasi che prevedono gli interventi sul campo. La DO Diagnosi malattie virali e l'Ufficio di Staff Biotecnologie vantano un'esperienza consolidata in termini di studi patogenetici, immunologici e filogenetici condotti nell'ambito delle malattie infettive degli equini e di altre specie animali, nonché esperienze e tecnologie avanzate nel campo della virologia e del settore biotecnologico.

## **Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi fra le varie UU.OO**

### ***Fase 1:***

WP 1.a : U.O. 1, 2, 4, 5: Revisione della letteratura inerente gli aspetti diagnostici, patogenetici, filogenetici ed epidemiologici del virus dell'AIE.

WP 1.b: U.O. 1, 4, 5: allestimento procedure e reagenti per l'esecuzione della in-house ELISA test e organizzazione logistica per la loro distribuzione ai laboratori della rete nazionale degli II.ZZ.SS.

WP 1.c: U. O. 1, 2: programmazione del disegno ed organizzazione logistica delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test diagnostici disponibili (ELISA, AGID, IB).

WP 1. d: U.O. 1: allestimento di un panel di sieri di controllo positivi e negativi per l'esecuzione delle prove di performance e per la valutazione di concordanza tra test diagnostici disponibili (ELISA, AGID, IB)

WP 1.e: U.O. 1, 6: revisione e definizione dei protocolli molecolari diagnostici per AIE

WP 2.a: U.O. 1, 2, 3, 7, 8, 11: realizzazione di una scheda strutturata (modello informativo) per la raccolta di informazioni relative ai possibili fattori di rischio per AIE. Pre-test e validazione della scheda in alcune aziende che detengono equidi.

WP 2.b: U.O. 2: definizione del disegno dello studio sui fattori di rischio per AIE nei cluster geografici di infezione. Definizione delle modalità di selezione delle aziende focolaio e delle aziende di controllo.

WP 2.c: U.O. 2, 3, 7, 8, 11: organizzazione logistica degli ingressi in aziende focolaio e controllo, individuate nell'ambito del PNS

WP 2.d: UO 2, 3, 7, 8, 11: organizzazione logistica per l'installazione di trappole per cattura di insetti vettori.

WP 3.a: U.O. 2, 5, 10: definizione del disegno di studio relativo alla valutazione clinica, immunologica e virologica in equidi naturalmente infetti e definizione dei protocolli di immunosoppressione farmacologica dei gruppi in studio.

WP 3.b: U.O. 4, 5, 10: definizione dei protocolli molecolari per gli studi filogenetici su stipiti virali isolati in equidi provenienti da focolai di infezione e negli equidi sottoposti a immunosoppressione farmacologica.

### ***Fase 2:***

WP 1.a: U.O. 1: Effettuazione delle prove di conferma (in-house Elisa, AGID e IB) dei campioni positivi allo screening sierologico provenienti dalla rete nazionale II.ZZ.SS. ed effettuati nell'ambito del PNS. Esecuzione delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test diagnostici disponibili (ELISA, AGID, IB).

WP 1.b: U.O. 1, 6: applicazione protocolli di RT-nested-PCR e Nested-PCR per la diagnosi diretta di AIE di tipo qualitativo e Real-Time Taq-Man PCR quantitativa su campioni di sangue e tessuti prelevati da equidi positivi da focolai di AIE

WP 1.c: U.O. 2: Raccolta ed archiviazione informatica dei risultati delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test sierologici.

WP 2.a: U.O. 2, 7, 8, 9 e 11: ingressi nelle aziende focolaio e nelle aziende di controllo, compilazione dei modelli informativi per lo studio dei fattori di rischio, raccolta delle informazioni ed invio alla U.O. 2. Ingressi per la cattura degli insetti vettori mediante trappole idonee.

WP 2. b: U.O. 2: raccolta ed archiviazione informatica dei dati contenuti nei modelli informativi

WP 3.a: U.O. 5, 9 e 11: Costituzione dei gruppi di equidi positivi all'interno della struttura autorizzata di detenzione temporanea. Esecuzione della immunosoppressione farmacologica e follow-up clinico, immunologico e virologico.

WP 3.b: U.O. 7, 8, 9, 11: prelievo al macello di organi e tessuti di equidi provenienti dai focolai reclutati per lo studio dei fattori di rischio e/o altri focolai diagnosticati attraverso il PNS, nell'ambito delle procedure di abbattimento.

WP 3.c: U.O. 4, 5: impiego dei protocolli molecolari e indagini filogenetiche su stipiti virali isolati in equidi provenienti da focolai di infezione e negli equidi sottoposti a immunosoppressione farmacologica.

WP 3.d: U.O. 2, 5: Raccolta ed archiviazione informatica dei dati relativi a rilievi clinici, immunologici e virologici con tipizzazione degli stipiti virali.

### ***Fase 3:***

WP 1.a: U.O. 1 e 2: Analisi statistica ed elaborazione dei risultati delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test diagnostici.

WP 1.b: U.O. 1, 6: valutazione dei protocolli di RT-nested-PCR e Nested-PCR per la diagnosi diretta di AIE di tipo qualitativo e Real-Time Taq-Man PCR quantitativa su campioni di sangue e tessuti prelevati da equidi positivi da focolai di AIE. Emissione procedure operative.

WP 2.a: U.O. 2: analisi statistica per elaborazione dei risultati dello studio sui fattori di rischio per AIE secondo adeguati strumenti di epidemiologia descrittiva ed analitica. Valutazione dei risultati relativi al monitoraggio entomologico in focolai d'infezione.

WP 3.a: U.O. 2, 4, 5: elaborazione dei dati relativi al follow-up clinico, immunologico e virologico in gruppi di equidi sottoposti a immunosoppressione farmacologica. Elaborazione dei risultati relativi agli studi filogenetici su ceppi virali provenienti da focolai di AIE. Analisi descrittiva dei

risultati anche mediante applicazione di idonee metodologie di statistica di base.

**Fase 4:**

Tutte le U.O.: produzione della relazione finale contenente la valutazione integrata delle evidenze prodotte nell'ambito del progetto. Redazione del rapporto finale del progetto e pubblicazione dei risultati ottenuti su riviste di settore, presentazioni a Convegni e diffusione mediante siti internet.

6. Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione

Produzione e distribuzione al SSN di metodi diagnostici e relative procedure operative .  
Relazione al Ministero della Salute; produzione di report tecnici su ognuna delle tematiche affrontate nel progetto (WP1, WP2, WP3) e loro diffusione ai Servizi veterinari territoriali e regionali, alle associazioni degli allevatori, alle Federazioni sportive e a qualsiasi altro Ente interessato. I risultati della Ricerca potranno essere comunicate via mail, attraverso siti istituzionali, comunicazioni, articoli scientifici, atti, incontri organizzati ad hoc (workshop, seminari, convegni).

**Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti**

*Obiettivo 1:* migliorare la sensibilità complessiva del Piano di Sorveglianza nazionale (PSN) applicando e valutando un nuovo protocollo per lo screening e la conferma dei casi,.

*Indicatori 1:* stima della "sensibilità relativa" della in-house ELISA e dell'AGID rispetto ai campioni di controllo positivi provenienti dal PNS.

*Obiettivo 2:* valutazione della concordanza dei risultati forniti da diversi Kit ELISA commerciali nei confronti di un panel di sieri di controllo positivi e negativi ottenuti nel corso dell'attività del PNS

*Indicatori 2:* precisione, accuratezza e grado di accordo depurato dall'effetto del caso tra i diversi test diagnostici disponibili per screening e conferma

*Obiettivo 3:* studiare, tramite studi osservazionali e tecniche classiche dell'epidemiologia analitica, le variabili associate alla presenza dell'infezione

*Indicatori 3:* numero di indagini condotte (modelli informativi) in focolai e aziende di controllo e individuazione dei fattori di rischio associati alla insorgenza, persistenza e diffusione dell'infezione

*Obiettivo 4:* attuazione di uno studio filogenetico sugli stipti circolanti nei cluster di infezione e la valutazione delle caratteristiche e della dinamica dell'infezione nei equidi naturalmente infetti

*Indicatori 4:* numero di soggetti sottoposti a controllo, identificazione degli stipti virali isolati