

## **Ricerca corrente anno finanziario 2010**

### **Valutazioni diagnostiche, patogenetiche ed epidemiologiche finalizzate all'acquisizione di elementi per l'analisi del rischio della diffusione dell'anemia infettiva equina**

**Responsabile Scientifico: Dr. Gian Luca Autorino**

**Durata del progetto : 24 mesi**

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

- 1) Dr. Gian Luca Autorino – IZSLT Direzione Operativa Diagnostica delle malattie virali CERME
- 2) D.ssa Maria Teresa Scicluna – IZSLT Direzione Operativa Diagnostica delle malattie virali CERME
- 3) Dr. Raniero Lorenzetti – IZSLT Ufficio di Staff Biotecnologie
- 4) Dr. Marcello Sala – IZSLT Ufficio di Staff Osservatorio Epidemiologico
- 5) Dr. Riccardo Forletta – IZSLT Sezione di Pisa CRAIE
- 6) Dr. Claudio De Liberato - IZSLT Direzione operativa Diagnostica Generale
- 7) Dr. Giorgio Saralli - IZSLT Sezione di Latina
- 8) Dr. Goffredo Grifoni - IZSLT Direzione operativa Diagnostica Generale
- 9) Dr. Luigi Ruocco – Ministero della Salute
- 10) Dr. Luigi Presutti – Ministero della Salute
- 11) Dr. Mauro Coletti – Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Perugia
- 12) Dr. Charles J. Issel - Gluck Equine Research Center
- 13) D.ssa Carmen Maresca - Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche
- 14) Dr. Angelo Toni - AUSL Rieti
- 15) Dr. Gian Carlo Micarelli - ASL Roma G
- 16) Dr. Antonio Messori – ASL FR distretto Alatri-Anagni;
- 17) Dr. Mario Mazzetti: ASL Avezzano – Sulmona – L'Aquila
- 18) D.ssa Giovanna Fusco - IZS Mezzogiorno
- 19) Dr. Nicola Cavaliere - IZS Puglia e Basilicata

#### **Razionale del progetto**

Dal 2007 è in vigore il piano di sorveglianza nazionale nei confronti dell'anemia infettiva equina (AIE) (l'O.M. 14/11/2006, GU n° 285 del 07-12-06), che nel tempo ha evidenziato una situazione epidemiologica caratterizzata da infezioni sporadiche con distribuzione a cluster, principalmente localizzate in alcune regioni dell'Italia Centrale. In tali aree si continuano a registrare nuovi casi incidenti nonostante l'estinzione di molti dei focolai. Il persistere del quadro epidemiologico sopra descritto, nonostante quattro anni di attività di controllo, pone la necessità di identificare meglio e, possibilmente, quantificare i fattori di rischio connessi all'insorgenza di nuovi casi di infezione nelle popolazioni di equidi a livello nazionale. Inoltre, pur essendo stati descritti a livello sperimentale alcuni aspetti patogenetici dell'infezione, si dovrebbe valutare più approfonditamente, nel tempo, il rischio legato al mantenimento di soggetti sieropositivi; questo anche in considerazione della possibile presenza e circolazione di stipiti virali di differente origine e con possibili diverse caratteristiche di virulenza.

Anche il progressivo impiego di metodi diagnostici più sensibili potrebbe essere un ulteriore motivo del riscontro di nuovi focolai e/o la diagnosi di casi incidenti. In tal senso, la valutazione e la standardizzazione dell'iter diagnostico e lo sviluppo e l'applicazione di nuovi metodi analitici, sarebbero utili per il miglioramento dell'efficienza complessiva del sistema di sorveglianza nazionale.

Obiettivi del progetto a breve termine:

- Acquisizione di informazioni per la valutazione della gestione dei focolai in termini di effettuazione delle indagini epidemiologiche previste e di adozione delle misure di biosicurezza e vigilanza.
- Individuazione di possibili associazioni fra persistenza dell'infezione e nuovi casi incidenti rispetto al metodo diagnostico impiegato per la sorveglianza e per gli accertamenti di cui al DM 1976 e DPR 243/94.
- Acquisizione di informazioni utili per la valutazione del rischio di introduzione dell'infezione attraverso gli scambi commerciali internazionali.
- Effettuazione di indagini virologiche qualitative e quantitative su campioni prelevati da soggetti infetti.

Obiettivi a lungo termine:

- Valutazione e standardizzazione dell'iter e dei metodi analitici impiegati nella diagnosi e nella sorveglianza dell'AIE per il miglioramento della sensibilità e della specificità diagnostica.
- Acquisizione di informazioni sull'epidemiologia e la patogenesi del virus dell'AIE (AIEV) necessarie per effettuare l'analisi del rischio di diffusione dell'infezione.

### ***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).
- Nagarajan M.M., Simard C.. Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia (EIAV) in naturally infected horses in Canada. *Virus Research*, 129 (2007): 228-335.
- Spyrou V. et al. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology*, Volume 95, Issues 1-2, , 29 August 2003, Pages 49-59.
- Scicluna M.T. et. al. Equine infectious anemia: should the agar immunodiffusion test still be used for screening and as unique confirmatory test? X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., 2008 – Alghero pag.78.
- Autorino G.L. et. al. Pharmacological reactivation of equine infectious anaemia virus in naturally infected mules: clinical, haematological and serological responses - XII Congresso SIDiLV 2010.

## **Descrizione complessiva del progetto**

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

Il piano di sorveglianza nazionale nei confronti dell'AIE, fin dal primo anno di applicazione, ha evidenziato una situazione epidemiologica caratterizzata da infezioni sporadiche a cluster, principalmente localizzate in alcune regioni dell'Italia Centrale e da tassi di prevalenza nel mulo più elevati rispetto a quelli riscontrati in altri equidi sensibili.

Il perdurare del sopra descritto quadro epidemiologico, nonostante il piano di sorveglianza sia già in vigore dal 2007, pone la necessità di identificare meglio e possibilmente quantificare specifici fattori di rischio connessi all'insorgenza di nuovi casi da AIEV nelle popolazioni di equidi a livello nazionale. Il riscontro di nuovi focolai o, anche, la diagnosi di casi incidenti nell'ambito di focolai ritenuti estinti (sacche di resistenza), potrebbe essere conseguente sia al progressivo impiego di metodi diagnostici più sensibili, sia alla presenza ed al mantenimento di specifici fattori di rischio.

Inoltre, è indispensabile approfondire il rischio di diffusione legato al mantenimento in vita degli animali sieropositivi. Infatti, in ambito nazionale, in base alla normativa vigente (D.P.R. 243 del 1994), non è obbligatorio l'abbattimento dei soggetti infetti, ma solo il loro isolamento. La definizione del ruolo epidemiologico di questi soggetti potrebbe quindi rivestire notevole interesse ai fini del controllo dell'infezione sul territorio, considerando anche la necessità di studiare meglio le specie di insetti vettori potenzialmente coinvolte nella trasmissione del virus nel nostro territorio.

Per quanto riguarda i metodi diagnostici sierologici impiegati nella sorveglianza, diversi studi hanno dimostrato che il test di immunodiffusione in gel di agar (AGID) ha una sensibilità inferiore rispetto ad altri test, quali l'ELISA o il Western Blotting (WB). Il primo trova utile impiego quale test di screening, il secondo è riportato nel Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010 (OIE, Chapter 2.5.6) come test di conferma. Il sistema di sorveglianza attuale, che impiega come metodo diagnostico principale l'AGID, presenta, di conseguenza, problemi di sensibilità, verosimilmente tali da determinare una perdita di almeno il 10% dei casi di infezione. Un ulteriore limite della diagnosi sierologica è conseguente all'esistenza di un periodo finestra dal contagio anche fino a tre mesi, durante il quale il soggetto, pur avendo una replicazione virale in atto, per tale periodo, può non presentare anticorpi rilevabili. Inoltre, esistono animali con infezione cronica che presentano reazioni sierologiche al limite della rilevabilità, quando esaminati con i metodi tradizionali. Va poi considerato che la diagnosi virologica di AIE vede nell'isolamento virale una metodica lunga e particolarmente difficoltosa. I test biomolecolari, ancora poco utilizzati nella pratica corrente, possono quindi trovare un utile impiego come test complementari a quelli sierologici, soprattutto quando è necessaria una diagnosi precoce, o quando l'analisi sierologica non dà un esito conclusivo. Negli ultimi anni sono state ottimizzate e standardizzate alcune metodiche biomolecolari che possono essere valutate per l'utilizzo nella routine diagnostica. Ne sono un esempio i saggi real time qPCR, che consentono di rilevare e quantificare anche bassi livelli di genoma virale in campioni biologici. Gli stessi metodi possono pertanto essere utilizzati per effettuare un monitoraggio dell'infettività per definire più chiaramente il ruolo epidemiologico dei soggetti positivi. Lo studio filogenetico dei ceppi, anche in considerazione della possibile presenza e circolazione di stipiti virali di differente origine e con diverse caratteristiche di virulenza, permetterebbe poi, sia di ottenere un quadro epidemiologico più chiaro, sia di valutare le caratteristiche specifiche dei singoli stipiti virali.

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

- Acquisire informazioni per la valutazione della gestione dei focolai in termini di effettuazione delle indagini epidemiologiche previste ed adozione delle misure di biosicurezza e vigilanza.
- Individuare possibili associazioni fra persistenza dell'infezione e nuovi casi incidenti rispetto al metodo diagnostico impiegato per la sorveglianza e per gli accertamenti di cui al DM 1976 e DPR 243/94.
- Ottenere informazioni per migliorare l'efficacia dell'iter e dei metodi impiegati nella diagnosi dell'AIE e quindi migliorare la sensibilità complessiva del sistema di sorveglianza.
- Acquisire informazioni utili per la valutazione del rischio di introduzione dell'infezione attraverso gli scambi commerciali internazionali.
- Ampliare le conoscenze di epidemiologia molecolare analizzando gli stipiti virali circolanti in Italia dal punto di vista filogenetico.
- Ottenere informazioni sull'andamento della viremia in animali infetti in funzione del tempo, del ceppo virale, delle razze/ibridi di equidi coinvolti, dello stato clinico dell'animale.
- Ampliare le conoscenze sui fattori che influenzano la persistenza di focolai e l'insorgenza di nuovi casi d'infezione sul territorio nazionale, in relazione alle differenti tipologie di allevamento, situazioni ambientali ed agli stipiti virali circolanti.
- Approfondire le conoscenze relative alle specie di insetti vettori potenzialmente coinvolte nella trasmissione del virus in base alla loro presenza ed abbondanza rilevate nei focolai.
- Acquisire informazioni sull'epidemiologia e la patogenesi del virus dell'AIE necessari per poter effettuare un'analisi del rischio di diffusione dell'infezione.

### **Metodologia**

#### **W.P.1. Valutazione dei fattori di rischio che influenzano la persistenza di focolai e l'insorgenza**

### **di nuovi casi d'infezione da AIEV sul territorio nazionale.**

Verranno aggiornate le conoscenze bibliografiche inerenti gli aspetti diagnostici, patogenetici, filogenetici ed epidemiologici dell'AIEV. Verranno analizzati i dati e le informazioni ottenute dall'attuazione del piano di sorveglianza dal 2007 ad oggi.

La raccolta di informazioni per l'identificazione dei fattori di rischio, verrà eseguita impiegando la scheda epidemiologica messa a punto nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZSLT 07/08 RC. Verranno definite la base campionaria e le procedure di somministrazione del questionario. I dati raccolti, in aziende focolaio ed in aziende controllo, verranno elaborati ed analizzati mediante metodi di epidemiologia descrittiva ed analitica, al fine di individuare possibili variabili di rischio associate alla persistenza dei focolai e alla diffusione dell'infezione. I dati raccolti verranno anche utilizzati per valutare le modalità di gestione dei focolai in termini di effettuazione delle indagini epidemiologiche previste e di adozione delle misure di biosicurezza e vigilanza.

Da equidi positivi verranno prelevati campioni biologici per studiare la dinamica della viremia in funzione del tempo, del ceppo virale identificato, delle razze/ibridi di equidi coinvolti e dello stato clinico dell'animale.

Mediante il posizionamento in aziende focolaio ed in aziende controllo di specifiche trappole per insetti, verranno effettuate delle catture finalizzate a valutare la presenza ed abbondanza di vettori potenzialmente coinvolti nella trasmissione del virus.

### **W.P.2. Acquisizione di informazioni utili per la valutazione del rischio di introduzione dell'infezione attraverso le movimentazioni internazionali.**

Sulla base dei flussi e delle movimentazioni di equidi vivi provenienti da paesi con differente situazione epidemiologica nei confronti dell'AIE, verrà messo a punto un piano di campionamento. I campioni raccolti dalla popolazione selezionata verranno esaminati, utilizzando i metodi diagnostici ritenuti più opportuni, anche diversi da quelli ufficiali. I dati raccolti verranno elaborati ed analizzati mediante metodi di epidemiologia descrittiva ed analitica, al fine di valutare il rischio di introduzione dell'infezione attraverso scambi e flussi internazionali.

### **W.P.3. Valutazione dell'iter e dei metodi analitici impiegati nella diagnosi e sorveglianza dell'AIE per il miglioramento della sensibilità e della specificità diagnostica.**

Verrà valutata la concordanza dei risultati ottenuti dall'analisi di campioni provenienti da focolai mediante l'impiego di metodi sierologici già in uso quali ELISA, AGID, WB e nuove tecniche biomolecolari in fase di sviluppo. Per quanto riguarda queste ultime verrà effettuata una revisione e una definizione di protocolli molecolari diagnostici (real-time taq-man PCR, real-time taq-man qtPCR), da applicare su diversi campioni biologici provenienti, sia da animali in vita, che abbattuti. Saranno valutate precisione e accuratezza di tali metodi, nonché la concordanza ed altri indici statistici appropriati. I risultati di laboratorio verranno messi in relazione alle informazioni epidemiologiche acquisite, al fine di poter valutare l'efficacia dell'iter e dei metodi diagnostici impiegati e quindi migliorare sensibilità e specificità diagnostiche complessive del sistema di sorveglianza nazionale.

### **W.P.4. Studi filogenetici e di epidemiologia molecolare del virus dell'AIE.**

Verranno analizzati ceppi identificati durante le attività diagnostiche routinarie, durante le attività di conferma effettuate dal Centro di Referenza Nazionale Malattie Equine (CERME) e ceppi collezionati durante un precedente studio (IZSLT 07/08 RC) condotto su equidi naturalmente infetti sottoposti a riattivazione virale. I ceppi verranno studiati tenendo conto di origine geografica/temporale, equide di provenienza e caratteristiche del focolaio. Per lo studio filogenetico, verranno scelte, amplificate e sequenziate una o più regioni significative del genoma di AIEV. Specifici programmi verranno impiegati per l'analisi delle sequenze ottenute e i risultati saranno valutati sia dal punto di vista genetico, che epidemiologico.

### **W.P.5. Divulgazione dei risultati della ricerca.**

I dati ottenuti dalle attività svolte nell'ambito del progetto di ricerca verranno raccolti ed analizzati al fine di poter elaborare le relazioni intermedia e finale, disponibili su Web. I risultati delle diverse attività saranno inoltre pubblicati su riviste scientifiche, presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche ed eventi formativi organizzati per il personale del SSN e per tutti gli stakeholders

coinvolti.

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

Il contributo fornito dalle diverse unità operative sarà utile per il miglioramento delle conoscenze epidemiologiche e patogenetiche dell'AIE e dei fattori di rischio relativi alla persistenza dei focolai e alla diffusione del virus in Italia.

Secondo quanto previsto dall'art. 2 del Decreto Ministeriale 4 ottobre 1999, il Centro di Referenza Nazionale ha il compito di trasferire alla rete nazionale dei Laboratori Ufficiali, metodi sviluppati e standardizzati, esprimendo valutazioni relative alla sensibilità e alla specificità dei test disponibili. In tal senso, lo sviluppo e l'adozione di metodiche di laboratorio innovative, di rapida esecuzione e soprattutto dotate di maggiore sensibilità, permetteranno di migliorare l'efficacia dell'iter diagnostico dell'AIE su tutto il territorio nazionale. Le informazioni ottenute dalla presente ricerca potranno inoltre essere utili per l'effettuazione dell'analisi del rischio di diffusione dell'AIE e costituire il supporto scientifico necessario alla modifica/revisione delle attuali norme sul controllo di questa infezione.

I risultati delle diverse attività saranno pubblicati sul sito internet del CERME, su riviste scientifiche e presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche, eventi formativi per il personale del SSN e per i professionisti operanti nel settore. Saranno inoltre resi disponibili agli Uffici competenti del Ministero della Salute, alle Regioni ed ai referenti degli Istituti Zooprofilattici.

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

Tra i compiti istituzionali del CERME vi è quello di definire le procedure diagnostiche valide da impiegare sul territorio nazionale, oltre che di confermare i casi di positività e di collaborare con il Ministero della Salute e le Regioni per la programmazione delle azioni di sorveglianza. Le differenti unità operative partecipanti alla ricerca ed in particolare il CERME, sono in grado di apportare specifici contributi per la realizzazione di tutte le attività specialistiche previste dal progetto, garantendo, attraverso il coinvolgimento di epidemiologi, virologi, immunologi, biologi molecolari ed entomologi, un approccio multidisciplinare integrato ai fini dello sviluppo di attività di sorveglianza e di ricerca nei confronti dell'AIE.

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

#### **W.P.1. Valutazione dei fattori di rischio che influenzano la persistenza di focolai e l'insorgenza di nuovi casi d'infezione da AIEV sul territorio nazionale.**

- a) Studio della letteratura inerente gli aspetti diagnostici, patogenetici, filogenetici ed epidemiologici dell'AIEV (1 mese UO 1, 2, 3, 4, 5).
- b) Analisi dei dati e delle informazioni ottenute dall'attuazione del piano di sorveglianza dal 2007 ad oggi (2 mesi UO 1, 2, 3, 4, 5, 9).
- c) Revisione della scheda epidemiologica messa a punto nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZSLT 07/08 RC (1 mese UO 1, 2, 4, 5, 7, 8).
- d) Definizione della base campionaria (allevamenti infetti e non infetti), delle procedure di somministrazione del questionario e organizzazione logistica degli ingressi (2 mesi UO 1, 2, 4).
- e) Ingresso nelle aziende focolaio e nelle aziende di controllo, compilazione dei modelli informativi per lo studio dei fattori di rischio (14 mesi UO 1, 2, 4, 5, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18).
- f) Raccolta delle informazioni ed archiviazione informatica dei dati contenuti nei modelli informativi (12 mesi UO 1, 2, 4, 7, 8, 13).

- g) Definizione delle modalità di prelievo ed effettuazione di campioni biologici per studiare la dinamica della viremia in funzione del tempo, del ceppo virale, delle razze/ibridi di equidi coinvolti, dello stato clinico dell'animale (22 mesi UO 1, 2, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19).
- h) Definizione delle aree e delle aziende in cui verranno posizionate le trappole per gli insetti vettori (1 mese UO 1, 2, 4, 6, 7, 8).
- i) Posizionamento delle trappole, raccolta dei vettori e definizione della loro abbondanza in funzione delle singole specie catturate (20 mesi UO 6, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18).
- j) Analisi statistica dei dati ottenuti dalla somministrazione del questionario e valutazione dei risultati ottenuti dalle indagini virologiche ed entomologiche (3 mesi UO 1, 2, 4).

**W.P.2. Acquisizione di informazioni utili per la valutazione del rischio di introduzione dell'infezione attraverso gli scambi commerciali internazionali.**

- a) Valutazione dei flussi e delle movimentazioni di equidi vivi provenienti da paesi con differente situazione epidemiologica nei confronti dell'AIE (2 mesi UO 1, 2, 4, 10).
- b) Definizione di un piano di campionamento e delle modalità di prelievo al fine dell'effettuazione di campioni biologici (2 mesi UO 1, 2, 4, 9, 10, 19).
- c) Raccolta ed analisi dei campioni utilizzando differenti metodi diagnostici (18 mesi UO 1, 2, 10, 19).
- d) Elaborazione ed analisi dei risultati mediante metodi di epidemiologia descrittiva ed analitica, al fine di valutare il rischio di introduzione dell'infezione attraverso gli scambi commerciali internazionali (2 mesi UO 1, 2, 4, 9, 10).

**W.P.3. Valutazione dell'iter e dei metodi analitici impiegati nella diagnosi e sorveglianza dell'AIE per il miglioramento della sensibilità e della specificità diagnostica.**

- a) Revisione e definizione dei protocolli molecolari diagnostici per AIE (3 mesi UO 1, 2, 3, 5, 12).
- b) Applicazione dei protocolli precedentemente definiti sui campioni selezionati (6 mesi UO 1, 2, 3, 5).
- c) Sulla base dei risultati ottenuti, valutazione dei protocolli di biologia molecolare impiegati, definizione delle caratteristiche e dei campi di applicabilità ed emissione di procedure operative per la loro esecuzione (3 mesi UO 1, 2, 3, 12).
- d) Selezione di campioni da utilizzare per l'esecuzione delle prove di comparazione e per le valutazioni di concordanza tra test diagnostici sierologici e di biologia molecolare (2 mesi UO 1, 2, 3).
- e) Programmazione ed esecuzione delle prove di comparazione tra test diagnostici sierologici già in uso e tecniche biomolecolari sviluppate nell'ambito del progetto (4 mesi UO 1, 2, 3).
- f) Raccolta ed archiviazione informatica dei risultati (2 mesi UO 1, 2, 3).
- g) Stima di precisione, accuratezza e concordanza di tali tecniche, applicando appropriati metodi statistici (2 mesi UO 1, 2, 4).
- h) Valutazione dei risultati ottenuti dalla comparazione dei metodi diagnostici in relazione alle informazioni epidemiologiche acquisite durante la ricerca, al fine di poter migliorare sensibilità e specificità diagnostiche complessive del sistema di sorveglianza nazionale (2 mesi UO 1, 2, 4, 5, 12).

**W.P.4. Studi filogenetici e di epidemiologia molecolare del virus dell'AIE.**

- a) Studio e definizione di una o più regioni significative del genoma di AIEV da sequenziare per l'esecuzione delle analisi filogenetiche (2 mesi UO 1, 2, 3, 5, 11, 12).
- b) Selezione di ceppi da sottoporre ad analisi sulla base di: origine geografica/temporale, equide di provenienza e caratteristiche del focolaio (2 mesi UO 1, 2, 3, 5).
- c) Amplificazione, sequenziamento ed analisi delle regioni scelte sui ceppi selezionati (15 mesi UO 1, 2, 3, 5, 11).

- d) Analisi filogenetica dei ceppi mediante specifici programmi (5 mesi UO 1, 2, 3, 11).
- e) Valutazione dei risultati ottenuti nel loro risvolto genetico ed epidemiologico (2 mesi UO 1, 2, 3, 5, 11, 12).
- f) Valutazione dei risultati ottenuti dalle analisi filogenetiche in relazione alle informazioni epidemiologiche acquisite durante la ricerca (2 mesi UO 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12).

#### **W.P.5. Divulgazione dei risultati della ricerca.**

- a) Raccolta, elaborazione dati, stesura delle relazioni intermedia e finale (4 mesi UO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 18).
- b) Organizzazione di eventi formativi per il personale del SSN e per gli stakeholders coinvolti e presentazione dei risultati nell'ambito di eventi scientifici (8 mesi UO 1, 2, 4, 9, 10).

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

- **Obiettivo:** acquisizione di informazioni per la valutazione della gestione dei focolai in termini di effettuazione delle indagini epidemiologiche previste ed adozione delle misure di biosicurezza e vigilanza.– **Indicatore:** numero di ingressi in allevamenti focolaio e non; numero di schede epidemiologiche somministrate.
- **Obiettivo:** verifica di possibili associazioni fra la persistenza dell'infezione e nuovi casi incidenti rispetto al metodo diagnostico impiegato per la sorveglianza e per gli accertamenti di cui al DM 1976 e DPR 243/94.– **Indicatore:** definizione delle sensibilità e specificità diagnostiche relative dei metodi di laboratorio impiegati.
- **Obiettivo:** valutazione del rischio di introduzione dell'infezione attraverso gli scambi commerciali internazionali. – **Indicatore:** Numero di partite/animali oggetto di scambi internazionali esaminati.
- **Obiettivo:** effettuazione di indagini virologiche qualitative e quantitative su campioni prelevati da soggetti infetti. – **Indicatore:** numero di campioni biologici esaminati; numero di sequenze ottenute ed analizzate dal punto di vista filogenetico.
- **Obiettivo:** valutazione dell'iter e dei metodi analitici impiegati nella diagnosi e sorveglianza dell'AIE per il miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica.– **Indicatore:** stima della precisione, accuratezza e concordanza dei metodi diagnostici già in uso e di nuovo sviluppo.
- **Obiettivo:** acquisizione di informazioni sull'epidemiologia e la patogenesi del virus dell'AIE al fine di effettuare un'analisi del rischio di diffusione dell'infezione. – **Indicatore:** numero di lavori scientifici, presentazioni scientifiche, linee guida, e protocolli prodotti e/o sviluppati sull'argomento.