

RICERCA CORRENTE 2003

Studio di prevalenza sulle principali malattie virali degli equini (Lista B O.I.E.) anche mediante l'utilizzo di metodiche innovative. Sperimentazione e sviluppo di un protocollo di sorveglianza della Influenza Equina e valutazione dei fattori di rischio associati all'insorgenza di focolai epidemici.

Progetto IZSLT 01/03RC - REPORT DEFINITIVO

Area tematica: Sanità Animale

Linea di ricerca n. 1/2 . Titolo linee di ricerca:

- Ricerca nel settore della sanità animale per l'individuazione delle cause determinanti e dei fattori di rischio
- Analisi delle malattie trasmissibili mediante lo studio di fattori intrinseci ed estrinseci correlati all'ospite

Responsabile Scientifico: Dr. Gian Luca Autorino

Durata del progetto: mesi 36

Data inizio progetto: 30 aprile 2004

Data fine progetto: 30 aprile 2007

Elenco delle Unità operative impegnate nel progetto:

U.O. 1 IZS Lazio e Toscana, Reparto Diagnosi Malattie Virali: Maria Teresa Scicluna

U.O. 2 IZS Lazio e Toscana, Reparto Virologia e Biotecnologie: Demetrio Amaddeo

U.O. 3 IZS Lazio e Toscana, Reparto Osservatorio Epidemiologico: Antonio Battisti

U.O. 4 IZS della Lombardia e della Emilia Romagna: Paolo Cordioli

U.O. 5 IZS delle Venezie: Ilaria Capua

U.O. 6 IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta: Loretta Masoero

U.O. 7 IZS Sicilia: Santo Caracappa

Importo assegnato: € 160.000.00

Descrizione complessiva del progetto

Fasi:

- a) messa a punto di un flusso informativo finalizzato alla raccolta ed alla aggregazione dei dati relativi al Piano nazionale di controllo dell'arterite virale degli equini (O.M. 13 gennaio 1994) (UU.OO. 1, 3);
- b) definizione della base campionaria e stima delle prevalenze per influenza equina, arterite virale, EHV 1, EHV 4, anemia infettiva e west Nile disease (UU.OO. 1, 3);
- c) messa a punto di metodi innovativi per la diagnosi della rinopolmonite (diagnosi differenziale EHV 1 / EHV 4), influenza equina e west Nile disease (UU.OO. 1, 2, 4)
- d) trasferimento di protocolli diagnostici e di materiali di riferimento alle diverse unità operative (UU.OO.1, 2, 4);
- e) organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio (UU.OO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7);
- f) definizione delle procedure operative, del flusso informativo e sperimentazione del sistema di sorveglianza per l'influenza equina (UU.OO. 1, 3, 4, 5, 6, 7);
- g) valutazione dei fattori di rischio connessi all'insorgenza di focolai di influenza equina ed alla diffusione delle infezioni sostenute da tali virus (UU.OO. 1, 3);
- h) caratterizzazione degli stipiti virali circolanti (UU.OO.1, 2);
- i) produzione dell'elaborato finale (UU.OO.1, 2, 3).

Metodologia:

- 1) redazione dei modelli informativi e definizione dei tracciati record finalizzati alla raccolta dei dati. Realizzazione di software per la loro archiviazione, aggregazione e gestione;
- 2) applicazione di metodi statistici per ottenere campioni rappresentativi ai fini degli studi di prevalenza e per la realizzazione del sistema di sorveglianza;
- 3) raccolta dei campioni, esecuzione degli esami sierologici, virologici e molecolari ed attivazione procedure di conferma dei positivi;
- 4) sviluppo di metodi immunoenzimatici con l'impiego di anticorpi monoclonali e di biologia molecolare;
- 4) tipizzazione degli stipiti isolati mediante metodi immunologici e molecolari;
- 5) allestimento di pannelli per l'esecuzione di prove di ripetibilità, riproducibilità e concordanza;
- 6) elaborazione statistica dei dati e verifica delle associazioni tra i teorici fattori di rischio e risultanze dell'attività analitica.

Risultati Attesi:

- 1) definizione del quadro relativo a presenza, prevalenza e dinamica delle malattie virali equine sul territorio nazionale;
- 2) realizzazione di un sistema di rilevazione integrato al network di sorveglianza dei virus influenzali;
- 3) trasferimento di procedure operative e diagnostici ai Laboratori Ufficiali;
- 4) valutazione dell'applicabilità dei metodi diagnostici innovativi

Modalità di trasferimento dei risultati previsti al SSN, significato del loro trasferimento, rapporto costo beneficio:

I dati prodotti relativi alla situazione epidemiologica nei confronti delle diverse malattie ed i metodi di diagnosi verranno trasferiti dal Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini (CeRME) agli Uffici competenti del Ministero della Salute, alle Regioni ed ai referenti degli Istituti Zooprofilattici anche attraverso la realizzazione di specifici eventi formativi.

Secondo quanto previsto dall'art. 2 del Decreto ministeriale 4 ottobre 1999 i risultati della ricerca e della standardizzazione dei diversi metodi produrranno un miglioramento rispetto alle capacità

diagnostiche della rete degli Istituti, mentre i dati epidemiologici potranno essere impiegati al fine di predisporre e pianificare programmi d'intervento a livello territoriale.

L'attivazione di sistemi di sorveglianza e la conoscenza dei fattori di rischio relativi all'insorgenza ed alla diffusione delle infezioni potranno essere utili al controllo delle malattie ed allo stesso tempo a limitare i danni diretti ed indiretti conseguenti alla diffusione delle stesse.

ELENCO ALLEGATI

Allegato 1 modello informativo per la raccolta dati ai fini dell' O.M. 13.01.94

Allegato 2 scheda di tracciato record per il trasferimento dati stalloni - O.M. 13.01.94

Allegato 3 CD con software per archiviazione, aggregazione e gestione dei dati O.M. 13.01.94

Allegato 4 risultati stima prevalenze delle malattie virali nella popolazione equina degli ippodromi

Allegato 5 sviluppo di una Real Time PCR per la diagnosi differenziale delle infezioni sostenute da gli Herpes virus equini tipo 1 e tipo 4

Allegato 6 allestimento dei pannelli di pcr real time simultanee

Allegato 7 metodi diagnostici (G.U.R.I. n.66 del 21.03.05)

Allegato 8 report proficiency test virus-neutralizzazione per arterite virale equina

Allegato 9 report proficiency test - tessuto coltura (tc) per l'isolamento del virus dell'arterite virale equina

Allegato 10 report proficiency test – RT- PCR per l'identificazione dell'RNA del virus dell'arterite equina

Allegato 11 report proficiency test – SRH

Allegato 12 protocollo di sorveglianza per l'influenza equina

Allegato 13 report sorvegliansa WND 2005

Allegato 14 report sorvegliansa WND 2006

Allegato 15 fattori di rischio influenza equina e caratterizzazione stipiti virali circolanti

Ai fini della valutazione dei diversi obiettivi su cui si articola la ricerca vengono di seguito brevemente riassunte le attività caratterizzanti le singole fasi del progetto, rimandando per l'approfondimento dei risultati agli allegati specifici.

Fase a: *messa a punto di un flusso informativo finalizzato alla raccolta ed alla aggregazione dei dati relativi al Piano nazionale di controllo dell'arterite virale degli equini (O.M. 13 gennaio 1994);*

Realizzati i modelli informativi (allegato 1), definiti i tracciati record finalizzati alla raccolta dei dati (allegato 2) e realizzazione del software per l'archiviazione, aggregazione e gestione dei dati relativi alle attività di controllo dei riproduttori svolta sul territorio nazionale (O.M. 13 gennaio 1994). (allegato 3- CD)

Sussistono ancora difficoltà per la gestione di tale attività perché il debito informativo non è sempre soddisfatto e, ancora, non sono uniformemente impiegati i modelli informativi ed i tracciati record realizzati e distribuiti per la raccolta dei dati.

Fase b: *definizione della base campionaria e stima delle prevalenze per influenza equina, arterite virale, EHV 1, EHV 4, anemia infettiva e west nile disease;*

Lo studio di prevalenza nei confronti delle infezioni sopra riportate è stato condotto sulla popolazione equina residente in ippodromi uniformemente distribuiti sul territorio nazionale.

I soggetti sottoposti a prelievo sono stati complessivamente 6.051, corrispondenti alla popolazione residente nel periodo settembre-dicembre 2002.

Per la definizione della base campionaria da sottoporre a controllo sono stati assunti dati di prevalenza differenti per le diverse infezioni virali, tenendo conto di quanto accertato in occasione di indagini condotte negli anni precedenti e di quanto riportato in letteratura.

La ricerca degli anticorpi per i virus influenzali degli equini è stata condotta mediante test di inibizione della emoagglutinazione impiegando come antigeni i ceppi A/eq/Praga/1/56, A/eq/Newmarket/1/93 ed A/eq/Newmarket/2/93.

Per valutare la diffusione di EHV 1 ed EHV 4 è stato impiegato un test ELISA del commercio (SVANOVA) in grado di discriminare le due differenti infezioni erpetiche

Per l'anemia infettiva degli equini sono stati impiegati, anche al fine di valutarne la concordanza, due differenti metodi: il test Coggins secondo OM 1976 con antigene prodotto su tessuto coltura ed un test ELISA competitivo realizzato nel corso di un nostro precedente progetto di ricerca finalizzata, che impiega come antigene la proteina strutturale ricombinante (p26) e due differenti anticorpi monoclonali reattivi verso epitopi antigenici della stessa.

I risultati delle indagini sono di seguito riportati nell'allegato 4.

Le indagini nei confronti del virus West Nile, pur essendo state condotte, non vengono rappresentate in quanto di difficile interpretazione non trattandosi di soggetti stanziali o dei quali non era possibile risalire, senza difficoltà, all'origine.

Fase c: *messa a punto di metodi innovativi per la diagnosi della rinopolmonite (diagnosi differenziale EHV 1 / EHV 4), influenza equina e west nile disease;*

RINOPOLMONITE - Messa a punto e standardizzato di un protocollo di PCR rapido, sensibile e specifico in grado di identificare e differenziare le infezioni da virus erpetiche degli equini sostenute dai sierotipi 1 e 4 (EHV-1 ed EHV-4), valutandone la sensibilità rispetto alla tecnica di isolamento su tessuto-coltura.

L'attività è stata svolta per avere strumenti utili per il controllo nei confronti di tali infezioni.

È stato impiegato, previa modificazione ed adattamento, un protocollo selezionato in letteratura che prevede l'amplificazione mediante tecnica di seminested PCR dei segmenti codificanti per le glicoproteine H (EHV-1) e B (EHV-4) che permette di ottenere prodotti di differenti dimensioni. I ceppi EHV-1 KyD ed EHV-4 405/76, sono stati sottoposti alla seminested PCR per valutare la specificità della tecnica.

Per valutare la sensibilità relativa delle PCR EHV-1 ed EHV-4, diluizioni in base 10 di EHV-1 ed EHV-4 sono state analizzate in PCR. Con la prima amplificazione, i rispettivi frammenti sono stati ottenuti fino alla diluizione di 10^{-5} per EHV-1 e di 10^{-4} per EHV-4. Con la seconda amplificazione, sono stati ottenuti frammenti di 287 bp per EHV-1 e di 323 bp per EHV-4, rispettivamente fino alle diluizioni di 10^{-6} e di 10^{-7} . Pertanto, la seconda amplificazione incrementa di 10 volte la sensibilità per EHV-1 e di 1000 volte per EHV-4. Per confrontare la sensibilità della tecnica con quella dell'isolamento in coltura, tali diluizioni in base 10 sono state inoculate su monostrati cellulari di RK13 per EHV-1 e di Equine Dermis per EHV-4. Sia per EHV-1 che per EHV-4, l'ECP è stato osservato fino alla diluizione 10^{-5} . Pertanto, nelle nostre condizioni, la seminested PCR si è dimostrata rispettivamente 10 volte e 100 volte più sensibile dell'isolamento in coltura di EHV-1 e di EHV-4.

I metodi sono stati quindi applicati su materiale biologico inviato al CeRME nel corso della diagnostica corrente e precedentemente esaminati in tessuto coltura (47 estratti di organi di feti abortiti) e (40 tamponi nasali prelevati nel corso della sorveglianza nei confronti di sindromi respiratorie. Tutti gli estratti da organi positivi in coltura sono stati confermati tali anche in PCR, evidenziando la concordanza tra le due prove. Un estratto da polmone è risultato negativo in tessuto coltura e positivo in PCR.

Fra i tamponi nasali, un campione è risultato positivo per EHV-1 ed un altro positivo per EHV-4. L'assenza di ECP su coltura cellulare di questi campioni, conferma la maggiore sensibilità della PCR.

In allevamento le sindromi respiratorie da EHV-1 possono precedere gli aborti. La tecnica di PCR applicata su tamponi nasali, offre pertanto un metodo rapido e sensibile per identificare e differenziare l'EHV-1 dall'EHV-4, consentendo di intervenire precocemente.

Definito un protocollo di Real Time PCR duplex per la diagnosi differenziale simultanea delle infezioni EHV-1 ed EHV-4 (allegato 5).

WEST NILE DISEASE - Adattato un protocollo di Real Time RT-PCR (Lanciotti et al, 1999, Science) con l'impiego di oligonucleotidi e di una sonda selezionati in letteratura e specifici per la regione NC del genoma del ceppo NY 99 di WNV. Al fine eliminare i rischi per gli operatori legati alla manipolazione del virus, è stato sintetizzato e prodotto un controllo positivo a rischio biologico nullo costituito da RNA ricombinante.

Sviluppato un test C-ELISA sensibile e specifico impiegabile per la diagnosi sierologica sulle diverse specie animali sensibili, alternativo ai prodotti del commercio.

Per la produzione di anticorpi monoclonali topi Balb/c sono stati immunizzati mediante inoculazione sottocutanea con $100\mu\text{g}$ di antigene (WNV Egypt 101) parzialmente purificato in adiuvante completo di Freund seguita dopo 30 giorni da una inoculazione intraperitoneale con $50\mu\text{g}$ di antigene non adiuvato. Tre giorni dopo, gli splenociti murini sono stati ibridizzati con cellule di mieloma murino NS0 in presenza di Peg 4000 secondo metodica standardizzata (Galfre, G., Milstein, C., 1981).

Lo screening degli ibridomi ottenuti è stato eseguito mediante ELISA indiretta, adottando gli stessi antigeni utilizzati come immunogeni e mediante immunofluorescenza su cellule infette e non infette per verificare le specificità dei legami.

Dei 22 ibridomi selezionati, inviati per la caratterizzazione al Pasteur Institute, di Lione (National Reference Centers for Arboviruses and Haemorrhagic fever Viruses, 2, neutralizzanti, sono specifici per WNV senza cross reagire con altri virus del gruppo encefalite giapponese della famiglia Flavivirus. I metodi messi a punto si sono rivelati sensibili e specifici e sono stati impiegati nel corso dei piani di sorveglianza 2005 e 2006 e nello studio trasversale volto a definire attraverso una valutazione retrospettiva la eventuale circolazione virale nel Padule di Fucecchio nel periodo 1999 – 2006

ARTERITE VIRALE - Verificata l'efficienza diagnostica del test di *RT-nested* PCR e di isolamento virale e confrontata la sensibilità su differenti matrici biologiche prelevate, sia da cavalli inoculati sperimentalmente, sia su sperma prelevato a stalloni controllati nel corso delle stagioni di monta (O.M. 13.01.1994)

Presso il Centro di Referenza per le Malattie degli Equini, oltre all'isolamento del virus su colture cellulari, è in uso un protocollo che prevede l'amplificazione mediante tecnica di *RT-nested* PCR di un segmento dell'ORF 7 (codificante per la proteina nucleocapsidica) del virus dell'AVE, che risulta essere tra le parti più conservate del genoma. Questo protocollo, applicato a campioni di sperma, si è rivelato sensibile, specifico ed altamente concordante con la metodica di isolamento del virus su colture cellulari. La ricerca si è basata sul confronto delle due tecniche su differenti matrici biologiche prelevate, sia da cavalli inoculati sperimentalmente, sia su sperma prelevato a stalloni controllati nelle durante le stagioni di monta 2001-2003.

Le prove effettuate impiegando i diversi metodi, hanno mostrato risultati discordanti in 3 tamponi nasali, 5 tamponi rettali, 1 estratto di organo, 12 liquidi seminali, 6 campioni di plasma, 5 campioni di siero e 18 di buffy coats. I campioni risultati positivi soltanto in PCR dimostrano una maggiore sensibilità di questa tecnica rispetto alle colture cellulari, attribuibile sia ad una bassa concentrazione virale nel campione, sia alla perdita della capacità infettante del virus presente nei campioni.

Nel caso delle positività riscontrate solo in TC, a fronte di PCR negative (1 tampone nasale, 6 buffy coats, 4 campioni di siero e 6 di plasma), i diversi volumi di inoculo impiegati nell'esecuzione delle due prove potrebbero essere stati determinanti agli effetti dei risultati, o anche, ad una attività di inibizione della PCR, dovuta a problemi legati alla procedura di estrazione dell'RNA. Per migliorare l'efficienza in termini di riduzione dei fattori di inibizione in queste matrici biologiche, può essere utile saggiare diluizioni superiori e comunque provare altri protocolli di estrazione.

L'elevata sensibilità della tecnica PCR riscontrata nei campioni di liquido seminale suggerisce ancora una volta di utilizzare questa prova come di supporto alla prova ufficiale di isolamento virale su colture cellulari. In caso di sospetto clinico di AVE, al fine di migliorare la sensibilità diagnostica nei confronti dell'AVE, risulta quindi raccomandabile l'impiego congiunto dei due metodi.

Messo a punto un protocollo di Real Time PCR per la ricerca del virus da matrici biologiche.

INFLUENZA EQUINA - Analizzate e definite le caratteristiche di diversi metodi virologici impiegati per la ricerca diretta dei virus influenzali valutandone sensibilità, specificità, costi e, sopra tutto, i tempi di esecuzione, considerato che la tempestività della diagnosi consente l'adozione tempestiva di misure sanitarie volte a limitarne la diffusione. Sono stati posti a confronto 4 diversi metodi al fine di valutarne l'efficienza diagnostica anche in relazione alle diverse condizioni d'impiego. A tale scopo sono stati esaminati tamponi nasali, prelevati a cavalli con sindromi respiratorie acute, nel corso di un focolaio da A/equi 2 (H3N8). Tutti i campioni sono stati esaminati mediante: ELISA antigene del commercio (Directigen FLU-A), inoculazione in uova embrionate (UE) di pollo e su cellule in linea continua di rene di cane (MDCK), PCR per l'identificazione di segmenti di genoma codificanti la nucleoproteina (PCR-NP). La PCR per l'amplificazione di segmenti dell'emoagglutinina H3 è stata eseguita per la tipizzazione dei campioni positivi alla PCR NP.

Fra i metodi impiegati, la PCR è risultato quello più sensibile e specifico, confermando tutti i risultati positivi ottenuti sia con l'ELISA e con l'isolamento su UE. Inoltre, le positività in PCR H3 è in grado di fornire rapidamente indicazioni relative al sottotipo del virus. Rispetto alle altre prove d'isolamento virale i costi sono inferiori, è di più rapida esecuzione (2 giorni), tuttavia per la sua esecuzione sono necessarie strutture adeguate e personale specializzato.

Il test ELISA è più sensibile delle prove di isolamento ed è in grado, come la PCR, di rilevare nei campioni anche la presenza di antigene virale non più infettante. Il test può dare reazioni aspecifiche. I costi sono inferiori rispetto a quelli degli altri 3 metodi, soprattutto considerando la rapidità di esecuzione e non necessita di alcun grado di specializzazione da parte degli operatori. Se ne raccomanda il suo impiego, anche sul campo, come test di screening a scopo diagnostico. Evidenziando gli antigeni della nucleoproteina, comuni a tutti i virus influenzali, non fornisce indicazioni epidemiologiche relative agli stipiti circolanti.

L'isolamento su UE risulta meno sensibile dei precedenti, più laborioso, richiede lunghi tempi di esecuzione prima di escludere la presenza del virus ed è, in assoluto, più costoso. Può risultare negativo quando i campioni siano prelevati a soggetti in fase di remissione della sintomatologia o a causa della perdita di infettività del virus per cattive condizioni di trasporto e conservazione dei campioni.

L'isolamento su tessutocolture è risultato il test meno affidabile. Se ne consiglia comunque l'uso poiché, per alcuni stipiti virali, il substrato cellulare impiegato (MDCK) può essere più sensibile delle UE.

In ogni caso, ai fini della sorveglianza degli stipiti virali circolanti, l'esecuzione di entrambe le prove di isolamento è comunque indispensabile sia per l'esecuzione di tutte le ulteriori prove di caratterizzazione fenotipica e genomica, sia per la necessità di aggiornare i vaccini con stipiti con caratteristiche antigeniche mutate rispetto a quelli impiegati.

Verificate condizioni operative comuni per l'estrazione e l'amplificazione del genoma di diversi virus in modo da poter effettuare diagnosi differenziali simultanee mediante Real Time PCR nei confronti di virus respiratori : influenza, EHV 1/4, arterite virale - virus responsabili di aborto: EHV 1 ed arterite virale (allegato 6).

Fase d: *trasferimento di protocolli diagnostici e di materiali di riferimento alle diverse unità operative;*

Sono stati prodotti e distribuiti a tutti gli Istituti Zooprofilattici materiali di riferimento, protocolli e procedure operative in forma normalizzata sia ai fini dell'attuazione delle indagini previste dal progetto di ricerca, sia ai fini dell'esecuzione degli esami previsti dalle disposizioni normative vigenti in materia di malattie degli equini. In particolare per queste ultime è stato elaborato il documento contenente le Metodologie diagnostiche e protocolli d'intervento per le malattie negli equidi maschi riproduttori in seguito pubblicato dal Ministero della Salute, sulla G.U.R.I. n.66 del 21.03.05, come "linee guida per l'attuazione del D.M.19/07/2000 n.403 e del regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991, n.30, concernente disciplina della riproduzione animale" (allegato 7).

Sono di seguito riportati i materiali di riferimento distribuiti:

- stipite di referenza del virus dell'arterite equina CVL – Bucyrus, Sieri Positivi di Referenza ad alto titolo, a basso titolo e negativi per il virus;
- cellule in linea continua RK 13 (clone CCL 37 ATCC) da impiegare per la prova di sieroneutralizzazione e cellule in linea continua RK 13 (Ky origine Gluck University, Kentucky) da impiegare per la prova di isolamento virale;
- Virus A1 (H7N7) Praga 56 (A/eq/Praga/1/56) e siero positivo di referenza A/Equine-1/Newmarket/77;

- Virus A2 (H3N8) American –Like (A/eq/Newmarket/1/93) e siero positivo di referenza - A/Equine-2/Newmarket 1/93);
- Virus A2 (H3N8) Eurasian–Like (A/eq/Newmarket/2/93) e siero positivo di referenza del virus A/Equine-2/Newmarket 2/93);
- Siero negativo di lavoro per l’Influenza Equina;
- Virus dell’EHV 1 (ceppo Kentucky D) e sieri positivi e negativi di lavoro;
- Virus dell’EHV 4 (ceppo 405/75) sieri positivi e negativi di lavoro;

Fase e: *organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio;*

La realizzazione, dei circuiti di prova inter-laboratorio, è un passaggio fondamentale per la messa a punto e l’accreditamento dei metodi analitici nei confronti delle malattie infettive. Questa attività, comprende la sperimentazione di reagenti e protocolli, il loro trasferimento alla rete diagnostica, la loro validazione nonché la valutazione dei risultati forniti in termini di accuratezza e precisione. Parallelamente, sulla spinta operata dagli organismi internazionali (EDQM, OIE, WHO), le prove inter-laboratorio rivestono un ruolo determinante anche nello sviluppo di sistemi diagnostici nello stesso tempo omogenei e rispondenti ad elevati standard qualitativi.

L’attivazione di processi continui di valutazione dei network costituiti dai laboratori accreditati per la diagnosi delle malattie infettive, sia a livello nazionale che internazionale è una garanzia di una informazione accurata rispetto allo status sanitario delle popolazioni animali.

Al fine di valutare e standardizzare l’efficienza diagnostica dei diversi laboratori, sono stati portati a termine i circuiti interlaboratorio di prova relativi ai metodi diagnostici nei confronti dell’arterite virale degli equini ed è stata effettuata l’analisi statistica dei risultati. I circuiti hanno riguardato rispettivamente la prova di sieroneutralizzazione per la determinazione di anticorpi, nonché le prove di isolamento virale e di reazione a catena della polimerasi (PCR) per la ricerca diretta del virus.

Il sistema ha previsto l’impiego di metodologie per la valutazione dei risultati in funzione dei dati espressi in termini sia qualitativi, sia quantitativi. Ciò ha permesso di verificare da un lato la stabilità delle condizioni operative dei singoli laboratori, attraverso un’analisi di ripetibilità, dall’altro la concordanza e la conseguente riproducibilità dei risultati.

Il circuito di prova è stato condotto su 10 laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

L’analisi dei risultati del proficiency-test ha consentito di formulare alcune raccomandazioni ed individuare accorgimenti per i laboratori volti a migliorare standard qualitativi individuali, attraverso l’adozione, nella diagnostica, di controlli interni per il monitoraggio costante della stabilità delle condizioni operative. Sulla base di questi elementi, alcuni laboratori hanno messo in atto procedure di verifica interna necessarie alla risoluzione dei problemi all’origine dell’esito non soddisfacente delle prove di accuratezza, ripetibilità e concordanza.

L’adozione di tali misure correttive potrà portare, attraverso un miglioramento della sensibilità e della specificità analitiche individuali dei laboratori, ad un miglioramento della riproducibilità dei risultati ed a una maggiore uniformità di risposta a livello nazionale.

I report relativi a tale attività sono stati trasmessi agli Uffici competenti di Codesta Direzione Generale ed al Laboratorio di Veterinaria dell’Istituto Superiore di Sanità (allegati 8, 9, 10).

I risultati di tale attività sono stati anche presentati in occasione dell’ ”International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection” tenuto nel mese di ottobre 2004 presso il Centro di Referenza OIE, Lexington Kentucky. In tale circostanza sono stati affrontati tutti gli aspetti tecnico-diagnostici relativi alla malattia, considerato che ai fini degli scambi internazionali, assume particolare importanza il raggiungimento di uniformi livelli diagnostici di eccellenza da parte di tutti i laboratori ufficiali. Particolare spazio è stato dedicato alla discussione relativa agli strumenti necessari per il mantenimento e la verifica della riproducibilità e ripetibilità dei risultati intra- ed inter-laboratorio.

Fase f: *definizione delle procedure operative, del flusso informativo e sperimentazione del sistema di sorveglianza per l'influenza equina e West Nile disease ;*

INFLUENZA EQUINA - E' stata messa a punto ed applicata nella diagnostica di base la metodica sierologica per la ricerca degli anticorpi per influenza equina Single Radial Hemolysis (SRH). Il metodo raccomandato dall'OIE risulta possedere caratteristiche che ne consentono di ottenere una maggiore ripetibilità rispetto alla tecnica di inibizione dell'emoagglutinazione. L'SRH è inoltre essere in grado di definire i livelli anticorpali protettivi, a seguito di vaccinazione, nei confronti dei diversi sierotipi circolanti e pertanto risulta essere un utile strumento per la definizione del rischio individuale e della popolazione rispettivamente in relazione alla possibilità di contrarre l'infezione ed alla possibilità della stessa di assumere un andamento epidemico. Per la prova in questione, il Reparto ha partecipato ad un circuito interlaboratorio organizzato dall'European Directorate for Quality Measurement con esito positivo (allegato 11).

Sperimentato un modello di sorveglianza nel periodo 2004 – 2006 rivelatosi sensibile ai fini della diagnosi precoce dell'infezione attraverso la valutazione integrata del dato sierologico, clinico e virologico per la definizione della dinamica dell'infezione in funzione del livello di immunizzazione della popolazione, alla individuazione dei ceppi virali attualmente circolanti ed alla individuazione dei periodi e delle aree di maggior rischio per la comparsa della malattia. Per lo svolgimento delle attività previste dal piano, sono state trasferite procedure operative e materiali di riferimento alle UUOO partecipanti al progetto.

L'attività, condotta presso 6 strutture, ha previsto:

- sorveglianza durante i periodi invernali e primaverili a cavallo fra gli anni 2004-2005 e 2005-2006 su popolazioni di cavalli sportivi presenti negli ippodromi italiani o in centri di allenamento. Tale valutazione è stata condotta attraverso un controllo sierologico mensile su una coorte di 50 soggetti di 2-4 anni per strutture . Sulla stessa coorte di animali sono state condotte visite cliniche settimanali allo scopo di rilevare precocemente i sintomi di malattie respiratorie, effettuare le diagnosi differenziali ed isolare e tipizzare eventuali ceppi virali coinvolti.
- valutazione della dinamica dei titoli anticorpali protettivi lungo il periodo di osservazione, in funzione dei pregressi trattamenti immunizzanti e/o dell'infezione naturale. A questo scopo sono stati utilizzati sia i risultati ottenuti mediante applicazione del test d'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) sia i risultati quantitativi della sierologia effettuata mediante SRH test. (allegato 12)

WEST NILE DISEASE - Per quanto riguarda i flussi informativi ed i risultati dei piani di sorveglianza per WND condotti utilizzando gli strumenti diagnostici messi a punto nel corso del progetto di ricerca si rimanda ai Piani di sorveglianza specifici proposti alla regione Toscana per gli anni 2005 e 2006. Allo scopo è stato definito, un protocollo di sorveglianza volto a migliorare l'efficienza del sistema di allerta rapido e ad aumentare la sensibilità del Piano Nazionale, impiegando i metodi diagnostici di cui al precedente punto. Allo scopo è stata aumentata la numerosità degli equidi sottoposti a sorveglianza per avere la possibilità di rilevare almeno un caso di sieroconversione, con prevalenze pari al 5%, (L. C. 99%) nel periodo luglio- novembre di ogni anno, reclutando ai fini del progetto aziende considerate a maggior rischio di circolazione virale (vicinanza dall'area considerata a rischio e presenza di almeno un soggetto già positivo alle indagini preliminarmente condotte).

Inoltre, essendo state accertate positività sierologiche in soggetti nati dopo il 1998 e sieroconversioni fra il 2003 ed il 2005, è stata condotta un'indagine, stratificando il campione per età al fine di stimare dati di prevalenza per coorte di nascita, nei cavalli residenti presso l'area del Padule del Fucecchio e presso i territori delle province di Pistoia, Empoli, Lucca ad essa contigui. I risultati attribuiscono la

circolazione virale ad episodi sporadici riferibili ad introduzioni stagionali ed occasionali del virus a cui non sono seguiti eventi epidemici né una endemizzazione dell'infezione (gli equidi nati prima del 1999 (n=102) hanno mostrato una probabilità circa 12 volte maggiore di risultare sierologicamente positivi per WN rispetto ai 233 nati successivamente (O.R. 11,82; I.C. approx. logaritmica 3,422 – 43,470; Livello di confidenza 95%) (allegati 13 e 14).

Fasi g ed h: *valutazione dei fattori di rischio connessi all'insorgenza di focolai di influenza equina ed alla diffusione delle infezioni sostenute da tali virus; caratterizzazione degli stipiti virali circolanti*

Valutati i fattori di rischio alla base dell'insorgenza di focolai attraverso l'impiego della Single Radial Hemolysis (SRH), prova in grado di stimare il grado di protezione conferito dai vaccini o da immunità naturale.

Condotta la sorveglianza sugli stipiti circolanti, in funzione delle strategie vaccinali da impiegare nelle popolazioni bersaglio ed identificazione dei ceppi di influenza isolati.

E' stata effettuata la caratterizzazione genetica dei virus H3N8 di influenza equina isolati in Italia nel periodo 1999-2005. Gli stipiti sono stati isolati in occasione di focolai accertati nel corso dell'attività di sorveglianza condotta dal Centro di Referenza per le Malattie degli Equini presso alcuni ippodromi italiani ed a seguito di diagnosi virologiche condotte da altri Laboratori in seguito a casi di sindromi respiratorie.

L'allineamento e l'analisi filogenetica della sequenza degli aminoacidi della emoagglutinina (HA1) ha permesso di collocare gli isolati nel periodo 2003-2005 a Roma ed a Bari nel lineage americano, e di stabilire una correlazione con altri virus influenzali equini recentemente isolati in Europa e nel continente americano, nonché all'ultimo prototipo raccomandato nella composizione dei vaccini (A/eq/South Africa/4/2003). Questi isolati risultano comunque diversi dallo stipite di referenza (A/eq/Newmarket/1/93) precedentemente raccomandato dall'Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines.

Il virus isolato nel 1999 in Lombardia risulta invece appartenere al lineage europeo.

Considerato che gli stipiti American-like sono stati isolati in occasione di focolai di malattia verificatisi anche in soggetti vaccinati, vengono discussi i seguenti, possibili, fattori di rischio alla base del verificarsi di tali situazioni:

- Inadeguatezza dei protocolli vaccinali, con particolare riferimento ai giovani soggetti;
- Vaccini commercializzati nel nostro Paese nella cui composizione sono presenti stipiti eterologhi rispetto a quelli raccomandati dall'OIE;
- Eccessivi ritardi nell'adeguamento dei vaccini rispetto all'evolvere della situazione epidemiologica;
- Scarsa sensibilità da parte dei veterinari utilizzatori rispetto all'impiego di vaccini efficaci.

Il lavoro è stato trasmesso per la pubblicazione alla rivista "Virus Research" nel mese di maggio 2007 che ha già individuato un peer reviewer ai fini della valutazione scientifica (allegato 15)

TRASFERIMENTO DEI RISULTATI AL SSN E SIGNIFICATO DEL LORO TRASFERIMENTO

- Trasferiti dal Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini agli Uffici competenti del Ministero della Salute ed alle Regioni i dati relativi alla situazione epidemiologica relativa alle diverse malattie, i metodi di diagnosi ai referenti degli IZZSS attraverso specifiche relazioni ed eventi formativi.
- Ottenuto un miglioramento ed uniformità diagnostica nei laboratori della rete degli IZZSS.

- Predisposti a livello territoriale programmi d'intervento e piani di sorveglianza congruenti alle situazioni epidemiologiche in precedenza osservate e basati sulla conoscenza dei fattori di rischio connessi all'insorgenza ed alla diffusione delle malattie.

DIFFUSIONE DEI PRODOTTI DELLA RICERCA

Nel corso dei 3 anni, i prodotti della ricerca sono stati resi disponibili ed illustrati a veterinari di Sanità Pubblica e libero professionisti, operatori del settore, nel corso di giornate di studio convegni e congressi, tavole rotonde, corsi di formazione, corsi specialistici e scuole di specializzazione,

2004

- Giornata di Studio Internazionale sull'Influenza Equina
- Incontro con gli addetti dell'Ippodromo di Capannelle su Influenza Equina, vaccini e strategie di controllo
- Congresso Nazionale FISE "Cavallo Sportivo, Sanità Pubblica ed Aggiornamenti Legislativi"
- Corso Specialistico in Horse Management organizzato dalla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche di Brescia e dall'Istituto di Zootecnia della facoltà di Medicina Veterinaria di Milano
- formazione ai veterinari UNIRE per la realizzazione dello studio di follow up sui virus influenzali
- Incontri con gli addetti dell'Ippodromi di Capannelle (Roma) e Vinovo (Torino) su Influenza Equina, vaccini e strategie di controllo.
- Giornata di formazione sulle malattie infettive degli equini nell'ambito del Programma Operativo Nazionale "Ricerca Scientifica, Sviluppo Tecnologico, Alta formazione 2000-2006"
- Giornata di formazione sull'analisi dei risultati dei proficiency test realizzati, cui hanno partecipato i referenti di tutti gli Istituti Zooprofilattici.
- Lezione effettuata in occasione dell'evento formativo per medici chirurghi, veterinari e biologi "Attualità sulla West Nile Disease e prospettive di controllo", Palermo 4-5 novembre 2004

2005

- Il Cavallo: le malattie parassitarie ed infettive tra pratica clinica e ricerca scientifica - 24 maggio 2005 - - Facoltà di medicina Veterinaria - Teramo
- Sanità Equina e Sanità Pubblica, 19-20 ottobre - 2005 - Castelnuovo Rangone (Mo) - Servizio Sanitario Regionale Regione Emilia Romagna
- West Nile Disease: approcci diagnostici in relazione all'epidemiologia dell'infezione - Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria - 28-29 novembre 2005, Roma - Istituto Superiore di Sanità

2006

- Lezioni sulla diagnosi delle malattie degli equini - Scuola di specializzazione in Sanità animale - Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna
- Tavola rotonda su: Direttiva 2003/99: misure di sorveglianza sulle zoonosi - West Nile: rischio attuale o potenziale? - Società Italiana di Patologia Aviare 19 maggio 2006
- Neuropatologie di origine virale degli equini - 13 e 15 ottobre 2006, Milano - Roma

Si riportano in elenco i lavori scientifici prodotti anche con risorse finanziarie assegnate al progetto di ricerca:

WEST NILE DISEASE: SORVEGLIANZA NEI CAVALLI DEL PADULE DI FUCECCHIO E STUDIO TRASVERSALE CON VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DEL PERIODO 1999 - 2006. M. Sala, M.T. Scicluna, G. Manna, C. Cocumelli, F. Susini, A. Santini, R. Ricchi, L. Selmi, A. Battisti, P. Cordioli, G.L. Autorino. Lavoro inviato per la presentazione al III Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria, 13 e 14 settembre 2007, Abano Terme – Padova.

SORVEGLIANZA SUGLI STIPITI VIRALI DI INFLUENZA EQUINA ISOLATI IN ITALIA IN RAPPORTO ALLA PROFILASSI IMMUNIZZANTE A.M. Damiani, M.T. Scicluna, I. Ciabatti, G. Cardeti, G. Vulcano, P. Cordioli, V. Martella, M. Sala, D. Amaddeo, G.L. Autorino. II° Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria, Ozzano Emilia (BO), 7-8 giugno 2007, presentazione orale

CHARACTERIZATION OF EQUINE INFLUENZA VIRUSES ISOLATED IN ITALY FROM 1999 TO 2005 A.M. Damiani, M.T. Scicluna, G.L. Autorino, M. Sal, G. Cardeti, G. Vulcano, P. Cordioli, V. Martella, D. Amaddeo. European Society for Veterinary Virology, 7th International Congress of Veterinary Virology – Lisboa Portugal Pag 78 (oral presentation)

EXTENDED PHYLOGENY OF EQUINE ARTERITIS VIRUS: DIVISION INTO NEW SUBGROUPS Christian Mittelholzer, Tomas Stadejek, Irja Johansson, Claudia Baule, Iliaria Ciabatti, Duncan Hannant, David Paton, Gian Luca Autorino, Norbert Nowotny and Sándor Belák Journal of Veterinary Medicine (2006) B 53 p. 55-58

DEVELOPMENT OF A REAL-TIME PCR FOR THE DIFFERENTIAL DETECTION OF EQUINE HERPESVIRUS TYPE 1 AND TYPE 4 A. Damiani, I.M. Ciabatti, G. Cardeti, R. Lorenzetti, M.T. Scicluna, G.L. Autorino, D. Amaddeo 5th National Congress of the Italian Society of Virology Orvieto 19-21-settembre 2005

I CIRCUITI DI PROVA PER LA VALUTAZIONE DEI LABORATORI: UN'ESPERIENZA DEL CENTRO DI REFERENZA PER LE MALATTIE DEGLI EQUINI Sala M., Scicluna M.T., Cardeti G., Damiani A., Miceli M., Amaddeo D., Autorino G.L. Atti VI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Abano Terme(PD), 10-12 novembre 2004, pagg. 18-27

CARATTERIZZAZIONE ED ANALISI FILOGENETICA DI TRE CEPPI DI INFLUENZA EQUINA ISOLATI IN ITALIA NEL 2003 E 2004 A. Damiani, I. Ciabatti, G. Vulcano, T. Scicluna, G. Cardeti, G.L. Autorino D. Amaddeo Atti VI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Abano Terme (PD), 10-12 novembre 2004, pagg. 71-72

PERFORMANCE EVALUATION OF ITALIAN OFFICIAL LABORATORIES FOR CELL CULTURE ISOLATION OF EQUINE ARTERITIS VIRUS FROM SEMEN SAMPLES BY INTRA AND INTER-LABORATORY TESTING M. Sala, M.T. Scicluna, M. Miceli, G. Cardeti, D. Amaddeo and G.L. Autorino, Atti International OIE Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection, 19 - 21 ottobre 2004, Lexington Kentucky, pag 24-25

EVALUATION OF NATIONAL LABORATORIES IN ITALY IN PERFORMING THE VIRUS NEUTRALIZATION TEST FOR THE DIAGNOSIS OF EQUINE ARTERITIS VIRUS INFECTION BY MEANS OF INTRA AND INTER-LABORATORY TESTING M. Sala, M.T. Scicluna, M. Miceli, G.L. Autorino, Atti International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection, 19 - 21 ottobre 2004, Lexington Kentucky, pag 43