

RICERCA CORRENTE 2008

REPORT FINALE Progetto IZSLT 07/08 RC

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 d'infezione .**
- **valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti**

Area tematica: **Sanità animale**

linea di ricerca: Analisi delle malattie trasmissibili mediante lo studio di fattori intrinseci ed estrinseci correlati all'ospite. comprensione e soluzione di problematiche sanitarie urgenti. Sistemi di sorveglianza sulle malattie infettive o sulle patologie di interesse della medicina veterinaria. Studio e messa a punto di nuovi protocolli diagnostici.

Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino

Struttura di appartenenza: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT), Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma

e-mail gianluca.autorino@izslt.it

Data scadenza del progetto: 31.03.2012

“ Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti”

Roma li, 30 Maggio 2013

INDICE GENERALE ED ELENCO DEGLI ALLEGATI

ELENCO DEI COLLABORATORI	4
SINTESI	9
INTRODUZIONE	16
WORK PACKAGE 1	
VALIDAZIONE DI METODI ELISA	
VALIDAZIONE DI UN ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI CONTRO LA p26 DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA NEL SIERO DI EQUIDI	19
VALIDAZIONE DI UN KIT ELISA INDIRETTO PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUINI	23
CONFRONTO TRA LE METODICHE ELISA DISPONIBILI IN ITALIA PER LA DIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA	31
SVILUPPO ED OTTIMIZZAZIONE DI SAGGI MOLECOLARI PER LA RICERCA E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA GENOMICO DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA IN CAMPIONI DI PLASMA	46
VALUTAZIONE DI UN NUOVO PROTOCOLLO DI SCREENING NELL'ATTUAZIONE DEL PIANO DI SORVEGLIANZA NAZIONALE E VERIFICA DELLA CONCORDANZA FRA METODICHE DISPONIBILI.	
WORK PACKAGE 2	
STUDIO DEI PRINCIPALI FATTORI DI RISCHIO NEI CLUSTER GEOGRAFICI D INFEZIONE	
REALIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UNA SCHEDA EPIDEMIOLOGICA STRUTTURATA PER LO STUDIO DEI FATTORI DI RISCHIO	
ANALISI DEI RISULTATI DELL'ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA CONDOTTA NEL PERIODO 2007 – 2011 NELL'AMBITO DEI PIANI DI CONTROLLO DELL'AIE	
WORK PACKAGE 3	
VALUTAZIONI CLINICHE ED IMMUNOLOGICHE IN EQUIDI NATURALMENTE INFETTI	
RISPOSTA CLINICA, SIEROLOGICA ED EMATOLOGICA IN MULI CON INFEZIONE NATURALE DA VIRUS DELL'AIE A SEGUITO DI RIATTIVAZIONE FARMACOLOGICA	
MODALITA' DI DIVULGAZIONE DEI RISLULATI	24

ALLEGATO 1

VALIDAZIONE DI UN ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI CONTRO LA p26 DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA NEL SIERO DI EQUIDI

ALLEGATO 2

VALIDAZIONE DI UN KIT ELISA INDIRETTO PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUINI

ALLEGATO 3

CONFRONTO TRA LE METODICHE ELISA DISPONIBILI IN ITALIA PER LA SIERODIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA

ALLEGATO 4

SCHEMA EPIDEMIOLOGICA

ALLEGATO 5

BROCHURE CONVEGNO INTERNAZIONALE "ANEMIA INFETTIVA EQUINA, ATTUALITÀ E PROSPETTIVE DI CONTROLLO A SEI ANNI DALLA SORVEGLIANZA PIANIFICATA"

ELENCO DEI COLLABORATORI

1. Unità Operativa n.1

Centro Nazionale di Referenza per l'Anemia Infettiva Equina - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Forletta Riccardo

Collaboratori: Ida Ricci, Enrica Ricci, Laura Gasperetti

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Revisione della letteratura inerente gli aspetti diagnostici, patogenetici, filogenetici ed epidemiologici del virus dell'AIE.
- 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)
- Revisione e definizione dei protocolli molecolari diagnostici per AIE
- 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).
- 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
- 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.
- Produzione della relazione finale limitatamente alle attività svolte

Unità operativa n. 2,

Osservatorio epidemiologico - IZSLT Roma

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Marcello Sala

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Programmazione del disegno ed organizzazione logistica delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test diagnostici disponibili (ELISA, AGID, IB).
- 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.
- 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.
- 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.
- Raccolta ed archiviazione informatica dei risultati delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test sierologici.
- Analisi statistica ed elaborazione dei risultati delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test diagnostici.

- 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.
- Redazione del rapporto finale del progetto e pubblicazione dei risultati ottenuti su riviste di settore, presentazioni a Convegni e diffusione mediante siti internet.

Unità operativa n. 3

IZSLT, Sezione Rieti

Responsabile dell'Unità Operativa: Goffredo Grifoni

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Organizzazione logistica degli ingressi in aziende focolaio e controllo, individuate nell'ambito del PNS
- 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
- 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.
- Follow-up clinico in gruppi di equidi positivi

Unità operativa n. 4

IZSLT, Ufficio di Staff Biotecnologie

Responsabile U.O.: dr. Ilaria Maria Ciabatti

Collaboratori: Antonella Cersini, Raniero Lorenzetti

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- 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.
- 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.
- Raccolta ed archiviazione informatica dei dati relativi a rilievi virologici e tipizzazione degli stipiti virali.
- Elaborazione dei risultati relativi agli studi filogenetici su ceppi virali provenienti da focolai di AIE.

Unità operativa n. 5

IZSLT, Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini (CERME) – Roma

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Gian Luca Autorino

Collaboratori: Teresa Scicluna, Roberto Nardini, Andrea Caprioli, Francesca Rosone, Elena Canelli, Giuseppe Manna, Raffaele Frontoso

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Revisione della letteratura inerente gli aspetti diagnostici, patogenetici, filogenetici ed epidemiologici del virus dell'AIE.
- 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.
- Programmazione del disegno ed organizzazione logistica delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test diagnostici disponibili (ELISA, AGID, IB).
- 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)
- 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.
- 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.
- 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.
- 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).
- Raccolta ed archiviazione informatica dei risultati delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test sierologici.
- Ingressi nelle aziende focolaio e nelle aziende di controllo, compilazione dei modelli informativi per lo studio dei fattori di rischio
- 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.
- 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.
- 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.
- Raccolta ed archiviazione informatica dei dati relativi a rilievi clinici, immunologici e virologici con tipizzazione degli stipiti virali.
- Analisi statistica ed elaborazione dei risultati delle prove di performance e della valutazione di concordanza tra test diagnostici.
- 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.
- 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.

Unità operativa n. 6

Centro Retrovirus – Sezione di Virologia, Università di Pisa

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Mauro Pistello,

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Revisione e definizione dei protocolli molecolari diagnostici per AIE
- 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
- 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.
- Redazione del rapporto finale sui risultati delle attività assegnate.

Unità operativa n. 7,

Servizio Veterinario ASL Rieti

Responsabile U.O. Angelo Toni

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Organizzazione logistica degli ingressi in aziende focolaio e controllo, individuate nell'ambito del PNS
- 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.
- 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.

Unità operativa n. 8,

Servizio Veterinario ASL RM G

Responsabile U.O. Giancarlo Micarelli

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Organizzazione logistica degli ingressi in aziende focolaio e controllo, individuate nell'ambito del PNS
- 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.
- 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.

Unità operativa n. 9

Servizio Veterinario ASL Frosinone

Responsabile U.O. Antonio Messore

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Organizzazione logistica degli ingressi in aziende focolaio e controllo, individuate nell'ambito del PNS
- 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.
- 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.

Unità operativa n. 10

Gluck Equine Research Center – Lexington, Kentucky

Responsabile U.O. Charles J. Issel

Collaboratori, Frank Cook

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- 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.
- 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.

Unità operativa n. 11

IZSLT, Sezione Latina

Responsabile U.O. Renato Ugo Condoleo

Collaboratori, Giorgio Saralli, Fabrizio Piovesan

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Organizzazione logistica degli ingressi in aziende focolaio e controllo, individuate nell'ambito del PNS
- 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
- 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.
- Follow-up clinico in gruppi di equidi positivi

SINTESI IN ITALIANO

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 d'infezione .**
- **valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti**

*Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti*

Autore: Gian Luca Autorino

N. identificativo progetto: IZSLT 07/08 RC

Responsabile Scientifico:

dal 1. 08. 2010 al 31. 12. 2011 Riccardo Forletta

dal 1.01.2012 al 30.06 2012 Gian Luca Autorino

e-mail: gianluca.@izslt.it

Obiettivi

Di seguito si rappresentano i principali obiettivi del progetto:

- a) Perseguire il miglioramento della sensibilità complessiva del Piano di Sorveglianza nazionale dell'anemia infettiva (PSN) applicando e valutando un nuovo protocollo per lo screening e la conferma dei casi, attraverso la stima della "sensibilità relativa" del metodo ELISA e dell'AGID rispetto ai campioni di controllo positivi provenienti dal PNS.
- b) 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).
- c) Valutare la 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 definendone il grado di precisione, accuratezza e di accordo depurato dall'effetto del caso ai fini di una loro utilizzazione nell'ambito del Piano di Sorveglianza, sia dai laboratori di prima istanza, sia dal Centro di Riferenza.
- d) Ottimizzare le tecniche di RT-PCR precedentemente sviluppate, allestire ulteriori metodi molecolari di tipo qualitativo e Real-Time Taq-Man PCR quantitativa e sperimentare tali protocolli per la diagnosi diretta di AIE su campioni di sangue, verificandone la specificità, sensibilità e riproducibilità al fine di poterne valutare la possibilità di impiego ad integrazione dei metodi sierologici.
- e) Ridefinire la strategia diagnostica relativamente all'AIE mediante metodi tradizionali ed innovativi.
- f) Definire oggettivamente i fattori di esposizione correlati alla presenza dell'infezione all'interno dei cluster geografici ai fini della gestione del rischio.
- g) Chiarire il ruolo delle diverse specie di equidi nel mantenimento e nella diffusione dell'AIE.

Metodologia

WP1 - Ai fini della valutazione di un nuovo protocollo di screening nell'attuazione del Piano di sorveglianza nazionale e verifica della concordanza fra metodiche disponibili, si è dapprima proceduto alla validazione di una in-house ELISA messa a punto presso il CERME, secondo i criteri definiti dall'OIE.

Sono stati quindi distribuiti la procedura ed i reagenti per l'esecuzione del test come metodo di screening ai laboratori degli II.ZZ.SS. nell'ambito del PNS del territorio di competenza, in particolare quelli operanti nelle aree a maggior prevalenza di AIE.

I campioni positivi sono stati sottoposti a conferma mediante immunodiffusione in gel di agar (AGID) ed immunoblotting (IB), valutandone la rispettiva sensibilità relativa.

Sono stati quindi 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 sono stati anche valutati i risultati ottenuti attraverso l'organizzazione di un proficiency test cui hanno partecipato 20 laboratori nazionali, in termini di precisione, accuratezza nonché di concordanza depurata dell'effetto del caso applicando la Statistica K di Cohen e altri indici statistici appropriati.

Sono stati 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.

WP2 - Ai fini dello studio dei principali fattori di rischio nei cluster geografici di infezione è stata realizzata una scheda strutturata (modello informativo) per la raccolta di informazioni relative ai possibili fattori di rischio per AIE e relativi all'anamnesi aziendale.

E' stato quindi operato un pre-test dei modelli informativi in alcuni allevamenti campione, con la finalità di individuare i quesiti incompleti o mal formulati, gli argomenti degni di maggior approfondimento utilizzando tale scheda per la raccolta dei dati epidemiologici nell'ambito dei focolai individuati nell'ambito del PNS.

WP3 - Alla luce dei risultati delle attività di cui al WP1 che mettevano in evidenza una modesta sensibilità analitica dell'AGID rispetto agli altri test di screening e del PSN attraverso il quale si rilevava che il rischio di trovare un animale infetto era oltre 50 volte superiore all'interno della categoria mulo rispetto a quello della categoria cavallo, la parte del progetto volta a definire le valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti è stata condotta su di un gruppo di muli. Sono stati pertanto reclutati 10 muli diagnosticati positivi nell'ambito del PNS che presentavano un differente pattern sierologico anche per valutare l'infettività di soggetti negativi ai test diagnostici convenzionali. Su tali animali, mantenuti in una struttura autorizzata, è stato condotto uno studio longitudinale per oltre 80 giorni al fine studiare gli eventuali quadri sindromici conseguenti a riacutizzazione dell'infezione naturale, raccogliendo sistematicamente i dati clinici e campioni biologici per le analisi immunologiche e virologiche da condurre attraverso i metodi diagnostici tradizionali ed innovativi. I parametri relativi a insorgenza e durata dei rilievi clinici, dinamica anticorpale e attività virale sono stati quindi analizzati anche per definire il rischio di trasmissione del virus in rapporto alle differenti condizioni dell'infezione.

Risultati e conclusioni

WP 1

VALIDAZIONE DI METODI ELISA

Sono stati messi a punto e validati, secondo i requisiti prescritti dal Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010, due metodi ELISA per la diagnosi sierologica di AIE dei quali, il primo è un metodo competitivo che impiega come antigene la proteina ricombinante p26 del virus ed il secondo è un metodo indiretto che ha come antigene una proteina ricombinante contenente epitomi antigenici sia della p26 che della glicoproteina gp45.

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici e pratici l'impiego dell'ELISA risponde alle necessità di riduzione di costi di produzione, dei tempi di risposta e, soprattutto, all'esigenza di avere criteri di lettura oggettivi e confrontabili.

Entrambi i metodi rispondono ai requisiti prescritti dal Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010. In particolare, risultano possedere caratteristiche intrinseche adeguate allo scopo per cui sono stati sviluppati in termini di specificità e sensibilità analitica non reagendo con sieri positivi per altri Retrovirus ed avendo un LOD di oltre 3 log₁₀ inferiori rispetto all'AGID, considerato come test di riferimento.

Le caratteristiche di ripetibilità, riproducibilità intra ed interlaboratorio e di concordanza ne rendono possibile l'impiego e la loro diffusione a tutti i laboratori di diagnostica sierologica in possesso di adeguate capacità professionali e requisiti strumentali.

La specificità diagnostica del test, valutata in rapporto all'immunodiffusione risulta essere buona e migliora in relazione all'immunoblotting, metodo dotato di maggiore sensibilità rispetto al citato metodo ufficiale di conferma.

Tuttavia, le performance in termini di elevata sensibilità diagnostica e specificità analitica, riconoscendo il 100% dei campioni positivi al metodo di conferma di riferimento, li rendono particolarmente indicati come test di screening da impiegare nel corso di programmi di controllo e di eradicazione essendo in grado di reclutare il maggior numero di soggetti reattivi.

Ciò, in particolare, se si considera che ogni positività deve essere successivamente confermata presso il Laboratorio di riferimento nazionale.

Va sottolineato che la precocità dimostrata dal secondo metodo nel rilevare la presenza di anticorpi in sieri di animali infettati sperimentalmente, ottenuti dalla UO n. 10, è una caratteristica importantissima soprattutto nel momento in cui il piano di sorveglianza si avvicina all'eradicazione della malattia e ne trova utile applicazione nell'ambito dei focolai.

CONFRONTO TRA LE METODICHE ELISA DISPONIBILI IN ITALIA PER LA DIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA

Le prove di concordanza eseguite in questa fase della ricerca hanno messo in evidenza che tutti i kit commerciali disponibili in Italia si sono idonei all'impiego come test di screening nell'ambito dell'attività di sorveglianza essendo in grado di riconoscere correttamente il pannello di campioni positivi e negativi impiegati nel corso del circuito interlaboratorio effettuato scegliendo parametri di valutazione oggettivi.

Tuttavia, ai fini del loro impiego corrente, i parametri di scelta, oltre alle caratteristiche tecniche al kit, possono essere vari: il costo, il tempo di esecuzione e soprattutto la sensibilità e precocità che si decide di ritenere accettabile in base anche alle caratteristiche della popolazione che si va ad esaminare.

Inoltre, questo confronto ha messo in evidenza come i kit necessitino di una validazione completa, effettuata seguendo delle criteri formali come quelli del manuale OIE. Ad oggi, disponibile per i due solo kit richiamati nei paragrafi precedenti.

SVILUPPO ED OTTIMIZZAZIONE DI SAGGI MOLECOLARI PER LA RICERCA E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA GENOMICO DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA IN CAMPIONI DI PLASMA

Nel corso del progetto sono stati sviluppati e confrontati metodi molecolari quantitativi e qualitativi per rilevare l'RNA genomico di EIAV in campioni di plasma.

I metodi quantitativi basati sulla tecnologia real-time presentano molti vantaggi rispetto all'amplificazione classica come la rapidità, la semplicità di esecuzione, la minor manipolazione del campione e quindi minor rischio di contaminazione. Inoltre, l'amplificazione, in parallelo ai campioni, di standard a concentrazione nota permette sia di quantificare i campioni che di valutare il range di linearità e la riproducibilità del metodo stesso.

Sono stati anche sviluppati due metodi di RT-nPCR. Per quanto riguarda i test quantitativi, il metodo One-Step (RT e PCR avvengono nella stesso tubo di reazione) ha mostrato notevoli vantaggi rispetto al Two-Step: rapidità, facilità di esecuzione, maggiore sensibilità e accuratezza. Entrambi i saggi hanno rivelato una sensibilità analitica di 100 copie di RNA ma la sensibilità espressa come numero di copie/ml plasma è risultata maggiore nel metodo One-Step poiché in questo caso, proprio per le modalità con le quali i saggi sono allestiti, tutto l'RNA retroscritto è amplificato mentre la Two-Step PCR amplifica solo una parte del cDNA. Per lo stesso motivo, la tecnica Two-Step RT-nPCR, che combina insieme RT e primo step della nPCR, è stata capace di rilevare un minor numero di copie di RNA virale/ml rispetto al saggio Three-Step. La Two-Step RT-PCR ha mostrato anche una maggiore sensibilità analitica poiché è stata più efficiente, rispetto al metodo Three-Step, nel rilevare le 10 copie del trascritto EIAV gag. La maggiore sensibilità dei saggi che combinano insieme RT e PCR è stata in seguito confermata dall'analisi di campioni di plasma EIAV negativi drogati con il surnatante di cellule infettate con il virus.

Le sacche di plasma equino, arrivate presso il nostro laboratorio e sospette di contaminazione da EIAV, sono state, trattandosi di campioni prelevati sul campo, una opportunità per validare i metodi molecolari sviluppati. Tra le dodici sacche risultate positive, particolarmente utili sono stati i quattro campioni (PD1, PD6, PD8 e PD22) con carica virale al limite della sensibilità dei test e molto simile a quella riscontrata negli animali in fase cronica²⁶. Il saggio One-Step real-time RT-PCR è stato di gran lunga il metodo più sensibile in quanto ha messo in evidenza il virus in tutti e quattro i campioni sopra citati; la Two-Step RT-nPCR, che utilizza la stessa miscela di reazione della One-Step real-time RT-PCR, ha fallito nel rilevare la positività di due campioni (PD1 e PD22) mentre nessuno dei 4 plasmi è stato amplificato mediante i test Two-Step real-time RT-PCR e Three-Step RT-nPCR, i due metodi meno sensibili.

In conclusione, le One-step real-time RT-PCR e Two-step RT-nPCR descritte in questo lavoro sono altamente specifiche, sensibili e accurate e possono essere utilizzate come test di routine per la ricerca di EIAV in campioni di plasma. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi su campioni di campo per verificare l'effettiva possibilità di impiego di questi metodi ad integrazione dei test sierologici per AIE.

VALUTAZIONE DI UN NUOVO PROTOCOLLO DI SCREENING NELL'ATTUAZIONE DEL PIANO DI SORVEGLIANZA NAZIONALE E VERIFICA DELLA CONCORDANZA FRA METODICHE DISPONIBILI

Fra il 2007 ed il 2010, dei 923.299 campioni controllati in Italia nel corso della sorveglianza per AIE, 96.468 sono stati esaminati utilizzando il test C-ELISA come metodo di screening. Fra questi, 331 sono risultati positivi, ma solo 124 potevano essere interpretati e confermati come tali con il metodo AGID. I 207 campioni C-ELISA positivi/AGID negativi sono stati quindi successivamente controllati mediante IB. Di questi 207 campioni, 25 sono stati interpretati come IB positivi in

quanto reattivi nei confronti delle tre principali proteine strutturali (p26, gp45 3 gp90) dimostrando pertanto l'esposizione dei soggetti al virus. Dei rimanenti 182, la maggior parte erano negativi in IB (146), mentre il 20% (36) erano reattivi per la sola proteina p 26. Pertanto la proporzione dei positivi in elisa sui 946.468 campioni testati è pari allo 0,037 per cento. Su 22 dei 25 soggetti rilevati come positivi attraverso l'integrazione dei metodi sierologici è stato possibile effettuare successive indagini che hanno messo in evidenza che 17 di questi (77%) erano stati esposti a fattori di rischio quali la presenza di precedenti casi di AIE nelle aziende di origine.

Pertanto, l'evidenza sierologica dell'infezione rilevata attraverso l'impiego integrato dei metodi è risultata superiore di circa il 17 per cento (25/149) di quanto sarebbe stata impiegando la sola immunodiffusione la cui quota di falsi negativi sull'intera popolazione di 96.468 soggetti campionati è pari allo 0,026 per cento. Solo il 12% dei campioni ELISA-positivi, risultati AGIDT negativi erano comunque confermati come positivi in immunoblot. Ciò significa che, secondo una differente prospettiva, la percentuale degli ELISA falsi positivi è pari allo 0,19 per cento (182/96.468).

A seguito della descrizione e della validazione dell'AGIDT il suo impiego nella diagnosi dell'AIE è stato favorevolmente accolto e raccomandato dalla comunità scientifica. Dagli anni '80 sono stati messi a punto numerosi kit ELISA che hanno trovato un largo impiego. Tuttavia, l'AGID è ancora oggi considerato il gold standard per la diagnosi sierologia dell'AIE in quanto strettamente correlato al test di inoculazione sperimentale e per le sue caratteristiche di accuratezza, essendo estremamente rara la frequenza di falsi positivi. Di conseguenza, ogni tentativo di modificare tale assunto è stato nel tempo valutato con scetticismo, in considerazione del successo ottenuto dall'AGID da parte delle autorità dei diversi paesi. I dati ottenuti, assieme ad altre evidenze virologiche indicano la crescente necessità di impiegare l'ELISA sia per motivi strettamente connessi alla maggiore sensibilità che per limitare l'occorrenza dell'errore umano nell'interpretazione dei risultati.

Come anche dimostrato dal lavoro svolto di comparazione dei kit ELISA commerciali di cui al capitolo precedente, i risultati di tutti sono in linea con quelli dell'AGIDT. In questo studio l'attenzione è stata concentrata sui campioni reattivi/positivi in ELISA ma negativi/equivoci in AGID. In questi casi l'impiego di un test maggiormente sensibile e specifico quale l'IB risulta di importanza fondamentale per chiarire l'effettivo stato sanitario degli equidi nei confronti dell'infezione. E' inoltre stato osservato che nei casi in cui la maggior parte degli equidi che risultano reattivi/positivi a più di un kit ELISA, interpretati negativi in AGID, sono quindi controllati in immunoblot, i campioni reagiscono positivamente nei confronti di entrambe le glicoproteine dell'envelope di AIEV.

In conclusione, i dati a disposizione indicano che un certo numero di equidi infetti con anticorpi per le tre principali proteine di AIE possono non essere rilevati quando controllati unicamente con l'AGID. La percentuale di questi non è ancora ben nota, tuttavia, sulla base delle nostre osservazioni che comunque tengono conto di un rilevante numero di controlli, si può stimare che circa il 20% dei soggetti infetti da AIE possa sfuggire al controllo. Se l'obiettivo dei programmi di controllo è quello di rilevare tutti gli equidi infetti attraverso l'impiego di test sierologici, lo sforzo degli organismi ufficiali dovrebbe essere quello di aumentarne la sensibilità attraverso il sistematico impiego di dei test ELISA nelle fasi di screening.

Sulla base del complesso delle attività condotte, consideriamo che l'affidabilità della sierologia costituisca ancora oggi il migliore approccio per il controllo dell'AIE in quanto le ricerche virologiche, o comunque del genoma virale, non sono oggi in grado di fornire risultati altrettanto accurati ed affidabili, considerata l'estrema variabilità sia delle concentrazioni virali ne corso della vita degli animali infetti e, nondimeno, dell'estrema diversità genetica che si osserva fra gli stipiti circolanti.

WP 2

REALIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UNA SCHEDE EPIDEMIOLOGICA STRUTTURATA PER LO STUDIO DEI FATTORI DI RISCHIO

Ai fini dello studio è stata realizzata una scheda strutturata per la raccolta di informazioni relative all'anamnesi aziendale in funzione della quantificazione dei possibili fattori di rischio per AIE. La scheda, da somministrare in focolai accertati nel corso delle attività di sorveglianza, si compone di una prima parte per la raccolta dei dati identificativi anagrafici ed include anche la descrizione della tipologia di allevamento, secondo le definizioni già presenti in Banca Dati Nazionale, nonché l'adozione di provvedimenti a seguito di notifica. Seguono quindi 6 sezioni ai fini della raccolta dei dati relativi a: stato sanitario dell'azienda, anamnesi aziendale, censimento, caratteristiche dell'azienda, tipologia del territorio, presenza ed abbondanza dei vettori, misure di biosicurezza aziendali, residenzialità degli equidi e movimentazioni degli stessi.

Nel corso del periodo della ricerca il questionario è stato somministrato in via sperimentale presso un numero limitato di aziende focolaio. Dopo revisione dello stesso ed eliminazione di quesiti ridondanti o che potessero costituire un fattore di confondimento, il suo impiego è stato esteso a 62 aziende con soggetti positivi di differenti categorie situate in 12 regioni. Questa attività costituirà la base per la realizzazione, a partire dal 2013, di uno studio caso-controllo confrontando i dati dei focolai con quelli che saranno raccolti in un numero almeno doppio di allevamenti negativi scelti secondo criteri di casualità.

ANALISI DEI RISULTATI DELL'ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA CONDOTTA NEL PERIODO 2007 – 2011 NELL'AMBITO DEI PIANI DI CONTROLLO DELL'AIE

I trend osservati nella popolazione di capi e aziende controllati nel 2011 sembra evidenziare un progressivo e costante abbattimento dei livelli di occorrenza di AIE sul territorio nazionale, nonostante la conferma di cluster di infezione del centro-sud Italia. Tale quadro risulterebbe congruo rispetto all'efficacia delle misure di controllo messe in atto, con conseguente progressiva riduzione delle fonti di infezione rappresentate dagli animali infetti. Considerando inoltre come la malattia sia connessa a meccanismi di trasmissione poco efficienti (infezione iatrogena – insetti vettori meccanici), tale riduzione delle fonti di contagio prefigura ripercussioni favorevoli sul futuro quadro epidemiologico dell'AIE.

Permane tuttavia come principale punto critico la valutazione dell'intensità di sorveglianza raggiunta sulla popolazione nazionale di equidi. In effetti, nell'ambito del precedente report relativo al periodo 2007-2010, veniva segnalata l'ipotesi che l'obiettivo di controllare l'intera popolazione generale di equidi, disposto dalla O.M. 2006, fosse stato raggiunto solo parzialmente nel 2007 e che sia invece stato ottenuto solo nell'arco del primo biennio 2007-2008. Considerando che la popolazione generale di equidi è stata sottoposta a controllo solo a partire dal 2007, il dato di prevalenza delle prime 2 annualità risulta verosimilmente costituito in maggioranza da campioni positivi "prevalenti", ossia da campioni di equidi mai testati prima, i quali hanno contratto l'infezione negli anni antecedenti il 2007.

Nello stesso report, si considerava plausibile che i capi risultati positivi nel primo biennio dovessero essere stati allontanati, e comunque non più testati. Le stime di prevalenza di campioni positivi del secondo biennio (2009-2010) venivano quindi interpretate come migliore espressione dell'incidenza dell'infezione, spiegata da 2 possibili motivazioni:

- il riscontro di campioni di equidi testati e negativi in precedenza i quali avevano contratto infezione a partire dal 2008
- il riscontro di nuovi casi su capi di nuovo arruolamento e non testati nel corso degli anni precedenti.

L'analisi effettuata sui dati 2011 sembra confermare quest'ultima ipotesi.

Nonostante l'entità dell'incidenza di nuovi focolai nel 2011 necessiti di una conferma più oggettiva e basata sull'archivio ufficiale delle notifiche pervenute al Ministero dal 2007, la tendenza al riscontro di focolai incidenti risulterebbe evidente sulla base dell'archivio storico delle conferme detenute dal CRAIE. In particolare emerge come tali focolai possano essere stati individuati in strutture che detengono equidi arruolati per la prima volta nell'ambito della sorveglianza, soprattutto nelle regioni del centro-sud.

WP 3

RISPOSTA CLINICA, SIEROLOGICA ED EMATOLOGICA IN MULI CON INFEZIONE NATURALE DA VIRUS DELL'AIE A SEGUITO DI RIATTIVAZIONE FARMACOLOGICA

Questo studio costituisce il primo report sulla riattivazione farmacologica dell'infezione da AIE in muli naturalmente infetti che apparentemente sembra produrre forme cliniche non gravi accompagnate da febbre, trombocitopenia e aumento della risposta anticorpale limitatamente ad alcuni soggetti. La prova condotta su 11 muli naturalmente infetti ha dimostrato quanto segue:

- L'immunosoppressione farmacologica si è dimostrata efficace in tutti i soggetti.
- A seguito di questa, sette degli animali in osservazione hanno mostrato sia febbre che trombocitopenia ed entrambe le alterazioni sono state concomitanti nella maggior parte dei soggetti, mentre gli altri sintomi clinici per i quali gli animali sono stati monitorati sono stati modesti o inapparenti.
- Sei degli animali sottoposti ad osservazione hanno mostrato incrementi di reattività sierologica per AIEV a seguito di immunosoppressione; di questi, 2 nei confronti di uno solo fra i metodi impiegati, mentre nei rimanenti 4 la sieroconversione è risultata evidente con tutti i tre metodi utilizzati. Sebbene i tre metodi abbiano la p26 come denominatore comune, l'aumento di reattività nei confronti di questa proteina è risultato più evidente e marcato in Elisa ed Agid, piuttosto che in IB, metodo quest'ultimo riconosciuto come maggiormente sensibile rispetto agli altri (Issel, C.J. *et. al.*, 1988). Come già riportato in letteratura, l'AGID si conferma il metodo meno sensibile per la rilevazione degli anticorpi AIE specifici. Questo risultato assume particolare rilevanza ai fini dell'appropriatezza dell'uso dei tre metodi nell'ambito dei piani di sorveglianza. Ciò impone la scelta dell'Elisa in posizione di assoluto vantaggio.
- Nel confrontare la risposta clinica rispetto ai risultati sierologici, si è osservato che fra gli 8 soggetti con febbre e trombocitopenia solo 4 hanno mostrato aumento di reattività sierologica. Risultati questi che dimostrano l'assenza di una correlazione evidente fra le due situazioni, almeno rispetto all'impiego dei metodi descritti.
- Le indagini virologiche che sono attualmente in corso sui campioni raccolti nel periodo P.IS. per valutare la concentrazione di virus sia ai fini della valutazione del rischio biologico costituito da tali soggetti nel corso delle fasi di infezione potranno fornire maggiori informazioni circa il potenziale ruolo epidemiologico che questa categoria di animali può rivestire nella diffusione dell'infezione sia nel corso della fase cronica/inapparente che in fase acuta/viremica.

INTRODUZIONE

L'Anemia Infettiva Equina (AIE) è un'infezione ad eziologia virale degli equidi, sostenuta da un virus della famiglia Retroviridae, genere Lentivirus. Questo virus ha tropismo per i monociti-macrofagi e in virtù di questa caratteristica invade diversi organi, principalmente milza, reni, polmoni, fegato e linfonodi. La trasmissione del virus dell'AIE avviene di solito attraverso veicoli biologici e meccanici. I veicoli biologici sono riconosciuti in varie specie di insetti ematofagi, appartenenti alle famiglie Tabanidae, Hippoboscidae e Muscinae; comunemente conosciuti rispettivamente come tafani, mosche cavalline e mosche domestiche. I veicoli meccanici principali sono gli interventi terapeutici/chirurgici effettuati senza rispettare le norme di biosicurezza.

Sperimentalmente l'infezione può decorrere con una fase acuta iniziale caratterizzata da febbre, inappetenza, edemi ed emorragie, che esita generalmente in una forma cronica con episodi febbrili ricorrenti. Più frequentemente può presentarsi in una forma inapparente che in momenti di stress può riacutizzarsi. L'infezione dal virus dell'AIE (AIEV) ha carattere persistente.

La diagnosi sierologica di questa infezione, secondo il D.M. 4/12/1976, deve essere effettuata dagli IZZSS competenti territorialmente e confermata dal Centro di Referenza Nazionale. Il test di conferma è l'immunodiffusione in gel di Agar (AGID), come da descritto da Coggins.

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 controllare sierologicamente tutta la popolazione nazionale di equidi, al fine di allontanare i soggetti positivi e valutare la prevalenza dell'infezione. La prosecuzione dell'attività anche a seguito di nuove disposizioni sulla sorveglianza (OM 18.12.07), ha determinato un notevole incremento dell'attività diagnostica svolta dai singoli I.Z.Z.SS. prevalentemente impiegando la prova di laboratorio usata in precedenza, basata su una tecnica di Immunodiffusione in gel di Agar (AGID), che rappresenta ancora il test prescritto dall'OIE ai fini delle movimentazioni internazionali. 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 che tuttavia risulta essere poco sensibile e l'interpretazione dei risultati soggettiva e non standardizzabile. Tali caratteristiche lo rendono poco adatto ad una applicazione negli screening di massa, soprattutto nelle attuali condizioni di bassa prevalenza dell'infezione.

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.

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 e confermati mediante Immunoblotting (IB), metodo raccomandato dal manuale OIE 2008 come test alternativo all'AGID nei casi di risultati non conclusivi (Sicluna et al 2008).

Come primo obiettivo il progetto ha inteso 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 II.ZZ.SS di introdurre ed implementare l'impiego di test ELISA in fase di screening è importante effettuare la validazione di questa ed 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 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.

Lo sviluppo di test molecolari per la diagnosi di routine dell'AIE ha trovato, ad oggi, molteplici difficoltà in conseguenza della significativa variabilità genetica che si riscontra fra ceppi di differente origine geografica e fra gli stessi stipiti virali che subiscono continue mutazioni nel corso dell'infezione, sia a causa dei bassissimi livelli RNA virale circolante caratteristici delle fasi di infezione in apparenza che sono talvolta al di sotto dei limiti di rilevabilità. Tuttavia, 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 ed in particolare dove è richiesta una diagnosi nelle fasi precoci dell'infezione, quando cioè ancora non sono rilevabili gli anticorpi circolanti attraverso i metodi sierologici. La sperimentazione di detti protocolli risulta quindi particolarmente importante ausilio nelle aziende sede di focolaio.

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 rurali rispetto a quella osservata fra i cavalli sportivi. Lo studio dei fattori di rischio associati all'infezione negli equidi assume notevole rilevanza per individuare interventi in grado di prevenire l'introduzione e/o la diffusione del virus ed anche ai fini della gestione dei focolai.

Per lo scopo si è ritenuta necessaria la realizzazione di uno strumento di rilevazione e raccolta dati per studiare, tramite studi osservazionali e tecniche classiche di epidemiologia analitica, le variabili associate alla presenza dell'infezione operando una raccolta sistematica di informazioni sui potenziali fattori di rischio 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 e sono quindi ineludibili approfondimenti per chiarire il possibile ruolo di questa specie nel mantenimento e la diffusione dell'infezione sul territorio nazionale.

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. 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 pressoché 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.

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. 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).

Il progetto si prefigge pertanto di valutare le caratteristiche e la dinamica dell’infezione in questa categoria di equidi, anche con un ulteriore livello di integrazione attraverso la verifica della patogenicità degli stipti virali circolanti.

WP1 - valutazione di un nuovo protocollo di screening nell'attuazione del Piano di sorveglianza nazionale e verifica della concordanza fra metodiche disponibili.

VALIDAZIONE DI METODI ELISA

VALIDAZIONE DI UN ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI CONTRO LA p26 DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA NEL SIERO DI EQUIDI

Per la trattazione completa si rimanda all'allegato 1, di seguito la sintesi della metodologia impiegata, dei risultati e delle conclusioni.

MATERIALI E METODI

Validazione di una in-house ELISA messa a punto presso il CERME, secondo le linee guida riportate nel Manuale OIE ed il rispetto dei requisiti di idoneità allo scopo (aumentare l'efficacia dei controlli condotti attraverso il Piano di Sorveglianza) ed all'utilizzo del test (costo per analisi, disponibilità delle attrezzature, livello di preparazione tecnica e facilità di interpretazione, disponibilità dei reagenti, requisiti di trasporto, sicurezza e biosicurezza).

1. Sviluppo del test: studi sperimentali

In breve, l'allestimento del nuovo ELISA è il risultato di diversi processi riassunti di seguito:

- Clonaggio della sequenza codificante la p26
- Induzione dell'espressione ed estrazione delle proteine di fusione
- Produzione degli anticorpi monoclonali
- Prove di competizione
- Allestimento ELISA competitivo
- Prova di applicabilità

2. Le caratteristiche di performance analitica sono state valutate in termini di:

Specificità analitica (selettività, esclusività ed inclusività)

Sensibilità analitica, calcolando il limite di rilevabilità, confrontando il limite del test con quello del test di Coggins analizzando diluizioni scalari di un siero positivo in siero negativo.

Ripetibilità utilizzando come valore di riferimento per la valutazione della ripetibilità 30 ripetizioni di un siero negativo di Riferimento Internazionale e sottoponendo i dati ottenuti al test di Huber, per evidenziare i dati anomali ed al test di Shapiro-Wilk utilizzando il software XL-Stat 2011â per verificarne la normalità, prima di essere utilizzati per il calcolo dello scarto tipo.

Riproducibilità Per la valutazione della riproducibilità si è considerata la duplice natura dell'esito della prova ELISA: la natura qualitativa espressa come categoria (positivo, negativo, dubbio) e quella quantitativa, espressa dalla OD.

La riproducibilità qualitativa è stata valutata attraverso un Ring test tra i dieci IZS, testando 40 campioni di siero forniti in cieco (6 negativi e 14 positivi). Sui risultati è stata valutata la concordanza tra più operatori utilizzando il K multiplo o di Fleiss

La riproducibilità quantitativa è stata invece valutata effettuando 7 prove differenti (per operatore o per giorno di esecuzione) saggiando 30 ripetizioni di un siero negativo certificato.

Controllo delle performance del metodo Per il controllo di qualità, con i dati a nostra disposizione si è proceduto alla messa a punto di una carta di controllo dell'ELISA, al fine di verificare la stabilità statistica del metodo nel tempo, definendo i limiti di affidabilità ed allarme (superiore ed inferiore) per ogni lotto prodotto

3. Caratteristiche di performance diagnostiche

Sensibilità e specificità diagnostica La valutazione della sensibilità (Dse) e della specificità diagnostica (Dsp) è stata condotta utilizzando come Gold Standard (GS) la tecnica AGID metodo

Coggins. I valori di Dse e Dsp attesi, utilizzati per il calcolo della Dse e Dsp del test sono rispettivamente 0,99 e 0,80, stabilendo un valore di confidenza del 99% ed una precisione assoluta del 5%. Essendo lo scopo di questo test lo screening della popolazione, i valori di Dse e Dsp attesi sono stati scelti avendo come obiettivo quello di ottenere un test molto sensibile, prevedendo e valutando come accettabile la conseguente diminuzione della specificità.

Allo scopo sono stati analizzati un numero totale di campioni pari a 1095 di cui 440 sieri di campo disponibili presso il Centro di Referenza Nazionale per l'Anemia Infettiva Equina ed il Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini e 665 disponibili presso la collezione European Union-Reference Laboratory analizzati da **ANSES Dozulé Laboratory for Equine Diseases**.

4. Interpretazione dei risultati del test

Valore predittivo positivo e negativo I valori predittivi positivo e negativo sono stati calcolati su 1095 campioni con una sensibilità attesa del 99%, una specificità attesa del 80%, un livello di confidenza del 99% ed una precisione assoluta del 5 %

Efficacia del test e test bias Sulla base del campione utilizzato per la stima delle caratteristiche diagnostiche sono state valutate anche l'efficacia del test e il test bias

RISULTATI

I risultati della validazione della in-house ELISA sono di seguito riassunti:

1. Idoneità all'utilizzo:

Costo per analisi modesto se si considera che in termini di quantità di reagenti, comparata tra AGID ed ELISA (ogni ml di antigene (p26) utilizzato in Agid è sufficiente per esaminare circa 60 campioni; lo stesso volume consente di testare circa 3000 campioni in ELISA)

Disponibilità delle attrezzature: attualmente la tecnica ELISA è largamente adottata presso tutti i laboratori

Livello di preparazione tecnica e facilità di interpretazione: la procedura di esecuzione richiede il medesimo livello di preparazione necessario all'utilizzo di qualsiasi altro kit ELISA.

Disponibilità dei reagenti: il kit è già completo di quasi tutti i reagenti necessari per l'esecuzione della prova.

Sicurezza e biosicurezza: in condizioni di norme generali di sicurezza tutte le fasi di esecuzione non comportano rischi per l'operatore.

Tempo di risposta: il tempo necessario per ottenere l'esito di un campione è di circa tre ore (per l'AGID risulta compreso tra 24 e 48h).

2. Caratteristiche di performance analitica

Specificità analitica

La selettività L'esecuzione secondo procedura conferisce alla prova caratteristiche di selettività, classificando correttamente i sieri indipendentemente dalla presenza di sostanze interferenti.

L'esclusività è la capacità del test di rilevare l'analita target e di escludere tutti le altre entità biologiche conosciute che possono risultare cross-reattive.

Sebbene il manuale OIE riporti questa caratteristica come essenziale per un test di conferma e non per un test di screening come l'ELISA in questione, si è scelto di valutarne ugualmente l'esclusività.

L'esclusività Tutti i sieri positivi per altri Retrovirus: FIV (Virus dell'Immunodeficienza Felina), FeLV (Virus della Leucemia felina), BELV (Virus della Leucosi Bovina Enzoistica), Virus della Visna Maedi sono risultati negativi quando impegnati con il kit ELISA AIE .

Sensibilità analitica

Il confronto ha indicato che l'ELISA ha un limite di rilevabilità di circa 3 Log₁₀ inferiore rispetto al Coggins. Inoltre un siero certificato come debolmente positivo in AGID ha prodotto un segnale di

forte positività in ELISA anche quando saggiato alla stessa diluizione indicata precedentemente (1:1000).

Ripetibilità

Il valore di scarto tipo ottenuto è 0,184.

La valutazione della ripetibilità, confrontando le varianze delle serie di dati con il test F di Fisher, ha dato un risultato di 1,3532 con un valore di p di 0,42; questo valore non risulta statisticamente significativo quindi possiamo concludere che l'ELISA è ripetibile.

Riproducibilità

I dati ottenuti, sottoposti al test di Huber, per evidenziare i dati anomali, al test di Shapiro-Wilk utilizzando il software XL-Stat 2011 per verificarne la normalità, prima di essere utilizzati per il calcolo dello scarto tipo. Successivamente è stato eseguito il test di Levene (test di omogeneità delle varianze) utilizzando l'applicazione XL-Stat. Il test ha fornito un valore uguale a 1,843 con un valore di p di 0,092. Questo valore non risulta statisticamente significativo quindi possiamo concludere che l'ELISA è riproducibile.

3. Caratteristiche di performance diagnostiche

Sensibilità e specificità diagnostica

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati dell'ELISA a confronto con il test di Coggins.

	COGGINS TEST		Totale
	+	-	
ELIS + A	857	47	904
-	0	191	191
Totale	857	238	1095

Tabella 1: Confronto tra tecnica ELISA ed AGID condotto su 1095 campioni

In tabella 2 sono riportati i valori di Dsp e Dse calcolate con i livelli di confidenza e la precisione assoluta prima riportate.

Dse (%)	100
Dsp (%)	80,3

Tabella 2: Valori di Dse e Dsp diagnostica calcolati su 1095 campioni con una sensibilità attesa del 99%, una specificità attesa del 80%, un livello di confidenza del 99% ed una precisione assoluta del 5 %

In merito al valore di specificità, anche se valutato come buono, è da sottolineare che una certa percentuale di campioni risulta negativa in AGID e positiva in ELISA ed è stata successivamente confermata come positiva in IB. Questo causa una riduzione del valore di specificità dell'ELISA, rispetto a quello che si otterrebbe utilizzando come GS l'IB e indica che, in realtà, l'AGID può risultare meno sensibile dell'ELISA. Questa considerazione è rafforzata anche dall'evidenza che il valore di LOD dell'ELISA risulta inferiore rispetto a quello dell'AGID.

4. Interpretazione dei risultati del test

Valore predittivo positivo e negativo

In tabella sono riportati il valore predittivo positivo e il valore predittivo negativo calcolati con i livelli di confidenza e la precisione assoluta prima esposte.

Valore predittivo positivo (%)	94,8
Valore predittivo negativo (%)	100

Tabella: Valore predittivo positivo e negativo calcolati su 1095 campioni con una sensibilità attesa del 99%, una specificità attesa del 80%, , un livello di confidenza del 99% ed una precisione assoluta del 5 %

Efficacia del test e test bias

Sulla base del campione utilizzato per la stima delle caratteristiche diagnostiche sono state valutate anche l'efficacia del test è risultata essere del 95,7%.

Il test bias valuta l'errore insito nel test usato e può essere anche interpretato come il rapporto tra prevalenza apparente e reale. Qualora risulti superiore a 1 il test sovrastima la malattia; se inferiore ad 1 la malattia viene sottostimata. Il test bias è stato calcolato utilizzando il seguente rapporto. Il test ELISA in oggetto è risultato avere un valore al test di bias pari a 1,05 indice di stima della malattia congruente con lo scopo del test.

CONCLUSIONI

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici e pratici l'impiego dell'ELISA risponde alle necessità di riduzione di costi di produzione, dei tempi di risposta e, soprattutto, all'esigenza di avere criteri di lettura oggettivi e confrontabili.

Il metodo sottoposto a validazione risponde ai requisiti prescritti dal Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010. In particolare, risulta possedere caratteristiche intrinseche adeguate allo scopo per cui è stato sviluppato in termini di specificità e sensibilità analitica non reagendo con sieri positivi per altri Retrovirus ed avendo un LOD di oltre 3 log₁₀ inferiore rispetto all'AGID, considerato come test di riferimento.

Le caratteristiche di ripetibilità, riproducibilità intra ed interlaboratorio e di concordanza ne rendono possibile l'impiego e la sua diffusione a tutti i laboratori di diagnostica sierologica in possesso di adeguate capacità professionali e requisiti strumentali.

La specificità diagnostica del test, valutata in rapporto all'immunodiffusione risulta essere buona e migliora in relazione all'immunoblotting, metodo dotato di maggiore sensibilità rispetto al citato metodo ufficiale di conferma.

Tuttavia, le sue performance in termini di elevata sensibilità diagnostica e specificità analitica, riconoscendo il 100% dei campioni positivi al metodo di conferma di riferimento, lo rendono particolarmente indicato come test di screening da impiegare nel corso di programmi di controllo e di eradicazione essendo in grado di reclutare il maggior numero di soggetti reattivi.

Ciò, in particolare, se si considera che ogni positività deve essere successivamente confermata presso il Laboratorio di riferimento nazionale.

VALIDAZIONE DI UN KIT ELISA INDIRETTO PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUINI

Il secondo metodo validato secondo le linee guida dell'OIE, è il prodotto di una collaborazione fra CERME e Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino. A differenza del metodo prima descritto (ELISA competitiva), è un'ELISA indiretta. Il è costituito da piastre sensibilizzate con una proteina ricombinante contenente epitopi antigenici della proteina virale p26 e della glicoproteina gp45.

MATERIALI E METODI

La parte metodologica in quanto analoga a quella della precedente validazione viene omessa e vengono fornite solo gli elementi per i quali il protocollo ha previsto modifiche e/o integrazioni.

Per la trattazione completa si rimanda all'allegato 2.

Si descrive brevemente la procedura di prova:

- Dispensazione di 95 µl di tampone di diluizione dei sieri
- Dispensazione di 5 µl di controlli e di sieri in esame
- Incubazione per 60 minuti a 37°C
- 3 cicli di lavaggio con soluzione di lavaggio
- Dispensazione di 100 µl di coniugato (anticorpo anti IgG di cavallo coniugato con perossidasi)
- Incubazione per 60 minuti a 37°C
- 3 cicli di lavaggio con soluzione di lavaggio
- Dispensazione di 100 µl di substrato
- Incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti
- Dispensazione di 100 µl di soluzione di stop
- Lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 405 nm

I criteri di validazione sono i seguenti:

- La densità ottica (DO) del controllo positivo deve essere >0,4
- Il rapporto tra DO del controllo positivo e negativo deve essere >3

Per l'interpretazione dei risultati si deve calcolare per ogni siero la percentuale di reattività secondo la formula:

$$R = \frac{DO_{\text{Campione}} - DO_{\text{Controllo Negativo}}}{DO_{\text{Controllo Positivo}} - DO_{\text{Controllo Negativo}}} \times 100$$

Sieri con reattività $\geq 50\%$ sono considerati positivi

Sieri con reattività $\leq 40\%$ sono considerati negativi

Sieri con reattività compresa fra 40% e 50% sono considerati dubbi

RISULTATI

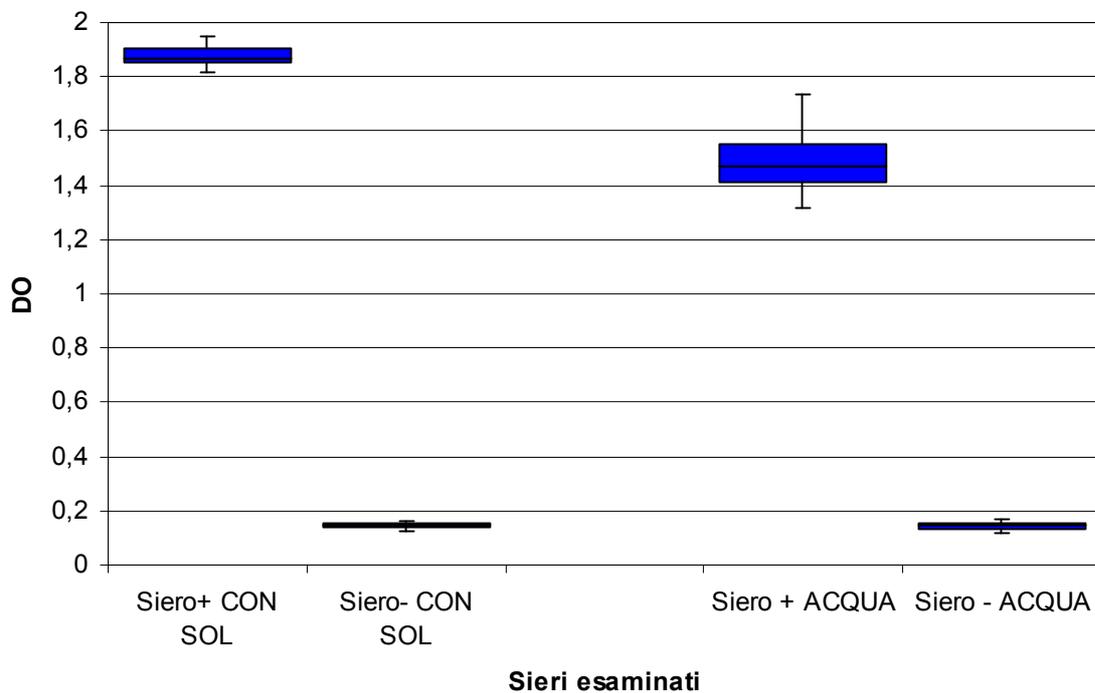
1. Caratteristiche di performance analitica

Specificità analitica

per valutare la selettività è stata effettuato un confronto tra una prova col lavaggio come previsto da procedura e prova con lavaggio con solo acqua ultrapura esaminando 24 sieri positivi e 26 sieri negativi .

Il confronto tra la metodica standard e quella modificata è esemplificato nel grafico 1. È stata rilevata tramite il test di Student una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di sieri positivi ($p < 0.01$); mentre tra i due gruppi di sieri negativi la differenza non è risultata significativa ($p = 0,568$).

Grafico 1: Confronto tra DO di sieri positivi e negativi utilizzando la soluzione di lavaggio e acqua pura



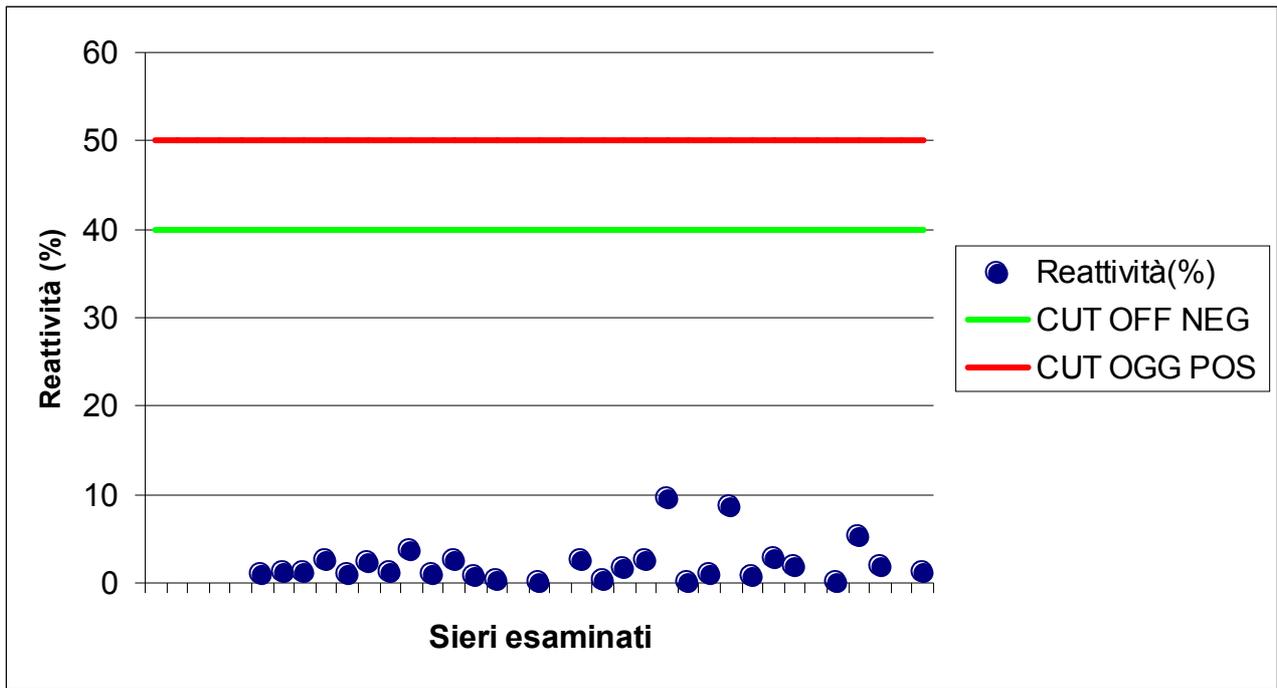
L'esclusività è stata valutata esaminando 37 sieri positivi per altri Retrovirus: FIV (Virus dell'Immunodeficienza Felina), FeLV (Virus della Leucemia felina), Virus della Visna Maedi. Nel grafico 2 sono mostrate le reattività dei sieri testati, tutti risultati negativi.

L'esclusività è stata valutata anche su sieri di cavallo positivi verso le seguenti patologie:

- Equid Herpesvirus 1 e 4
- Equine Viral Arteritis
- Equine Influenza A 1 e 2 (H7N7 e H3N8)

Tutti i sieri sono risultati negativi al test.

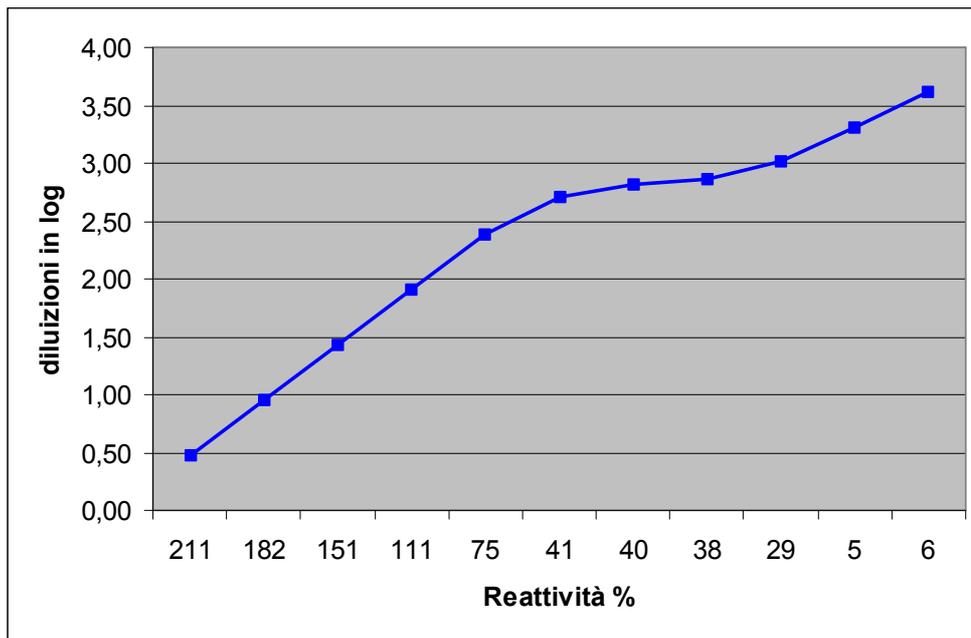
Grafico 2: Reattività dei sieri FIV FeLV e Visna Maedi positivi testati con il kit per AIE, in rosso e verde rispettivamente i valori di cut off positivo e negativo.



Sensibilità analitica

Non essendo possibile, per questo, metodo, la quantificazione diretta dell'analita, in questo caso gli anticorpi contro AIEV, si è proceduto a confrontare il limite di rilevabilità del test ELISA con quello del test di Coggins analizzando diluizioni scalari in base 3 di un siero positivo di riferimento secondario, in siero negativo. Per un'ulteriore valutazione della sensibilità analitica sono stati analizzati 96 sieri di 24 animali sperimentalmente infetti, a vari giorni post-infezione; e 55 sieri di 10 muli naturalmente infetti e immunosoppressi a diversi giorni post-immunosoppressione; anch'essi confrontati con l'AGID e con tutti gli altri kit ELISA disponibili in commercio in Italia. Nel grafico 3 sono mostrati i valori di reattività delle diluizioni scalari del siero positivo di riferimento secondario. In tabella 2 sono mostrati i risultati qualitativi delle stesse diluizioni analizzate con la tecnica AGID confrontate con l'ELISA.

Grafico 3: Reattività delle diluizioni scalar,(trasformate in LOG₁₀), del siero positivo di riferimento



secondari

Tabella 2: Confronto tra esiti qualitativi di diluizioni scalari di un siero positivo di riferimento secondario testate in parallelo in ELISA ed AGID

Diluizione	ELISA	AGID
1:3	POSITIVO	POSITIVO
1:9	POSITIVO	POSITIVO
1:27	POSITIVO	NEGATIVO
1:81	POSITIVO	NEGATIVO
1:243	POSITIVO	NEGATIVO
1:512	DUBBIO	NEGATIVO
1:650	DUBBIO	NEGATIVO
1:729	NEGATIVO	NEGATIVO
1:1024	NEGATIVO	NEGATIVO
1:2048	NEGATIVO	NEGATIVO
1:4096	NEGATIVO	NEGATIVO

Nel grafico 4 sono mostrati i valori di reattività dei sieri di animali sperimentalmente infetti . In tabella 3 sono mostrati i risultati qualitativi degli stessi sieri analizzati con la tecnica AGID confrontate con l'ELISA (sono stati analizzati sono il T21 e il T28 PI). Nella tabella 4 sono mostrati i risultati qualitativi dei muli infetti immunosoppressi analizzati con la tecnica AGID confrontati con l'ELISA.

Grafico 4: Reattività di 24 sieri di animali sperimentalmente infetti a vari giorni post infezione (T0, T14,T21,T28) esaminati in ELISA

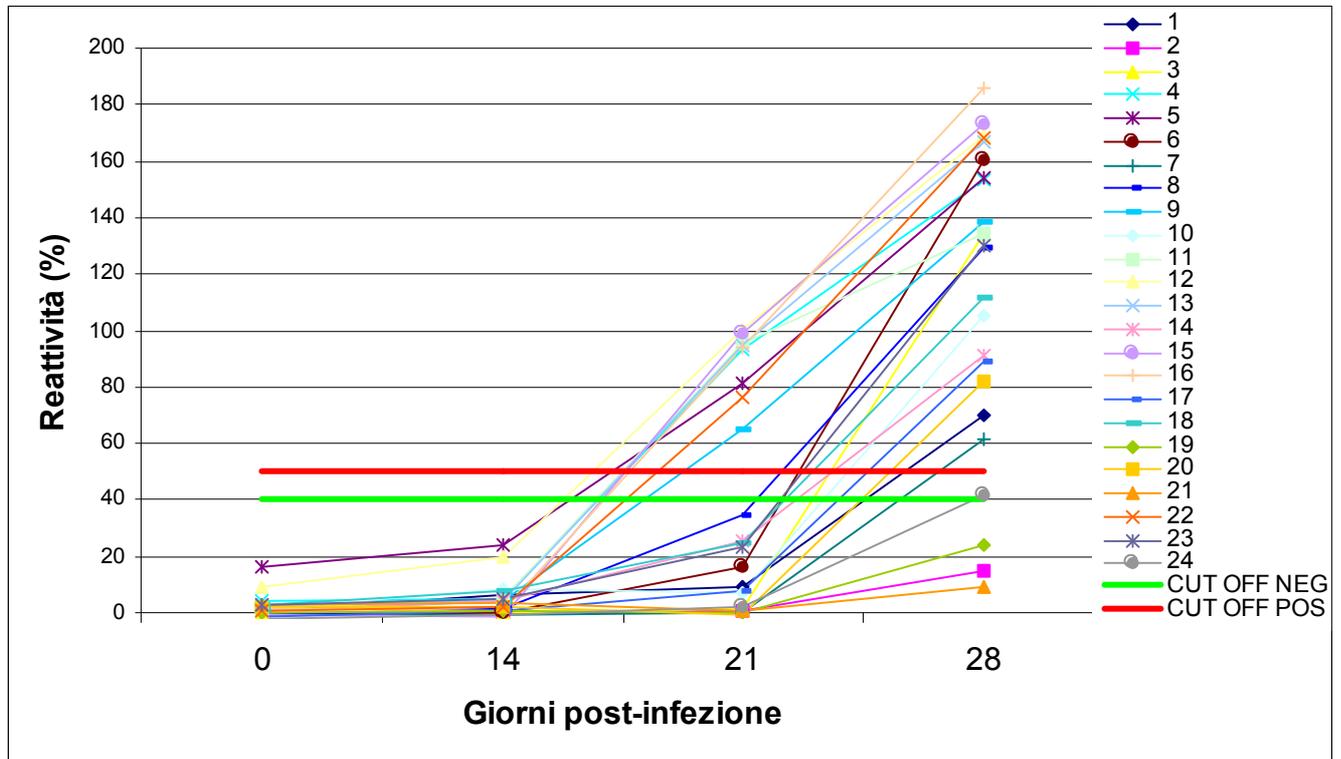


Tabella 3: Confronto tra esiti qualitativi di animali sperimentalmente infetti a vari giorni post infezione (T21 e T28) testati con il kit DPAEE (ELISA) e gli altri kit commerciali (KIT 1-5) e con l'AGID. I prelievi a tempo 0 e 14 non sono stati riportati perché risultati negativi con entrambi i test.

Sieri T21	ELIS A	KIT 1	KIT 2	KIT 3	KIT 4	KIT 5	AGID	Sieri T28	ELISA	KIT 1	KIT 2	KIT 3	KIT 4	KIT 5	AGID
1	-	-	-	-	-	-	-	1	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	3	+	-	+	+	+	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	-	-	-	-	-	-	5	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	6	+	+	+	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-	-	7	+	+	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	-	-	-	-	-	-	9	+	-	+	+	+	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	10	+	-	-	+	+	-	-
11	+	-	-	-	+	-	-	11	+	+	+	+	+	+	+
12	+	-	-	-	-	-	-	12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	-	-	-	-	-	13	+	+	+	+	+	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	14	+	+	+	+	+	+	+
15	+	-	-	-	-	-	-	15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	-	-	-	-	-	-	16	+	+	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	17	+	-	+	-	Dubbio	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	18	+	-	-	-	+	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	20	+	-	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	22	+	+	+	+	+	+	+
23	-	-	-	-	-	-	-	23	+	Dubbio	-	+	+	-	+
24	-	-	-	-	-	-	-	24	Dubbio	-	-	-	Dubbio	-	-

Tabella 4: Confronto tra risultati qualitativi dei muli infetti immunosoppressi analizzati in parallelo in ELISA ed AGID

	T2		T7		T14		T21	
	ELISA	AGID	ELISA	AGID	ELISA	AGID	ELISA	AGID
1	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
2	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
3	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
4	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
5	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
6	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
7	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
8	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
9	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

10	POS							
11	NEG							

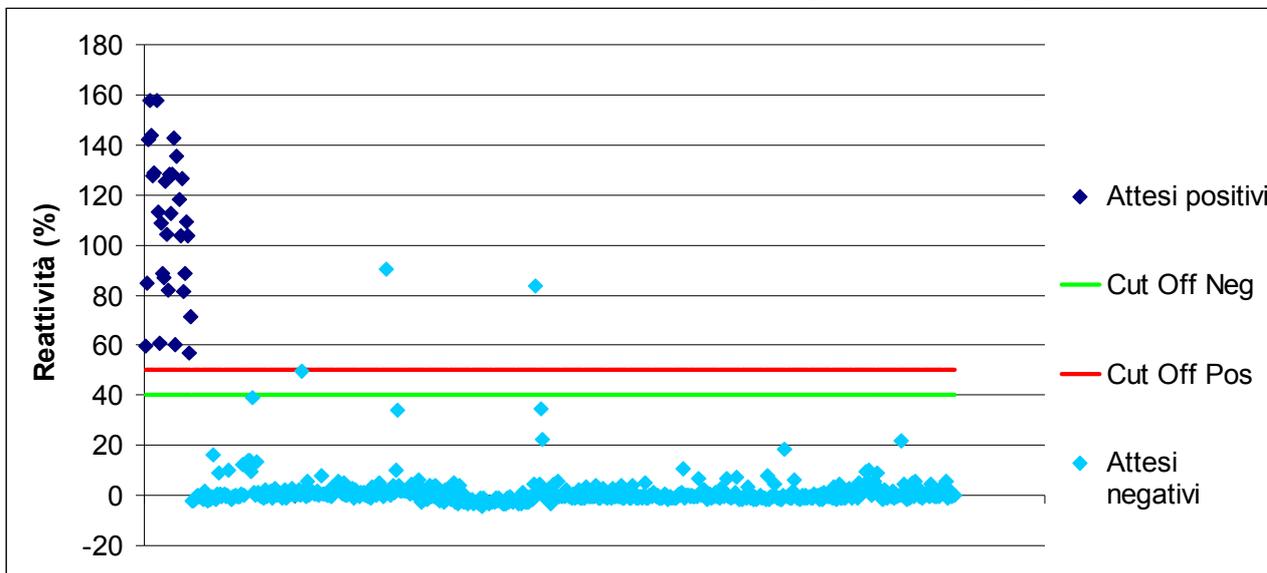
L'analisi di questi dati dimostra che il kit in esame ha un LOD di 1,4 Log₁₀ inferiore rispetto all'AGID se si considera il risultato positivo; mentre di 1,86 Log₁₀ inferiore se si considera anche il risultato dubbio ; il secondo valore ci sembra comunque più corretto considerando che un risultato dubbio in ELISA necessita di ulteriori approfondimenti per la conferma (rif. Tabella 2). Rispetto all'AGID inoltre, l'ELISA ha mostrato chiaramente una precocità di rilevamento della risposta sierologica in termini temporali, il che le conferisce ottime caratteristiche per l'utilizzo in un piano di sorveglianza.

2 Caratteristiche di performance diagnostiche

Sensibilità e specificità diagnostica, valore predittivo positivo e negativo

Nel grafico 5 sono mostrati i valori di reattività dei 540 sieri esaminati. Nella tabella 5 sono mostrati i risultati del confronto tra ELISA e AGID (il campione dubbio ELISA è stato classificato come positivo) e nella tabella 6 sono riassunte le caratteristiche di performance diagnostica del Kit ELISA.

Grafico 5: Valori di reattività (%) dei 540 sieri (31 positivi e 509 negativi)



ELISA	NEGATIVI	0	506	506
	TOTALE	31	509	540

Tabella 6: Caratteristiche di performance diagnostica del kit ELISA in validazione

	Valore(%)	- IC 95%	+ IC 95%
Sensibilità	100	100	100
Specificità	99,41	98,75	100 (100,08)
Valore predittivo positivo	91,18	81,64	100 (100,7)
Valore predittivo negativo	100	100	100

Merita un commento il risultato relativo ai 3 soggetti, 2 positivi ed uno dubbio ELISA, attesi come negativi. I tre soggetti sono stati ripetuti, confermando il loro risultato in ELISA e sono stati analizzati anche con l'Immunoblotting. Questa tecnica svela la presenza di anticorpi sierici evidenziando le tre componenti antigeniche più importanti dell'AIE, la p26, la gp45 e la gp90. Si considera positivo un siero che abbia reattività alla p26 più ad almeno una delle due glicoproteine.

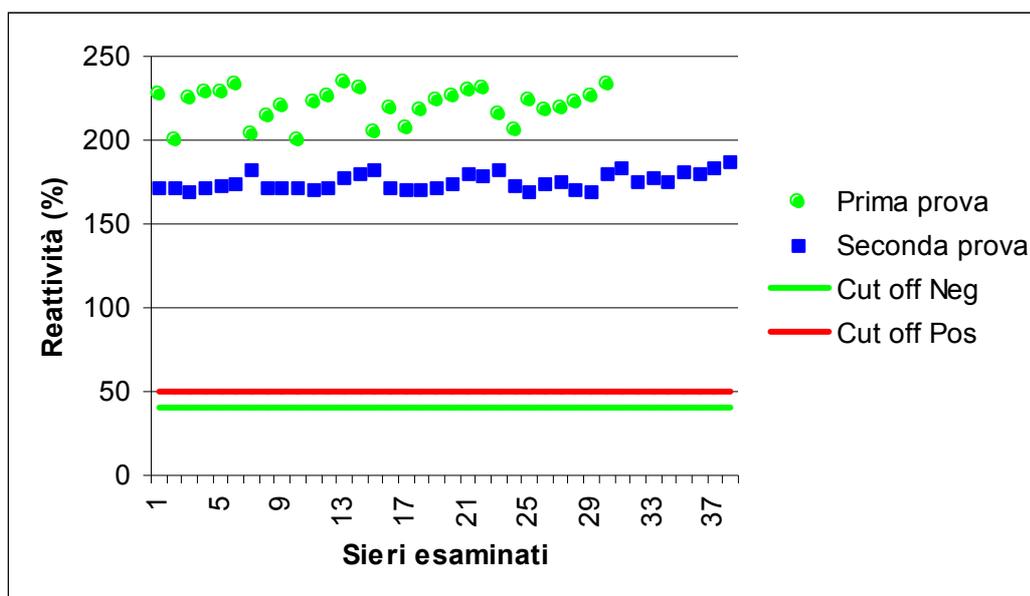
Tutti e tre sieri sono risultati reattivi alla sola p26, probabilmente, per tale caratteristica, sono stati riconosciuti positivi dall'ELISA. Nell'ottica di un piano di sorveglianza comunque questa estrema sensibilità è una caratteristica ottimale.

3 Ripetibilità

In tabella 3 sono mostrati i risultati del test di Huber per le 38 ripetizioni. In tabella 4 e nel grafico 2 sono mostrati, rispettivamente, i risultati del test di normalità e l'istogramma relativo ai dati. In tabella 5 è riportato il risultato del test F di Fisher per il confronto tra le varianze delle due prove.

I dati, per quanto abbiano mostrato un CV molto basso (rispettivamente 4,3% la prima e 2,6% la seconda) da valutare come molto buono in quanto inferiore al 20%, sono risultati nella seconda prova distribuiti non normalmente. Si è comunque deciso di procedere con il test di Fisher che non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le due varianze a confronto. Da notare che le deviazioni standard delle due prove sono risultate molto ridotte (rispettivamente 0,077 e 0,049). Dal punto di vista qualitativo il test ha riportato una ripetibilità del 100% in quanto tutte le ripetizioni sono state qualificate come positive. In grafico 6 sono riportate le reattività delle due prove.

Grafico 6: Reattività delle due prove per la verifica della ripetibilità



4 Riproducibilità

La riproducibilità qualitativa è stata valutata effettuando una prova interlaboratorio tra 10 laboratori. A ciascuno è stato chiesto di analizzare 30 sieri e di riportare i risultati sia in termini di DO che qualitativi. Sui risultati è stata valutata la concordanza tra più operatori utilizzando il K multiplo o di Fleiss.

Il K multiplo è risultato essere 0,976, giudicato secondo la classificazione proposta da J. Richard Landis e Gary G. Koch [11] come quasi perfetto (grado massimo di concordanza).

La riproducibilità quantitativa è stata invece valutata effettuando 7 prove differenti (per operatore o per giorno di esecuzione) saggiando minimo 30 ripetizioni di un siero positivo certificato.

Tabella: Valori di sR calcolati per ogni test di Levene effettuato

Prove incluse	s _R

1-7	0,056
1,2,4-8	0,037
1,4,6-8	0,039

I valori di s_R , in ogni caso, sono molto ristretti, indice di buona riproducibilità.

CONCLUSIONI

I risultati della validazione del kit ELISA per AIE hanno dimostrato che:

1. specificità analitica: il kit è capace di eliminare le interferenze della matrice siero e non rilevare come positivi sieri reattivi contro altri retrovirus o contro altre virosi equine.
2. sensibilità analitica: il kit presenta un LOD di 1,86 LOG maggiore rispetto all'AGID e presenta una precocità di rilevamento della sieropositività, sia rispetto all'AGID che rispetto a tutti i kit ELISA attualmente in commercio in Italia.
3. performances diagnostiche: il kit presenta sensibilità pari al 100% specificità pari al 98,78%; valore predittivo positivo del 91,18% e valore predittivo negativo pari al 100%. Queste caratteristiche sono compatibili con lo scopo prefissato di utilizzo del test come test di screening.
4. le prove di ripetibilità qualitativa hanno mostrato una ripetibilità del 100%. A livello quantitativo invece le varianze delle prove sono risultate differenti significativamente; questo dato è di rilevanza minore essendo il test principalmente qualitativo. Comunque, vista i valori di sd, si può anche considerarli accettabili.
5. le prove di riproducibilità qualitativa hanno rilevato un valore di K di Cohen di 0.976, da considerarsi ottimale.
6. per la riproducibilità quantitativa, il valore di s_R è di 0,039 indice di riproducibilità molto buona.
7. la classificazione secondo tre categorie, inclusa anche la categoria "dubbio" permette di aumentare la sensibilità del sistema, includendo sì dei falsi positivi ma permettendo di non ottenere falsi negativi.

CONFRONTO TRA LE METODICHE ELISA DISPONIBILI IN ITALIA PER LA DIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA

Per la trattazione completa si rimanda all'allegato 3, di seguito la sintesi della metodologia impiegata, dei risultati e delle conclusioni.

Da oltre 20 anni, per la diagnosi sierologica di AIE sono disponibili numerosi kit ELISA, dichiarati dai produttori come di pari o maggiore sensibilità rispetto all'AGID. Alla luce della sua maggiore sensibilità l'ELISA può essere utilizzata per lo screening sierologico, inviando alla conferma i campioni positivi da testare in AGID.

Considerata la disponibilità di più kit ELISA in Italia, parallelamente al circuito interlaboratorio AGID/ELISA del 2012, con la collaborazione di alcuni laboratori degli Istituti Zooprofilattici, si è proceduto al confronto di alcune caratteristiche diagnostiche ed ad una valutazione della precocità dei kit effettuata presso il CRAIE, per un loro possibile impiego nella sierodiagnosi di AIE.

MATERIALI E METODI

Kit ELISA impiegati

I kit ELISA disponibili in Italia e utilizzati nel confronto sono i seguenti:

1. *VMRD EIA Virus Antibody kit* ® - ELISA di tipo indiretto che utilizza un antigene p26 ricombinante adsorbito alla piastra ed un antigene p26 ricombinante coniugato con perossidasi per evidenziare la reazione.
2. *IDEXX Herd Chek*® *EIA Celisa* - ELISA di tipo competitivo che utilizza anticorpi monoclonali contro la p 26 adsorbiti alla piastra ed un antigene p26 coniugato con perossidasi. I sieri ed i monoclonali adsorbiti competono per il legame con l'antigene coniugato. La presenza di anticorpo nel siero in esame sarà svelata dal mancato sviluppo del colore.
3. *IDVET ID Screen* ® *Equine Infectious Anemia Double Antigen* - ELISA di tipo indiretto che utilizza un antigene p26 ricombinante adsorbito alla piastra e lo stesso antigene coniugato con perossidasi per svelare la reazione.
4. *SYNBIOTICS ViraCHEK*®/*EIA Test Procedure* - ELISA di tipo indiretto che utilizza un antigene ricombinante adsorbito alla piastra e lo stesso antigene coniugato con perossidasi per svelare la reazione.
5. *Kit in-house ELISA CTB* prodotto e validato dal CRAIE - ELISA di tipo competitivo che utilizza un monoclonale anti p26 adsorbito alla piastra, che compete con gli anticorpi sierici per il legame con l'antigene p26 ricombinante. La reazione è svelata da un secondo anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi diretto contro lo stesso antigene p26.
6. *Kit Eradikit EIAV* messo a punto presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino e valicato - ELISA di tipo indiretto che utilizza antigeni gag ed env ricombinanti. La reazione è svelata da un anticorpo anti IgG di equino marcato con perossidasi.

Laboratori partecipanti

Oltre al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini, sono stati coinvolti 10 laboratori di sierologia degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Pannello di sieri e prove eseguite

Il pannello era costituito da 30 sieri di equidi: 11 sieri positivi in doppia aliquota e 8 aliquote di un siero negativo. I sieri positivi utilizzati derivano da sieri di collezione e da sieri raccolti durante attività di ricerca, utilizzati a varie diluizioni; il siero negativo invece è di tipo commerciale (GIBCO ®). Degli 11 sieri positivi 2 avevano caratteristiche di forte positività, 3 media positività e 6 debole positività. Il pannello è stato analizzato una sola volta per ogni kit ELISA.

Per effettuare una valutazione della precocità rispetto alla positività sierologica in seguito ad infezione, sono stati inoltre analizzati dal CERME, 96 sieri, prelevati a 24 animali immunizzati (0, 14, 21 e 28 giorni p.v.) con diversi virus vivi attenuati, presso il Gluck Center for Equine Diseases (Kentucky, USA).

VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES

Un kit ELISA può essere valutato sia sotto il punto di vista qualitativo, quindi sulla base dei risultati categorici che esprime (positivo, negativo e talvolta dubbio); sia sotto il punto di vista quantitativo, valutando la grandezza che misura, in questo caso la densità ottica.

Le performances dei prodotti sono state valutate in termini di:

- **Accuratezza** - accuratezza qualitativa si stima attraverso la specificità (Sp) e la sensibilità (Se), Secondo Langton et al.
- **Ripetibilità e riproducibilità** - condotta prendendo in considerazione: il Coefficiente di Variazione, l'accordanza, la concordanza e il Concordance Odds Ratio (COR) secondo Langton, e il K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto
- **Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti** - Per un'ulteriore valutazione della sensibilità analitica sono stati analizzati 96 sieri di 24 animali sperimentalmente infetti, a vari giorni post-infezione; e 55 sieri di 10 muli naturalmente infetti e immunosoppressi a diversi giorni post-immunosoppressione; anch'essi confrontati con l'AGID e con tutti gli altri kit ELISA disponibili in commercio in Italia. Per la limitata disponibilità dei sieri in oggetto questa valutazione è stata effettuata solo da parte del CRAIE.
- **Questionari di valutazione** - A ciascun laboratorio sono stati somministrati dei questionari, uno per ciascun kit ELISA, con le seguenti domande:

DOMANDA		da	1	2	3	4	5	a
1	Come giudichi la chiarezza del protocollo fornito con il kit?	insufficiente						ottima
2	Come giudichi le lingue utilizzate nella redazione del protocollo?	incomprensibile						comprensibile
3	Come giudichi l'esecuzione del test?	facile						difficile
4	Si ritiene necessario un addestramento specifico all'esecuzione della prova?	NO		/	/	/	/	SI
5	Come consideri il volume del campione e dei reagenti a fini dell'accuratezza del prova?	scarso			<input type="checkbox"/> adeguato			eccessivo
6	Come consideri il tempo totale di esecuzione del test?	eccessivo						breve
7	Il kit richiede l'utilizzo di strumentazioni di cui non siete in possesso?	NO		/	/	/	/	SI
8	Se si è risposto sì alla domanda 7, indicare quale strumentazione/accessorio richiesto non è in vostro possesso							
9	Come giudichi la modalità di interpretazione dei risultati?	complessa						semplice
10	Come consideri la categorizzazione dell'esito?	inadeguata						adeguata
11	Consideri il kit completo rispetto ai componenti forniti?	NO		/	/	/	/	SI
12	Se si è risposto alla domanda 11 in modo diverso da completo indicare cosa sarebbe necessario fornire							
13	Come giudichi la tenuta dei contenitori per i reagenti?	insufficiente						ottima
14	Sono presenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati?	NO		/	/	/	/	SI
15	Se si è risposto SI alla domanda 14, giudichi le informazioni fornite esaurienti?	NO		/	/	/	/	SI
16	Se si è risposto SI alla domanda 14, come giudichi le classi di rischio dei reagenti utilizzati?	pericolose						poco pericolose
17	Che valore attribuisce alla validazione del kit?	trascurabile		/	/	/	/	necessaria

Oltre alle domande vi era anche un campo Osservazioni in cui i compilatori potevano scrivere osservazioni libere.

RISULTATI

Accuratezza - Sensibilità e specificità

L'accuratezza è stata valutata anche mediante il K di Cohen, il K di Cohen pesato e il K multiplo di Cohen di tutti i laboratori, confrontando gli esiti ottenuti con quelli attesi. I kit valutati hanno una categorizzazione dei risultati o dicotomica (VMRD ®; IDEXX ® e Synbiotics ®) o a tre categorie, comprendendo il dubbio (IDVet ®; Kit in-house ELISA CTB e Kit Eradikit EIAV). Al fine di valutare la concordanza dei risultati ricevuti con quelli attesi, è stato utilizzato il K di Cohen per i kit che riportavano solo due categorie, negativo e positivo, mentre per i kit con tre categorie è stato utilizzato il K pesato di Cohen.

Tabella 1 - Valori di sensibilità e specificità calcolati su tutti i laboratori

	Se	Sp
CTB	99,5	100
ERADIKIT	99,09	100
IDEXX	98,18	100
IDVET	100	100
VMRD	100	100
SYNBIOTICS	98,63	100

K di Cohen

K di Cohen pesato (3 categorie)

In tabella 2 sono riportati i valori di K (di Cohen o pesato a 3 categorie a seconda del kit) per ogni laboratorio

LAB	1	2	3	4	5
CTB	1	1	1	-	0,95
ERADIKIT	1	1	1	1	0,88
IDEXX	1	1	1	1	1
IDVET	0,84	1	1	1	1
VMRD	1	1	1	1	1
SYNBIOTICS	1	1	1	1	1
LAB	6	7	8	9	10
CTB	1	1	1	1	1
ERADIKIT	1	0,88	1	1	1
IDEXX	1	0,67	1	1	1
IDVET	1	1	1	1	1
VMRD	1	1	1	1	1
SYNBIOTICS	1	0,75	1	1	1

***K* multiplo**

Il valore del K multiplo è stato calcolato utilizzando come valori di P_o e P_e quelli trovati per il K di Cohen o per il K pesato a 3 categorie, in funzione del kit. Questo valore di K indica quanto, tutti gli esiti di tutti i laboratori siano concordi rispetto all'atteso.

Tabella 3 - Valori di K multiplo per ogni kit

	K MULTIPLO
CTB	0,991
ERADIKIT	0,975
IDEXX	0,952
IDVET	0,976
VMRD	1,000
SYNBIOTICS	0,964

INTERPRETAZIONE DEL VALORE DI K

La tabella interpretativa del valore di K adottata in questo confronto è riportata in Tabella 8 [10].

Tabella 8: Criteri di interpretazione di K proposti da J. Richard Landis e Gary G. Koch

Kappa	Grado di accordo
<0,00	Scarso
0,00-0,20	Lieve
0,21-0,40	Discreto
0,41-0,60	Moderato
0,61-0,80	Sostanziale
0,81-1,00	Quasi perfetto

Ripetibilità e riproducibilità

Coefficiente di variazione

Il CV è stato calcolato non per la densità ottica, ma per il valore, indicato nella procedura di ogni kit, necessario all'interpretazione del risultato (PI per CTB, S/P per IDVET, reattività per ERADIKIT).

Tabella 4 - Valori di Coefficiente di Variazione (CV) per ogni siero per ogni kit considerando tutti i laboratori.

SIERO	SIERI PANNELLO		CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	4	10	1,44	23,73	3,65	21,31	34,86	33,91
2	24	27	0,98	24,25	3,74	17,44	34,56	38,14
3	20	11	1,39	19,42	5,29	17,97	34,75	38,17
4	30	7	1,65	22,19	4,62	17,19	35,87	36,16
5	9	17	0,82	21,67	5,18	30,70	34,34	34,55
6	13	8	1,87	21,02	9,59	30,74	36,10	36,87
7	12	25	1,54	23,64	4,75	18,34	34,04	40,00
8	1	14	1,16	24,94	4,35	18,06	34,99	33,86
9	21	2	1,46	27,18	4,19	18,36	36,02	37,42
10	18	26	1,28	26,52	3,81	18,40	33,71	34,74
11	19	28	18,74	29,20	6,76	15,15	34,50	38,45
12	22,5,3,15,29,6,16,23		108,96	55,27	-312,69	534,31	35,28	52,30

Accordanza

Tabella 5 - Valori medi di accordanza per ogni siero e per ogni kit

SIERO	SIERI PANNELLO		CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	4	10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	24	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
3	20	11	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	30	7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
5	9	17	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00
6	13	8	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00
7	12	25	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
8	1	14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	21	2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	18	26	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	19	28	0,90	0,81	0,81	1,00	1,00	1,00
12	22,5,3,15,29,6,16,23		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Concordanza secondo Langton e COR

Tabella 6 - Valori di concordanza per ciascun siero per kit e tra tutti i laboratori

Siero	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
5	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00
6	1,00	1,00	0,80	0,90	1,00	1,00
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	0,78	0,48	0,80	1,00	1,00	0,80
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

COR (Concordance odds ratio)

Tabella 7 - Valori di Concordance Odds Ratio (COR) per ogni siero e per ogni kit.

COR	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
6	1,00	1,00	1,25	1,00	1,00	1,00
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	1,16	1,69	1,01	1,00	1,00	1,25
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

K totale (secondo Quatto) non confrontato con l'atteso

In tabella 8 sono mostrati i valori di K considerando tutti i laboratori ed escludendo i laboratori con prove non validabili. Questa concordanza, a differenza delle precedenti, non viene calcolata considerando l'atteso ma stima solo quanto i laboratori siano concordi tra loro nell'espressione dei risultati.

Prendendo in considerazione il valore 0,72, questo risulta, secondo la tabella proposta da Landis et al., interpretabile come accordo sostanziale, indicando quindi una buona riproducibilità.

Tabella 8 - Valori di concordanza secondo Quatto per ogni kit e totale

	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS	TOTALE
CONCORDANZA QUATTO	0,95	0,90	0,92	0,96	1,00	0,88	0,94

Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti

I risultati relativi al tempo 0 e al tempo 14 non sono stati riportati in quanto tutti negativi. Nell'appendice dell'allegato 3 sono riportati i risultati qualitativi.

Tabella 9 - Risultati percentuali dei Kit ELISA su 24 sieri di animali sperimentalmente infetti 21 giorni post infezione.

T21						
SIERI	CTB	ERADIKIT	IDVET	IDEXX	SYMBIOTICS	VMRD
POSITIVI (%)	4,17	37,50	4,17	0	0	0
NEGATIVI (%)	95,83	62,50	95,83	100	100	100

Tabella 10 - Risultati percentuali dei Kit ELISA su 24 sieri di animali sperimentalmente infetti 28 giorni post infezione.

T28						
SIERI	CTB	ERADIKIT	IDVET	IDEXX	SYMBIOTICS	VMRD
POSITIVI (%)	66,67	83,33	50,00	62,50	58,33	41,67
DUBBIO (%)	8,33	4,17	4,17	0,00	0,00	0,00
NEGATIVI (%)	25,00	12,50	45,83	37,50	41,67	58,33

Questionari di valutazione

In tabella 11 sono riportate le mode per ciascuna domanda per ciascun kit, ed il punteggio totale calcolato sommando le mode. Per le domande 3 e 4, il cui punteggio minore indicava una valutazione ottima, e per la domanda 5 in cui il valore ottimale era il punteggio 3, sono stati effettuate le dovute correzioni.

Tabella 11

DOMANDA	CTB	DPAEE	IDEXX	IDVET	SYNBIOTICS	VMRD
1	4	5	5	5	3	5
2	5	5	4	4	4	4
3	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1
5	3	1	3	3	3	3
6	2	3	5	4	5	5
7	1	1	1	1	1	1
9	5	5	5	5	5	5
10	5	5	4	5	5	5
11	1	5	5	5	5	5
13	4	5	5	5	5	5
14	5	1	1	5	1	1
15	5	5		5	5	5
16	2	5		3	5	5
17	5	5	5	5	5	5
PUNTEGGIO TOTALE	56	57	59	63	58	60

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

□ Accuratezza

Sensibilità e specificità

Tutti i kit hanno riconosciuto correttamente i sieri negativi; possiamo quindi affermare che tutti i kit hanno una specificità del 100% .

Per quanto riguarda la sensibilità tutti i kit hanno mostrato un valore superiore a 98%, e due hanno mostrato il 100% di sensibilità.

Dobbiamo ribadire che per una valutazione della specificità e sensibilità diagnostica il numero di sieri negativi e positivi da testare dovrebbe essere molto più elevato e con provenienza rappresentativa della popolazione in esame; questo pannello è stato allestito per una valutazione

della sensibilità diagnostica relativa tra i diversi kit. L'interpretazione dei valori esposti quindi dovrebbe tenere conto di questa valutazione limitata e dovrebbe essere effettuata congiuntamente alla valutazione della precocità di ciascun kit.

K di Cohen

L'analisi della tabella 6 mostra come quasi la totalità dei kit abbia mostrato una concordanza pari ad 1 rispetto al risultato atteso in ogni laboratorio. I risultati minori di 1 possono essere così commentati:

- il valore minimo, diverso da uno, è 0,67 ed il massimo 0,95. Entrambi i valori, se interpretati secondo lo schema di valutazione proposto, devono essere considerati indice di accordo sostanziale o quasi perfetto.

- i risultati diversi da 1 sono clusterizzati in 3 laboratori e riguardano kit diversi. I sieri che hanno diminuito il valore di K dei kit CTB, IDEXX E ERADIKIT sono il 19 e il 28 (WP), mentre per il kit IDVET i sieri 8 e 9, un WP ed un MP rispettivamente. Per il kit Synbiotics invece i sieri sono il 24 e il 27 (SP), il 30 e il 7 (MP), il 12 e il 25 (WP); da notare che i sieri non sono stati correttamente identificati da parte di un solo laboratorio.

Il valore di K è influenzato anche dalla ripetibilità e dalla riproducibilità inerenti all'operatore. Essendo i risultati per gli altri laboratori concordi rispetto ai sieri che hanno ridotto il valore di concordanza per i singoli laboratori, è ipotizzabile un problema dovuto all'esecuzione e non al kit utilizzato.

K multiplo

La concordanza tra tutti i laboratori rispetto all'atteso è risultata essere di grado "Quasi perfetto" per tutti i kit. Le differenze tra uno e l'altro, in termini di centesimi, non sono assolutamente rilevanti.

□ Ripetibilità e riproducibilità

Coefficiente di variazione

L'interpretazione del CV come indice di ripetibilità e riproducibilità, è di facile intuitività. Una fonte [13] definisce un CV come accettabile se inferiore al 20%, solo per dati di densità ottica grezzi e riportando solo un parere personale senza fornire dati o bibliografie di supporto. Un'altra fonte [14] delinea come valore soglia di CV 50%, oltre al quale non si può più considerare la distribuzione dei dati descrivibile attraverso la media e indici di dispersione derivati. Una terza fonte [15] riporta una scala di valutazione del CV con tre categorie: good (CV \leq 15%), fair (15% $>$ CV \leq 30%), e use with caution (CV $>$ 30%). I sieri negativi in generale hanno mostrato un CV molto alto. Questo è spiegabile considerando che sia la PI che la S/P e la reattività dei sieri negativi tendono allo zero e quindi una minima variazione influenza notevolmente il CV. Da notare anche che alcuni risultati in termini di PI o S/P sono di segno negativo, contribuendo quindi ad aumentare l'ampiezza del CV.

Considerando tutto quanto suddetto e che i sieri negativi sono stati classificati correttamente, per la nostra valutazione si è tenuto conto solo dei CV dei sieri positivi. Abbiamo deciso di adottare la classificazione con tre categorie [15] ed è stato ritenuto accettabile un CV pari o inferiore al 30%. Nel caso dei sieri positivi il CV è molto ristretto per alcuni kit (CTB ed IDEXX) e più ampio per altri, ma senza comunque superare mai il 40%. In particolare due kit, VMRD e SYNBIOTICS, hanno mostrato un CV maggiore del 30% per quasi tutti i sieri.

Accordanza

Considerando l'accordanza come ripetibilità qualitativa possiamo affermare che tutti i kit sono ripetibili. In particolare VMRD ha mostrato una ripetibilità pari ad uno per tutti i sieri; 3 (CTB, ERADIKIT e IDEXX) hanno avuto solo un siero su 12 con minore ripetibilità; 1 (IDVET) 2 sieri e 1 (SYNBIOTICS) 3 sieri.

Concordanza secondo Langton

La concordanza, stimata per valutare la riproducibilità, è risultata pari ad uno per la maggioranza dei sieri esaminati e con tutti i kit utilizzati. Il siero 11 ha fatto rilevare una riproducibilità del risultato diversa da 1 con 4 kit su 6 (eccetto IDVET e VMRD). Anche i sieri 4, 5, 6, 7 hanno avuto valori diversi da 1 con i kit (IDEXX, IDVET, VMRD, SYNBIOTICS), anche se è da sottolineare che i valori sono pari a 0,9 in 4 casi su 5 e a 0,8 nel restante caso.

Il valore più basso si è riscontrato con il siero 11 ed il kit ERADIKIT: 0,48. In particolare questo siero ha dato risultati diversi dall'atteso in 3 laboratori: al lab 5 e al lab 7 le due repliche hanno dato esito dubbio/negativo, mentre al lab 9 dubbio in entrambe. Visto che anche con altri kit sono stati riscontrati problemi si potrebbe interpretare come un difetto di stabilità intrinseca del siero. Un'altra ipotesi per spiegare la performance ridotta del kit ERADIKIT potrebbe essere la ridotta quantità di siero richiesto per l'esecuzione, che potrebbe portare a risultati falsi negativi in caso di basse reattività; ma vedremo più avanti come altri dati confutino questa ipotesi.

COR (Concordance odds ratio)

L'analisi del COR ci permette di concludere, come dall'analisi di accordanza e concordanza, che per alcuni kit vi possa essere una variabilità interlaboratorio maggiore di quella intralaboratorio. In ogni caso questa variabilità è di grado lieve in quanto il di scostamento dal valore ideale di 1 è sempre inferiore all'unità.

K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto

Il K secondo Quatto misura il grado di concordanza tra i kit in diversi laboratori, indipendentemente dal risultato atteso. Questo da un indice della riproducibilità del risultato. I kit hanno mostrato un K tra 0,88 e 1, valori interpretabili come un alto grado di riproducibilità.

□ Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti

Riconoscere il più precocemente possibile un animale come infetto è una caratteristica fondamentale per un kit ELISA che si ha intenzione di utilizzare nell'ambito di un piano di sorveglianza. Il kit ERADIKIT ha riconosciuto come positivi il 37,5 % dei 24 sieri analizzati a 21 d.p.i.; i kit CTB e IDVET il 4,17% e gli altri non hanno rilevato positivi. A 28 d.p.i. il kit ERADIKIT ha riconosciuto come positivi l' 83,3 % dei sieri, il kit CTB il 66,67; il kit IDEXX il 62,5; il kit SYNBIOTICS il 58,33 % il kit IDVET il 50% e il kit VMRD il 41,67%. L'analisi statistica ha rilevato differenze significative per il confronto tra le proporzioni a T21 ma non a T28 ($p < 0.0001$ e $p > 0.05$ rispettivamente). Il kit CTB, il kit ERADIKIT e il kit IDVET inoltre, hanno rilevato dei campioni dubbi a T28 in percentuale dell' 8,33 %, 4,17% e del 4,17% rispettivamente. Su questi campioni, se fossero campioni di screening, sarebbero svolte le stesse prove di conferma dei campioni positivi, aumentando quindi la sensibilità del sistema rispetto ai kit che hanno solo due categorie di risultato. Il kit ERADIKIT, probabilmente per le caratteristiche dell'antigene impiegato, presenta una precocità elevata.

□ Questionari di valutazione

I questionari di valutazione sono un metodo per rilevare valutazioni su aspetti che non possono essere valutati quantitativamente, essendo spesso di carattere soggettivo e mutevole in funzione dell'utilizzatore del kit. L'utilizzo della moda, invece della media, permette di evidenziare le valutazioni che ricorrono più frequentemente, senza risentire del peso di singole valutazioni che si

collocano agli estremi della scala. In generale le somme delle mode, con le dovute correzioni, sono comprese in un range tra 56 e 63, da ritenere buono. Il punteggio massimo ottenibile è 65.

Nel particolare ci sono dei punti critici che sono emersi:

- Kit CTB: il tempo di esecuzione è ritenuto leggermente più ampio di quello ideale; il kit inoltre non è ritenuto completo e si consiglia di fornire tutti i reagenti e le soluzioni che sono richieste dalla prova se non già le piastre presensibilizzate; le classi di rischio dei reagenti sono considerate moderatamente pericolose; probabilmente per l'utilizzo dell' OPD.
- Kit ERADIKIT: il volume di siero necessario per l'esecuzione della prova è considerato eccessivamente ridotto; sono assenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati.
- Kit IDEXX, IDVET, SYNBIOTICS: sono assenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati.
- Kit SYNBIOTICS: il protocollo non è chiaro; sono assenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati.

Il kit CTB è un kit in-house e sicuramente ha dei margini di miglioramento sia per quanto riguarda i tempi di esecuzione che i reagenti utilizzati. Fornire già piastre e reagenti sarebbe un traguardo auspicabile ma necessita di tempo per l'ottimizzazione e la nuova validazione che si renderebbe necessaria ogni volta si cambi qualcosa nella procedura. Da sottolineare, al fronte dei punti da migliorare suddetti, gli indubbi vantaggi in termini di precocità e di costo, decisamente minore e il fatto che sia stato validato secondo il metodo OIE [16].

Il kit ERADIKIT ha delle ottime performance e la quantità ridotta di siero non sembra influire negativamente. La quantità ridotta di siero può essere percepita, come è effettivamente accaduto nei questionari da parte di alcuni laboratori, come una possibile causa di aumento di variabilità delle misure e quindi di ridotta sensibilità. Nonostante questa percezione il kit dimostra una precocità elevata.

Tutti i kit dovrebbero fornire informazioni più dettagliate e conformi alla Nuova classificazione delle sostanze secondo il Regolamento CE 1272/2008, questo per permettere una migliore gestione dei reagenti stessi in termini di manipolazione e smaltimento.

Il kit SYNBIOTICS dovrebbe invece revisionare e rendere più chiaro il protocollo di esecuzione in particolare la parte riguardante il lavaggio.

CONCLUSIONI

Questo report ha di fornire parametri di valutazione oggettivi, quali strumenti di scelta dei kit per la diagnosi sierologica per AIE da parte dei laboratori.

I parametri di scelta, oltre alle caratteristiche tecniche al kit, possono essere vari: il costo, il tempo di esecuzione e soprattutto la sensibilità e precocità che si decide di ritenere accettabile in base anche alle caratteristiche della popolazione che si va ad esaminare. Va sottolineata che la precocità è una caratteristica importantissima soprattutto nel momento in cui il piano di sorveglianza si avvicina all'eradicazione della malattia, come accade in Italia in questi anni.

Inoltre, questo confronto ha messo in evidenza come i kit necessino di una validazione completa, effettuata seguendo delle criteri formali come quelli del manuale OIE. Ad oggi, una completa validazione secondo i criteri proposti dall'OIE è stata effettuata solo per due kit: il kit in house CTB e il kit ERADIKIT.

Sarebbe auspicabile che anche le ditte produttrici rendessero completamente accessibili le metodologie seguite per la validazione e i risultati ottenuti, in modo da permettere una valutazione individuale da parte degli acquirenti.

SVILUPPO ED OTTIMIZZAZIONE DI SAGGI MOLECOLARI PER LA RICERCA E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA GENOMICO DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA IN CAMPIONI DI PLASMA

Responsabile scientifico Dr. Riccardo Forletta

U.O. impegnate nella task del progetto: 1 e 6

Scopo dell'attività

Negli animali infetti gli anticorpi specifici contro il virus dell'anemia infettiva equina (EIAV), compaiono a distanza di tempo dal contagio. Quindi, i test sierologici possono fallire nel diagnosticare l'infezione precoce durante la quale i livelli di viremia sono elevati ma gli anticorpi specifici contro il virus non sono ancora presenti o sono presenti a livelli inferiori alla soglia di rilevabilità del test.

Il Centro di Referenza Nazionale dell'Anemia Infettiva Equina (CRAIE) dell'IZSLT Sezione di Pisa, in questi ultimi anni ha sviluppato saggi molecolari qualitativi e quantitativi per la diagnosi dell'AIE nell'ambito di due progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute:

- Ricerca Corrente 2003 "Organizzazione di un sistema di sorveglianza nazionale, epidemiologico-molecolare per il controllo dell'infezione da virus dell'AIE in Italia"³³;
- Ricerca Corrente 2006 "Standardizzazione di metodiche molecolari innovative per la diagnosi diretta qualitativa e quantitativa di Anemia Infettiva Equina"³⁴.

Nell'ambito del progetto di ricerca corrente 2008 il CRAIE dell'IZSLT Sezione di Pisa, in collaborazione con il Centro Retrovirus, Sezione di Virologia dell'Università di Pisa, ha portato avanti lo studio e si è focalizzato sui seguenti obiettivi:

- Ricerca e quantificazione dell'RNA genomico di EIAV in campioni di plasma mediante metodi molecolari;
- Ottimizzazione delle tecniche di RT-PCR precedentemente sviluppate;
- Allestimento di ulteriori innovativi metodi di RT-PCR quantitativi e qualitativi;
- Verifica della specificità, sensibilità e riproducibilità di tutti i metodi allestiti al fine di poterne valutare l'applicabilità e la reale possibilità di impiego per una diagnosi diretta dell'AIE rapida, di facile esecuzione ed interpretazione dei risultati.

INTRODUZIONE

Diagnosi diretta mediante metodi molecolari

Il manuale OIE³² prevede l'impiego di saggi molecolari qualitativi e quantitativi per la diagnosi di AIE da impiegare accanto ai più comuni test sierologici. In particolare, la PCR può essere impiegata per la ricerca del genoma virale in caso di:

- risultati discordanti ai test sierologici;
- sospetto d'infezione in presenza di risultati sierologici non conclusivi;
- come test complementare per la conferma di prove sierologiche positive;
- nella diagnosi precoce, nei casi di infezione recente, prima dell'evidenza delle reattività sierologiche.

La PCR attualmente è impiegata a scopo di conferma e di ricerca e non può essere considerato come test di screening nei piani di controllo.

MATERIALI E METODI

Campioni utilizzati

I campioni utilizzati in questo studio sono stati utilizzati i seguenti:

- Controlli positivi di RT-PCR: surnatante di cellule di derma equino ED (ATCC-cod. CCI57) infettate col ceppo Wyoming di EIAV (EIAV_{Wyo}, GenBank ID: M16575) e plasma di animali AGID positivi;
- Controllo negativo di RT-PCR: plasma di soggetti sieronegativi per EIAV;
- 46 sacche di plasma equino, prodotto ed impiegato per emotrasfusione in puledri, con sospetta contaminazione da virus dell'AIE. I campioni di plasma, sono stati suddivisi in due gruppi in base alla loro provenienza, PD (1-30) e SI (1-16), e sottoposti ad accertamenti virologici mediante le tecniche molecolari sviluppate ed ottimizzate nel presente lavoro (Tab. 2.1).

I campioni di plasma e surnatante cellulare sono stati aliquotati e conservati a -80°C .

<i>Campioni</i>	<i>Lotto</i>	<i>Campioni</i>	<i>Lotto</i>	<i>Campioni</i>	<i>Lotto</i>
PD1	01/06	PD16	43/05	SI1	02/06
PD2	01/06	PD17	43/05	SI2	02/06
PD3	01/06	PD18	43/05	SI3	02/06
PD4	01/06	PD19	43/05	SI4	02/06
PD5	01/06	PD20	43/05	SI5	02/06
PD6	08/06	PD21	43/05	SI6	02/06
PD7	08/06	PD22	43/05	SI7	02/06
PD8	08/06	PD23	43/05	SI8	02/06
PD9	08/06	PD24	43/05	SI9	02/06
PD10	02/06	PD25	43/05	SI10	02/06
PD11	02/06	PD26	43/05	SI11	02/06
PD12	03/06	PD27	08/06	SI12	02/06
PD13	03/06	PD28	08/06	SI13	02/06
PD14	03/06	PD29	08/06	SI14	02/06
PD15	03/06	PD30	08/06	SI15	02/06
				SI16	02/06

Tab. 2.1: Sacche di plasma equino sospette di contaminazione da EIAV.

Estrazione di RNA virale

L'RNA virale è stato estratto a partire da diverse quantità di plasma equino (1000, 140, 280 e 420 μl) utilizzando il QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) che prevede di utilizzare 140 μl di plasma; le quantità dei reagenti sono state aggiustate in modo proporzionale quando siamo partiti da 280 μl e 420 μl . Il campione costituito da 1000 μl di plasma è stato precedentemente centrifugato a 400.000 g per 90' a 4°C per precipitare il virus; il pellet ottenuto è stato risospeso in 140 μl di PBS 1X sterile ed utilizzato per l'estrazione dell'RNA virale secondo il protocollo. L'RNA estratto è stato eluito in 40 μl . Campioni di acqua RNasi free e plasma di animali sieronegativi per EIAV sono stati processati insieme ai campioni per testare eventuali contaminazioni.

Primer e probe

I primer disegnati amplificano la regione p26 di EIAV (§ 1.1 e tab. 2.2)³³⁻³⁴⁻³⁷⁻³⁸. Le sequenze nucleotidiche dell'intero *gag* di ceppi EIAV isolati in Italia (ceppo Ita-1, GenBank ID: EU240733; Ita-2, EU375543; Ita-3, EU375544; Ita-4, EU741609; Ita-5, GQ265785; Ita-6, GU060664), Romania (Rom-1, GQ229581; Rom-2, GQ923952; Rom-4, GU060662; Rom-5, GU060663), Regno Unito (UK, AF016316), Canada (Can1, EF418582; Can3, EF418583; Can7, EF418584; Can10, EF418585), Stati Uniti (ceppo prototipo, NC_001450; EIAV_{Wyo}, M16575; p19/wenv17, AF028232; WSU5, AF247394), Cina (Liaoning, AF327877) e Giappone (V70, AB008196; V26, AB008197) sono state allineate utilizzando il programma BIOEDIT (version 7.0.5) ed analizzate al fine di identificare regioni *gag* perfettamente conservate tra tutti questi ceppi. La sequenza del ceppo EIAV isolato in Irlanda³⁵, non essendo depositata in GenBank, è stata inserita manualmente e considerata nell'analisi.

I primer sono stati disegnati nelle conservate e poi controllati per la formazione di dimeri, eterodimeri e hairpin intra- e inter-primer con il programma Primer Express software (version 1.5, Applied Biosystems).

Tab. 2.2: Primer utilizzati per la ricerca qualitativa e quantitativa dell'RNA di EIAV mediante PCR.

saggio RT-PCR	Primer	Sequenza (5'→3')	Posizione nucleotidica ^a	amplicone (bp)	
Real-time	EIAV _{Taq} -F	ATTACCGAATGCTCCACTGGTG	1154-1175	133	
	EIAV _{Taq} -R	GTCTATATGTCTGCCTAAACTGATCAA AAG	1287-1258		
	EIAV _{probe}	FAM- CACCACCACAAGGGCCTATTCCCAT- TAMRA	1177-1201		
Nested	EIAV _{gag} ext-F	CTACTTGGGTGAATACCATACAGACA AA	958-985	599	
	EIAV _{gag} ext-R	TGTCTCTGCAAGCATACATTTTCTC	1557-1533		
	EIAV _{gag} int-F	ATGAATGCATTTTTGGATGTGGT	1053-1075		432
	EIAV _{gag} int-R	CCTCATTTGCGTTCTGAATAGTCA	1485-1462		

^a Riferita al ceppo prototipo di EIAV (Genbank ID: NC_001450).

I trascritti EIAV *gag*

I trascritti di RNA utilizzati come *gag*/RNA standard sono stati sintetizzati *in vitro* dal plasmide pGEM3Zf (+) (Promega) nel quale è stato clonato, utilizzando gli enzimi di restrizione BamHI e XbaI, un frammento di 1.5 Kb del gene *gag* (386-1933 bp) di EIAV_{Wyo} (GenBank ID: M16575). Questo plasmide è stato linearizzato con l'enzima HindIII per il quale è presente un sito di taglio a

valle della regione che si desidera trascrivere ed utilizzato come stampo per la T7 RNA-polimerasi e quindi retrotrascritto utilizzando il kit commerciale RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (Promega) secondo le indicazioni fornite dal protocollo. Al termine della reazione, il DNA stampo è stato digerito con DNasi-RNasi free. Il trascritto così ottenuto è stato controllato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% e quantificato mediante lettura spettrofotometrica dell'assorbanza (O.D.) a 260 nm; dalla concentrazione dell'acido nucleico si risale al numero di copie mediante la formula:

$$\text{Numero di copie}/\mu\text{l} = \frac{\text{O.D.}_{260} \times \text{fattore di diluizione}}{\text{Nu} \times 300 \times 11 \cdot 10^3} \times N \times 10^{-6}$$

dove N è il numero di Avogadro, 300 è il peso molecolare medio di una base e 11×10^3 è la media dell' ϵ delle quattro basi; nu indica il numero di nucleotidi che costituiscono il trascritto.

Real Time TaqMan RT-PCR: metodi One- e Two-Step

Per quantificare l'RNA virale presente nei campioni (plasma e surnatante) è stata utilizzata la tecnica TaqMan-PCR (TM-PCR). La sequenza di DNA target da noi utilizzata per l'amplificazione, è la regione p26 presente all'interno del gene *gag* (§ 1.1). I primer e il probe utilizzati nella PCR sono indicati nella tabella 2.2.

Il frammento amplificato è di 133 bp. Il probe è marcato con i fluorocromi 6-carbossifluoresceina (FAM) all'estremità 5' e 6-carbossitetrametilrodamina (TAMRA) all'estremità 3'. Prima di eseguire la TM-PCR i campioni di RNA sono stati retrotrascritti poiché la Taq DNA polimerasi non amplifica RNA.

In questo studio sono state sviluppate e comparate due tecniche di Real Time TM RT-PCR chiamate One- e Two Step Real Time RT-PCR³⁸.

One-step Real Time RT-PCR

Nel metodo One-Step i saggi di retrotrascrizione (RT) e amplificazione sono stati effettuati nello stesso tubo di reazione. Il saggio è stato allestito mescolando, in un volume finale di 20 μl , tutti i componenti della reazione: 5X UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System reaction mix (Invitrogen), 0.3 μM EIAV_{Taq-F}, 0.9 μM EIAV_{Taq-R}, 0.1 μM EIAV_{probe}, 1.25 μl dell'UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System Enzyme (Invitrogen) e 10 μl dell'RNA virale. Il profilo di retrotrascrizione/amplificazione adottato è indicato nella tabella 2.3.

Two-step Real Time RT-PCR

In questo caso le reazioni di RT e amplificazione sono state condotte separatamente. Il saggio di RT è stato allestito mescolando, in un volume finale di 20 μl , i seguenti reagenti: 8 U di AMV RT (Fisher Scientific), 2 μl del 10X reaction buffer, 10 μl dell'RNA virale, 1 mM dNTPs e 0.4 μM EIAV_{Taq-R}. La retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando il protocollo indicato nella tab. 2.3.

La 2X Universal Master Mix (Applied Biosystems) contiene già tutti i componenti necessari per la reazione di amplificazione, vale a dire la Taq DNA polimerasi Gold, i dNTPs e l' Mg^{2+} ; nella mix è, inoltre, presente la polimerasi UNG (uracil-N-glicosidasi) in grado di eliminare eventuali DNA contaminanti degradandoli a livello dell'UTP. Alla Master Mix sono stati aggiunti 0.3 μM EIAV_{Taq-F}, 0.9 μM EIAV_{Taq-R} e 0.1 μM EIAV_{probe}. A 15 μl di miscela di amplificazione, così costituita, sono

stati aggiunti 10 µl del cDNA campione da quantificare. Il profilo della PCR è riportato nella tab. 2.3.

One –Step Real Time RT-PCR		Two–Step Real Time RT-PCR	
Profilo di retrotrascrizione/amplificazione		Reazione di retrotrascrizione	
Retrotrascrizione	55°C 60'	Denaturazione	65°C 5'
Inattivazione RT, attivazione Taq DNA polimerasi	95°C 5'	Retrotrascrizione	42°C 60'
Denaturazione*	95°C 15"	Inattivazione RT	95°C 5'
<i>Annealing</i> *	65°C 1'		
Estensione*	65°C 1'		
* 45 cicli di amplificazione		↓	
		Profilo di amplificazione	
		Attivazione UNG	50°C 2'
		Inattivazione UNG, attivazione polimerasi GOLD	95°C 10'
		Denaturazione*	95°C 15"
		<i>Annealing</i> ed estensione*	60°C 60"
		* 45 cicli di amplificazione	

Tab. Profili di amplificazione adottati nella One- e Two-Step Real Time RT-PCR.

Entrambe le reazioni One- e Two-Step sono state eseguite utilizzando lo strumento IQ5 Multicolor real-time 950 Detection System (Bio-Rad).

Per la quantificazione dell'RNA virale sono state utilizzate diluizioni seriali del trascritto EIAV *gag* (§ 2.4) contenenti da 10 a 10⁷ copie nei 10 µl utilizzati per la reazione di RT.

L'RNA estratto da surnatante o da plasma di animali AGID positivi è stato utilizzato come controllo positivo mentre, per verificare l'assenza di contaminazione, sono stati inclusi controlli negativi aggiungendo 10 µl di acqua RNasi free sterile al posto dell'RNA virale.

Per assicurare una più corretta quantificazione, standard e campioni sono stati processati allo stesso modo e nella stessa seduta di amplificazione; ogni campione è stato analizzato in triplicato.

I risultati sono espressi come copie di RNA virale/ml.

RT-nested PCR: metodi Two- e Three-Step

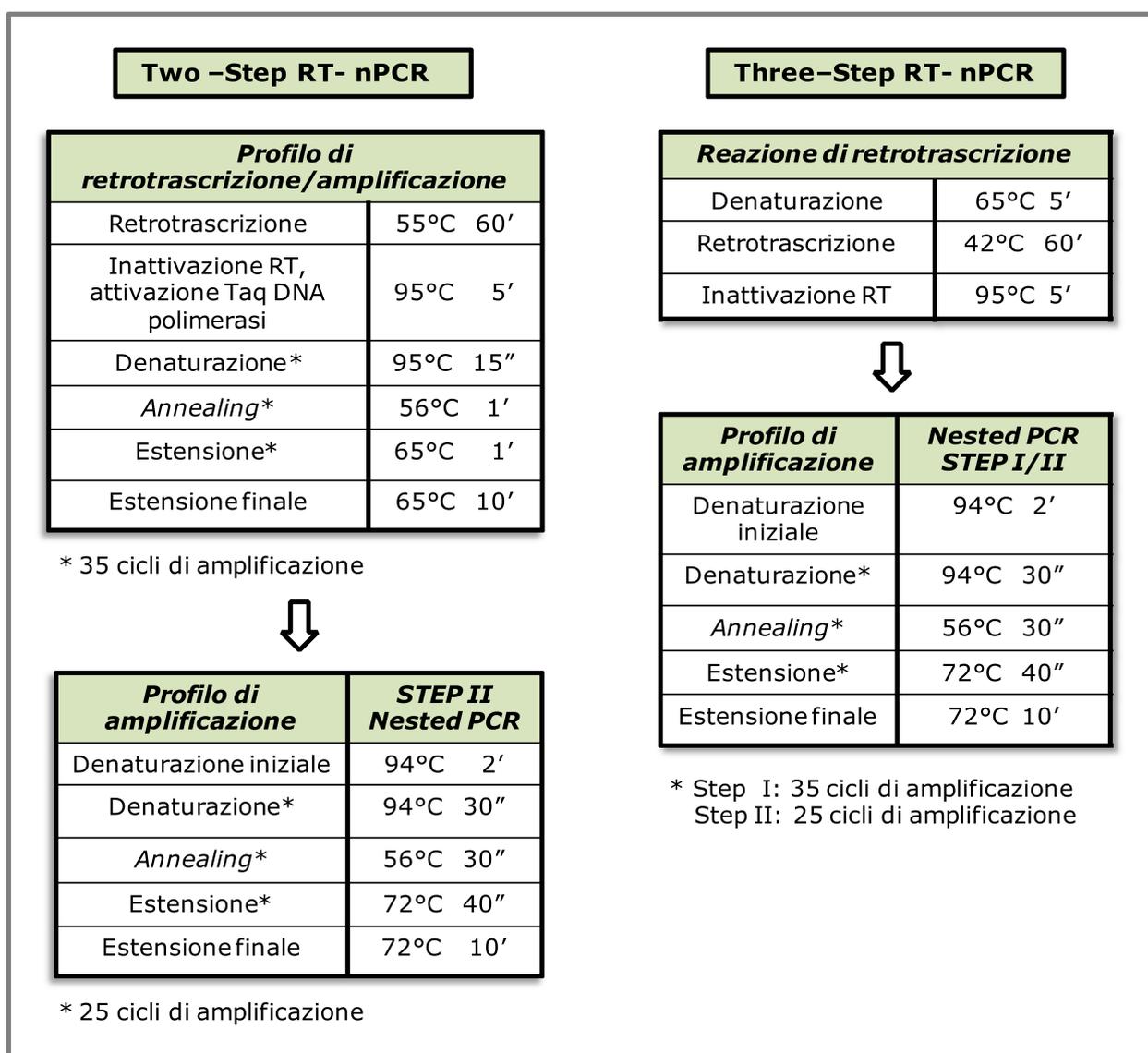
In questa ricerca sono stati sviluppati anche due saggi di RT-nested PCR (RT-nPCR). Nel metodo chiamato Two-Step RT-nPCR la RT ed il primo step della nPCR sono stati effettuati nello stesso tubo di reazione dopodiché è stato eseguito il secondo step della nPCR. Nel metodo invece

chiamato Three-Step RT-nPCR le tre reazioni RT, primo e secondo stadio della nPCR sono state condotte separatamente³⁸.

Two-step RT-nPCR

La RT ed il primo step della nPCR sono state effettuate utilizzando l'UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen); la miscela di reazione è stata preparata come descritto in precedenza (§ 2.5.1) ad eccezione dei primer che in questo caso sono EIAV_{gag} ext-F e -R, utilizzati a 0.4 µM. Il profilo di retrotrascrizione/amplificazione adottato è indicato nella tabella 2.4.

Il secondo stadio della nPCR è stato allestito mescolando, in un volume finale di 50 µl, tutti i componenti della reazione: 1 U di Taq DNA polimerasi (Polymed), 10X reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 3 µl del prodotto della prima reazione, 0.4 µM EIAV_{gag} int-F e -R. Il protocollo di amplificazione è riportato nella tabella 2.4.



Tab. Profili di amplificazione adottati nella Two- e Three-Step RT-nPCR.

Three-step RT-nPCR

Nel metodo Three-Step RT-nPCR, la miscela di RT è stata preparata come descritto nel § 2.5.2 ad eccezione del primer reverse, 0.4 μM EIAV_{gag} ext-R. La RT è stata condotta con lo stesso protocollo utilizzato in precedenza (tab. 2.3 e 2.4).

La prima PCR è stata allestita mescolando, in un volume finale di 50 μl , tutti i componenti della reazione: 10 μl di cDNA, 1 U di Taq DNA polimerasi, 10X reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs e 0.4 μM EIAV_{gag} ext-F e -R. Il profilo di amplificazione adottato è indicato nella tab. 2.4. La seconda PCR è consistita nell'amplificazione di 3 μl del prodotto della prima reazione diluiti in 50 μl di una miscela del tutto identica a quella utilizzata nella prima PCR ad eccezione dei primer forward e reverse, 0.4 μM EIAV_{gag} int -F e -R. Il profilo di amplificazione è uguale a quello del primo stadio, con la sola variazione dei cicli di amplificazione che vengono ridotti da 35 a 25 (Tab. 2.4).

Entrambe le tecniche di RT-nPCR sono state condotte utilizzando il termocicizzatore ABI 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

L'RNA estratto da surnatante o da plasma di animali AGID positivi è stato utilizzato come controllo positivo mentre, per verificare l'assenza di contaminazione, sono stati inclusi controlli negativi aggiungendo 10 μl di acqua RNasi free sterile al posto dell'RNA virale.

I prodotti della prima e seconda PCR, 599 bp e 432 bp, rispettivamente, sono stati evidenziati su gel di agarosio all'1% dopo corsa elettroforetica (Tab. 2.2).

Metodi utilizzati per valutare la specificità, sensibilità e riproducibilità dei saggi allestiti

La specificità dei metodi allestiti è stata testata utilizzando, come controllo negativo, il plasma di animali sieronegativi per EIAV e, come controlli positivi, il surnatante di cellule ED infettate con EIAV_{wyo} o il plasma di soggetti AGID positivi.

La sensibilità, l'accuratezza e la linearità delle metodiche sono state valutate invece utilizzando diluizioni seriali del trascritto EIAV *gag*: da 10 a 10⁷ copie di trascritto nella real-time RT-PCR, da 10 a 10⁵ copie nella RT-nPCR.

La riproducibilità è stata analizzata utilizzando campioni di plasma di soggetti AGID negativi drogati con il trascritto EIAV *gag* o con surnatante di cellule infettate con EIAV.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato e in tre corse indipendenti.

Il plasma di soggetti sieronegativi per EIAV e acqua RNasi free sono stati interspersi tra i campioni positivi per verificare eventuali contaminazioni.

RISULTATI

Disegno sperimentale

In questo lavoro abbiamo sviluppato due saggi di real-time RT-PCR per quantificare l'RNA genomico di EIAV *in vivo*. Poiché gli strumenti per real-time PCR sono molto costosi e la tecnologia richiede personale adeguatamente formato e reagenti *ad hoc*, abbiamo allestito anche due metodi di RT-nPCR.

I primer e probe utilizzati in tutti i saggi molecolari amplificano la regione p26 di EIAV e sono stati disegnati nelle regioni del gene *gag* più conservate tra i diversi ceppi EIAV conosciuti (§ 1.1, 2.3 e tab. 2.2). Abbiamo poi testato e comparato la sensibilità, l'accuratezza, la specificità e la riproducibilità, caratteristiche fondamentali di qualsiasi test diagnostico, di tutte le metodiche messe a punto. Per aumentare ulteriormente la sensibilità dei saggi, vari protocolli di estrazione dell'RNA virale sono stati comparati al fine di isolare quantità maggiori di acido nucleico. Infine, tutti i saggi sono stati applicati su 46 sacche di plasma, prodotto e utilizzato per emotrasfusione in puledri, sospette di contaminazione da EIAV. Le sacche di plasma sono state suddivise in due gruppi, in base alla loro provenienza, denominati PD (1-30) e SI (1-16) (tab. 2.1).

Tutte le metodiche molecolari sono state sviluppate e ottimizzate presso il Centro di Referenza per l'AIE dell'IZS di Pisa in collaborazione con il Centro Retrovirus, Sezione di Virologia dell'Università di Pisa³³⁻³⁴⁻³⁷⁻³⁸.

Allestimento e comparazione dei saggi real-time RT-PCR

I due saggi di real-time RT-PCR allestiti sono stati chiamati:

1. One-Step real-time RT-PCR: RT e PCR avvengono nello stesso tubo di reazione;
2. Two-Step real-time RT-PCR: RT e PCR sono due reazioni separate.

La sensibilità di ciascun metodo è stata testata utilizzando diluizioni seriali del trascritto EIAV *gag* analizzate in triplicato e in tre esperimenti indipendenti.

Entrambi i saggi One- e Two-Step real-time RT-PCR hanno mostrato una sensibilità analitica di 100 copie che, nel nostro sistema, corrispondono ad un ciclo soglia (ciclo di amplificazione al quale il segnale di fluorescenza è al di sopra della linea soglia) compreso tra 35 e 40. Tuttavia, il metodo One-Step è risultato più sensibile in quanto le 100 copie di trascritto sono state sempre detectate ad un ciclo di PCR 2-3 volte inferiore a quello osservato per il metodo Two-Step. Inoltre, le 10 copie del trascritto EIAV *gag* sono state rilevate 7 volte su 9 con il saggio One-Step, 3 volte su 9 con il saggio Two-Step (dati non mostrati). Poiché l'RNA virale è stato estratto da 140 µl di plasma, l'RNA isolato risospeso in 40 µl e di questi 1/4 e 1/8 sono stati analizzati con il metodo One- e Two-Step, rispettivamente, possiamo concludere che la sensibilità analitica di 100 copie corrisponde ad una sensibilità di 3.000 copie di RNA virale /ml plasma per il saggio One-Step e di 6.000 copie/ml per il metodo Two-Step.

L'efficienza delle due tecniche è stata invece stimata drogando il plasma di animali AGID negativi con il trascritto EIAV *gag* (da 3×10^2 a 3×10^7 copie/ml). Il metodo One-Step è risultato molto più efficiente in quanto:

- entrambi i saggi sono stati capaci di quantificare accuratamente l'RNA virale nei campioni drogati con 30.000-3.000.000 copie di trascritto/ml ma il metodo One-Step è risultato più preciso nella quantificazione rispetto al saggio Two-Step (Tab. 3.1);
- solo con il metodo One-Step è stato possibile quantificare l'RNA, seppur in modo impreciso, nei campioni drogati con 1.000 e 3.000 copie di trascritto/ml (Tab.3.1).

Per valutare il range di linearità e la capacità dei metodi real-time di quantificare l'RNA virale in campioni altamente positivi è stato utilizzato il surnatante di cellule ED infettate con EIAV_{wyo} raccolto al 24° e 26° passaggio. La presenza di un elevato numero di particelle virali nel surnatante è stata determinata mediante saggio dell'attività della retrotrascrittasi e western blot (dati non mostrati). Dopodichè, il surnatante è stato testato con le due tecniche real-time le quali hanno detectato un numero di copie di RNA simile e molto elevato, come atteso, ma il saggio One-Step ha rilevato un numero di copie consistentemente più elevato rispetto al metodo Two-Step (Tab. 3.1).

Tab. Valutazione della sensibilità e dell'accuratezza dei saggi real-time RT-PCR e RT-nPCR.^a

Campioni RNA	copie addizionate/ml o surnatante cellulare	Real-time RT-PCR ^b		RT-nPCR ^c	
		One-Step	Two-Step	Two-Step	Three-Step
Plasma	30,000,000	26,785,714	20,228,571	+	+
drogato	3,000,000	2,960,714	2,754,286	+	+
con il trascritto	300,000	326,714	275,429	+	+
<i>gag</i> ^d	30,000	30,393	29,486	+	+
	3,000	3,450	4,520	+	+
	1,000	1,529	NS ^e	+	-
	300	587	NS	+/- ^f	-
Surnatante cellulare ^g	24° passaggio	700,200,000	394,980,000	ND ^h	ND
	26° passaggio	10,120,000,000	8,050,000,000	+	+

^a Media dei valori ottenuti da tre esperimenti indipendenti. I campioni sono stati analizzati in triplicato.

^b I risultati sono espressi come numero di copie di RNA virale/ml.

^c Metodi qualitativi. Gli ampliconi sono evidenziati su gel di agarosio.

^d Plasma di animali EIAV sieronegativi drogati con differenti copie di trascritto EIAV *gag*.

^e Segnale di fluorescenza assente o al di sotto della linea soglia.

^f il campione è risultato positivo 5 volte su 9.

^g Surnatante di cellule ED infettate con EIAV raccolto al passaggio indicato.

^h ND: non eseguito.

Allestimento e comparazione dei saggi RT-nPCR

I due saggi di RT-nPCR messi a punto sono stati chiamati:

- Two-Step RT-nPCR: la RT ed il primo step della nPCR avvengono nello stesso tubo di reazione;

- Three-Step RT-nPCR: RT, primo e secondo step della nPCR sono tre reazioni separate.

Le dimensioni degli ampliconi prodotti nel primo e secondo stadio della nPCR sono di 599 bp e 432 bp, rispettivamente (Tab. 2.2).

La specificità e la sensibilità dei saggi sono state valutate utilizzando diluizioni scalari del trascritto EIAV *gag* (da 10 a 10⁵ copie) amplificate in triplicato e in tre esperimenti indipendenti.

Il surnatante di cellule ED infettate con EIAV_{wyo} raccolto al 26° passaggio e il plasma di animali sieronegativi per EIAV sono stati utilizzati come controllo positivo e negativo, rispettivamente.

La sensibilità analitica di entrambi i metodi qualitativi è risultata 100 copie di trascritto (Fig.1).

Tuttavia, il metodo Two-Step ha mostrato una maggiore sensibilità in quanto:

- Sebbene l'intensità delle bande non sia proporzionale al numero di copie di RNA presente nei campioni, in tutti gli esperimenti effettuati la banda prodotta dall'amplificazione delle 100 copie è apparsa sempre più intensa quando il campione è stato amplificato con il saggio Two-Step rispetto a quando amplificato mediante Three-Step RT-nPCR;

- le 10 copie di trascritto sono state amplificate 6 volte su 9 con il saggio Two-Step e solo 3 volte con il test Three-Step (dati non mostrati).

Poiché nella Two- e Three-Step RT-nPCR sono stati utilizzati 1/4 e 1/8 dell'RNA estratto da 140 µl di plasma e risospeso in 40 µl, la sensibilità dei metodi è risultata di 3.000 e 6.000 copie di RNA virale/ml plasma, rispettivamente.

Nessuna banda è stata prodotta dall'amplificazione del plasma di soggetti sieronegativi per EIAV, indicando che i saggi sono specifici per EIAV e che nessuna contaminazione è avvenuta durante i processi di estrazione dell'RNA ed amplificazione (Fig. 1).

L'efficienza dei saggi RT-nPCR è stata testata drogando campioni di plasma di animali AGID negativi con il trascritto EIAV *gag* (3×10^2 - 3×10^7 copie/ml) (Tab.3.1). Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato e in tre esperimenti indipendenti. Entrambe le tecniche hanno amplificato i campioni contenenti da 3.000 a 30.000.000 copie di RNA/ml. Al contrario, i campioni 300 e 1.000 copie/ml sono stati amplificati solo con il saggio Two-Step (le 300 copie/ml sono state detectate 5 volte 9). Questo esperimento ha confermato la maggiore sensibilità della tecnica Two-Step RT-nPCR.

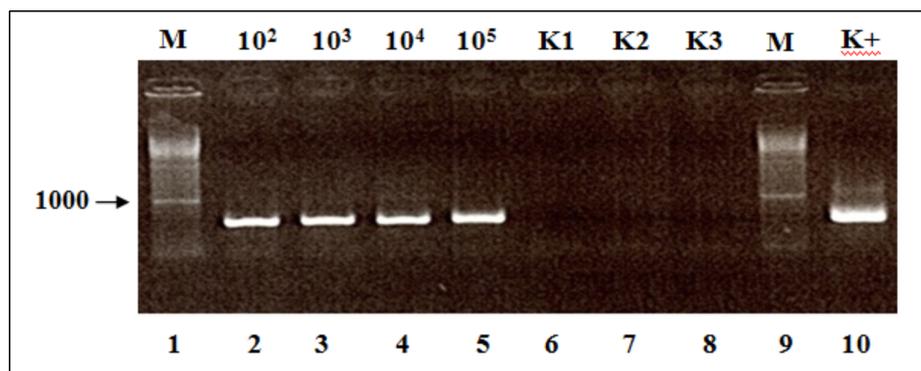


Fig. Ampliconi prodotti dall'amplificazione delle diluizioni scalari del trascritto EIAV *gag* (10^2 - 10^5 copie) mediante il saggio Three-Step RT-nPCR (pozzetti 2-5). K1 = Controllo negativo (acqua RNasi free) del primo step della nPCR (pozzetto 6). K2 = Controllo negativo del secondo step della nPCR (pozzetto 7). K3 = Plasma di animali sieronegativi per EIAV (pozzetto 8). K+ = Supernatante di cellule ED in coltura infette con EIAV (pozzetto 10). M= DNA marker (100 bp) (pozzetto 9). La dimensione dell'amplicone è di circa 432 bp.

Ottimizzazione dell'estrazione di RNA virale al fine di aumentare la sensibilità delle metodiche molecolari

Poichè la fase cronica di infezione è caratterizzata da bassi livelli di viremia, è fondamentale avere a disposizione dei saggi diagnostici altamente sensibili. Quindi, abbiamo cercato di aumentare la sensibilità di tutti i metodi molecolari allestiti ottimizzando il processo di estrazione dell'RNA virale.

Il surnatante di cellule ED infettate con EIAV_{wyo} è stato raccolto al 26° passaggio (Tab. 3.1) e diluito con plasma di soggetti AGID negativi in modo da ottenere campioni contenenti da 2×10^3 a 3×10^6 copie di RNA virale/ml. L'acido nucleico è stato poi estratto da diverse quantità di surnatante: 1000, 420, 280 e 140 µl. Il protocollo di estrazione utilizzato prevede di utilizzare 140 µl di plasma quindi le quantità dei reagenti sono state aggiustate in modo proporzionale quando siamo partiti da 280 µl e 420 µl. I campioni costituiti da 1000 µl di surnatante sono stati ultracentrifugati, il pellet risospeso in 140 µl e l'RNA virale estratto secondo protocollo. Gli acidi nucleici sono stati poi amplificati con i metodi molecolari risultati più sensibili: One-Step real-time RT-PCR e Two-Step RT-nPCR.

Per ragioni, che non abbiamo approfondito, la quantificazione dell'RNA nei campioni ultracentrifugati è risultata estremamente inefficiente. Infatti, con l'ultracentrifugazione i campioni che contengono da 200.000 a 3.000.000 di copie/ml hanno perso circa 1/3 delle particelle virali. La perdita è stata ancora più marcata nei campioni scarsamente positivi: il surnatante 4.000 copie /ml è

risultato negativo alla PCR qualitativa e mediante real-time RT-PCR sono state quantificate solo 710 copie/ml. Nessuno dei due metodi ha amplificato il campione con 2.000 copie/ml (Tab. 3.2).

Risultati più soddisfacenti sono stati invece ottenuti con i campioni non ultracentrifugati:

- la quantificazione dell'RNA nei campioni contenenti da 6.000 a 3.000.000 di copie/ml è stata molto efficiente indipendentemente dal volume di surnatante utilizzato per l'estrazione dell'RNA;
- la quantificazione dell'acido nucleico nei campioni 2000 e 4000 copie/ml è stata invece più precisa utilizzando 420 µl di surnatante; il campione 2.000 copie/ml è stato amplificato mediante RT-nPCR solo quando l'RNA è stato estratto da 420 µl (Tab. 3.2).

Quindi, l'impiego di 420 µl di surnatante ha permesso di quantificare il virus nei campioni scarsamente positivi ed ha inoltre permesso di aumentare la sensibilità di entrambi i saggi, qualitativo e quantitativo, a 1.000 copie di RNA virale/ml.

In conclusione, per minimizzare i costi, abbiamo deciso di utilizzare nella routine 140 µl di plasma per l'estrazione dell'RNA virale e di ritestare i soggetti risultati negativi, ma infettati cronicamente o sospetti di infezione, riestraendo l'acido nucleico da 420 µl.

Tab. Determinazione della quantità ottimale di plasma da utilizzare per estrarre l'RNA virale al fine di aumentare la sensibilità dei saggi One-Step real-time RT-PCR e Two-Step RT-nPCR. ^a

Campioni (copie/ml)	Volume plasma per estrazione RNA (µl) ^b							
	140		280		420		1,000	
3,000,000	3,253,571	+	3,589,286	+	2,648,571	+	2,269,400	+
1,000,000	960,000	+	1,000,653	+	842,857	+	750,000	+
200,000	187,000	+	225,000	+	219,048	+	128,200	+
150,000	133,000	+	170,286	+	155,952	+	87,260	+
40,000	35,464	+	38,750	+	35,179	+	18,400	+
30,000	31,571	+	29,286	+	21,786	+	12,650	+
20,000	17,286	+	16,786	+	9,155	+	2,080	+
10,000	11,036	+	9,232	+	8,095	+	1,340	+
6,000	5,607	+	6,232	+	6,314	+	1,530	+
4,000	2,475	+	3,327	+	3,417	+	710	-
2,000	1,530	-	ND ^c	-	2,274	+	NS ^d	-

^a Media dei valori ottenuti da tre esperimenti indipendenti. I campioni (surnatante di cellule infettate con EIAV_{wyo} titolato e diluito con plasma di animali AGID negativi) sono stati analizzati in triplicato.

^b I risultati sono espressi come numero di copie di RNA/ml (saggio real-time RT-PCR) e come presenza (+) o assenza (-) (nPCR) del genoma virale. I campioni 1,000 µl di plasma sono stati ultracentrifugati ed il pellet risospeso in 140 µl di PBS1X prima dell'estrazione dell'RNA virale.

^c ND: non eseguito.

^d NS: Segnale di fluorescenza assente o al di sotto della linea soglia.

Analisi delle sacche di plasma equino sospette di contaminazione da EIAV

Una volta sviluppati i saggi molecolari, questi sono stati applicati su 46 sacche di plasma equino arrivate presso il Centro di Referenza dell'AIE, IZS Sezione di Pisa. Tali sacche, utilizzate per somministrare immunoglobuline a puledri, erano sospette di contaminazione da EIAV e ritenute la causa di due focolai AIE in Italia (Tab. 2.1).

Essendo stati prelevati sul campo, questi campioni hanno rappresentato un'opportunità per validare e comparare i saggi molecolari sviluppati. Le sacche sono state analizzate con tutti i saggi di PCR, qualitativi e quantitativi. Le condizioni e le modalità operative sono state le seguenti:

- a. Gli acidi nucleici sono stati estratti da 140 µl di plasma.;
- b. I campioni negativi o con un basso numero di copie di RNA virale sono stati ritestati estraendo l'RNA a partire da 420 µl di plasma e ripetendo la PCR;
- c. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato;
- d. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite da due diversi operatori e in tempi differenti;
- e. Infine, i campioni positivi sono stati confermati riestraendo e riamplicando l'RNA virale.

Dodici campioni (PD1, PD6, PD8, PD9, PD11, PD12, PD13, PD14, PD16, PD17, PD18 e PD22) sono risultati EIAV positivi. Come indicato nella tabella 3.3, la carica virale riscontrata in tali campioni è stata estremamente variabile: da 700 (PD22) a 2.000 (PD1, PD6 e PD8) fino a 1.500.000 di copie/ml (PD11, PD13 e PD14). I risultati ottenuti dall'analisi quantitativa sono stati poi confermati mediante metodo qualitativo Two-Step RT-nPCR che ha detectato il virus in tutti i campioni ad eccezione di PD1 e PD22 nei quali i livelli di viremia sono al di sotto del limite di sensibilità della metodica (Tab. 3.3 e Fig. 3.2). Sulla base di quanto detto in precedenza (§ 3.4), il campione PD1, che contiene circa 1.800 copie di EIAV/ml, è stato ritestato riestraendo l'RNA da 420 µl di plasma e riamplicato mediante saggio Two-Step RT-nPCR: in questo caso il campione è risultato positivo (dati non mostrati).

I metodi meno sensibili, Two-Step real-time RT-PCR e Three-Step RT-nPCR, falliscono nel detectare il virus nei campioni PD1, PD22, PD6 e PD8 che contengono circa 2000 copie/ml (Fig. 3.2 e Tab. 3.3). Gli stessi risultati sono stati ottenuti riamplicando questi campioni dopo aver riestratto l'RNA da 420 µl di plasma.

Tab. Analisi delle sacche di plasma sospette di contaminazione da EIAV con i metodi molecolari qualitativi e quantitativi sviluppati. ^a

Sacche plasma	Real-time RT-PCR ^b		RT-nPCR ^c	
	One-Step	Two-Step	Two-Step	Three-Step
PD1	1879	NS ^d	-	-
PD6	2118	NS	+	-
PD22	796	NS	-	-
PD8	2254	NS	+	-
PD9	35714	29857	+	+
PD11	1225000	765714	+	+
PD12	272500	195714	+	+
PD13	1528571	1068571	+	+
PD14	1353571	975714	+	+
PD16	145714	88714	+	+
PD17	183964	167143	+	+

PD18	35643	31714	+	+
------	-------	-------	---	---

^a Nella tabella sono riportati i campioni positivi. L'RNA virale è stato estratto da 140 µl di plasma. I campioni negativi o bassi positivi sono stati ritestati dopo aver riestratto l'RNA da 420 µl di plasma. Media dei valori ottenuti da tre esperimenti indipendenti. I campioni sono stati analizzati in triplicato.

^b I risultati sono espressi come numero di copie/ml.

^c Metodi qualitativi. Gli ampliconi sono evidenziati su gel di agarosio.

^d NS: Segnale di fluorescenza assente o al di sotto della linea soglia.

In modo del tutto analogo, le 34 sacche di plasma risultate EIAV negative al primo screening, si sono riconfermate tali dopo essere state rianalizzate effettuando l'estrazione dell'RNA virale da 420 µl (dati non mostrati).

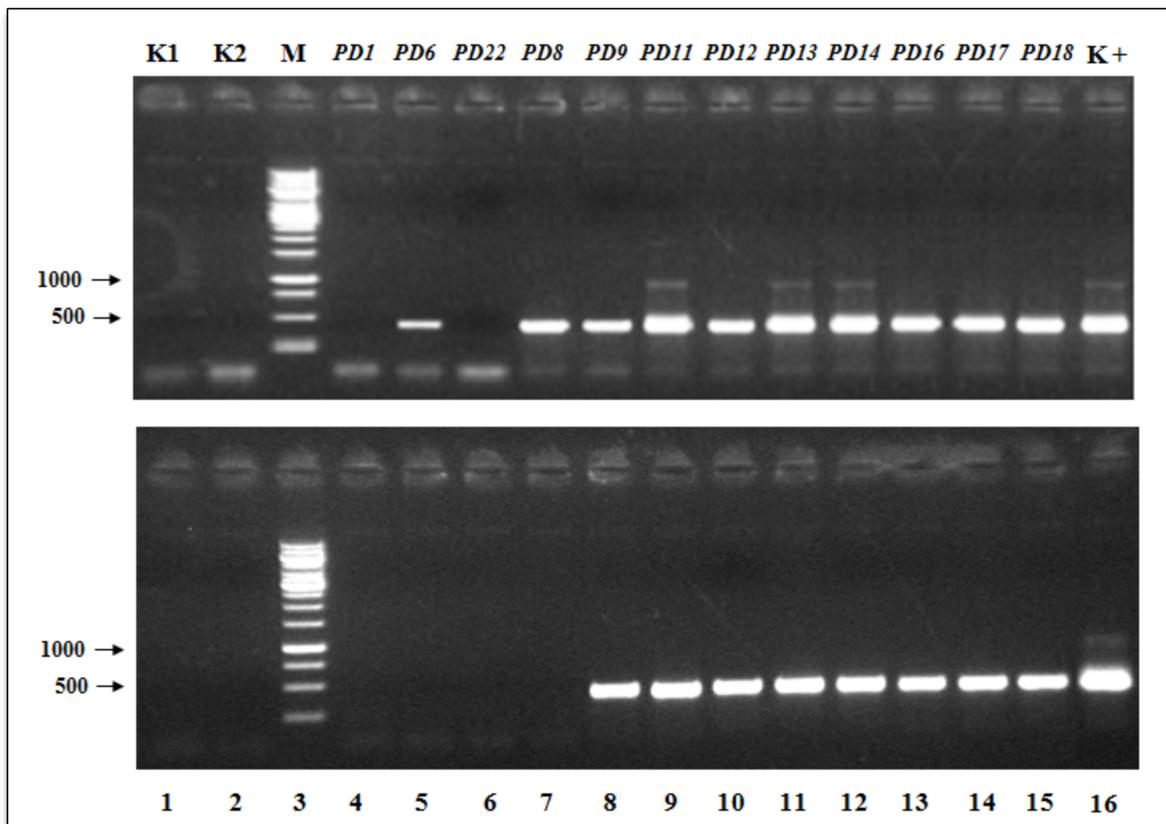


Fig. 3.2. Ampliconi prodotti dall'amplificazione delle sacche di plasma PD1-PD22 mediante i saggi Two- (foto in alto) e Three-Step RT-PCR (foto in basso). (pozzetti 4-15). K1 = Plasma di animali sieronegativi per EIAV (pozzetto 1). K2 = Controllo negativo (acqua RNasi free) (pozzetto 2). K+ = Supernatante di cellule ED in coltura infettate con EIAV (pozzetto 16). M= DNA marker (1 Kb) (pozzetto 3). La dimensione dell'amplicone è di circa 432 bp.

DISCUSSIONE

La diagnosi tradizionale di AIE si basa sulla rivelazione di anticorpi specifici contro EIAV. Sebbene siano facili da eseguire, relativamente economici e applicabili in larga scala, i test sierologici presentano alcuni svantaggi: essi infatti falliscono nel rilevare il virus nelle fasi precoci dell'infezione quando gli anticorpi non sono ancora presenti o sono presenti a livelli inferiori rispetto al limite di sensibilità dei test⁶⁻⁷⁻³²⁻⁴³⁻⁴⁴. Gli animali in fase acuta di infezione, risultati negativi ai saggi sierologici, in realtà possiedono un'elevata viremia e quindi possono contribuire a trasmettere il virus¹⁹⁻¹⁰⁻¹⁷.

I test molecolari, che ricercano direttamente il virus, sono molto utili nelle retrovirusi per diagnosticare precocemente l'infezione. Ad oggi però nessun saggio molecolare è disponibile per la diagnosi di AIE.

In questo lavoro abbiamo sviluppato e comparato metodi molecolari quantitativi e qualitativi per rilevare l'RNA genomico di EIAV in campioni di plasma³⁸.

I metodi quantitativi basati sulla tecnologia real-time presentano molti vantaggi rispetto all'amplificazione classica come la rapidità, la semplicità di esecuzione, la minor manipolazione del campione e quindi minor rischio di contaminazione. Inoltre, l'amplificazione, in parallelo ai campioni, di standard a concentrazione nota permette sia di quantificare i campioni che di valutare il range di linearità e la riproducibilità del metodo stesso. Tuttavia, tale tecnologia richiede strumenti relativamente costosi e personale adeguatamente addestrato. Quindi abbiamo sviluppato anche due metodi di RT-nPCR (chiamati Two- e Three-Step RT-nPCR).

Come è noto, la sequenza del primer determina la sensibilità e la specificità di un test molecolare. Abbiamo quindi disegnato primer che amplificano la regione p26 di EIAV, altamente conservata tra i vari isolati, e già considerata come target di PCR in precedenti studi²⁻⁹⁻²⁴⁻³⁵. I primer e probe disegnati sono stati in grado di rilevare e quantificare non solo l'RNA genomico di EIAV_{wyo}, il ceppo prototipo, ma anche di altri isolati (differenti dal ceppo prototipo) presenti in sacche di plasma equino arrivate presso il nostro laboratorio e ritenute la causa di due focolai AIE in Italia. Al contrario, nessun amplicone è stato ottenuto amplificando il plasma di animali AGID negativi, indicando che i saggi sono specifici per EIAV.

Per quanto riguarda i test quantitativi, il metodo One-Step (RT e PCR avvengono nella stesso tubo di reazione) ha mostrato notevoli vantaggi rispetto al Two-Step: rapidità, facilità di esecuzione, maggiore sensibilità e accuratezza. Entrambi i saggi hanno rivelato una sensibilità analitica di 100 copie di RNA ma la sensibilità espressa come numero di copie/ml plasma è risultata maggiore nel metodo One-Step poiché in questo caso, proprio per le modalità con le quali i saggi sono allestiti, tutto l'RNA retrotrascritto è amplificato mentre la Two-Step PCR amplifica solo una parte del cDNA.

Per lo stesso motivo, la tecnica Two-Step RT-nPCR, che combina insieme RT e primo step della nPCR, è stata capace di rilevare un minor numero di copie di RNA virale/ml rispetto al saggio Three-Step. La Two-Step RT-PCR ha mostrato anche una maggiore sensibilità analitica poiché è stata più efficiente, rispetto al metodo Three-Step, nel rilevare le 10 copie del trascritto EIAV *gag*. La maggiore sensibilità dei saggi che combinano insieme RT e PCR è stata in seguito confermata dall'analisi di campioni di plasma EIAV negativi drogati con il surnatante di cellule infettate con il virus.

Poiché durante la fase cronica di infezione i livelli di viremia sono piuttosto bassi, abbiamo cercato di aumentare la sensibilità dei test allestiti ottimizzando il processo di estrazione dell'RNA virale. A tal fine, il surnatante di cellule infettate con EIAV è stato titolato e poi diluito con plasma di animali AGID negativi in modo da ottenere campioni contenenti differenti copie di virus. L'RNA virale è stato estratto dai seguenti volumi di surnatante: 1000, 420, 280 e 140 µl. Il campione costituito da 1000 µl è stato precedentemente ultracentrifugato per concentrare il virus ed il pellet ottenuto risospeso in 140 µl. Gli acidi nucleici estratti sono stati testati con i due metodi risultati più

sensibili, One-Step real-time RT-PCR e Two-Step RT-nPCR. Pur avendo utilizzato dei parametri di ultracentrifugazione simili a quelli trovati in letteratura⁹, la quantificazione dell'RNA nei campioni ultracentrifugati è stata estremamente inefficiente. Questo risultato non deve però sorprendere in quanto è noto che la concentrazione, mediante ultracentrifugazione, di retrovirus, lentivirus e vettori derivati è spesso problematica e permette di recuperare uno scarso numero di particelle virali. Quindi, ad oggi sono necessari metodi alternativi per concentrare i retrovirus.

L'estrazione di RNA virale da 140 µl di surnatante, la quantità raccomandata dal fornitore, ha permesso una corretta e precisa quantificazione del virus nei campioni contenenti più di 6.000 copie di RNA/ml con entrambi i metodi, One-Step real-time RT-PCR e Two-Step RT-nPCR. Al contrario, la quantificazione dell'RNA nei campioni con bassi livelli di viremia è stata più efficiente partendo da 420 µl. Da sottolineare che, utilizzando un volume di plasma tre volte superiore a quello consigliato dal fornitore, è stato possibile ottimizzare la sensibilità dei saggi One-Step real-time RT-PCR e Two-Step RT-nPCR a 1.000 copie di RNA/ml e minimizzare la possibilità di ottenere falsi negativi.

Quindi, al fine di ridurre costi e tempo, abbiamo deciso di utilizzare nella routine 140 µl di plasma e di estrarre l'RNA da 420 µl per ritestare animali negativi al protocollo di routine ma cronicamente infettati o sospetti di aver contratto l'infezione o ad alto rischio di contagio.

Le sacche di plasma equino, arrivate presso il nostro laboratorio e sospette di contaminazione da EIAV, sono state, trattandosi di campioni prelevati sul campo, una opportunità per validare i metodi molecolari sviluppati. Tra le dodici sacche risultate positive, particolarmente utili sono stati i quattro campioni (PD1, PD6, PD8 e PD22) con carica virale al limite della sensibilità dei test e molto simile a quella riscontrata negli animali in fase cronica²⁶. Il saggio One-Step real-time RT-PCR è stato di gran lunga il metodo più sensibile in quanto ha messo in evidenza il virus in tutti e quattro i campioni sopra citati; la Two-Step RT-nPCR, che utilizza la stessa miscela di reazione della One-Step real-time RT-PCR, ha fallito nel rilevare la positività di due campioni (PD1 e PD22) mentre nessuno dei 4 plasmi è stato amplificato mediante i test Two-Step real-time RT-PCR e Three-Step RT-nPCR, i due metodi meno sensibili.

In conclusione, le One-step real-time RT-PCR e Two-step RT-nPCR descritte in questo lavoro sono altamente specifiche, sensibili e accurate e possono essere utilizzate come test di routine per la ricerca di EIAV in campioni di plasma. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi su campioni di campo per verificare l'effettiva possibilità di impiego di questi metodi ad integrazione dei test sierologici per AIE.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrimi P., Schiavo A. e Forletta R., 1979. Il contributo dei recenti provvedimenti di polizia veterinaria alla lotta contro l'Anemia Infettiva degli equini. *Annali della facoltà di medicina Veterinaria*, vol. XXXII.
2. Cappelli, K., Capomaccio, S., Cook, F.R., Felicetti, M., Marenzoni, M.L., Coppola, G., Verini-Supplizi, A., Coletti, M., Passamonti, F. 2011. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. *J Clin. Microbiol.* 49, 27-33.
3. Ceccarelli A., Forletta R. e Agrimi P., 1974. Impiego della reazione di Coggins in un focolaio di Anemia Infettiva. *Atti della Società delle Scienze Veterinarie*, vol. XXVIII.

4. Clabough-Sellon, D.C., Perry, S.T., Coggins, L., Fuller, F.J., 1992. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J. Virol.* 66, 5906-5913.
5. Codazza D., Agrimi P., Redaelli G. e Forletta R. The course and the control of E.I.A. from 1977 to 1981 in the Italian Horses. II Simpósio Internacional de Anemia Infeciosa Equina. São Paulo Hilton Hotel – 21-24/marco/82.
6. Coggins, L., Norcross, N.L., 1970. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet.* 60, 330-335.
7. Coggins, L., Norcross, N.L., Nusbaum, S.R., 1972. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.* 33, 11-18.
8. Coggins, L., 1981. Equine infectious anaemia. *Comp. Diagn. Viral Dis.* IV, 647-657.
9. Cook, R.F., Cook, S.J., Li, F., Montelaro, R.C., Issel, C.J., 2002. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol. Methods.* 150, 171-179.
10. Cullinane, A., Quinlivan, M., Nelly, M., Patterson, H., Kenna, R., Garvey, M., Gildea, S., Lyons, P., Flynn, M., Galvin, P., Neylon, M., Jankowska, K., 2007. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Vet. Rec.* 161, 647-652.
11. Cupp, E.W., Kemen, M.J., 1980. The role of stable flies and mosquitoes in the transmission of equine infectious anemia virus. *Proc. Annu. Meet. U S Anim. Health Assoc.* 84, 362-367.
12. Foil, L.D., Meek, C.L., Adams, W.V., Issel, C.J., 1983. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Am. J. Vet. Res.* 44, 155-156.
13. Foil, L.D., Adams, W.V., McManus, J.M., Issel, C.J., 1987. Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *J. Med. Entomol.* 24, 613-616.
14. Forletta R., Vulcano G. e Aleandri M. Sul controllo dell'Anemia Infettiva degli Equini nel Lazio ed in Toscana dal 1984 al 1988. *Atti della Società delle Scienze Veterinarie* 1974; vol. XLII (Mantova, 29 Settembre-1 Ottobre 1988).
15. Garbarino C., Barigazzi G., Foni E., Ricci I., Forletta R., Cresci L., Capitelli C., Cavalca M. e Calzolari M. Un recente focolaio di Anemia Infettiva Equina in provincia di Parma: un'occasione per alcune considerazioni sulla malattia. *Il Progresso Veterinario.* Anno LXI n°9, pp. 406-408.
16. GU n. 66 del 21/3/2005 Comunicato relative alle metodologie diagnostiche per le malattie degli equidi riproduttori maschi ai fini della disciplina della riproduzione animale.
17. Harrold, S.M., Cook, S.J., Cook, R.F., Rushlow, K.E., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2000. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J. Virol.* 74, 3112-3121.

18. Issel, C.J., Coggins, L., 1979. Equine infectious anemia: current knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 727-733.
19. Issel, C.J., Adams, W.V.J., Meek, L., Ochoa, R., 1982. Transmission of equine infectious anemia virus from horses without clinical signs of disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 272-275.
20. Issel, C.J., Foil, L.D., 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 293-297.
21. Issel, C.J., Rushlow, K., Foil, L.D., Montelaro R.C., 1988. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *Vet. Microbiol.* 17, 251-286.
22. Issel, C.J., Cook, R.F., 1993. A review of techniques for serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 137-141.
23. Kemen, M.J.Jr., Coggins, L., 1972. Equine infectious anaemia: Transmission from infected mares to foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 161, 496-499.
24. Langemeier, J.L., Cook, S.J., Cook, R.F., Rushlow, K.E., Montelaro, R.C., Issel, C.J. 1996. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1481-1487.
25. Leroux, C., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 1997. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J. Virol.* 71, 9627-9639.
26. Leroux, C., Cadore, J.L., Montelaro, R.C., 2004. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 35, 485-512.
27. Lichtenstein, D.L., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 1996. Genomic quasispecies associated with the initiation of infection and disease in ponies experimentally infected with equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 70, 3346-3354
28. Ligné, M., 1843. Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydroémie, cachexie acquise du cheval. *Rec. Med. Vet.* 20, 30-44.
29. Maury, W., 1994. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 68, 6270-6279.
30. McConnell, S., Katada, M., 1981. Transmission of equine infectious anaemia virus from a horse negative to agar gel immunodiffusion testing. *Equine Vet. J.* 13, 123-126.
31. Montelaro, R.C., Parekh, B., Orrego, A., Issel, C.J., 1984. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J. Biol. Chem.* 259, 10539-10544.
32. OIE Terrestrial Manual, Equine Infectious Anemia. Chapter 2.5.6 2008.

33. Progetto di ricerca corrente: "Organizzazione di un sistema di sorveglianza nazionale epidemiologico e molecolare per il controllo dell'infezione da virus dell'anemia infettiva equina" (IZS LT 02/03 RC).
34. Progetto di ricerca corrente: "Standardizzazione di metodiche molecolari innovative per la diagnosi diretta qualitativa e quantitativa di Anemia Infettiva Equina" (IZS LT 09/06 RC).
35. Quinlivan, M., Cook, R.F., Cullinane, A., 2007. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia based on gag gene sequence determination. *Vet. Rec.* 160, 611-618.
36. Ramachandran, S., Sakkubai, P.R., 1989. Transmission in equine infectious anemia: current insights. *Centaur.* VI, 1-5.
37. Ricci, I., Ricci E., Pistello M. e Forletta R. Sviluppo e applicazione di metodiche molecolari nella diagnosi dell'Anemia Infettiva Equina. III Workshop nazionale di virologia veterinaria. Valenzano (Bari), 11-12 giugno 2009. *Atti*, p.86.
38. Ricci E., Ricci I., Gasperetti L., Isola P., Chiuppesi F., Ceccherini Nelli L., Pistello M., Forletta R. Development of rapid and sensitive molecular assays to detect and quantitate the equine infectious anemia virus genome in horse plasma transfusion bags. *Submitted*.
39. Sala M., Ricci I., Scaramozzino P. e Forletta R. Studio trasversale di sieroprevalenza dell'Anemia Infettiva Equina in Italia nel 2007. IV Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria. Roma, 11-12 dicembre 2008. *Atti*; p.23.
40. Salinovich, O., Payne, S.L., Montelaro, R.C., Hussain, K.A., Issel, C.J., Schnorr, K.L., 1986. Rapid emergence of novel antigenic and genetic variants of equine infectious anemia virus during persistent infection. *J. Virol.* 57, 71-80.
41. Sellon, D.C., Perry, S.T., Coggins, L., Fuller, F.J., 1992. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J. Virol.* 66, 5906-5913.
42. Sellon, D.C., Walker, K.M., Russell, K.E., Perry, S.T., Covington, P., Fuller, F.J., 1996. Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. *J. Virol.* 70, 590-594.
43. Shane, B.S., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 19, 351-355.
44. Suzuki, T., Ueda, S., Samejima, T., 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia. *Vet. Microbiol.* 7, 307-316.
45. Vallée, H., Carré, H., 1904. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. *Acad. Sci.* 139, 331-333.
46. Williams, D.L, Issel, C.J, Steelman, C.D, Adams, W.V.Jr., Benton, C.V., 1981. Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of

virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1469-73.

47. Zhang, B., Jin, S., Jin, J., Li, F. & Montelaro, R. C., 2005. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 9918–9923.

VALUTAZIONE DI UN NUOVO PROTOCOLLO DI SCREENING NELL'ATTUAZIONE DEL PIANO DI SORVEGLIANZA NAZIONALE E VERIFICA DELLA CONCORDANZA FRA METODICHE DISPONIBILI.

Sono stati quindi distribuiti la procedura ed i reagenti per l'esecuzione del test come metodo di screening ai laboratori degli II.ZZ.SS. nell'ambito del PNS del territorio di competenza, in particolare quelli operanti nelle aree a maggior prevalenza di AIE.

I campioni positivi sono stati sottoposti a conferma mediante immunodiffusione in gel di agar (AGID) ed immunoblotting (IB), valutandone la rispettiva sensibilità relativa.

I dati che si presentano si riferiscono al periodo 2007-2010 ed all'attività analitica condotta nel Lazio, regione in cui il sistema diagnostico su tre livelli è stato adottato sistematicamente nella maggior parte delle province dall'inizio della sorveglianza pianificata.

Nel periodo considerato sono stati controllati complessivamente 96.468 campioni sia in AGID che con il metodo C-ELISA competitivo per le cui caratteristiche si rimanda all'allegato 1.

Risultati

Fra il 2007 ed il 2010, dei 923.299 campioni controllati in Italia nel corso della sorveglianza per AIE, 96.468 sono stati esaminati utilizzando il test C-ELISA come metodo di screening. Fra questi, 331 sono risultati positivi, ma solo 124 potevano essere interpretati e confermati come tali con il metodo AGID.

I 207 campioni C-ELISA positivi/AGID negativi sono stati quindi successivamente controllati mediante IB. Di questi 207 campioni, 25 sono stati interpretati come IB positivi in quanto reattivi nei confronti delle tre principali proteine strutturali (p26, gp45 3 gp90) dimostrando pertanto l'esposizione dei soggetti al virus. Dei rimanenti 182, la maggior parte erano negativi in IB (146), mentre il 20% (36) erano reattivi per la sola proteina p 26. Pertanto la proporzione dei positivi in elisa sui 96.468 campioni testati è pari allo 0,037 per cento.

Su 22 dei 25 soggetti rilevati come positivi attraverso l'integrazione dei metodi sierologici è stato possibile effettuare successive indagini che hanno messo in evidenza che 17 di questi (77%) erano stati esposti a fattori di rischio quali la presenza di precedenti casi di AIE nelle aziende di origine.

Pertanto, l'evidenza sierologica dell'infezione rilevata attraverso l'impiego integrato dei metodi è risultata superiore di circa il 17 per cento (25/149) di quanto sarebbe stata impiegando la sola immunodiffusione la cui quota di falsi negativi sull'intera popolazione di 96.468 soggetti campionati è pari allo 0,026 per cento.

Solo il 12% dei campioni ELISA-positivi, risultati AGIDT negativi erano comunque confermati come positivi in immunoblot. Ciò significa che, secondo una differente prospettiva, la percentuale degli ELISA falsi positivi è pari allo 0,19 per cento (182/96.468).

Discussione

A seguito della descrizione e della validazione dell'AGIDT il suo impiego nella diagnosi dell'AIE è stato favorevolmente accolto e raccomandato dalla comunità scientifica.

Dagli anni '80 sono stati messi a punto numerosi kit ELISA che hanno trovato un largo impiego. Tuttavia, l'AGID è ancora oggi considerato il gold standard per la diagnosi sierologia dell'AIE in quanto strettamente correlato al test di inoculazione sperimentale e per le sue caratteristiche di accuratezza, essendo estremamente rara la frequenza di falsi positivi.

Di conseguenza, ogni tentativo di modificare tale assunto è stato nel tempo valutato con scetticismo, in considerazione del successo ottenuto dall'AGID da parte delle autorità dei diversi paesi.

I dati ottenuti, assieme ad altre evidenze virologiche (allegato veterinari record), indicano la crescente necessità di impiegare l'ELISA sia per motivi strettamente connessi alla maggiore sensibilità che per limitare l'occorrenza dell'errore umano nell'interpretazione dei risultati.

Come anche dimostrato dal lavoro svolto di comparazione dei kit ELISA commerciali di cui al capitolo precedente, i risultati di tutti sono in linea con quelli dell'AGIDT.

In questo studio l'attenzione è stata concentrata sui campioni reattivi/positivi in ELISA ma negativi/equivoci in AGID. In questi casi l'impiego di un test maggiormente sensibile e specifico quale l'IB risulta di importanza fondamentale per chiarire l'effettivo stato sanitario degli equidi nei confronti dell'infezione.

E' inoltre stato osservato che nei casi in cui la maggior parte degli equidi che risultano reattivi/positivi a più di un kit ELISA, interpretati negativi in AGID, sono quindi controllati in immunoblot, i campioni reagiscono positivamente nei confronti di entrambe le glicoproteine dell'envelope di AIEV.

Tuttavia, si possono osservare simili reazioni in ELISA in presenza di sieri di equini che riconoscono solo la p26 e tali reazioni aspecifiche possono essere riconosciute solo alla successiva verifica in IB.

Fortunatamente, come dimostrato, la percentuale di equidi che presentano questo tipo di reazione risulta essere piuttosto modesta e potrebbe essere messa in relazione a cross-reattività nei confronti di comuni determinanti antigenici di altri lentivirus correlati, come già dimostrato fra AIEV e HIV (Montagnier et al. 1984, Egberink et al. 1990, Grund et al. 1994).

In conclusione, i dati a disposizione indicano che un certo numero di equidi infetti con anticorpi per le tre principali proteine di AIE possono non essere rilevati quando controllati unicamente con l'AGID. La percentuale di questi non è ancora ben nota, tuttavia, sulla base delle nostre osservazioni che comunque tengono conto di un rilevante numero di controlli, si può stimare che circa il 20% dei soggetti infetti da AIE possa sfuggire al controllo.

Se l'obiettivo dei programmi di controllo è quello di rilevare tutti gli equidi infetti attraverso l'impiego di test sierologici, lo sforzo degli organismi ufficiali dovrebbe essere quello di aumentare la sensibilità attraverso il sistematico impiego di dei test ELISA nelle fasi di screening.

Sulla base del complesso delle attività condotte, consideriamo che l'affidabilità della sierologia costituisca ancora oggi il migliore approccio per il controllo dell'AIE in quanto le ricerche virologiche, o comunque del genoma virale, non sono oggi in grado di fornire risultati altrettanto accurati ed affidabili, considerata l'estrema variabilità sia delle concentrazioni virali in corso della vita degli animali infetti e, nondimeno, dell'estrema diversità genetica che si osserva fra gli stipiti circolanti.

Pertanto, nella consapevolezza che eventi stressanti possono provocare, nel breve periodo, anche consistenti aumenti dei titoli virali circolanti e non avendo la possibilità di monitorare accuratamente e nel tempo la replicazione virale in tutti i soggetti positivi, i programmi di controllo devono par-

tire dall'assunto, scientificamente corretto e difendibile, rispetto al quale tutti gli equidi infetti costituiscono un potenziale rischio ai fini della trasmissione dell'AIE.

WP2 - Studio dei principali fattori di rischio nei cluster geografici di infezione

Ai fini dello studio è stata realizzata una scheda strutturata (allegato 4) per la raccolta di informazioni relative all'anamnesi aziendale in funzione della quantificazione dei possibili fattori di rischio per AIE.

La scheda, da somministrare in focolai accertati nel corso delle attività di sorveglianza, si compone di una prima parte per la raccolta dei dati identificativi anagrafici ed include anche la descrizione della tipologia di allevamento, secondo le definizioni già presenti in Banca Dati Nazionale, nonché l'adozione di provvedimenti a seguito di notifica.

Seguono quindi tre sezioni ai fini della raccolta dei dati relativi a:

I. STATO SANITARIO DELL'AZIENDA, prima del rilievo del focolaio rispetto all'AIE, quindi se già controllata in precedenza, periodo dell'ultimo controllo e se accertate precedenti positività;

II. ANAMNESI AZIENDALE, in riferimento all'osservazione di sintomatologia riferibile ad AIE nel periodo successivo all'ultimo controllo sierologico negativo ed alla tipologia di segni clinici presenti, al periodo dell'anno nel quale si fossero verificati ed al numero di soggetti, per categoria, interessati;

III. CENSIMENTO, riferito sia al numero di equidi presenti suddiviso per specie e categoria, sia ad altre specie animali allevate. Per quanto concerne le CARATTERISTICHE DELL'AZIENDA, sono state considerate: UBICAZIONE, se urbana o rurale; TIPOLOGIA DEL TERRITORIO, riferita alla località presso cui sono mantenuti e, se differente, svolgono l'attività/lavoro gli equidi; presenza/assenza di altri insediamenti di equidi nel raggio di 500 metri; utilizzo e periodo dell'anno del pascolo; Tipo di lavoro svolto in caso di aziende registrate con tale attitudine, eventuale promiscuità con equidi di altra origine e località e periodo di svolgimento di attività nell'ultimo anno; VETTORI, presenza/assenza nell'ultima stagione estiva con valutazione circa l'abbondanza e le specie osservate, con verifica circa eventuali trattamenti specifici;

IV. MISURE DI BIOSICUREZZA AZIENDALI, con particolare riguardo all'adozione di misure sanitarie relative a quarantena degli animali di nuova introduzione; verifica dello stato sanitario nei confronti dell'AIE sugli stessi, prima dell'immissione nel gruppo di allevamento; interventi terapeutici e profilattici sugli animali, se effettuati e se sì, da chi (veterinario/proprietario); impiego di dispositivi monouso in caso di terapia e sostituzione tra un equide ed il successivo; pratica di trattamenti antiparassitari se per via orale o per inoculazione e loro frequenza; effettuazione di trasfusioni o impiego di emoderivati; cambio e/o sterilizzazione degli strumenti chirurgici e di mascalcia prima di un loro successivo riutilizzo; tipologia di fecondazione se artificiale o naturale (nella seconda fattispecie se con stallone di proprietà o presso stazioni di monta pubblica); modalità di smaltimento delle deiezioni;

V. RESIDENZIALITÀ DEGLI EQUIDI (*tutti i soggetti*), con particolare riferimento al periodo temporale delle movimentazioni, al motivo delle stesse, alla loro frequenza, alla stagione dell'anno in cui queste avvengono più frequentemente ed alle località verso cui i soggetti dell'azienda sono stati movimentati;

VI. MOVIMENTAZIONI DEGLI EQUIDI in entrata (*tutti i soggetti*), con indicazione dell'introduzione definitiva successiva all'ultima prova sierologia effettuata in azienda, se da altri allevamenti o fiere/mercati con indicazione dei luoghi di origine.

Nel corso del periodo della ricerca il questionario è stato somministrato in via sperimentale presso un numero limitato di aziende focolaio. Dopo revisione dello stesso ed eliminazione di quesiti ridondanti o che potessero costituire un fattore di confondimento, il suo impiego è stato esteso da parte delle UUOO 2, 3, 5, 7, 8, 9 ed 11 a 62 aziende con soggetti positivi di differenti categorie situate in 12 regioni.

REGIONE	PROVINCIA	Totale
ABRUZZO	AQ	2
CALABRIA	KR	1
CAMPANIA	AV	1
	BN	1
	CE	5
	NA	2
	SA	2
EMILIA ROMAGNA	BO	2
	FO	1
FRIULI	UD	1
LAZIO	FR	1
	RI	11
	RM	5
	VT	2
LIGURIA	GE	14
	IM	1
MOLISE	CB	1
PIEMONTE	AL	1
	TO	1
PUGLIA	BT	1
	FG	2
TOSCANA	LU	1
	PT	1
VENETO	VR	2
Totale		62

Questa attività costituirà la base per la realizzazione, a partire dal 2013, di uno studio caso-controllo confrontando i dati dei focolai con quelli che saranno raccolti in un numero almeno doppio di allevamenti negativi scelti secondo criteri di casualità.

ANALISI DEI RISULTATI DELL'ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA CONDOTTA NEL PERIODO 2007 – 2011 NELL'AMBITO DEI PIANI DI CONTROLLO DELL'AIE (allegato 5)

Le attività di controllo svolte in Italia nel periodo 2007- 2011 sono state svolte in ottemperanza alle specifiche OOMM 14 novembre 2006, 18 dicembre 2007, ed 8 agosto 2010 e si riferiscono all'attività di diagnostica indiretta (esami sierologici) condotta dai 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali su campioni prelevati nelle rispettive Regioni di competenza.

I risultati sono riportati in base ai campioni testati, risultando inattuabile, a livello nazionale, poter identificare con certezza i singoli equidi analizzati sulla base dell'identificazione univoca (microchip-N° passaporto).

Complessivamente, nel periodo 2007-2011, gli Istituti Zooprofilattici hanno analizzato 1.141.643 campioni di equidi, mentre i campioni sottoposti a conferma presso il CRAIE e risultati positivi sono 2.255.

Analisi di campioni della specie “cavallo”

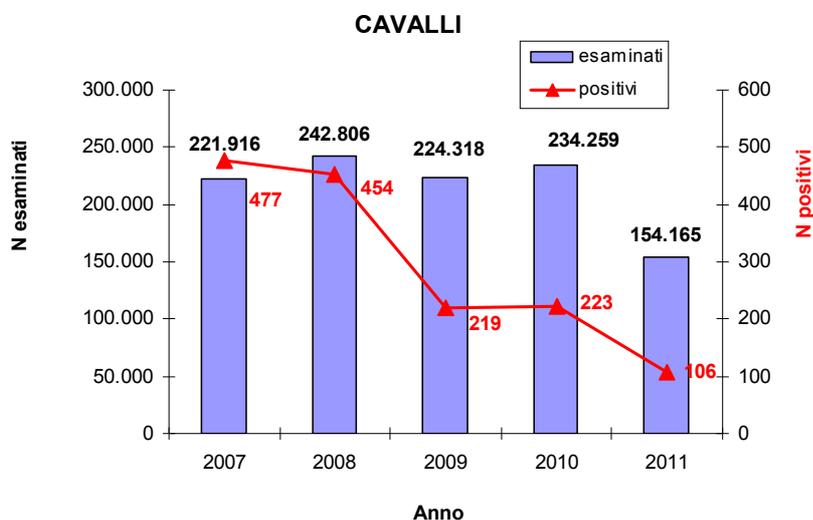
Nel periodo 2007-2011 sono stati analizzati 1.077.464 campioni appartenenti alla specie cavallo, 1.479 dei quali confermati positivi dal CRAIE (0,14%) (tabella 1 e figura 1)

Tabella 1: specie cavallo - campioni ematici analizzati e positivi per regione di provenienza

Regione	2007		2008		2009		2010		2011	
	testati	positivi								
ABRUZZO	7.867	228	8.994	205	7.618	62	9.427	55	11.152	46
BASILICATA	2.195	6	2.705	4	3.279	4	3.622	7	2.057	1
CALABRIA	1.258	4	1.100	2	2.275	2	2.136	1	1.693	2
CAMPANIA	9.356	7	8.752	12	8.903	5	10.620	15	5.067	6
EMILIA-ROMAGNA	14.083	13	28.221	6	21.462	0	21.874	5	7.927	1
FRIULI-VG	2.147	2	2.164	1	2.227	1	2.595	3	1.322	0
LAZIO	28.337	95	30.940	151	31.625	76	34.757	31	30.807	22
LIGURIA	4.496	0	5.054	0	5.098	0	6.264	55	3.949	0
LOMBARDIA	43.781	8	41.223	3	35.347	1	32.943	0	23.186	2
MARCHE	7.450	9	7.183	2	7.370	1	6.783	3	2.832	0
MOLISE	1.453	15	2.676	17	2.651	26	2.988	7	3.177	4
PIEMONTE	24.319	2	29.430	2	26.162	0	25.998	1	14.597	0
PUGLIA	8.059	17	8.048	6	7.308	13	8.169	21	5.922	5
SARDEGNA	5.595	0	5.831	4	4.936	0	5.455	0	3.881	0
SICILIA	*	0	10.982	4	12.327	1	15.144	8	7.620	0
TOSCANA	34.153	47	28.901	13	23.939	1	22.961	3	10.704	4
TRENT-A. ADIGE	7.312	1	2.926	0	2.920	2	2.638	0	1.377	0
UMBRIA	6.192	12	7.179	17	10.503	13	11.654	5	11.738	9
VALLE D'AOSTA	408	0	524	0	521	0	510	0	210	0
VENETO	13.455	11	9.973	5	7.847	11	7.721	3	4.947	4
TOTALE	221.916	477	242.806	454	224.318	219	234.259	223	154.165	106

*per il 2007 non sono pervenuti campioni dalla Sicilia

Figura 1: specie cavallo - campioni ematici analizzati e positivi nel periodo 2007-2011



E' evidente nel corso del 2011 una riduzione del numero di equidi sottoposti a controllo, determinata dal diradamento delle attività di sorveglianza disposto nelle regioni e province autonome a bassa incidenza (Piemonte, Liguria, Valle D'Aosta, Lombardia, Emilia Romagna, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Trentino Alto Adige, Toscana, Marche, Puglia, Sardegna e Sicilia). La prevalenza grezza di campioni positivi nel periodo passa da 0,21% (IC95% 0,19-0,23) nel 2007 a 0,07% (IC95% 0,04-0,13) nel 2011.

La figura 2 rappresenta l'andamento della prevalenza di campioni positivi, con una tendenza alla progressiva e significativa diminuzione (chi square for linear trends: 220,7; p=0,00000).

Si sottolinea che il reale abbattimento delle prevalenza per AIE nei cavalli si riferisce all'anno 2009 rispetto al biennio precedente. Nel successivo biennio la sieroprevalenza rimane sostanzialmente costante e risulta comunque tale da rappresentare, nel dato cumulato nazionale, uno stato di apparente infezione sporadica.

Figura 2: specie cavallo - prevalenza annuale di campioni ematici positivi confermati dal CRAIE nel periodo 2007-2011

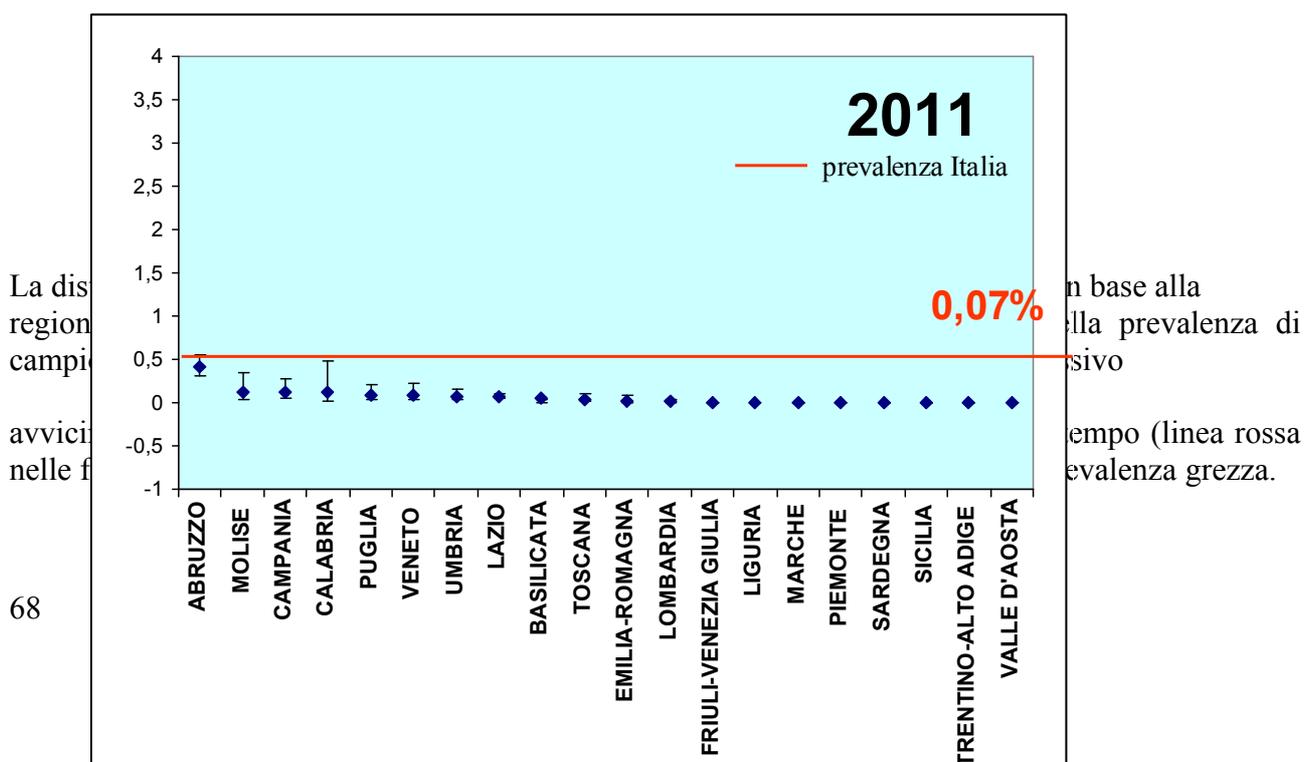
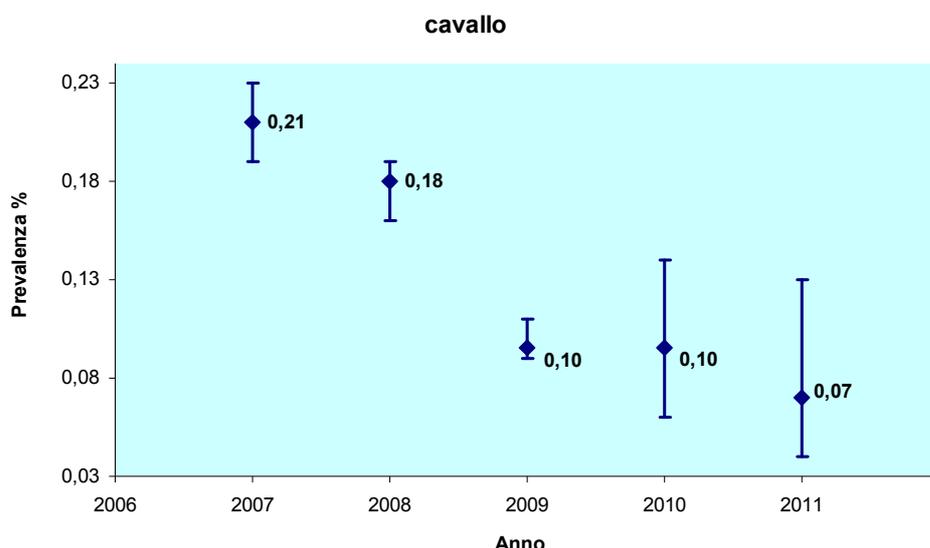


Figura 3: specie cavallo – prevalenza di campioni positivi confermati dal CRAIE in base alla regione – anno 2011

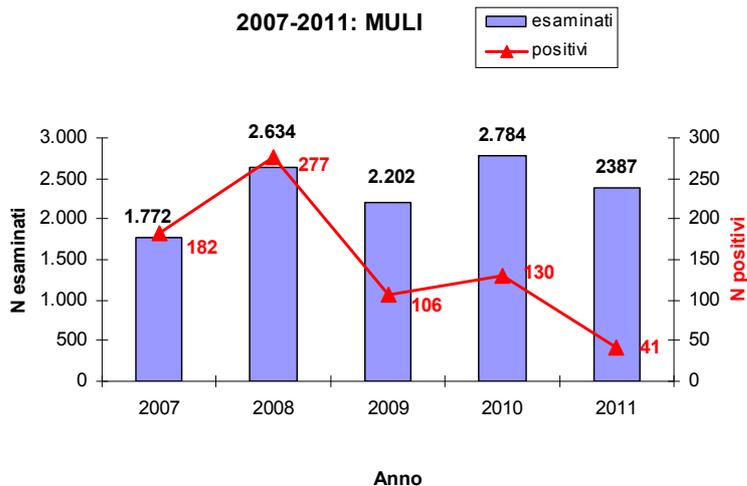
Analisi di campioni dell'ibrido "mulo"

Nel periodo 2007-2011 sono stati analizzati 11.789 campioni di mulo, 736 dei quali confermati positivi dal CRAIE (6,2%). (tabella 2 e figura 8)

Tabella 2: specie mulo - campioni analizzati e positivi confermati per regione di provenienza

Regione	2007		2008		2009		2010		2011	
	testati	positivi	testati	positivi	testati	positivi	testati	positivi	testati	positivi
ABRUZZO	656	96	674	119	490	29	588	68	667	17
BASILICATA	16	0	13	0	18	0	21	0	16	0
CALABRIA	0	0	0	0	0	0	1	0	8	0
CAMPANIA	117	3	50	11	77	1	74	4	39	6
EMILIA-ROMAGNA	16	3	14	0	28	0	14	0	25	0
FRIULI-VG	0	0	1	0	5	3	7	5	3	0
LAZIO	307	46	981	113	644	60	1.004	27	739	8
LIGURIA	11	0	35	0	55	0	124	4	104	0
LOMBARDIA	63	0	62	0	45	0	51	0	26	0
MARCHE	216	21	222	13	210	2	170	5	136	1
MOLISE	20	0	10	0	7	0	21	2	27	0
PIEMONTE	84	0	130	0	88	1	174	1	162	1
PUGLIA	19	0	25	0	36	2	39	3	42	1
SARDEGNA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SICILIA	*		1	0	0	0	0	0	20	0
TOSCANA								1	66	2
TRENT-A. ADIGE								0	1	0
UMBRIA								10	294	5
VALLE D'AOSTA								0	0	0
VENETO								0	12	0
TOTALE							130	2.387	41	

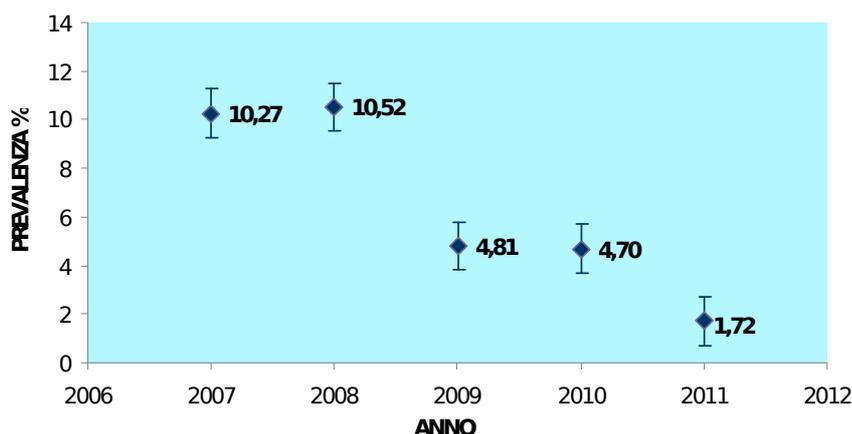
Figura 4: specie



La prevalenza di campioni positivi nel periodo passa da 10,27% (IC95% 8,8-11,7) nel 2007 a 1,7% (IC95% 1,3-2,4) nel 2011.

La figura 9 rappresenta l'andamento della prevalenza di campioni positivi, con una evidente tendenza alla progressiva e significativa diminuzione (chi square for linear trends: 203,4; $p=0,00000$).

Figura 5: specie mulo - prevalenza annuale di campioni positivi nel periodo 2007-2011



La distribuzione annuale delle prevalenze di campioni positivi di muli per AIE in base alla regione di provenienza conferma quanto osservato nella specie cavallo circa l'evidente concentrazione delle positività nelle regioni dell'Italia Centrale.

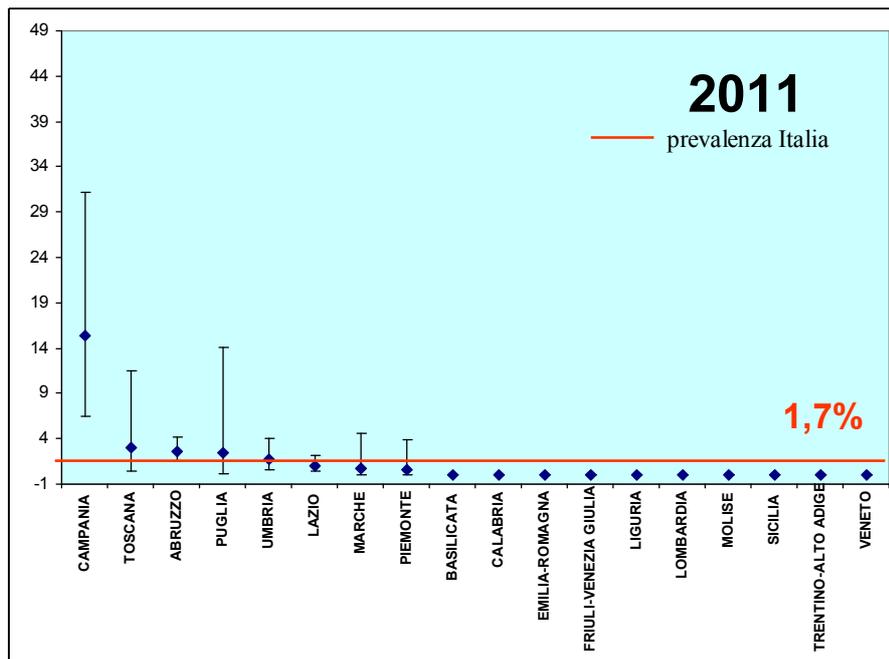
Si sottolinea il dato della Campania caratterizzato da una notevole riduzione (circa 50%) del numero di muli testati rispetto agli anni precedenti a fronte di 6 positivi confermati.

Nel complesso, si osserva una progressiva tendenza alla riduzione della prevalenza di campioni positivi nel periodo 2007-2011, con due punti di flessione significativa:

- tra 2008 e 2009 (Chi Square Yates corrected $\chi^2=2,7$; $p<0,00000$)
- tra 2010 e 2011 (Chi Square Yates corrected $\chi^2=1,8$; $p<0,00000$)

Il drastico abbattimento della prevalenza osservato nei 2 punti di flessione rappresenta un risultato importante delle misure di controllo messe in atto nei focolai di AIE nei 5 anni di attuazione del Piano di controllo.

Figura 6: ibrido mulo – prevalenza di campioni positivi in base alla regione – anno 2011



Nessun mulo testato in Valle D'Aosta e Sardegna nel 2011.

Analisi di campioni della specie “Asino”

Nel periodo 2007-2011 sono stati analizzati 52.390 campioni appartenenti alla specie asino, 35 dei quali confermati positivi dal CRAIE (0,07%). (tabella 3 e figura 7)

Tabella 3: specie asino - campioni ematici analizzati e positivi confermati

Regione	2007		2008		2009		2010		2011	
	testati	positivi								
ABRUZZO	256	1	310	5	354	2	517	5	496	0
BASILICATA	169	0	89	0	231	0	262	0	180	0
CALABRIA	15	0	0	0	34	0	59	0	181	0
CAMPANIA	101	0	124	0	111	0	177	1	165	0
EMILIA-ROMAGNA	324	1	391	1	799	0	1.486	0	783	0
FRIULI-VG	23	0	22	0	125	0	223	0	171	0
LAZIO	1.106	0	1.039	3	1.140	1	1.573	1	1.712	1
LIGURIA	178	0	144	0	556	0	704	7	675	0
LOMBARDIA	2.162	1	0	0	1.878	0	1.523	0	667	0
MARCHE	339	0	300	0	582	0	590	0	349	0
MOLISE	28	0	23	0	51	0	55	0	84	0
PIEMONTE	1.548	0	965	0	2.530	0	3.357	0	2.028	0
PUGLIA	231	0	169	0	467	0	421	0	475	0
SARDEGNA	150	0	17	0	85	0	151	0	231	0
SICILIA	169	0	169	0	379	0	303	1	253	0
TOSCANA	1.724	1	1.162	0	682	0	996	0	904	0
TRENT-A. ADIGE	246	0	14	0	113	0	149	1	103	0
UMBRIA	218	0	372	0	809	1	1.119	0	1.217	1
VALLE D'AOSTA	13	0	22	0	23	0	88	0	46	0
TOTALE	9.376	4	5.463	9	11.532	4	14.695	16	11.324	2

nel 2007 non sono pervenuti campioni dalla Sicilia

Figura 7: specie asino - campioni ematici analizzati e positivi confermati dal CRAIE nel periodo

2007-2011

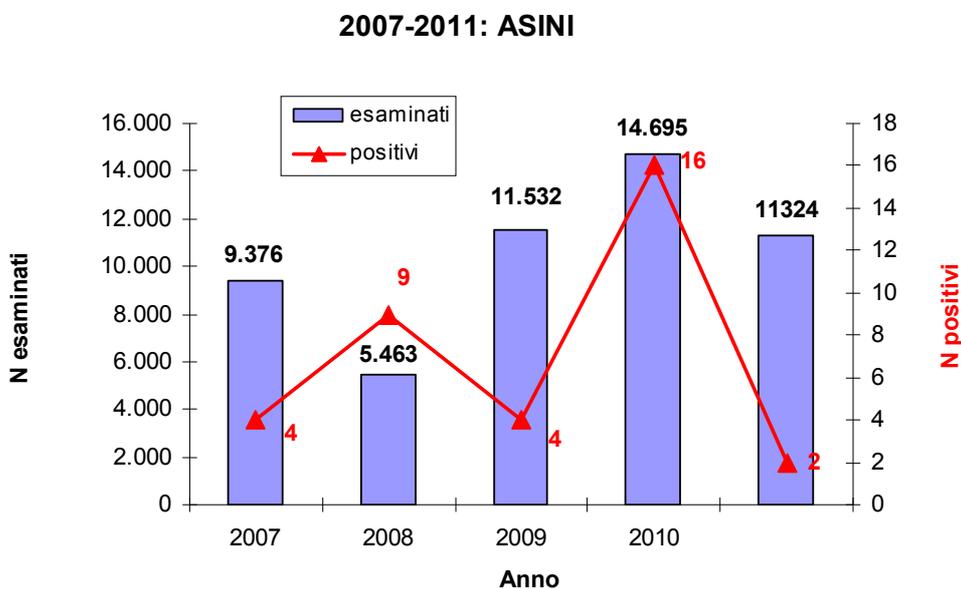
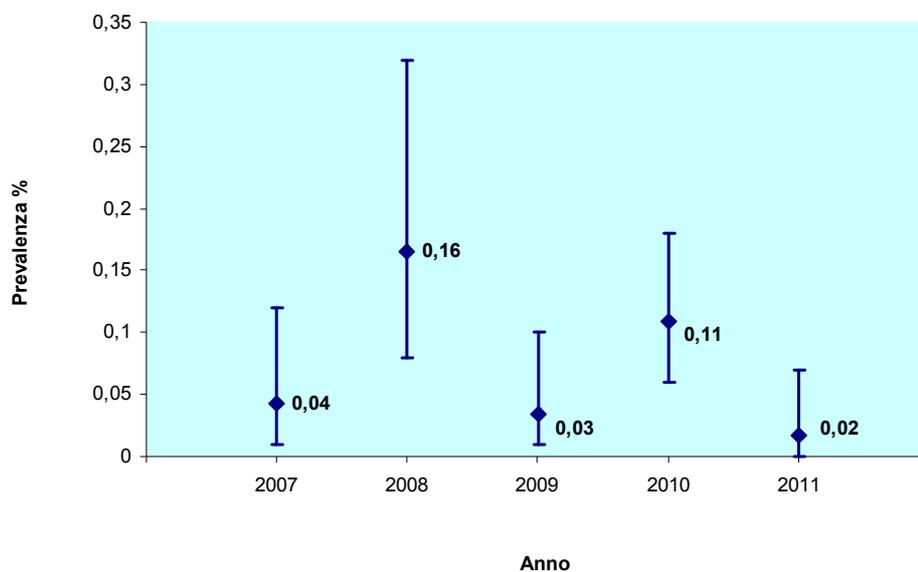


Figura 8: specie asino - prevalenza annuale di campioni positivi periodo 2007-2011



Si rileva che la numerosità di campioni analizzati su base annuale è assai variabile con un numero minimo di test eseguiti nel 2008 (N=5.463) ed un picco nel 2010 (N=14.695).

Tale dato suggerisce una diversa intensità di prelievo sui capi della specie asino nel quadriennio ed un verosimile mancato raggiungimento del 100% dei controlli sulla popolazione reale in uno o più anni di sorveglianza. La disomogeneità dei denominatori (numero di campioni testati per anno) potrebbe aver quindi determinato distorsioni nella stima delle prevalenze annuali di campioni positivi.

Tuttavia, il numero di casi individuati su base annuale suggerisce una incidenza sporadica dell'infezione nella specie ASINO

Un confronto del rischio per AIE tra Cavalli e Muli

Nel corso del quinquennio 2007-2011 la prevalenza cumulativa di campioni positivi per i muli (6,3%) è risultata decisamente più elevata rispetto ai campioni esaminati della specie cavallo (0,14%).

Utilizzando i dati relativi ai controlli svolti nel periodo di studio, è stato stimato il rischio per AIE in funzione della specie di appartenenza dei campioni.

Sulla base delle prevalenze di campioni positivi per AIE osservate nelle 2 specie, è stata “misurata” l’eccedenza di rischio di risultare positivi per AIE dei muli rispetto ai cavalli.

Tale verifica è stata effettuata per ogni annualità mediante calcolo dell’ Odds Ratio – O.R. ponendo come riferimento i dati (N° positivi e N° analizzati) relativi ai cavalli rispetto ai muli.

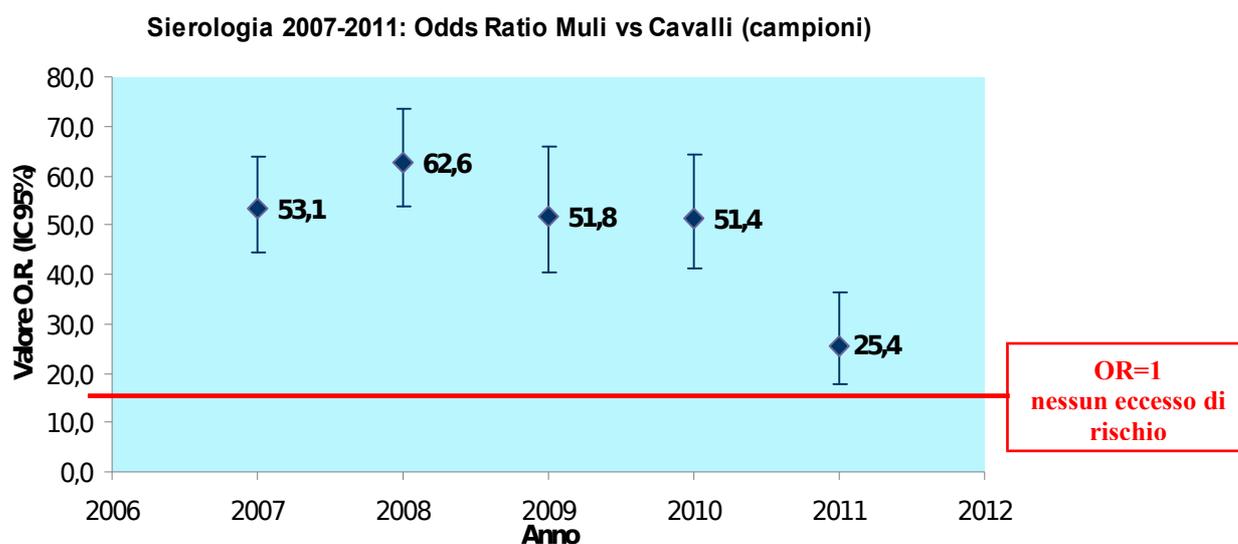
In tabella 4 si riporta la sintesi dei campioni negativi e positivi confermati nel quadriennio per i muli ed i cavalli e calcolo di O.R. (stima del rischio per i muli rispetto ai cavalli).

In figura 9 sono riportate le OR calcolate per ogni anno di riferimento.

Tabella 4: campioni ematici negativi, positivi confermati dal CRAIE e prevalenza in base a specie nel periodo 2007-2011 – OR (IC95%) mulo rispetto a cavallo per ogni annualità 2007-2011

		campioni		prevalenza %	O.R.	IC 95%	
		positivi	negativi			limite inf.	limite sup.
2007	cavallo	477	221.439	0,21	baseline		
	mulo	182	1.590	10,27	53,14*	44,31	63,71
2008	cavallo	454	242.352	0,18	baseline		
	mulo	277	2.357	10,52	62,64*	53,57	73,46
2009	cavallo	219	224.099	0,10	baseline		
	mulo	106	2.096	7,38	51,75*	40,59	65,94
2010	cavallo	223	234.036	0,10	baseline		
	mulo	130	2.654	4,81	51,41*	41,02	64,4
2011	cavallo	106	154.059	0,07	baseline		
	mulo	41	2.346	1,72	25,4	17,7	36,5

Figura 9



Per ogni annualità, i campioni della specie mulo hanno mostrato un rischio significativamente più elevato di risultare positivi per AIE rispetto ai campioni della specie cavallo, subendo tuttavia una riduzione nel corso del 2011.

Nonostante le prevalenze osservate per i campioni di entrambe le specie mostrino un trend significativo di riduzione nel corso del quadriennio (figure 2 e 8), il notevole eccesso di rischio per AIE nei muli si mantiene nell'intero periodo di osservazione.

Si conferma, inoltre, una prevalenza di campioni positivi nella specie mulo decisamente più elevata rispetto a quanto osservato nella specie cavallo e comunque tale da rendere necessario il mantenimento delle misure di controllo attualmente in atto. Ciò al fine di determinare una

ulteriore riduzione dell'incidenza dell'infezione in questa specie e rimuovere il possibile rischio di persistenza della stessa a livelli endemici.

I muli testati infatti sono afferenti ad aziende con orientamento produttivo da lavoro, e gestite in ambiente rurale con scarsi, se non nulli criteri di biosicurezza, ossia nelle condizioni migliori per il mantenimento di livelli di trasmissione virale che potrebbero determinare la persistenza di serbatoi di infezione.

Aziende con Equidi sottoposte a controllo nel 2011 e conteggio dei focolai

Viene rappresentato in tabella 5 il dettaglio delle aziende controllate nel 2011 in funzione delle specie testate nella singola azienda. Il numero complessivo di aziende testate rappresenta quindi il numero reale di strutture sottoposte a controllo nel 2011.

Tabella 5.

REGIONE	N° aziende Monospecie			N° aziende Miste			Totale aziende
	Solo Asino	Solo Cavallo	Solo Mulo	Asino e Cavallo	Mulo e Cavallo	Altre combinazioni	
ABRUZZO	110	2.080	54	92	99	11	2.446
BASILICATA	37	708	3	32	3	1	784
CALABRIA	21	515	4	29		0	569
CAMPANIA	20	1.100	1	38	5	1	1.165
EMILIA ROMAGNA	197	1.810	4	75	6	0	2.092
FRIULI-VENEZIA GIULIA	25	265		50	1	0	341
LAZIO	242	5.084	37	306	156	23	5.848
LIGURIA	199	804	9	102	33	11	1.158
LOMBARDIA	61	3.374	4	290	12	8	3.749
MARCHE	82	755	8	63	27	2	937
MOLISE	18	869	4	19	9	1	920
PIEMONTE	477	2.561	46	323	37	34	3.478
PUGLIA	34	1.276	6	95	17	2	1.430
SARDEGNA	30	1.535		26		0	1.591
SICILIA	20	2.273	3	59	12	4	2.371
TOSCANA	169	2.132	5	168	21	4	2.499
TRENTINO-ALTO ADIGE	28	447	1	45		0	521
UMBRIA	203	2.526	12	231	66	13	3.051
VALLE D'AOSTA	21	56		8		1	86
VENETO	96	1.181		240	5	3	1.525
Totale aziende	2.090	31.351	201	2.291	509	119	36.561

Nella tabella 6 si riporta la numero di strutture sottoposte a controllo per AIE nel 2011. I conteggi relativi alle aziende testate sono stati estratti dal Database della sorveglianza 2011 e si riferiscono alle strutture con almeno 1 equide controllato nel 2011, indipendentemente dalla specie.

Si riporta il numero complessivo di aziende con almeno 1 equide positivo confermato nel 2011 (casi prevalenti) ed il numero di aziende risultate positive per la prima volta dal 2007 (casi incidenti). La valutazione rispetto all'incidenza è stata operata verificando la presenza delle aziende confermate nel 2011 nell'elenco storico delle aziende positive .

Tabella 6.

REGIONE	N°aziende controllate	N° Aziende Positive confermate	di cui N° Focolai incidenti	% prevalenza	% incidenza
ABRUZZO	2.446	37	25	1,51	1,02
BASILICATA*	784	1	1	0,13	0,13
CALABRIA	569	2	2	0,35	0,35
CAMPANIA*	1.165	10	10	0,86	0,86
EMILIA ROMAGNA*	2.092	1	1	0,05	0,05
FRIULI-VENEZIA GIULIA	341	0	0	0,00	0,00
LAZIO	5.848	19	15	0,32	0,26
LIGURIA	1.158	0	0	0,00	0,00
LOMBARDIA*	3.749	2	2	0,05	0,05
MARCHE	937	1	0	0,11	0,00
MOLISE	920	6	5	0,65	0,54
PIEMONTE*	3.478	1	1	0,03	0,03
PUGLIA*	1.430	6	6	0,42	0,42
SARDEGNA	1.591	0	0	0,00	0,00
SICILIA	2.371	0	0	0,00	0,00
TOSCANA	2.499	5	4	0,20	0,16
TRENTINO-ALTO ADIGE	521	0	0	0,00	0,00
UMBRIA	3.051	11	10	0,36	0,33
VALLE D'AOSTA	86	0	0	0,00	0,00
VENETO*	1.525	4	4	0,26	0,26
Totale complessivo	36.561	106	86	0,29	0,24

Si ricorda che nel conteggio sono compresi i focolai relativi al 2011 raccolti a posteriori nel 2012 da SIMAN o dal Ministero, a prescindere dalla loro notifica su SIMAN.

La tabella evidenzia che circa 80% delle aziende risultate positive nel 2011 sarebbero nuovi focolai ossia focolai incidenti. Il restante 20% è rappresentato da aziende già risultate positive in passato. Si rileva in particolare che in alcune regioni (evidenziate con asterisco"*) la totalità dei focolai riscontrati sono incidenti.

Risultano evidenti cluster di positività nelle regioni dell'Italia centro-meridionale:

Abruzzo, Molise, Lazio, Umbria, Campania e Puglia.

Si sottolinea il dato della Campania, regione nella quale si è assistito ad una notevole riduzione degli equidi testati nel 2011 rispetto agli anni precedenti (cfr tabelle 1 e 2) a fronte di una

prevalenza di campioni positivi pressoché invariata e di una incidenza di AIE nel 0,9% delle aziende controllate.

Tale dato necessita di ulteriori approfondimenti epidemiologici, soprattutto in relazione alla possibilità che le positività riscontrate siano riferibili a equidi e/o aziende arruolati per la prima volta nel sistema di sorveglianza.

Una conferma in tal senso risulta difficoltosa a causa dello scarso livello di efficienza del sistema di anagrafe individuale degli equidi, ma lascerebbe presupporre l'esistenza, anche per altre regioni, di una sensibile proporzione di popolazione "nascosta" o non ancora censita e controllata che potrebbe rappresentare un rischio di persistenza reale dell'infezione sul territorio.

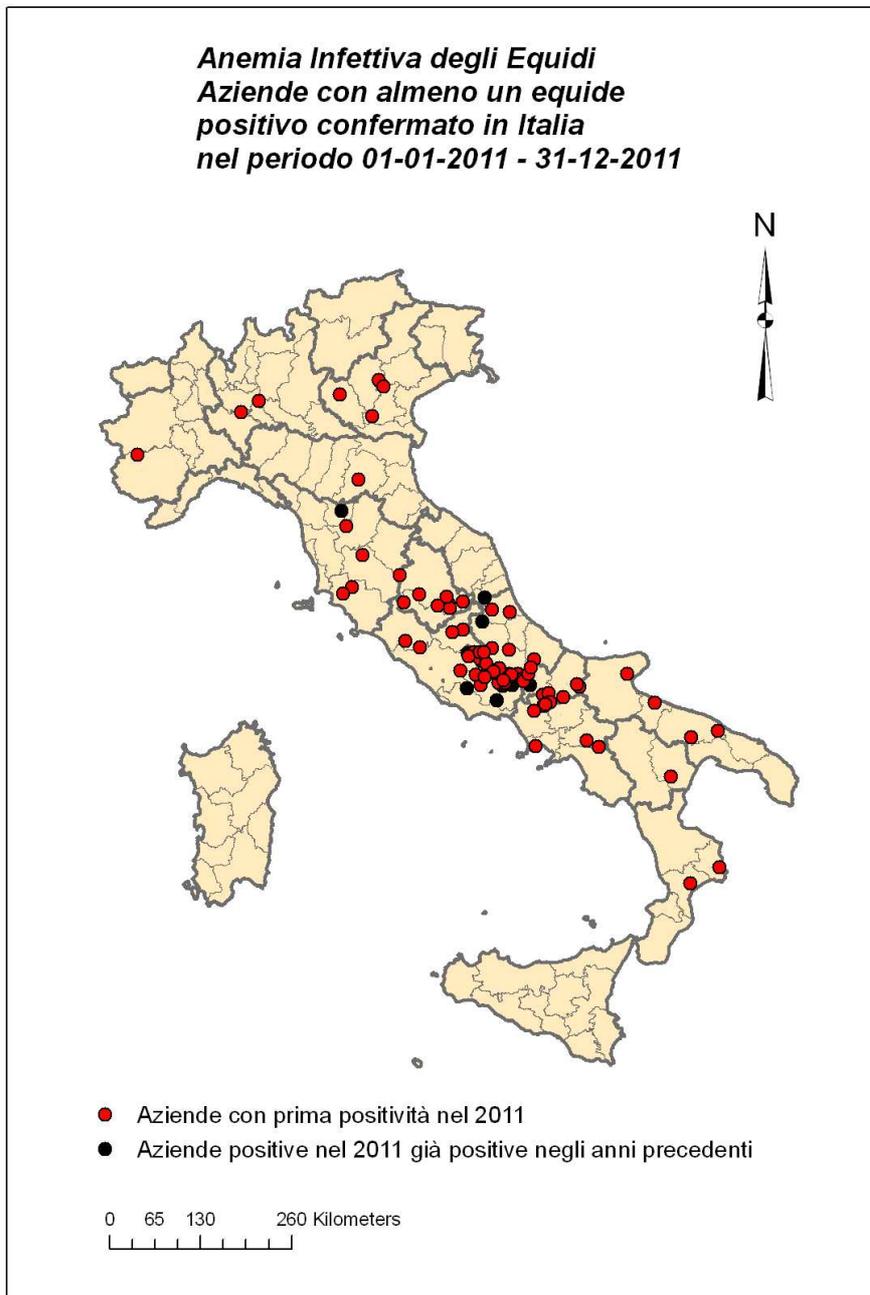
Stima dell'intensità di sorveglianza

Localizzazione delle aziende con almeno 1 equide positivo confermato dal CRAIE nel 2011

Nella figura 10 si riporta, a scopo descrittivo, la distribuzione geografica delle aziende sede di riscontro di almeno 1 equide positivo confermato nel 2011. A tale scopo sono stati utilizzati gli archivi storici delle aziende sede di conferma diagnostica detenuti dal CRAIE opportunamente integrati con i dati riportati nel sistema notifica ufficiale dei focolai SIMAN.

Grazie a tale integrazione è stato possibile ricostruire la situazione dei focolai Incidenti (nuovi focolai) nel 2011.

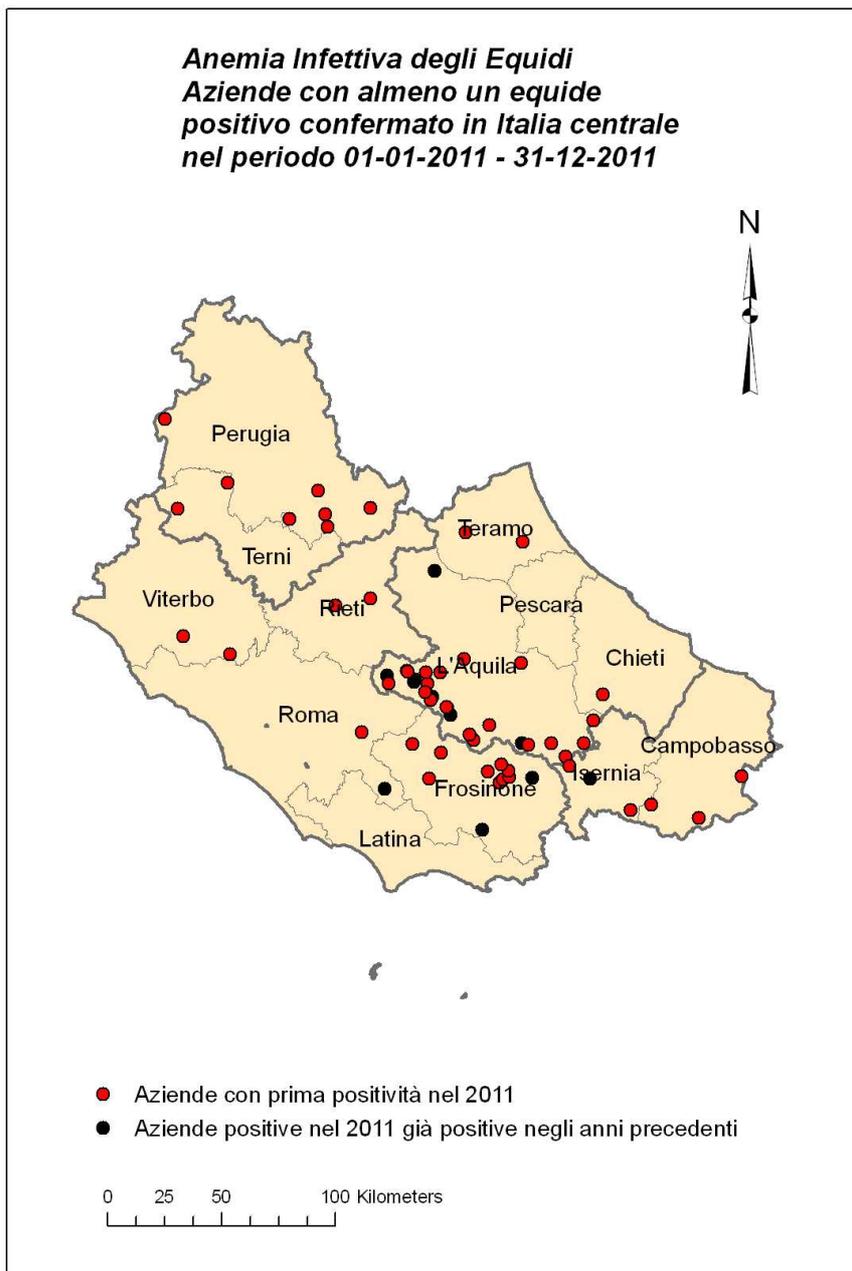
Figura 10: localizzazione delle aziende con almeno 1 equide positivo confermato nel 2011
http://195.45.99.82:900/img/AIE_italiaG2011.jpg



Nel 2011 viene confermato quanto già evidenziato nei capitoli precedenti a proposito delle prevalenze di campioni positivi, relativamente alla clusterizzazione in Italia Centrale (+++) e Meridionale (+) delle aziende positive confermate nel 2011. Nella figura 11 si riporta il dettaglio per l'Italia Centrale

Figura 11: localizzazione delle aziende con almeno 1 equide positivo confermato dal CRAIE nel 2011. In rosso FOCOLAI INCIDENTI – Italia Centrale

http://195.45.99.82:900/img/AIE_italia_centG2011.jpg



**Tabella 7: distribuzione delle aziende con almeno 1 equide positivo confermato nel 2011.
FOCOLAI PREVALENTI**

REGIONE	N° aziende Monospecie			N° aziende Miste			Totale
	Solo Asino	Solo Cavallo	Solo Mulo	Asino e Cavall o	Mulo e Cavall o	Altre combinazio ni	
ABRUZZO		27	10			0	37
BASILICATA		1				0	1
CALABRIA		2				0	2
CAMPANIA		4	6			0	10
EMILIA ROMAGNA		1				0	1
FRIULI-VENEZIA GIULIA						0	0
LAZIO	1	13	3		2	0	19
LIGURIA						0	0
LOMBARDIA		2				0	2
MARCHE			1			0	1
MOLISE		5	1			0	6
PIEMONTE			1			0	1
PUGLIA		5	1			0	6
SARDEGNA						0	0
SICILIA						0	0
TOSCANA		4	1			0	5
TRENTINO-ALTO ADIGE						0	0
UMBRIA	1	6	4			0	11
VALLE D'AOSTA						0	0
VENETO		4				0	4
Totale complessivo	2	74	28	0	2	0	106

Tabella 8: distribuzione delle aziende con almeno 1 equide positivo confermato nel 2011. In rosso FOCOLAI INCIDENTI (Stima Nuovi focolai)

REGIONE	N° aziende Monospecie			N° aziende Miste			Totale
	Solo Asino	Solo Cavallo	Solo Mulo	Asino e Cavallo	Mulo e Cavallo	Altre combinazioni	
ABRUZZO		20	5			0	25
BASILICATA		1				0	1
CALABRIA		2				0	2
CAMPANIA		4	6			0	10
EMILIA ROMAGNA		1				0	1
FRIULI-VENEZIA GIULIA						0	0
LAZIO	1	12			2	0	15
LIGURIA						0	0
LOMBARDIA		2				0	2
MARCHE						0	0
MOLISE		4	1			0	5
PIEMONTE			1			0	1
PUGLIA		5	1			0	6
SARDEGNA						0	0
SICILIA						0	0
TOSCANA		4				0	4
TRENTINO-ALTO ADIGE						0	0
UMBRIA	1	6	3			0	10
VALLE D'AOSTA						0	0
VENETO		4				0	4
Totale complessivo	2	65	17	0	2	0	86

Analisi sintetica delle criticità del flusso nazionale 2010

I trend osservati nella popolazione di capi e aziende controllati nel 2011 sembra evidenziare un progressivo e costante abbattimento dei livelli di occorrenza di AIE sul territorio nazionale, nonostante la conferma di cluster di infezione del centro-sud Italia.

Tale quadro risulterebbe congruo rispetto all'efficacia delle misure di controllo messe in atto, con conseguente progressiva riduzione delle fonti di infezione rappresentate dagli animali infetti.

Considerando inoltre come la malattia sia connessa a meccanismi di trasmissione poco efficienti (infezione iatrogena – insetti vettori meccanici), tale riduzione delle fonti di contagio prefigura ripercussioni favorevoli sul futuro quadro epidemiologico dell'AIE.

Permane tuttavia come principale punto critico la valutazione dell'intensità di sorveglianza raggiunta sulla popolazione nazionale di equidi.

In effetti, nell'ambito del precedente report relativo al periodo 2007-2010, veniva segnalata l'ipotesi che l'obiettivo di controllare l'intera popolazione generale di equidi, disposto dalla O.M. 2006, fosse stato raggiunto solo parzialmente nel 2007 e che sia invece stato ottenuto solo nell'arco del primo biennio 2007-2008. Considerando che la popolazione generale di equidi è stata sottoposta a controllo solo a partire dal 2007, il dato di prevalenza delle prime 2 annualità risulta verosimilmente costituito in maggioranza da campioni positivi "prevalenti", ossia da campioni di equidi mai testati prima, i quali hanno contratto l'infezione negli anni antecedenti il 2007.

Nello stesso report, si considerava plausibile che i capi risultati positivi nel primo biennio dovessero essere stati allontanati, e comunque non più testati. Le stime di prevalenza di campioni positivi del secondo biennio (2009-2010) venivano quindi interpretate come migliore espressione dell'incidenza dell'infezione, spiegata da 2 possibili motivazioni:

- il riscontro di campioni di equidi testati e negativi in precedenza i quali avevano contratto infezione a partire dal 2008
- il riscontro di nuovi casi su capi di nuovo arruolamento e non testati nel corso degli anni precedenti.

L'analisi effettuata sui dati 2011 sembra confermare quest'ultima ipotesi.

Nonostante l'entità dell'incidenza di nuovi focolai nel 2011 (analisi condotta per la prima volta), necessita di una conferma più oggettiva e basata sull'archivio ufficiale delle notifiche pervenute al Ministero dal 2007, la tendenza al riscontro di focolai incidenti risulterebbe evidente sulla base dell'archivio storico delle conferme detenuto dal CRAIE.

In particolare emerge come tali focolai possano essere stati individuati in strutture che detengono equidi arruolati per la prima volta nell'ambito della sorveglianza, soprattutto nelle regioni del centro-sud.

Tale ipotesi, seppur parzialmente avvalorata da informazioni raccolte sul territorio, tuttavia risulta in questa sede di difficile valutazione stante l'inadeguata implementazione del sistema di identificazione individuale degli equidi e del sistema di anagrafe equina.

Va inoltre ricordato che una prima valutazione in questo senso potrebbe derivare dalla analisi più oggettiva dell'intensità di sorveglianza applicata alla popolazione di aziende di equidi presente e censita nelle singole regioni in relazione al numero di aziende controllate nell'arco dell'anno.

Quest'ultimo rappresenta un obiettivo di analisi di processo che il CRAIE intende condurre nell'ambito del 2012.

WP 3 - valutazioni cliniche ed immunologiche in equidi naturalmente infetti

RISPOSTA CLINICA, SIEROLOGICA ED EMATOLOGICA IN MULI CON INFEZIONE NATURALE DA VIRUS DELL'AIE A SEGUITO DI RIATTIVAZIONE FARMACOLOGICA

Introduzione

A seguito dell'implementazione del Piano nazionale di sorveglianza per AIE, a partire dal 2007, è stata osservata una evidente proporzione di soggetti sieropositivi fra i muli, anche la consistenza della popolazione appartenente a questa categoria è notevolmente inferiore a quella degli asini e, in particolare, dei cavalli.

La numerosità di casi registrata fra questi animali non era mai stata riportata in Italia, né in altri paesi.

Tenuto conto di questo dato epidemiologico ed in considerazione dell'assenza di descrizioni relative a studi clinici nei muli, sono state condotte osservazioni in un gruppo di soggetti per iniziare a definire il loro possibile ruolo nella persistenza e diffusione dell'infezione.

In particolare, vengono di seguito rappresentati I dati clinici, ematologici e l'andamento sierologico a seguito di riattivazione farmacologica in soggetti con infezione naturale.

Materiali e metodi

Animali sottoposti ad osservazione: 11 muli sieropositivi provenienti dalle province di Rieti, Roma, Frosinone, Latina ed Aquila. Sebbene i soggetti fossero stati arruolati da 7 differenti focolai, provenivano comunque da un'area dell'Italia centrale relativamente ristretta dove l'infezione risulta endemica. I muli sono stati identificati con numeri progressivi da 1 ad 11. L'età era variabile 1-2 anni (muli 2 ed 11), fra 8 e 13 anni (muli 1, 5, 6, 7, 9 e 10), 17 anni (mulo 8), 22 e 30 anni rispettivamente i muli 4 e 3. Durante l'intero corso del periodo di osservazione (circa 80 giorni) tutti i soggetti sono stati mantenuti assieme e nelle stesse condizioni, nel rispetto delle condizioni di benessere e sotto controllo e supervisione veterinaria. Prima della riattivazione farmacologica, gli animali sono stati trattati nei confronti di alter infezioni ad andamento cronico-ricidivante (piroplasmosi – EHV1) che potessero interferire con l'AIE e sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario. Al momento del loro arruolamento, sono stati riconfermati sieropositivi per AIE attraverso l'esecuzione in serie dei test sierologici C - Elisa ed immunoblot (IB).

Protocollo di immunosoppressione : eseguito secondo quanto descritto da Craig J.K. *et al.*, (2), somministrando dexamezone per via intramuscolare per 8 giorni nella dose di 0,1 mg/kg p.v. a tutti i soggetti, ad eccezione dei muli 1 ed 11 per i quali il trattamento è stato prolungato sino al decimo giorno. L'efficacia del trattamento è stata valutata attraverso una reazione intradermica volta a quantificare l'ipersensibilità cellulo-mediata a seguito di inoculazione in differenti parti del collo di 50µg of fitoemoagglutinina (PHA) in 1ml di soluzione salina e 1ml di soluzione salina assoluta.

L'aumento di spessore della pelle è stato verificato con un calibro 24 ore dopo l'inoculazione delle due soluzioni, valutando quindi il rapporto fra reazione conseguente ad inoculazione con PHA e reazione nel punto di inoculo di controllo con soluzione salina.

I sintomi clinici per i quali i muli sono stati sottoposti a controllo durante l'intero periodo di osservazione, a partire dal settimo giorno precedente la somministrazione del cortisone (giorno 0) fino al ventottesimo giorno sono stati la febbre e la trombocitopenia, in accordo a quanto descritto da Leroux C. J. *et al.* (2004) per i cavalli. Altri sintomi per i quali è stata effettuato il monitoraggio erano l'alterazione delle condizioni generali, presenza di edemi, anemia e congestione delle mucose apparenti emorragie petecchiali ed ittero.

La temperatura, misurata sempre alla stessa ora, veniva considerate febrile quando superava I 39°C.

I campioni di sangue venivano prelevati dalla vena giugulare in provette con e senza anticoagulante, poste a temperatura di refrigerazione ed immediatamente consegnate al laboratorio. Per la conta delle piastrine (PLT), il cui valore di base è stato fissato a $100 \times 10^3/\mu\text{l}$, è stato impiegato un contaglobuli automatico Cell-Dyn 3700 (ABBOTT).

Dopo centrifugazione dei campioni a 179 g per $10'$, i sieri ottenuti venivano conservati a -20°C . Al fine di valutare le possibili differenze in termini di reattività nel corso della prova per la ricerca degli anticorpi venivano impiegati la in-house C-Elisa, l'immunodiffusione in gel di agar (Agid) e l'Immunoblotting (IB) in quanto metodi utilizzati a diverso livello (screening e conferma) nell'ambito della sorveglianza dell'AIE.

Per la descrizione completa della in-house C-Elisa si rimanda all'allegato 1. Con detto metodo la diluizione dei sieri nella andava da 1/6 a 1/384.

L'AGID veniva eseguito secondo procedure descritte dal Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010 e secondo Coggins (5). In entrambi i metodi utilizzando come antigene la proteina ricombinante p26 prodotta presso l'IZSLT.

L'IB veniva eseguita secondo quanto riportato da Issel C. J. *et. al.*, (4), diluendo 1/50 i sieri negativo e positivo di controllo ed 1/80 i sieri in esame, per poterne valutare eventuali variazioni di intensità di reazione, in quanto presentavano reazioni troppo forti alle diluizioni d'uso dei controlli.

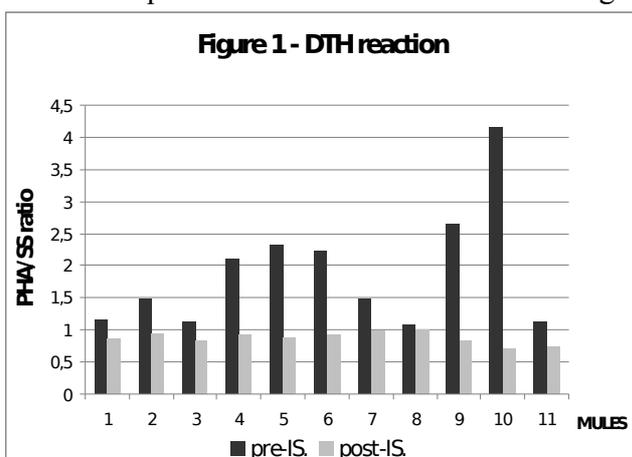
La lettura e l'interpretazione dei risultati teneva in considerazione la reattività dei sieri nei confronti della proteina capsidica p26 e delle glicoproteine di transmembrana (gp45) e di superficie (gp 90).

Per evitare ogni possibile variabilità, per tutti i metodi sierologici i campioni di ogni mulo venivano esaminati lo stesso giorno e nella stessa seduta di lavoro e, per l'IB impiegando la stessa membrana.

Nel periodo post immunosoppressione è stata inoltre effettuata la ricerca diretta di EHV 1 e 4 impiegando una duplex Real Time PCR descritta da Damiani A. *et. al.* (3) per verificare eventuali, possibili riattivazioni di infezioni latenti da parte di questi virus.

Resultati

Il test di ipersensibilità ritardata ha dimostrato, come già descritto (2) una effettiva soppressione dell'immunità a partire dall'ottavo giorno in tutti i soggetti, fatta eccezione per i muli 1 ed 11 nei quali è stata ottenuta al dodicesimo giorno di trattamento (fig. 1).



Nei muli 6, 7, ed 8 non è stata osservata trombocitopenia. Nei muli 1, 2, 3, 4, 5 e 9, 10 ed 11 la riduzione significativa delle piastrine si è verificata fra il giorno 8 e 28 P.IS., con durata variabile:

un giorno (muli 2, 9 e 11), due giorni (mulo 10), tre giorni (muli 3 e 4), 5 giorni (mulo 5) e 7 giorni nel mulo 1. I valori erano generalmente molto bassi anche nei casi di breve durata (fig. 2).

Figure 2 - PLT counts lower than baseline value (100, 000 X microlitre)

Mules								
D.P.IS.	1	2	3	4	5	9	10	11
8				5				
14	75	10	13	7	11	8	13	
15	43		17	6	8		7	
16	58		62		5			
17	75				96			
18	45		69	99	78			
19	90							
20	95							
24			95					
28			17					18

Febbre (fig. 3): l'aumento di temperatura ($> 39^{\circ}\text{C}$) è stato registrato nei soggetti 1, 5 e 10, fra il giorno 9 e 17 P.IS, mentre nel mulo 11, fra il giorno 21 e 24 P.IS.. e per i numeri 3, 4 sono stati osservati due differenti picchi febbrili fra l'11 ed il 16/17 giorno rispettivamente. Nei muli 6, 7, 8 e 9, anche in caso di alterazione della temperatura, non sono stati osservati innalzamenti oltre la soglia di 39°C considerata .

Figure 3 - Temperatures $> 39^{\circ}\text{C}$

Mules							
D.P. IS.	1	2	3	4	5	10	11
9						40.1	
10						40.5	
11		39.5	39.5	39.7		40.6	
12				39.9	40.1	39.1	
13	39.5				39.9		
14	41.1				40.4		
15	41				40.1		
16			39.6		39.3		
17			39.7	39.2			
21							39.1
22							
23							40.8
24							40.3

Il valore più elevati (41°C) è stato registrato nei muli 1, 10 e 11, mentre la durata del rialzo termico è stata variabile, da un giorno (mulo 2), tre giorni (1, 2, 3, 4 e 11), quattro giorni (mulo 10) e cinque giorni nel soggetto n. 5.

Gli altri sintomi oggetto di monitoraggio erano presenti ed in grado variabile, da in apparenti a modesti in tutti i soggetti, in concomitanza con la comparsa della febbre e della trombocitopenia. I risultati sierologici sono presentati in relazione ai campioni prelevati con cadenza settimanale a partire dal giorno -7 fino al giorno 28 P.IS.

C-Elisa (fig. 4): tutti i soggetti, ad eccezione del numero 6, erano reattivi al test Elisa. I muli 3, 5 e 7 hanno mostrato generalmente titoli bassi, mentre il mulo 11 ha mostrato positività a partire dal

giorno 28 P.I.S.. Aumenti dei titoli si sono registrati al giorno 14 per il mulo 7 ed al ventunesimo giorno nei soggetti 3, 8, 9 e 10, con un significativo incremento negli ultimi due soggetti, come anche per il mulo 5.

Sebbene il mulo 6 fosse risultato positivo all'Elisa nel corso della sorveglianza e, successivamente, al momento del reclutamento, lo stesso si è mantenuto negativo nel corso dei 35 giorni di osservazione.

Figure 4 - Elisa titres

Mules

D.P.I.S.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
-7	48	192	0	576	12	0	6	48	24	192	0
0	192	192	6	576	12	0	6	24	48	192	0
7	48	192	6	576	12	0	0	12	48	192	0
14	48	192	0	384	12	0	6	12	0	192	0
21	48	192	12	192	12	0	12	48	576	576	0
28	48	192	12	192	192	0	48	48	576	576	48

AGID (fig. 5): la reattività con i due metodi è risultata pressoché equivalente nel corso del periodo di osservazione. In particolare, in caso di positività debole, la reazione era più evidente con il metodo OIE, al contrario, I sieri forti positivi avevano più evidenti con il metodo Coggins.

Figure 5 - Reactivity of serum samples in Agid

Mules

D.P. IS.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
-7	2	3	0	3	1	0	1	1	2	3	0
0	2	3	0	3	1	0	0	1	2	3	0
7	2	3	0	3	1	0	1	1	2	2	0
14	2	3	0	3	1	0	0	1	2	3	0
21	2	3	0	3	1	0	1	1	4	4	0
28	2	3	0	3	2	0	1	1	4	4	2

Per una più facile interpretazione e valutazione dei risultati è stato assegnato un punteggio rispetto ai differenti gradi di reattività che di seguito si rappresenta:

0 – assenza di banda di precipitazione, 1 – precipitazione verso l'interno del pozzetto, 2 – banda di precipitazione tangenziale al pozzetto del campione, 3 – linea di precipitation vicina al pozzetto, 4 – equidistante fra i pozzetti del campione e dell'antigene, 5 – precipitazione tangenziale al pozzetto dell'antigene.

Durante tutto il periodo di osservazione I muli 3 e 6 hanno reagito negativamente al test, mentre I soggetti 7, 9 e 10 hanno mostrato un aumento di reattività al giorno 21, i muli 5 ed 11 in corrispondenza del prelievo del giorno 28, alla stessa stregua di quanto osservato con il test Eisa..

IB: nella fig. 6 viene descritta la reattività dei differenti soggetti nei confronti delle tre proteine (p

Figure 6 - Description of reactivity of mules in IB

mule		mule	
1	Strong pos for all proteins on all days	7	Strong pos for p26 medium for gp 45 & 90 with increase on day 28 for gp 90
2	Strong pos for all proteins on all days	8	Strong pos for p26 & gp 90, medium for gp 45 with increase on day 14 and for gp 90 on day 21
3	Strong pos for all with increase of p26 on day 21	9	Strong pos for p26 & gp 90, medium for gp 45 with increase from day 14 for gp 45
4	Strong pos for all with decrease on day 14	10	Strong pos for gp 90 with increase from day 21 for p 26
5	Strong pos for all on all days	11	Weak pos only for p26 increase from day 14 for gp 90 on day 28 for p26
6	Medium pos for p26 & gp 90 & weak pos for gp 45 for all days		

E' stato possibile osservare un effettivo aumento di reattività nei confronti della p26 nei muli 10 ed 11 rispettivamente in occasione dei prelievi dei giorni 21 e 28, per la gp 45 nei muli 8 e 9 ai prelievi dei giorni 14 e 21 e, infine, per la gp 90 nei muli 7 ed 11 nei giorni 21 e 28 rispettivamente.

In un solo caso (mulo 6) la Real Time PCR ha messo in evidenza la riattivazione di EHV 1 da i tamponi nasali prelevati in corrispondenza del 18° giorno P.IS.. In tale soggetto non è stata osservata febbre, trombocitopenia né aumento di reattività all'IB, unico metodo sierologico nei confronti del quale l'animale è sempre risultato reattivo nell'intero periodo di osservazione.

Discussione

L'immunosoppressione farmacologica si è dimostrata efficace in tutti i soggetti.

A seguito di questa, sette degli animali in osservazione hanno mostrato sia febbre che trombocitopenia ed entrambe le alterazioni sono state concomitanti nella maggior parte dei soggetti (figure 2 e 3). Gli altri sintomi clinici per i quali gli animali sono stati monitorati sono stati modesti o inapparenti.

Sei degli animali sottoposti ad osservazione hanno mostrato incrementi di reattività per AIEV a seguito di immunosoppressione; di questi, 2 nei confronti di uno solo fra i metodi impiegati, mentre nei rimanenti 4 la sierconversione è risultata evidente con tutti i tre metodi utilizzati.

Sebbene i tre metodi abbiano la p26 come denominatore comune, l'aumento di reattività nei confronti di questa proteina è risultato più evidente e marcato in Elisa ed Agid, piuttosto che in IB, metodo quest'ultimo riconosciuto come maggiormente sensibile rispetto agli altri (Issel, C.J. *et. al.*, 1988). Ciò potrebbe essere in conseguenza del fatto che non tutti gli animali, in seguito a riattivazione virale, sono in grado di produrre anticorpi allo stesso modo nei confronti degli epitopi lineari delle proteine, che nell'IB sono esposti in forma denaturata.

Come già riportato da Issel, C.J. *et. al.*, (4), Leroux C. *et. al.*, (6) and Scicluna *et.al.* (7) l'AGID si conferma il metodo meno sensibile per la rilevazione degli anticorpi AIE specifici.

Questo risultato assume particolare rilevanza ai fini dell'appropriatezza dell'uso dei tre metodi nell'ambito dei piani di sorveglianza. Infatti nella scelta dei test di screening da impiegare nei piani di controllo, fra le caratteristiche da considerare la sensibilità analitica assume una rilevanza prioritaria. Ciò impone la scelta dell'Elisa in posizione di assoluto vantaggio.

Nel confrontare la risposta clinica rispetto ai risultati sierologici, si è osservato che fra gli 8 soggetti con febbre e trombocitopenia solo 4 hanno mostrato aumento di reattività sierologica. Risultati questi che dimostrano l'assenza di una correlazione evidente fra le due situazioni, almeno rispetto all'impiego dei metodi descritti. Infatti, in letteratura, in analoghi studi condotti su cavalli infetti, aumenti di produzione di anticorpi nei confronti della gp 90, a seguito di immunosoppressione, sono stati osservati solo attraverso l'impiego di test di virus-neutralizzazione, Howe H. *et. al.*, (8). Pertanto il nostro studio necessita dell'impiego di altre metodiche per poter meglio approfondire gli aspetti legati alla risposta umorale nei confronti dell'infezione.

Saranno inoltre condotte indagini virologiche sui campioni raccolti nel periodo P.IS. per valutare la concentrazione di virus sia ai fini della valutazione del rischio biologico costituito da tali soggetti nel corso delle fasi di infezione. Lo studio ha già parzialmente prodotto informazioni circa il potenziale ruolo epidemiologico che questa categoria di animali può rivestire nella diffusione dell'infezione sia nel corso della fase cronica/inapparente che in fase acuta/viremica.

La caratterizzazione degli stipiti virali di ogni animale in relazione ai differenti pattern sierologici e clinici osservati, in considerazione dell'origine dei soggetti da focolai differenti anche se geograficamente vicini, potrà forse dare ulteriori informazioni su aspetti ancora non del tutto chiari.

Questo studio costituisce il primo report sulla riattivazione farmacologica dell'infezione da AIE in muli naturalmente infetti che apparentemente sembra produrre forme cliniche non gravi

accompagnate da febbre, trombocitopenia e aumento della risposta anticorpale limitatamente ad alcuni soggetti.

Bibliografia

1. Amaddeo D. *et. al.*, 1998. Final Report of Current Research Programme - “Development of Elisa Methods for the Serological Diagnosis of Equine Infectious Anemia, using Recombinant Antigens and Monoclonal Antibodies” .
2. Craigo *et. al.*, 2007. Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines *Vaccine*. 15; 25(5): 834–845
3. Damiani A. *et. al.*, 2005 Development of a real-time PCR for the differential detection of equine herpesvirus type 1 and type 4 5th National Congress of the Italian Society of Virology Orvieto 19-21-settembre 2005
4. Issel, C.J. *et. al.*, 1988. Evolution of equine infectious anemia diagnostic tests: recognition of a need for detection of anti-EIAV glycoprotein antibodies. In D.G. Powell (Editor), *Proc. 5th Int. Conf. Eq. Inf. Dis. Univ. Press of Kentucky, Lexington, KY*, pp. 196-200.
5. Issel C.J. *et. al.*, 1993. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J Vet Diagn Invest*;5: pp 137–141.
6. Leroux C. *et. al.*, 2004. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV’s country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 35.485–512.
7. Scicluna M.T. *et. al.*, 2008. 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. – Alghero pag.78.
8. Howe H. *et. al.*, 2005 Specificity of serum neutralizing antibodies induced by transient immune suppression of inapparent carrier ponies infected with a neutralization-resistant equine infectious anemia virus envelope strain. *J. Gen. Virol.* 86, 139–149

MODALITA' DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI

I risultati della ricerca sono stati resi disponibili alla comunità scientifica attraverso la realizzazione di 11 presentazioni nel corso di convegni/eventi formativi a carattere nazionale ed internazionale di seguito riportate in elenco diretti a veterinari pubblici operanti nel settore della Sanità animale, liberi professionisti ippisti e laboratoristi coinvolti nell'attività di ricerca nel settore.

Parte dei dati sono stati anche pubblicati su rivista a diffusione internazionale (1) impattata, mentre i report di validazione dei metodi standardizzati nonché dei circuiti interlaboratorio sono stati inviati a tutte le strutture coinvolte nella filiera dei controlli. I documenti tecnici sono inoltre disponibili sulla pagina Web del Centro di referenza nazionale dell'anemia infettiva equina dell'istituto all'indirizzo

Infine, il 1 ottobre 2012, l'Istituto, in collaborazione con la Direzione Generale Sanità animale e farmaco veterinario, ha organizzato uno specifico congresso internazionale dal titolo "Anemia infettiva equina, attualità e prospettive di controllo a sei anni dalla sorveglianza pianificata" per divulgare i risultati della ricerca e le finalizzarli in termini operativi che ha visto la partecipazione di oltre 250 delegati provenienti dalle regioni italiane e da 6 differenti paesi europei.

1. CHALLENGES AND PROPOSED SOLUTIONS FOR MORE ACCURATE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF EQUINE INFECTIOUS ANAEMIA Issel CJ, Scicluna MT, Cook SJ, Cook RF, Caprioli A, Ricci I, Rosone F, Craigo JK, Montelaro RC, Autorino GL. Veterinary Record, 2012 veterinaryrecord.bmj.com on November 26, 2012 - Published by group.bmj.com
2. WHAT FEEDBACK AFTER FIVE YEARS FROM THE IMPLEMENTATION OF THE ITALIAN NATIONAL SURVEILLANCE PROGRAMME FOR EQUINE INFECTIOUS ANEMIA (EIA) M. Sala, G. Ferri, M.T. Scicluna, P. Scaramozzino, I. Ricci, R. Nardini, L. Ruocco, M. Paglialunga, R. Forletta, G.L. Autorino. G. Manna , G. L. Autorino, Jour. Equine Vet. Science , 2012, **10**, Vol 32
3. IS A DIAGNOSTIC SYSTEM FOR EQUINE INFECTIOUS ANAEMIA (EIA) BASED EXCLUSIVELY ON AGAR GEL IMMUNODIFFUSION (AGIDT) ADEQUATE FOR CONTROLLING THE SPREAD OF THIS INFECTION? Maria Teresa Scicluna, Charles J. Issel, R Frank Cook, Giuseppe Manna, Antonella Cersini, Francesca Rosone, Raffaele Frontoso, Andrea Caprioli, G. L. Autorino. IX International Congress of European Society of Veterinary Virology (4-7 settembre 2012 Madrid). Oral presentation
4. VALUTAZIONE DI ALCUNE PERFORMANCE DIAGNOSTICHE DI KIT ELISA PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA (AIE); Nardini R., Scicluna M.T., Terregino C., Mandola M.L., Cavaliere N., Cordioli P., Fusco G., Purpari G., Angioni A., Panzieri C., Manca M., Autorino G. Atti XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V 24-26 ottobre 2012 Sorrento. Poster
5. VALIDATION OF A COMPETITIVE ELISA FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES ANTI-P26 OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS IN EQUINE SERA. EAVLD 2ND CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS (EAVLD) R. Nardini, G.L. Autorino, R.Lorenzetti,

- P. Cordioli, A. Caprioli, M.T. Scicluna Kazimierz Dolny, Poland, 1-4 July 2012. oral presentation
6. QUADRO EPIDEMIOLOGICO RISULTANTE DAL PIANO DI SORVEGLIANZA PER L'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUIDI NEL QUADRIENNIO 2007-2010 Forletta R., Ferri G., Nardini R., Ricci I., Scicluna M. T., Scaramozzino P., Autorino G.L., Sala M. 2002-2010 XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.. Trani, 12-14 Ottobre 2011 , Oral presentation
 7. IMPORTANZA DELL'IMPIEGO IN SERIE DI DIFFERENTI METODI SIEROLOGICI NELL'AMBITO DEL PIANO DI SORVEGLIANZA E PER LA CONFERMA DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA Ricci I., Forletta R., Gasperetti L., Caciolo D., Sabatini S., Scicluna M.T., Autorino G.L. 2002-2010 XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.. Trani, 12-14 Ottobre 2011 , Poster
 8. RISULTATI DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO ORGANIZZATO DAL CRAIE NEGLI ANNI 2002-2010 XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.. Trani, 12-14 Ottobre 2011 Poster
 9. VALIDAZIONE DI UN ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI CONTRO LA P26 DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA NEL SIERO DI EQUIDI. G.L. Autorino, R. Nardini, I. Ciabatti, R.Lorenzetti, P. Cordioli, D. Caciolo, E. Letizia, M.T. Scicluna. Atti IV Workshop nazionale di virologia veterinaria pag. 14 (presentazione orale), Brescia 9-10 giugno 2011
 10. PHARMACOLOGICAL REACTIVATION OF EQUINE INFECTIOUS ANAEMIA VIRUS IN NATURALLY INFECTED MULES: CLINICAL, HAEMATOLOGICAL AND SEROLOGICAL RESPONSES - **Part 2** Autorino G.L. , Rosone F., Caprioli A., Canelli. E., Mastromattei A., Scicluna M.T. Part 2 Atti XII Convegno SIDiLV Genova 27-29 Ottobre 2010 (presentazione orale)
 11. PHARMACOLOGICAL REACTIVATION OF EQUINE INFECTIOUS ANAEMIA VIRUS IN NATURALLY INFECTED MULES: CLINICAL, HAEMATOLOGICAL AND SEROLOGICAL RESPONSES - **Part 1** Autorino G.L. ,Caprioli A., Rosone F., Mastromattei A., Lai O., Grifoni G., Saralli G., Alfieri L., Ciccia F. Giordani F., Scicluna M.T. Atti XII Convegno SIDiLV Genova 27-29 Ottobre 2010 (presentazione orale)
 12. EQUINE INFECTIOUS ANEMIA: SHOULD THE AGAR IMMUNODIFFUSION TEST STILL BE USED FOR SCREENING AND AS UNIQUE CONFIRMATORY TEST? Scicluna M.T1., Zini M. 1, Caprioli A. 1, Cordioli P., Vulcano G., Della Verità F., Gregnanini S., Palmerini T., Simula M., Stilli D., Autorino G.L., Atti X Convegno SIDiLV Alghero 22-24 Ottobre 2008, pag. 78-79 (presentazione orale)