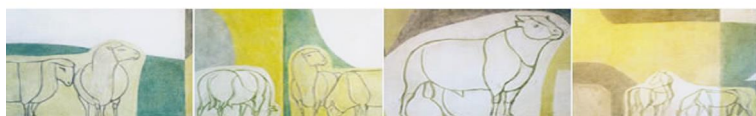




- Anemia infettiva degli equini (AIE):**
- **valutazione di un nuovo protocollo di screening nell'attuazione del piano di sorveglianza Nazionale e verifica della concordanza fra metodiche disponibili.**
  - **valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti**
  - **studio dei principali fattori di rischio nei cluster geografici di infezione.**

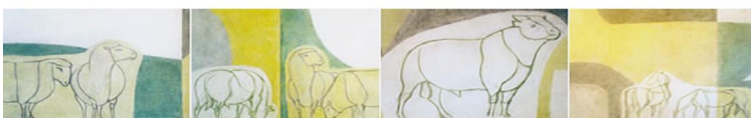
***L'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:  
RICADUTA APPLICATIVA NELLE REALTÀ TERRITORIALI***

Ricerca approvata e finanziata dal Ministero della Salute - IZSLT 07/08 RC

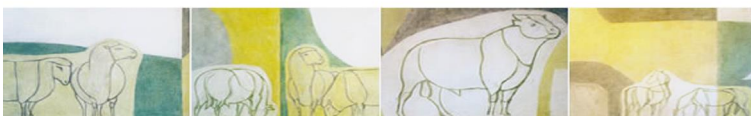


## Elenco delle Unità Operative (U.O.) impegnate nel progetto:

Dr. Riccardo Forletta – CRAIE, IZSLT Sezione di Pisa,  
Dr. Charles J. Issel, Gluck Equine Research Center – Lexington Kentucky  
Dr. Gian Luca Autorino – CERME, D.O. Diagnosi delle Malattie Virali IZSLT  
Dr. Marcello Sala - IZSLT, Osservatorio Epidemiologico Veterinario (OEVR)  
Dr. Goffredo Grifoni - IZSLT Sezione di Rieti  
Dr. Ilaria Maria Ciabatti - Ufficio di Staff Biotecnologie IZSLT  
Prof. Pistello Mauro - Università di Pisa  
Dr. Renato Ugo Condoleo - IZSLT Sezione di Latina  
Dr. Angelo Toni - Servizio Veterinario ASL Rieti  
Dr. Gian Carlo Micarelli - Servizio Veterinario ASL RM/G  
Dr. Antonio Messore, Servizio Veterinario ASL Frosinone

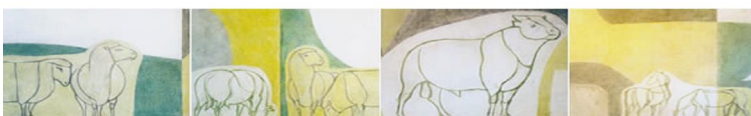


**Valutazione di un nuovo protocollo di  
screening per l'AIE  
nell'attuazione del piano di  
sorveglianza Nazionale  
e verifica della concordanza fra metodiche  
disponibili**



## Premessa

- L'O.M. 14/11/2006, con durata biennale, disponeva, per la prima volta, **l'obbligo di esaminare sierologicamente tutta la popolazione nazionale di equidi**, al fine di valutare la prevalenza dell'infezione dell'Anemia Infettiva.
- La prosecuzione dell'attività anche nel biennio 2008-2009 (OM 18.12.07) determinava un **notevole incremento dell'attività diagnostica** da svolgere da parte dei singoli II.ZZ.SS.



## Considerazioni

La prova di laboratorio usata ai quei tempi era la tecnica di **Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID)**, la quale, secondo la procedura descritta dal manuale OIE, rappresenta ancora **il test di riferimento per la movimentazione internazionale degli equina.**

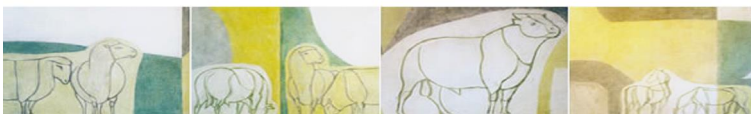
Principali vantaggi dell'AGID sono:

- **semplicità di esecuzione** e
- soprattutto **elevata specificità**, caratteristica per la quale è ancora oggi considerato come **valido test di conferma.**

Principali svantaggi dell'AGID sono:

- **bassa sensibilità**
- **turnover di campioni lavorati/operatore basso, quando si confronta con altri metodi sierologici come l'Elisa**

Tale caratteristiche rendono **l'AGID poco adatto ad una applicazione negli screening di massa.**

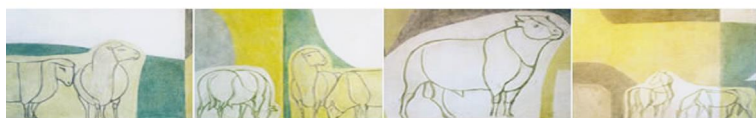


**Inoltre,**

nelle **condizioni di bassa prevalenza** dell'infezione sul territorio nazionale e con la **necessità di assicurare il reclutamento di tutti i casi di infezione**, il "sistema diagnostico" doveva prediligere **l'utilizzo di metodi di screening più sensibili.**

**Infatti,**

l'esperienza maturata nel 2007 dall'IZSLT su circa 35 000 campioni del PNS ha evidenziato che **utilizzando l'AGID come screening si sarebbe "persa" una frazione pari a circa 10% di "veri positivi"**, invece individuati da un in-house ELISA test, validato nel 2000, e confermati mediante Immunoblotting (IB), anch'esso già raccomandato dal manuale OIE 2008.



# Tecnica di Immunoblotting

IB – (*Isse/et. al, 1999*) – un siero è considerato positivo se mostra una banda in corrispondenza della p26 e ad almeno 1 delle altre 2 glicoproteine maggiore del virus dell'AIE



**gp90**

**gp45**

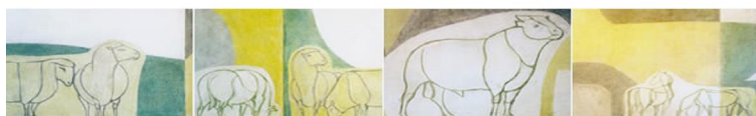
**p26**



**Pertanto,**

come primo obiettivo specifico, si intendeva:

- ***migliorare la sensibilità complessiva del PNS ,***
- ***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 serie dei risultati forniti da AGID e IB.***



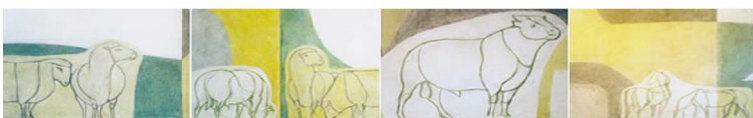


## Premesse scientifiche:

- Durante gli ultimi 30 anni è stato riconosciuto che una **bassa percentuale di equini esposti all'AIEV potrebbero diventare portatori persistenti del virus e porsi come una sfida diagnostica quando esaminati con l'AGID** (*Toma, 1980, Issel and Adams 1982, McConnell et. al., 1983*).
- Dagli anni '80, un numero di **metodi diagnostici di tipo ELISA sono stati approvati per la serodiagnosi dell'AIE** e la maggior parte dei campioni esaminati hanno avuto dei risultati concordanti in AGID ed ELISA (*Matsushita et. al., 1989*).

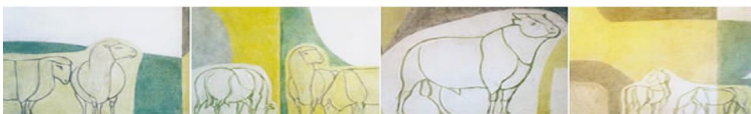


- **L'utilizzo in serie di metodi diagnostici**, per una diagnosi più accurata dell'infezioni da EIAV, è stata già adottata e sperimentata da vari gruppi di studiosi (*Isse/ et. al., 1987, 1999, McConnico et. al., 1998*).
- La strategia sfrutta **l'alta sensibilità dell'ELISA** e **l'alta specificità dell'AGID** e utilizza **l'IB (per entrambi le caratteristiche)** su i campioni rari che danno un esito positivo in ELISA ma negativo in AGID.
- La maggior parte di questi campioni sono generalmente "FALSI POSITIVI", ma **una minoranza rappresentano delle "VERI INFEZIONI"**.



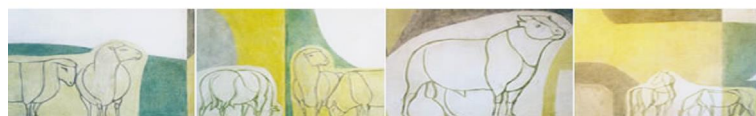
## Materiali e Metodi

- I **dati presentati** si riferiscono alla attività condotta nell'ambito del **PNS condotto tra il 2007 e 2010**.
- I campioni esaminati derivano **dall'attività di sorveglianza effettuata nella regione Lazio e successivamente inoltrati per conferma presso il CRAIE**.
- In totale, sono stati esaminati quasi **100 000 campioni** con il sistema descritto, impiegando un metodo **ELISA** competitivo (sviluppato e validato utilizzando i criteri OIE) e l'**AGID** ( eseguito come indicato dal Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals), entrambi utilizzando come antigene la p26 ricombinante e per i campioni discordanti (ELISA pos/ AGID neg) la tecnica **IB**.



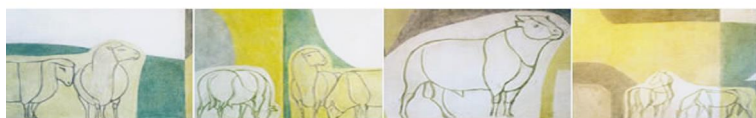
# Risultati

	Number	Rate
Samples tested in survey	96,468	
Positive in IT C-ELISA	331	0.34%
Positive IT C-ELISA and AGIDT	124	0.13%
Positive IT C-ELISA and Negative AGIDT	207	
Negative Immunoblot	182	88%
Positive Immunoblot	25	12%
Overall number judged positive for EIA	124+25 = 149	0.15%
Total Number of samples tested in survey	96,468	
Apparent False-Positive IT C-ELISA	182	0.19%
Apparent False-Negative AGIDT	25	0.026%



## Considerazioni

- con l'uso di una sierologia comparativa, si ha una evidenza sierologica dell'infezione con un tasso più alto del **12%.**
- Dei 25 casi di EIA confermati sierologicamente, per 22 era stato possibile **verificare se esistevano dei fattori di rischio** ed in effetti per 17 di loro (82%) é stato possibile confermare la loro presenza come, ad esempio, **allevamenti con precedenti casi di AIE.**



# Algoritmo diagnostico per la sierodiagnosi dell'AIE utilizzando un sistema in serie

## Laboratorio di prima istanza

Esaminare campione impiegando un ELISA approvato dal Centro di Referenza

Se Negativo – refertare come negativo

Se Positivo – ripetere l'esame - se negativo refertare come negativo

- se positivo inoltrare a laboratorio di seconda istanza

## Laboratorio di seconda istanza

Esaminare campione con la stessa ELISA e con almeno un'altra ELISA

Se negativo in entrambi - refertare come negativo

Se positivo solo in un ELISA - refertare come negativo

Se positivo/dubbio in 2 o più ELISA diversi

Eseguire AGID – se positivo refertare come positivo

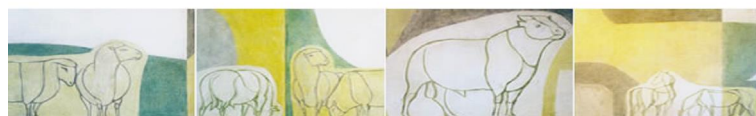
- se negativo inviare al Centro di Referenza

## Centro di Referenza

Esaminare campione in ELISA e AGID

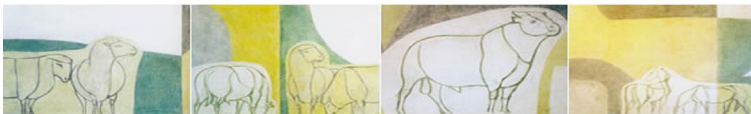
Se positivo esaminare in IB - se positivo per alla p26 e ad almeno gp90 o gp45 – refertare come positivo

Se positivo solo alla p26 - refertare come negativo (esposizione a lentivirus correlati)





# **DINAMICA DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA IN MULI NATURALMENTE INFETTI CON REAZIONE SIEROLOGICA EQUIVOCA.**

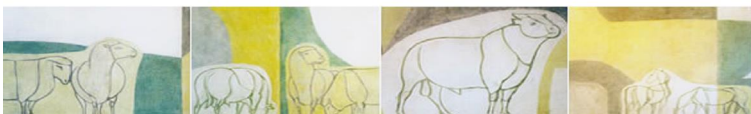




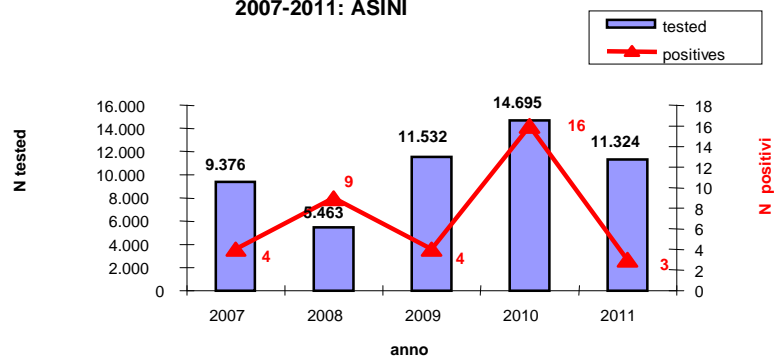
# Distribuzione dei casi di Anemia Infettiva Equina (AIE) tra le specie esaminate durante l'attività di sorveglianza nel periodo 2007-2011

<http://www.izslt.it/izslt/>

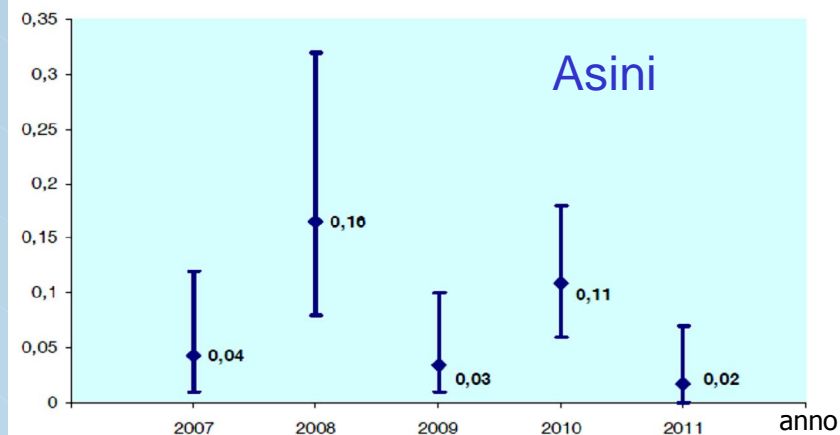
**2007-2011 report dell'attività di sorveglianza per AIE  
svolta dal CERME e CRAIE.**



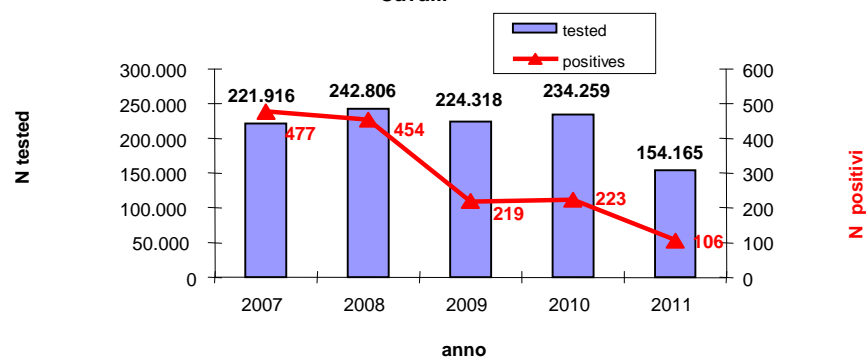
2007-2011: ASINI



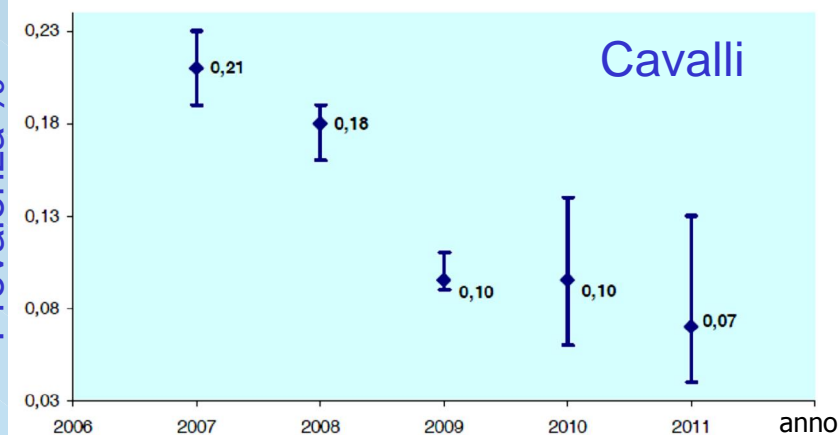
Prevalenza %



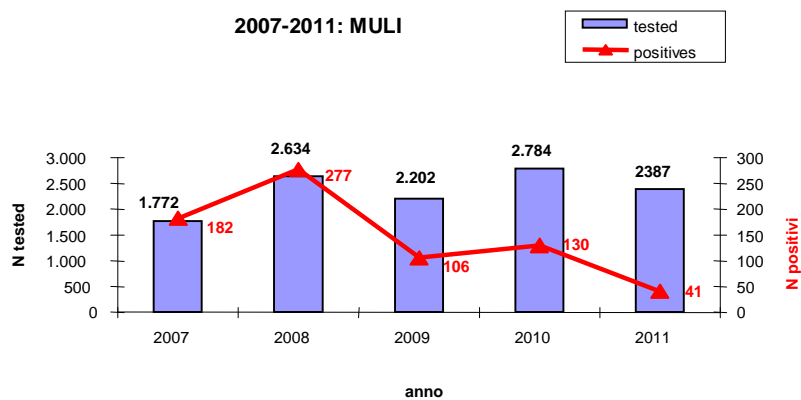
Cavalli



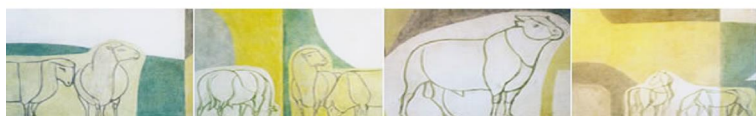
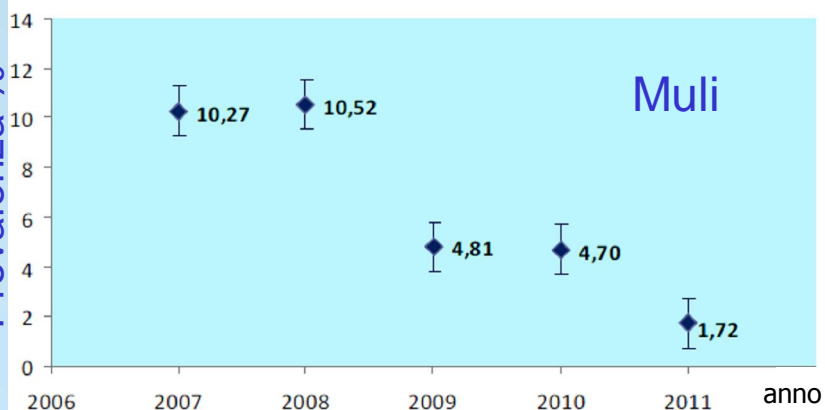
Prevalenza %



2007-2011: MULI



Prevalenza %

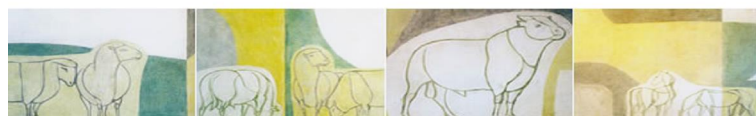


# Come interpretare lo stato di infezione di animali apparentemente negativi in AGID

## – valore predittivo di reazioni Elisa/IB positive?

	Number	Rate
Samples tested in survey	96,468	
Positive in IT C-ELISA	331	0.34%
Positive IT C-ELISA and AGIDT	124	0.13%
Positive IT C-ELISA and Negative AGIDT	207	
Negative Immunoblot	182	88%
Positive Immunoblot	25	12%
Overall number judged positive for EIA	124+25 = 149	0.15%
Total Number of samples tested in survey	96,468	
Apparent False-Positive IT C-ELISA	182	0.19%
Apparent False-Negative AGIDT	25	0.026%

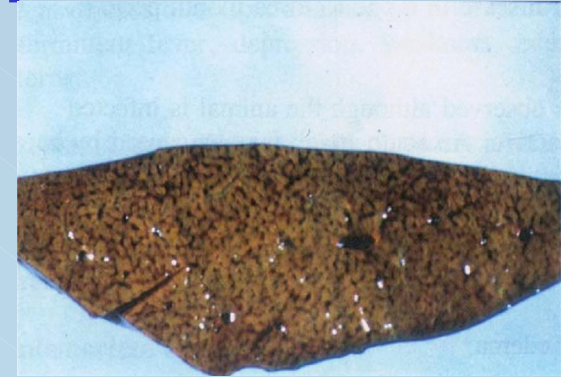
13/25 apparenti falsi negativi in AGID erano muli di cui 11/13 provenivano da focolai prevalenti.



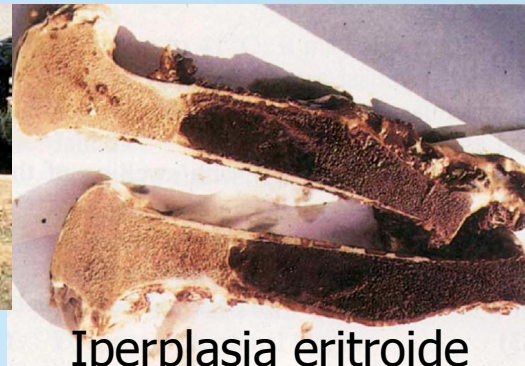
# Segni clinici della malattia descritti maggiormente nella specie equina

<http://www.fao.org/docrep/003/t0756e/T0756E07.htm>

La malattia nella **maggior parte dei casi ha un decorso subclinico/inapparente** ma può avere anche decorso acuto/cronico in cavalli infettati con lo stesso *stipite virale*. (*Hammond et. al. 2000, Leroux et. al. 2001, Cook et. al. 2001*).



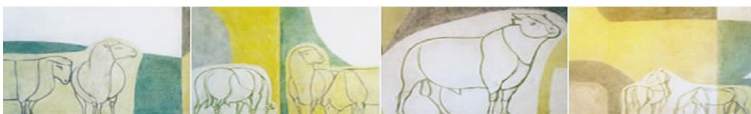
Fegato rosso/grigiastro aumentato di volume con pattern lobolare ed emorragie sottocapsulare.



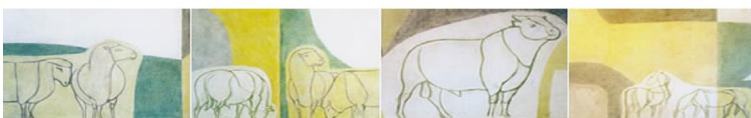
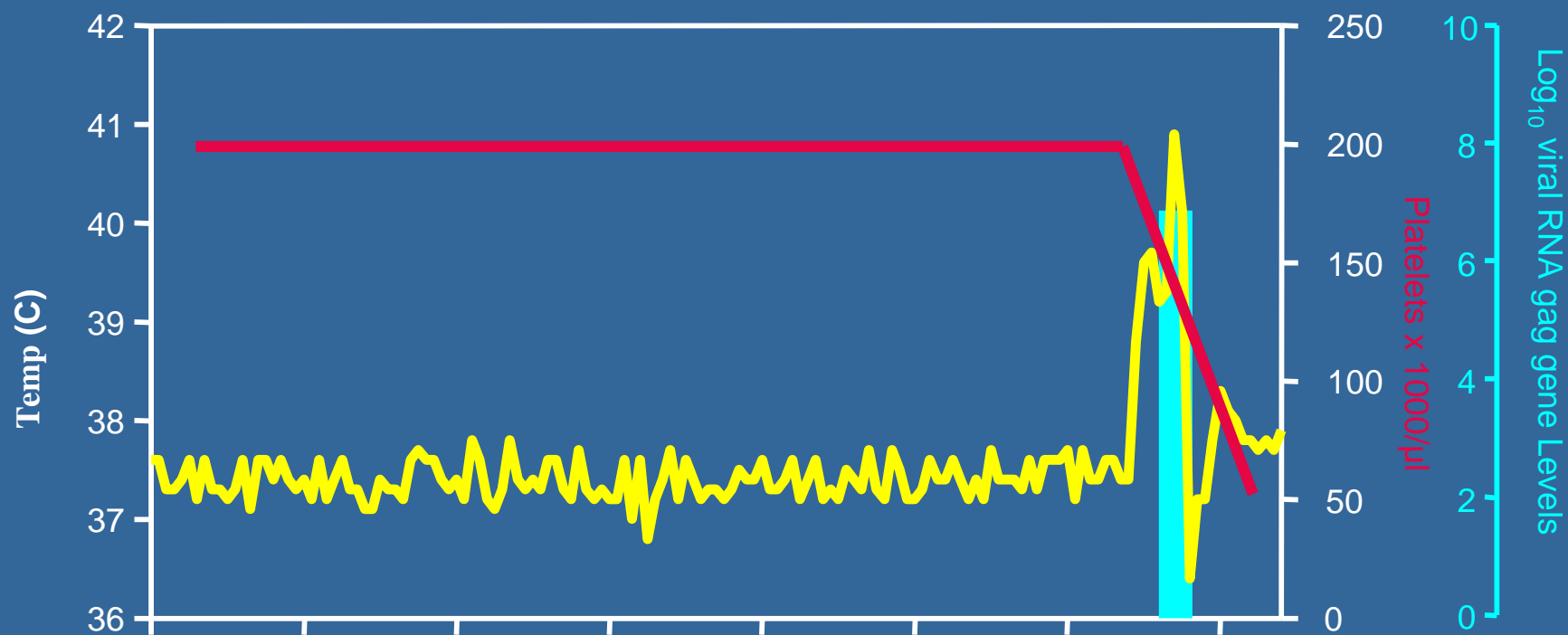
Iperplasia eritroide

Casi cronici sono caratterizzati da cicli intermittenti di: febbre, anemia, dimagrimento e letargia alternata a periodi di normalità.

La riacutizzazione può seguire a fattori quali: stress, malnutrizione, lavoro eccessivo o interventi chirurgici.



# Principali parametri di valutazione in corso di infezione da virus AIE



# Scarse le informazioni in letteratura sull'AIE nei muli



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

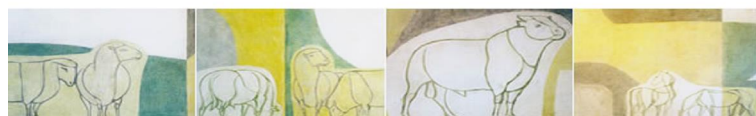
Veterinary Microbiology 95 (2003) 49–59

**veterinary  
microbiology**

[www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies

V. Spyrou<sup>a</sup>, M. Papanastassopoulou<sup>a</sup>, V. Psychas<sup>b</sup>,  
Ch. Billinis<sup>a</sup>, M. Koumbati<sup>a</sup>, J. Vlemmas<sup>b</sup>,  
G. Koptopoulos<sup>a,\*</sup>





# Obiettivo dello Studio

Determinare lo **Stato Virologico** e il **Significato Epidemiologico** di muli con **risultati sierologici equivoci** per AIE.

Table 1

Characteristics of the study group regarding age, sex, serological reactivity observed on testing during surveillance and duration of immune suppression treatment in days of the mules used in the study.

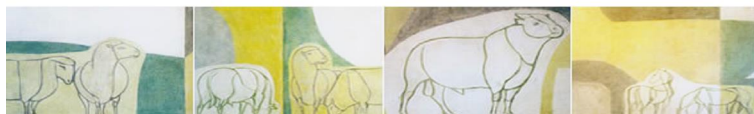
Mule identification no.	Age	Sex	Serological result (ELISA/AGIDT/IB) <sup>a</sup>	Duration of IS treatment in days
1	12	Female	+/2/+	8
2	2	Female	+/3/+	10
3	30	Female	+/0/+	10
4	22	Female	+/3/+	10
5	9	Fe male	+/1/+	10
6	8	Female	±/0/+	10
7	11	Castrated male	+/1/+	10
8	17	Female	+/1/+	10
9	11	Female	+/2/+	10
10	7	Female	+/3/+	10

<sup>a</sup> Serological results for ELISA and IB are reported qualitatively as positive (+) or negative (-). The AGIDT reactivity is reported as scores as described in Fig. 1A. The mules that had registered scores 0 or 1 are respectively mules 3 and 6 and mules 5, 7 and 8.



Studio longitudinale su un gruppo di 10 muli, naturalmente infetti provenienti da 5 differenti focolai, comprendente **5 soggetti con patterns sierologico Elisa/AGID equivoco**

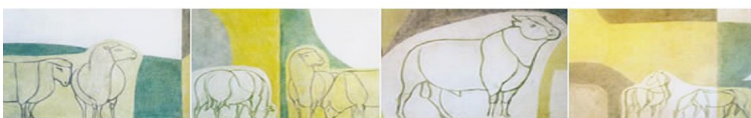
Disegno dello studio





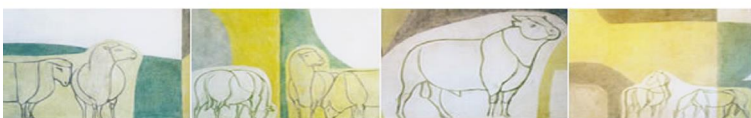
La conferma di positività per AIE, sui campioni dei soggetti prelevati prima dell'arruolamento, effettuata mediante:

- **PCR**; tutti i muli risultavano PCR positivi e il sequenziamento degli amplificati mostrava omologia con i ceppi dei virus dell'AIE in Europa (*Cappelli et al, 2011*);
- **IB** -tutti i muli risultavano IB positivi (*Isse/ et. al, 1999*).



## Altri dettagli sul gruppo

- Anamnesi clinica riferiva che in **alcuni soggetti presentavano riduzioni di performance** e debolezza senza altri apparenti segni clinici;
- Acquistati dopo che i proprietari avevano optato per la macellazione;
- La struttura dell'IZS presso cui è stato condotto lo studio è stata autorizzata dal Servizio Veterinario e dalla Regione; la stessa è stata **dichiarata focolaio di AIE**, adottando tutte le misure di biosicurezza volte ad **escludere la possibile diffusione dell'infezione**.



# Set-up sperimentale

**Durata dello studio :** circa 4 mesi.

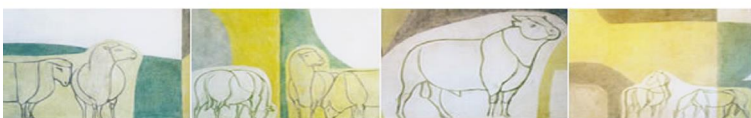
## **Esame clinico**

Monitoraggio quotidiano – esame obiettivo generale

## **Raccolta dei campioni**

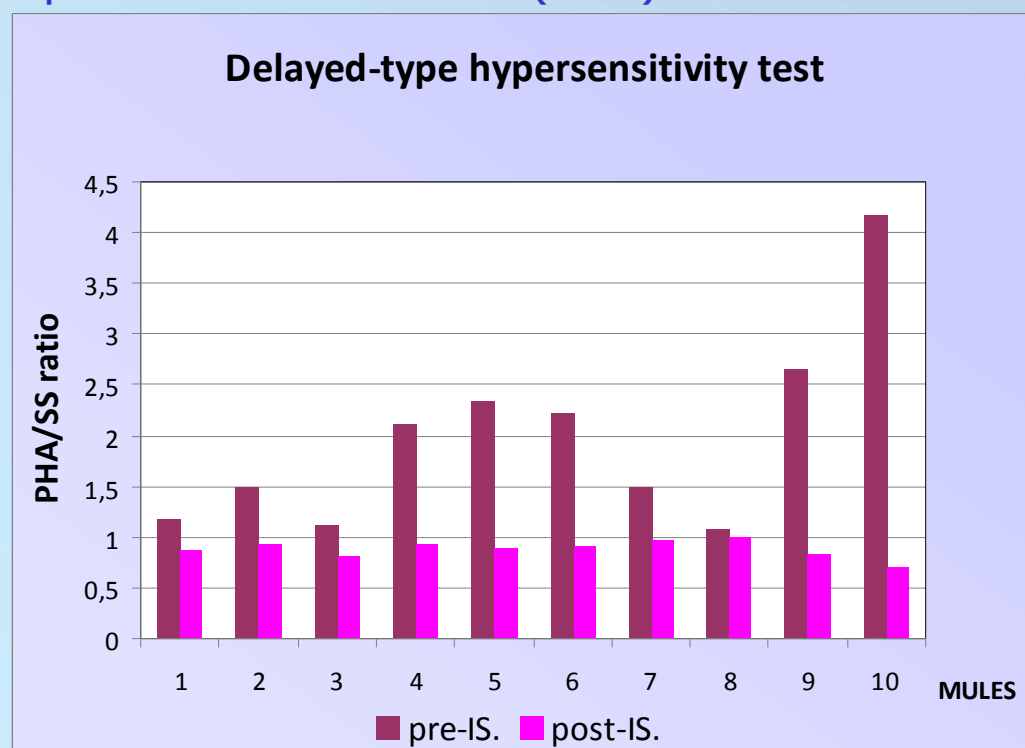
Sangue con e senza anticoagulante prelevato giornalmente.

**Immunosoppressione (IS) & verifica** – somministrazione di desametazone a metà del periodo di osservazione (*Craigo et. al, 2007* - dosi nei limiti dei livelli terapeutici)

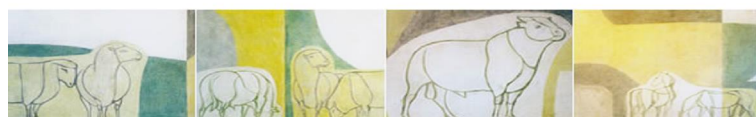


# Verifica dell' IS

Lo stato immunitario è stato valutato mediante un saggio di ipersensibilità ritardata (DTH)



Per la stima del DTH è stato valutato il rapporto tra lo spessore delle pliche cutanee corrispondenti ai punti di inoculo dell'antigene (PHA) e della soluzione salina usata come controllo.



## Parametri di laboratorio valutati e metodi diagnostici impiegati

**Conta Piastrinica** ( $\log_{10}/\mu\text{L}$ ) (contatore automatico Cell-Dyn 3700 ABBOTT)

**Diagnostica sierologica qualitativa e quantitativa** utilizzando il sistema su tre livelli (three tier system):

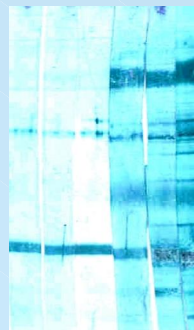
ELISA competitiva in house (C-ELISA) (*Amaddeo - 1998*)

**Valutazione quantitativa della risposta sierologica**

Test AGID con metodo Coggins (*Coggins et. al, 1972*) ed

OIE (OIE Diagnostic Terrestrial Manual, 2013)

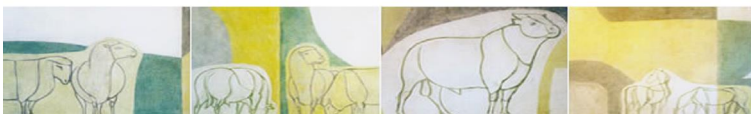
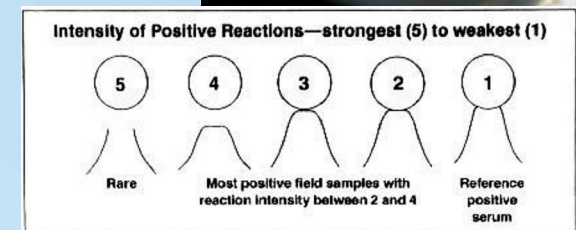
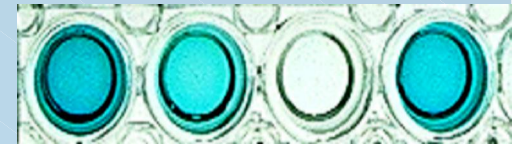
**IB** – (*Issel et. al, 1999*) –  
positivo se il campione mostra  
una banda in corrispondenza  
della p26 e ad almeno 1 delle  
altre 2 glicoproteine



gp90

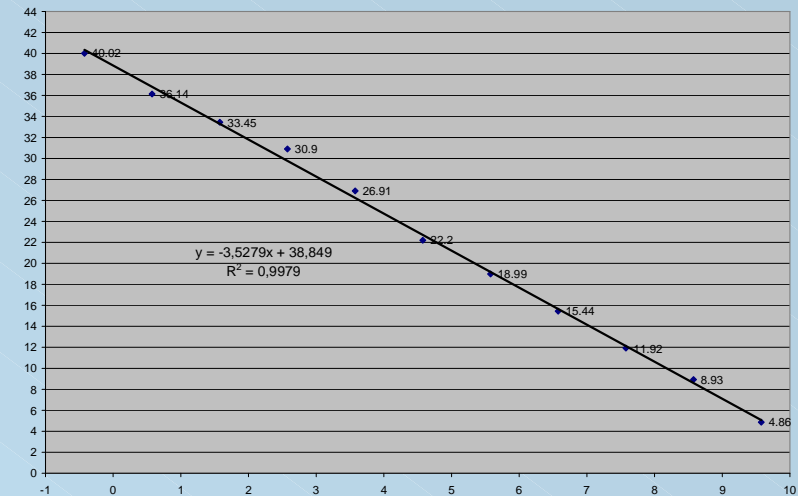
gp45

p26



# Sviluppo di una Real Time PCR quantitativa

Per la determinazione del numero di copie di RNA virale plasma-associato è stata impiegata una TaqMan® based **RT-PCR, diretta contro esone 1 del gene *tat***, utilizzando uno standard interno quantificato



**Primer disegnati - da Dott. F. Cook**

**MkIII Forward** : 5'-GGC GCC CGA ACA GGG ACC-3' (UK position numbers = 310-327)

**MkIII Reverse 1**: 5'-TGG CCA GGA ACA CCT CCA GAA GAC-3' (UK position numbers = 405-428)

**Probe LNA EIAV** : 5'-FAM -T+GA ACC T+GG +CTG ATC G+TA G+GA-3'BHQ 1

## Profilo della reazione

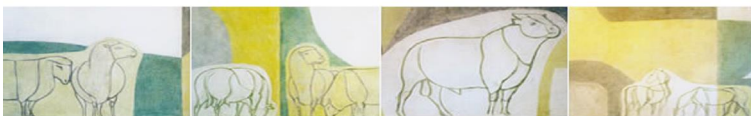
**1° fase – estrazione del RNA** - **140 µl di plasma**, utilizzando un estrattore automatico Qiacube® con Mini kit Viral RNA della Qiagen

**2° fase – sintesi del cDNA** - High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems®)

Thermal profile - 25°C for 10', 37°C for 120', 85°C for 5' & 4°C ∞

**3° fase - Real Time qPCR** - TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®)

Profilo termico - 50°C per 2', 95°C per 10', 50 cicli: 95°C per 15", 52°C per 30" e 60°C per 1', 72°C per 2'





# RISULTATI

## Reattività dei campioni di siero in AGID Identificativo Muli

Giorni Post-IS	10	2	4	9	1	5	8	7	3	6
-7	3	3	3	2	2	1	1	1	0	0
0	3	3	3	2	2	1	1	0	0	0
7	2	3	3	2	2	1	1	1	0	0
14	3	3	3	2	2	1	1	0	0	0
21	4	3	3	4	2	1	1	1	0	0
28	4	3	3	4	2	2	1	1	0	0

Alta reattività

Bassa Reattività

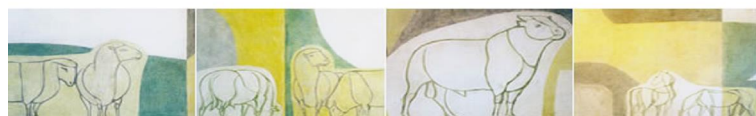
## Titolo limite in ELISA Identificativo Muli

Giorni Post-IS	4	10	9	2	1	5	8	7	3	6
-7	576	192	24	192	48	12	48	6	0	0
0	576	192	48	192	192	12	24	6	6	0
7	576	192	48	192	48	12	12	0	6	0
14	384	192	0	192	48	12	12	6	0	0
21	192	576	576	192	48	12	48	12	12	0
28	192	576	576	192	48	192	48	48	12	+/-

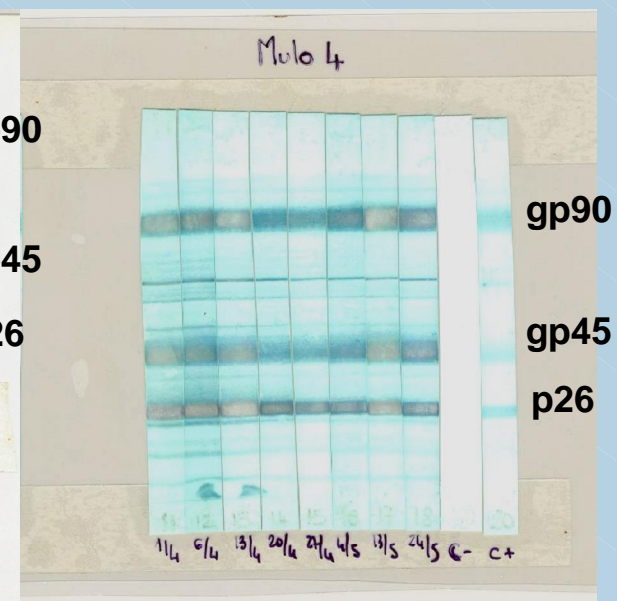
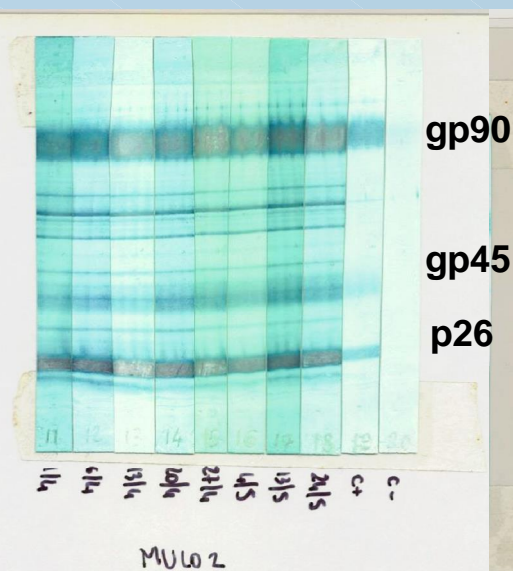
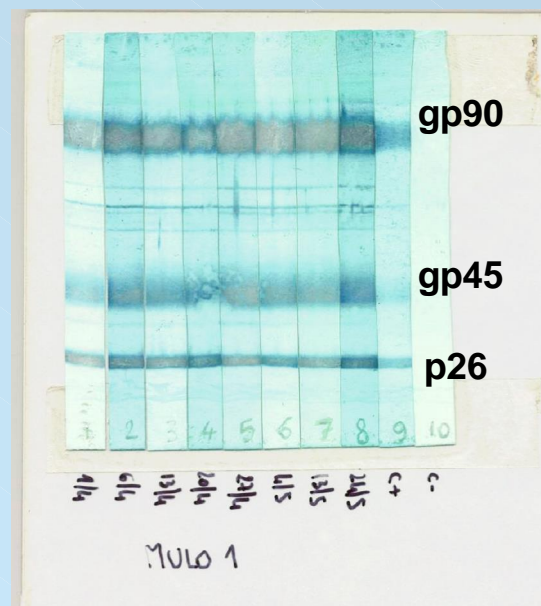
Alta reattività

Bassa Reattività

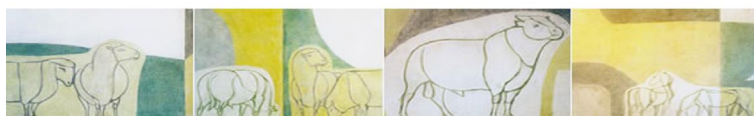
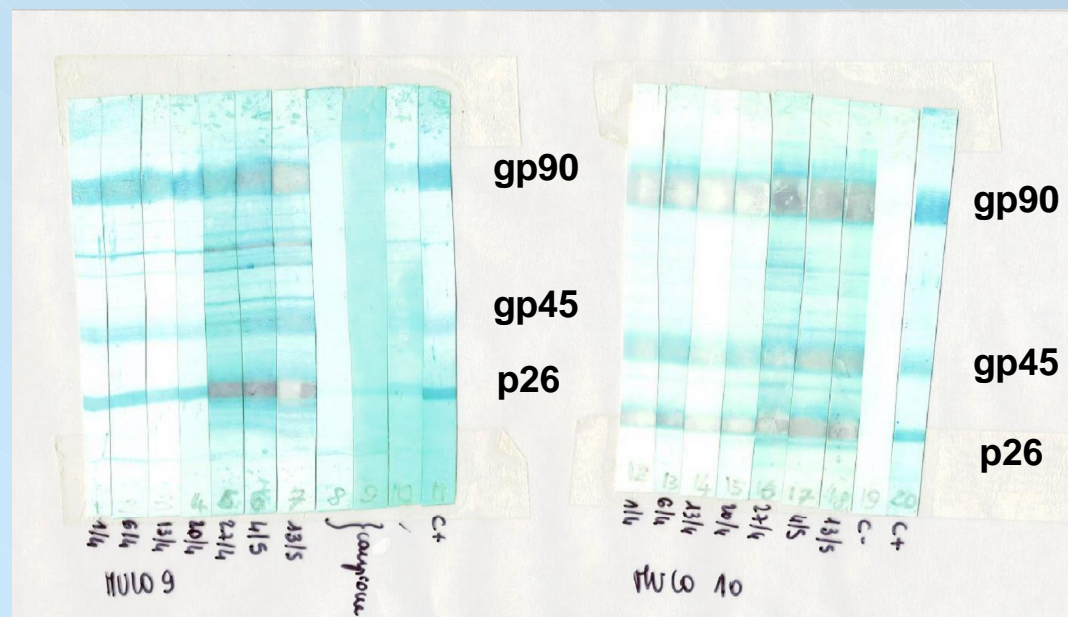
Esiti  
sierologici  
dell'AGID e  
dell'ELISA

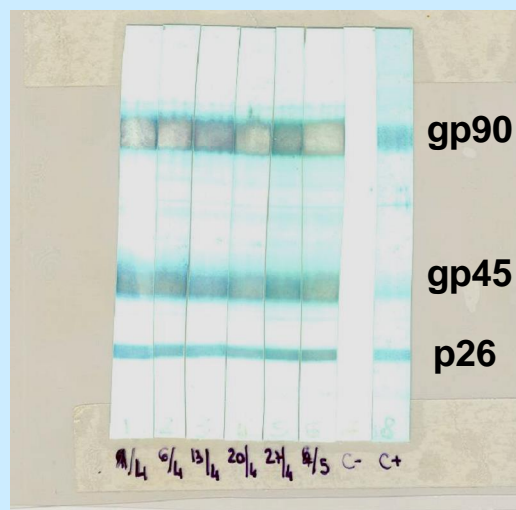




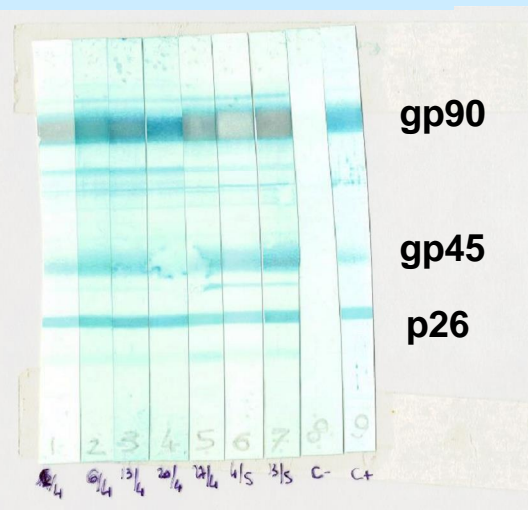


**Risultati dell'IB dei muli con una reattività evidente ai test AGID/Elisa**

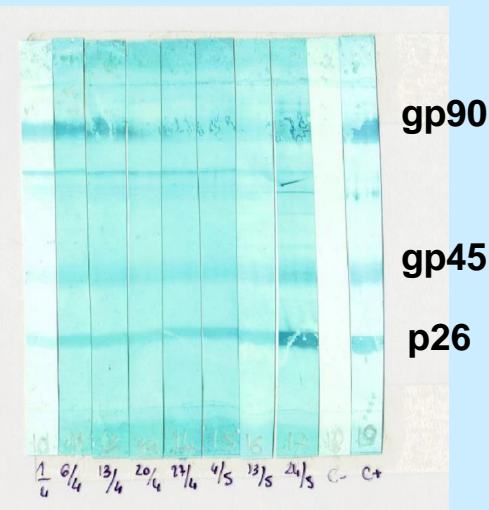




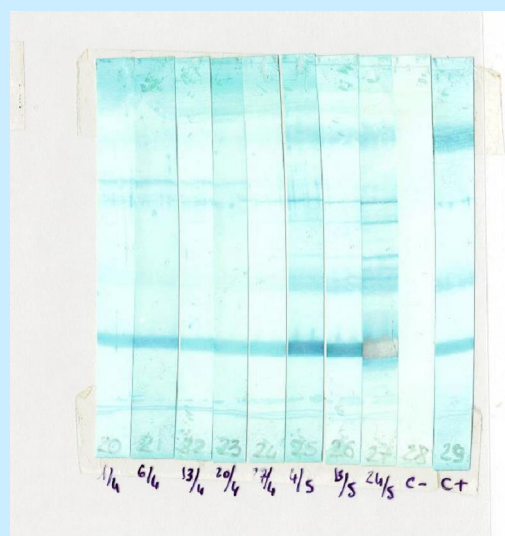
Mule 3



Mule 5



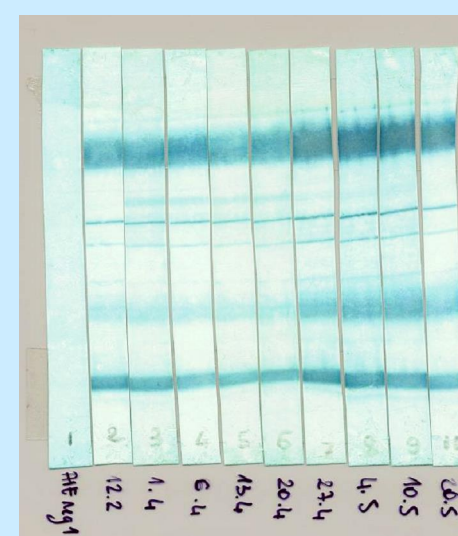
Mule 6



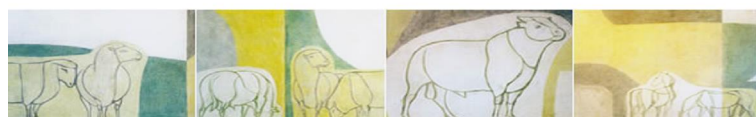
Mule 7

gp90  
gp45  
p26

**Risultati dell'IB dei  
muli con una bassa  
reattività ai test  
AGID/Elisa**

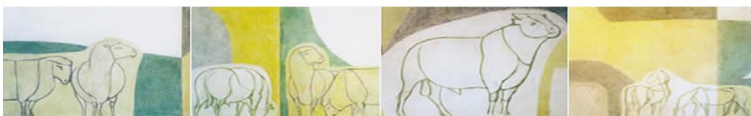
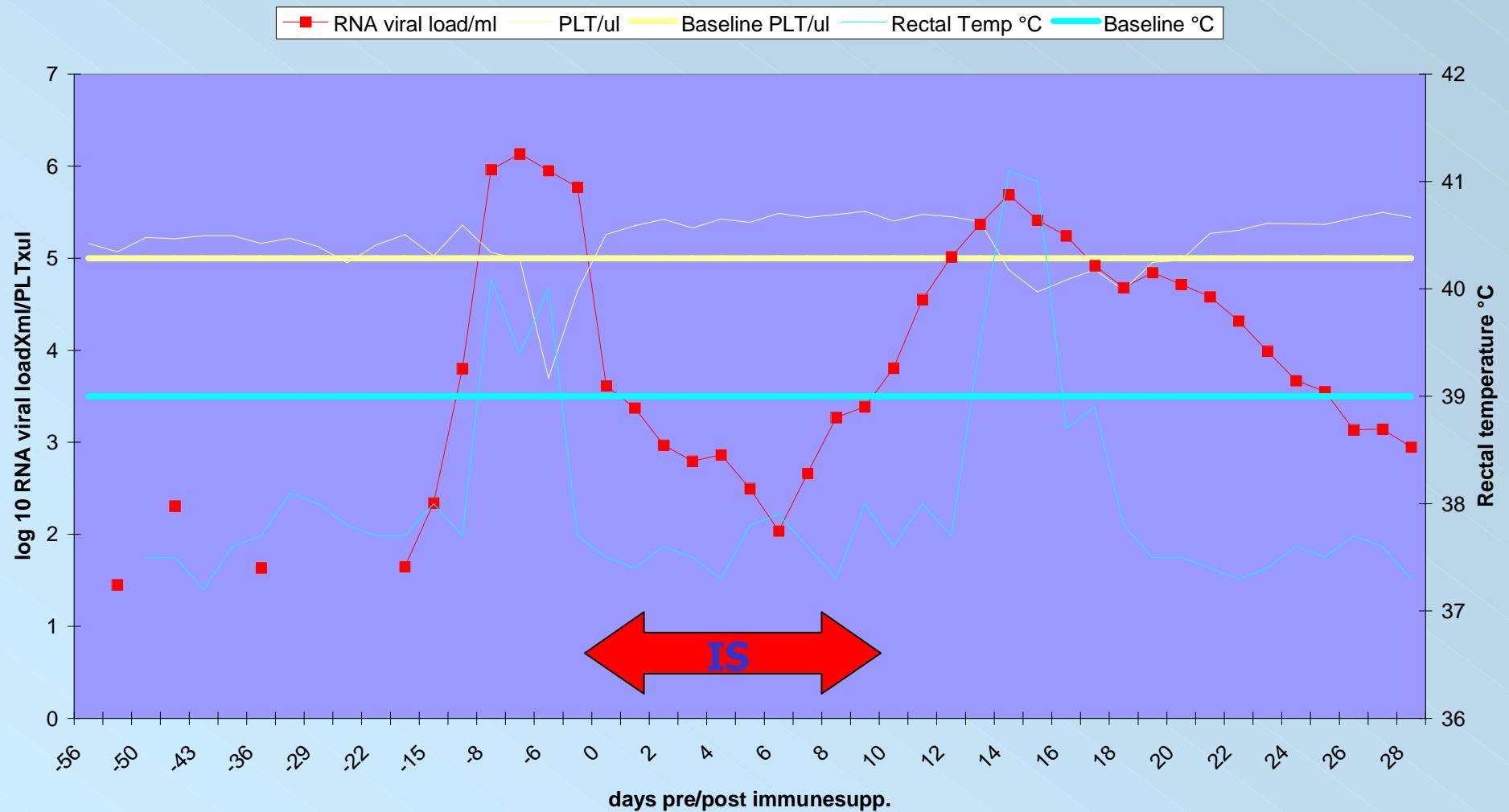


Mule 8

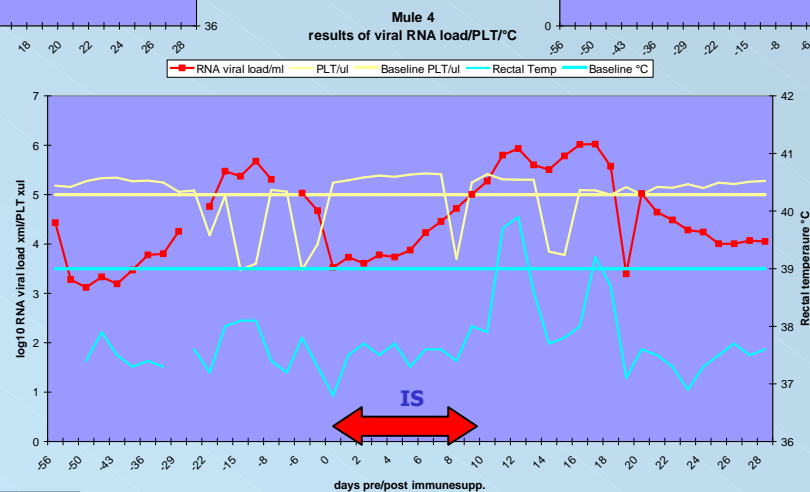
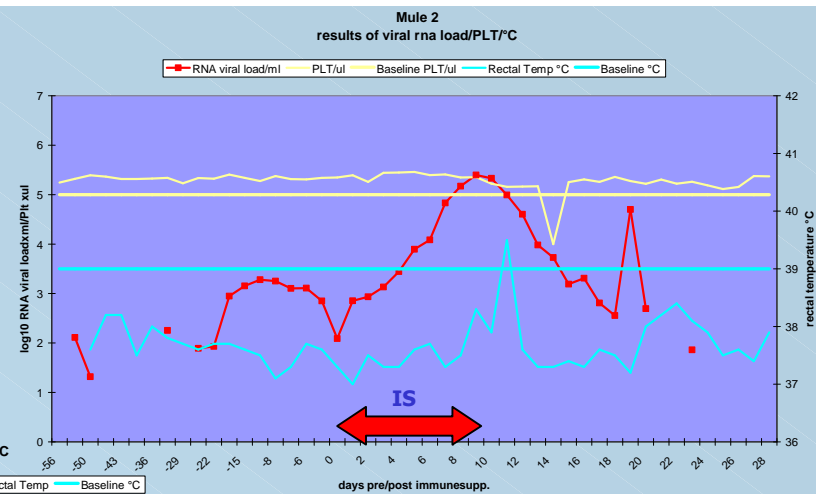
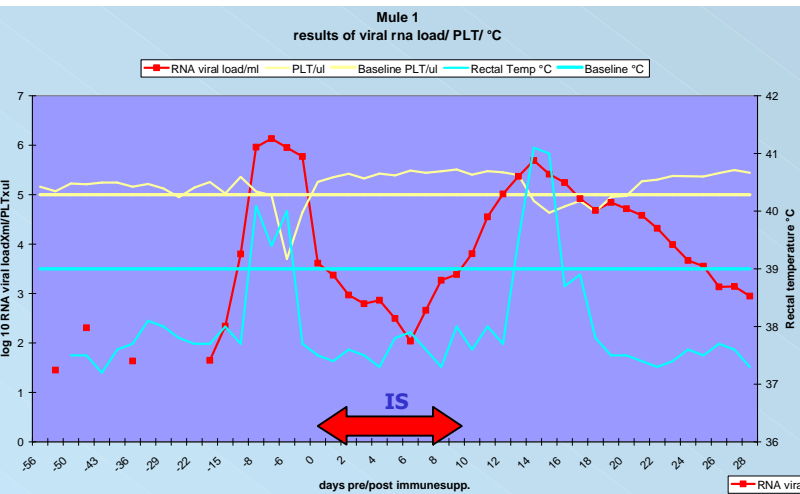


# RNA virale plasma-associato, conta piastrinica (plt) e temperatura (°C)

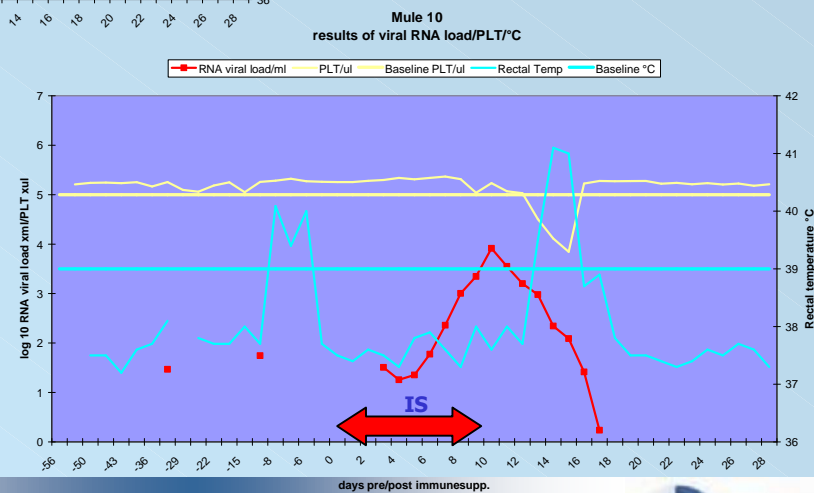
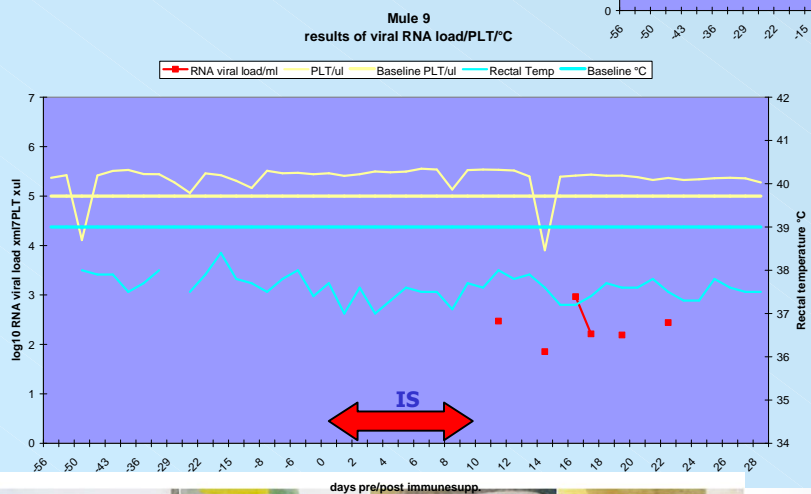
Mule 1  
results of viral rna load/ PLT/ °C

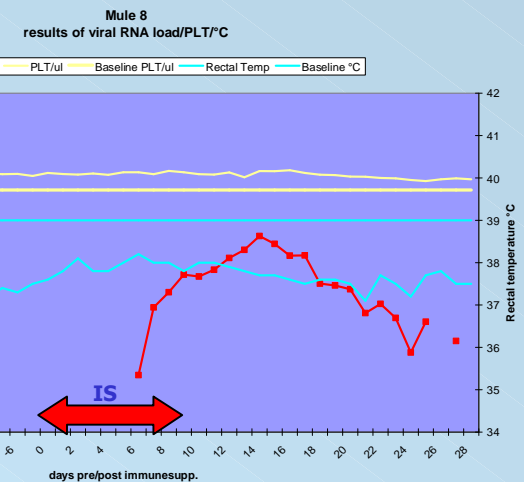
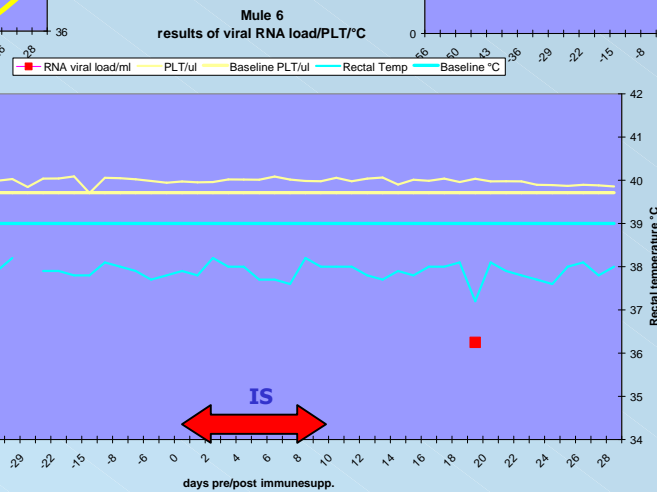
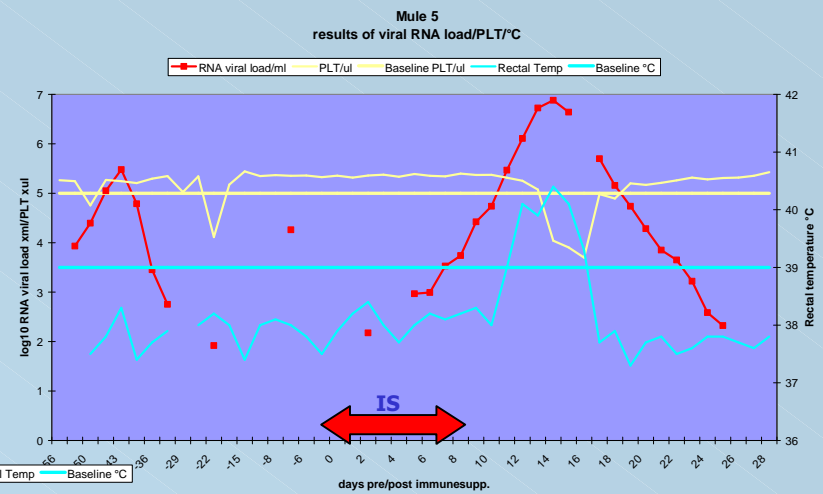
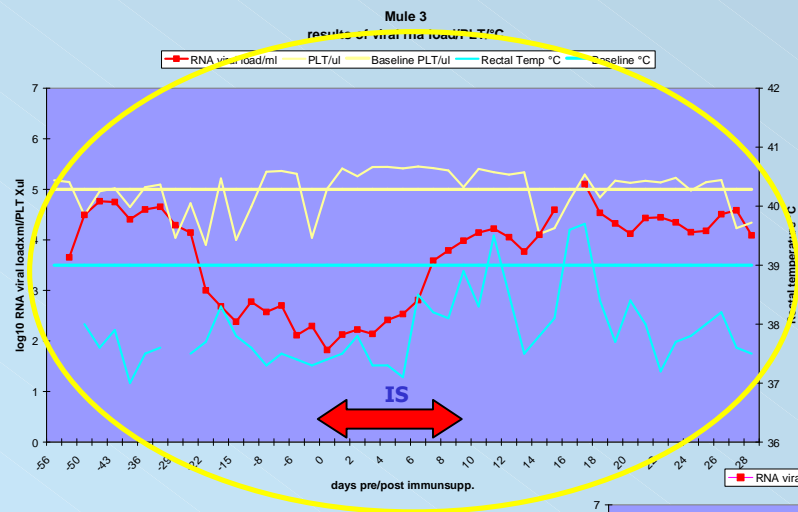




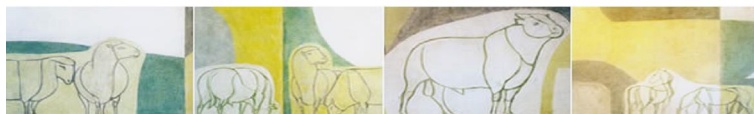
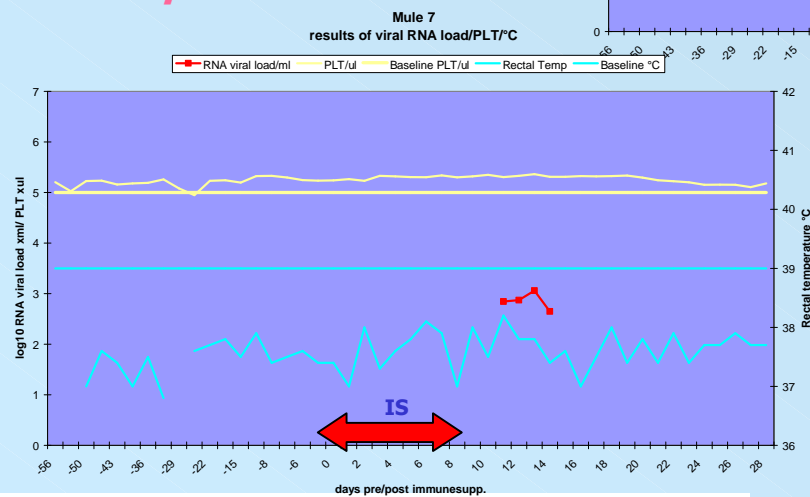


**Profili del RNA virale/plt/°C dei muli con una evidente reattività ai test AGID/Elisa**





**Profili del RNA virale/plt/°C dei muli con una bassa reattività ai test AGID/Elisa**



# Segni Clinici

D.P.IS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
9		H									
10										P	
11		A, D								P	
12		A									
13			A	D	A					A	
14		A	A	D						A	
15	D		A		J, P, D		D		D		
16			A, D	A	J			A			
17	D		D	D							
18	H	A	J	A		A			A	A	
19		A		A, J	A	A, J					
20	D	A	A, J	E, A	A	A		A	A		
21		A	A	E	A						
22		A			A						
23			D								
24		A			A				J		A
25			D	A, D							
26			D								
27		A			A						



febbre

trombocitopenia

febbre e trombocitopenia

A

D

P

febbre

depressione

polipnea

H

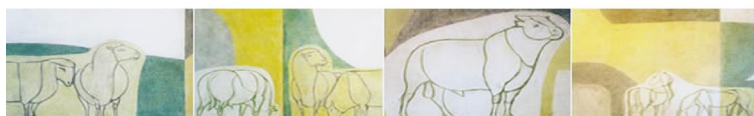
J

E

iperemia

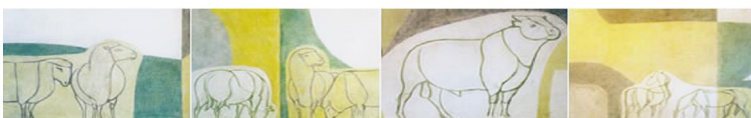
ittero

edema



## Altri risultati

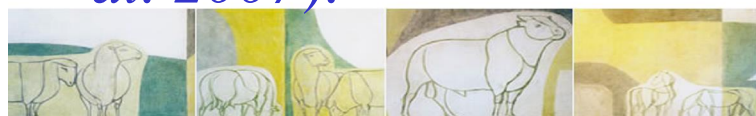
- Le sequenze nucleotidiche dei prodotti di PCR hanno confermato che tutti i muli erano infetti con il virus dell'AIE,
- Prima dell' IS, l'**RNA virale è stato rilevato in almeno un campione dei 7 muli**, tra questi, un animale con reazione AGID negativa (dovuta ad altre condizioni di stress ???),
- In alcuni soggetti, di cui 3 con bassa reattività all' AGID, abbiamo osservato una notevole variabilità dell'RNA virale plasma-associata nel tempo, con incrementi da **95 a 30.000 volte**, e differenze individuali significative in termini di durata (**impossibilità di definirne la durata avendo sospeso l'osservazione al quarto mese**),





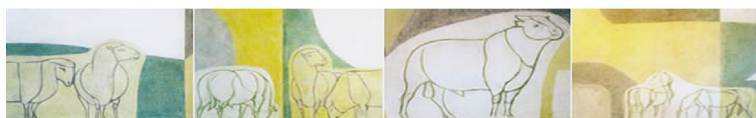
## Altri risultati

- Dopo l'IS per tutti i muli abbiamo rilevato **un incremento dell'RNA plasma-associato**, con valori che raggiungevano  **$\log_{10}6$  copie di RNA/ml per 4 muli**,
- **Solo 3 muli hanno avuto un incremento di 4 volte dei titoli anticorpale in C-ELISA e 2 soggetti sono rimasti AGID negativi** (1 dei quali anche C-ELISA negativo),
- **Non è stata rilevata nessuna correlazione tra trend virologico e risultati sierologici negativi in AGID, caratteristiche individuali & ceppi virali**,
- **Concentrazioni di genoma virale simili a quelle osservate in casi acuti di AIE in cavalli** (*Quinlivan M., et al. 2007*).



# CONSIDERAZIONI

- **segni clinici non specifici, transitori e non gravi** in tutti i muli → gli animali AGID negativi **non sarebbero stati rilevati in caso di sorveglianza sindromica,**
- animali con **reattività sierologica equivoca non possono** essere considerati a **rischio zero** di trasmissione dell'infezione.



# Ancora Considerazioni e Punti di Riflessione

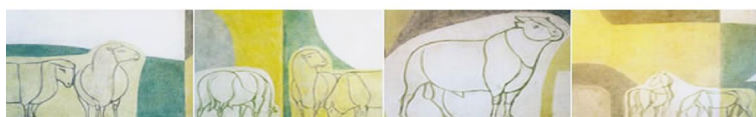
L' **utilizzo esclusivo del test di AGID** può classificare alcuni animali come **falsi negativi** e aumentare il **rischio di diffusione della malattia**

**La sola AGID o un sistema su 2 livelli (Elisa e AGID) insufficiente**

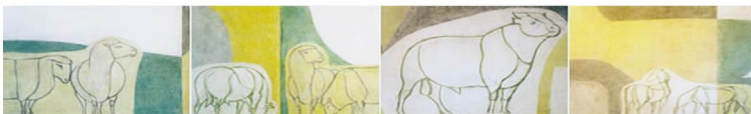
**Alto valore predittivo di test Elisa/IB positivi**

**Analoghe misure di biosicurezza per gli animali con risposta sierologica equivoca e soggetti positivi ...**

**Quale il costo (diretto e indiretto) di questi animali nel contesto di in un programma nazionale di sorveglianza?**

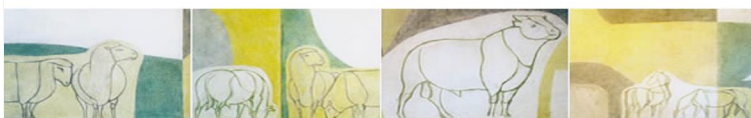


**Anemia Infettiva Equina.  
Studio  
dei principali fattori di rischio  
nei cluster geografici di  
infezione**



## Premessa per lo studio

- 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.**
- Tra i cavalli, la **prevalenza più elevata** è stata riscontrata tra gli **equidi detenuti in strutture ricreative o rurali** rispetto a quella osservata fra i cavalli sportivi.
- **AIE nei muli è risultato circa 50 volte superiore rispetto ai cavalli.** Tale situazione è particolarmente evidente nelle regioni dell'Italia Centrale - **possibile ruolo di questa specie quale serbatoio dell'infezione sul territorio nazionale.**



## **Obiettivo specifico**

**individuare**

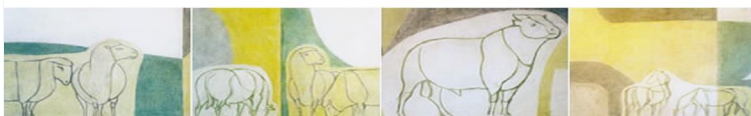
**tramite studi osservazionali (studio di caso controllo)**

**e tecniche classiche dell'epidemiologia analitica,**

**le variabili associate alla presenza dell'infezione**

**operando una raccolta sistematica di informazioni**

**sui fattori di rischio potenziali all'interno dei focolai di  
AIE ed in aziende di controllo negative.**

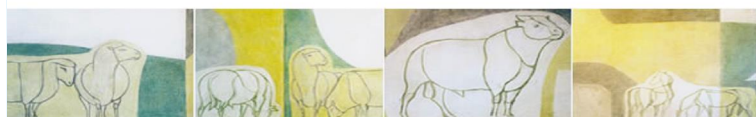


## Materiale e Metodi

E' 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 **operato un pre-test dei modelli informativi** per la raccolta dati in alcuni allevamenti campione, con la **finalità di individuare i quesiti incompleti o mal formulati, gli argomenti degni di maggior approfondimento**, ecc.

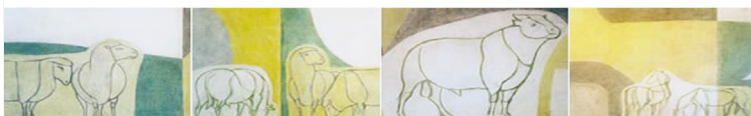
Sono stati utilizzati dei modelli informativi per la **raccolta dei dati epidemiologici** nell'ambito dei focolai individuati nell'ambito del PNS.





## In ricerche ancora in itinere si stanno:

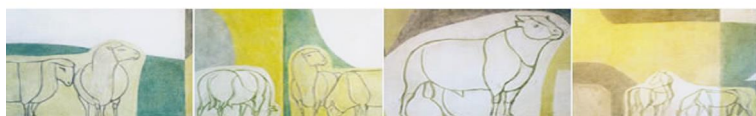
- **selezionando aziende di controllo** indenni da AIE ma simili ai focolai per localizzazione geografica, indirizzo produttivo, specie di equidi presenti.
- organizzando **catture di insetti vettori** mediante impiego di trappole collocate nelle aziende focolaio e controllo.
- **mettendo a punto sistemi informatizzati** per l'archiviazione ed elaborazione dei dati.
- si stanno raccogliendo, archiviando su supporto informatico, elaborando ed analizzando dei dati raccolti con i classici metodi della epidemiologia descrittiva ed analitica al fine di **individuare possibili variabili di rischio associate alla insorgenza, persistenza e diffusione dell'infezione.**



# Sulla base dei risultati ottenuti si è riformulato il nuovo piano di sorveglianza nazionale dell'AIE

## Principi

- Tutti gli equidi di età superiore a 6 mesi, ad esclusione di quelli esclusivamente destinati alla macellazione, devono essere sottoposti ad **almeno un test sierologico per AIE, nel corso della vita.**
- **I test devono essere ripetuti ad ogni passaggio di proprietà dell'equide** cui corrisponda una registrazione sul documento identificativo del soggetto ed in BDE.



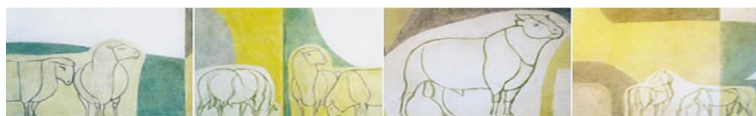
## **SORVEGLIANZA BASATA SUL RISCHIO - Principi per la categorizzazione delle aree**

### **Area a rischio elevato:**

- sia stato controllato meno del 60% (percentuale cumulativa) delle aziende registrate in BDN
- prevalenza dei focolai osservata nell'anno precedente sia risultata superiore a 0,5% (limite superiore dell'intervallo di confidenza)

### **Aree a rischio basso:**

- le Regioni e le Province Autonome non comprese tra quelle a rischio elevato

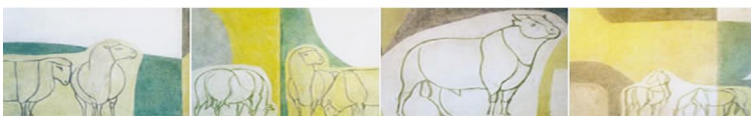


## **Area di sorveglianza attiva (ASA):**

- Si considera l'area avente raggio di 3 km dal limite di un nuovo focolaio incidente o di un focolaio prevalente di AIE.

## **Cluster di infezione (si applica in aree del territorio a rischio basso):**

- Sono costituiti da aree in cui siano presenti almeno 2 focolai di AIE incidenti e/o prevalenti ad una distanza massima di 10 Km.
- Il cluster potrà essere estinto quando tutti i focolai in esso presenti risulteranno estinti. In caso di persistenza di un singolo focolaio prevalente, saranno applicate le misure previste per l'ASA.

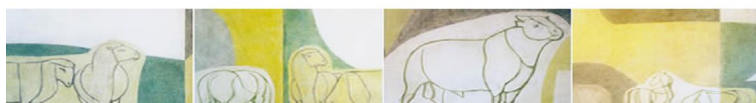


## LE ATTIVITA' DI CONTROLLO NELLE VARIE AREE

- a) **Aree a rischio elevato:** tutti gli equidi di età superiori ai 6 mesi, ad eccezione degli equidi da macello non destinati alla riproduzione, sono **sottoposti annualmente ad un test sierologico per AIE.**
- b) **Aree a rischio basso:** la sorveglianza sugli animali non destinati alla macellazione viene condotta **secondo quanto descritto inizialmente.**

Gli equidi mantenuti nelle aziende presenti nel **cluster di infezione e nelle ASA** devono essere sottoposti a un **test diagnostico di screening annuale fino all'estinzione dei focolai corrispondenti.**

- c) **Categorie a rischio:** Indipendentemente dalle sopraccitate categorizzazioni di rischio delle aree, sono sottoposti a **test diagnostico annuale tutti gli equidi da lavoro e quelli presenti nelle aziende che detengono muli.**  
Ai fini della sorveglianza sulle categorie considerate a maggior rischio, gli animali possono essere sottoposti a **prelievo presso gli stabilimenti di macellazione tutti gli equidi allevati in Italia.**





Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia?



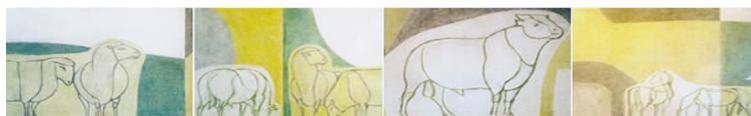
Maria Teresa Scicluna<sup>a,\*</sup>, Charles J. Issel<sup>b</sup>, Frank R. Cook<sup>b</sup>, Giuseppe Manna<sup>a</sup>, Antonella Cersini<sup>a</sup>, Francesca Rosone<sup>a</sup>, Raffaele Frontoso<sup>a</sup>, Andrea Caprioli<sup>a</sup>, Valeria Antonetti<sup>a</sup>, Gian Luca Autorino<sup>a</sup>

## Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia

C. J. Issel, M. T. Scicluna, S. J. Cook, R. F. Cook, A. Caprioli, I. Ricci, F. Rosone, J. K. Craig, R. C. Montelaro, G. L. Autorino

Veterinary Record (2012)

doi: 10.1136/vr.100735





**OSSERVAZIONI??????????**

