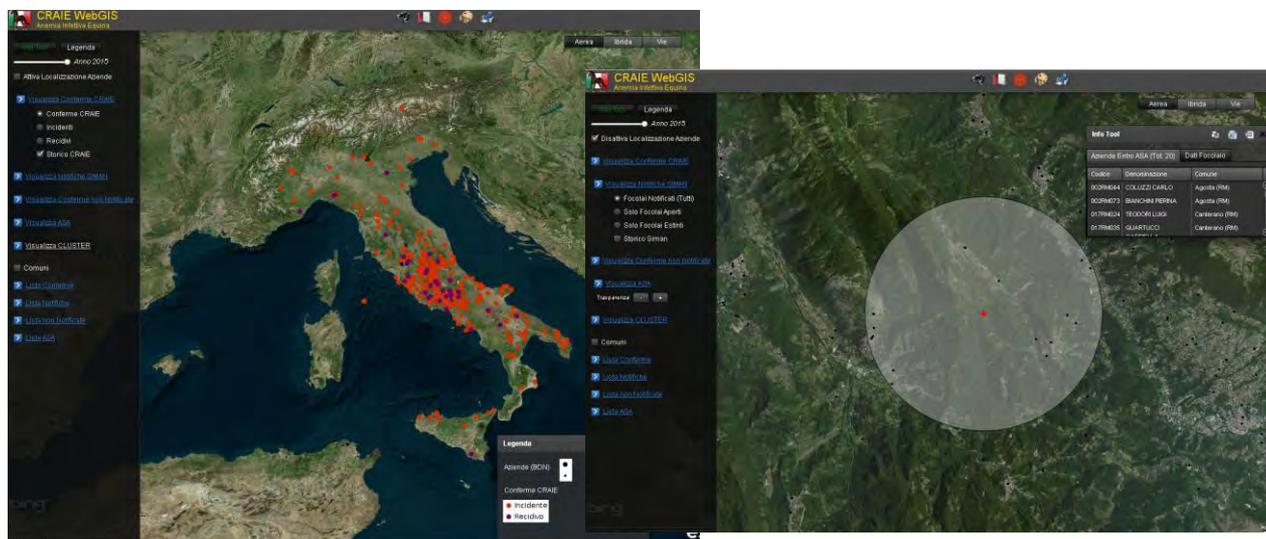


I criteri della sorveglianza dell'Anemia Infettiva degli Equidi definiti dal Decreto del 2 Febbraio 2016 "Piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo dell'anemia infettiva degli equidi"



Maria Teresa Scicluna

teresa.scicluna@izslt.it

Responsabile del Centro Referenza Nazionale Anemia Infettiva Equina

centroreferenzaaie@izslt.it

Anemia Infettiva Equina malattia virale diffusa in quasi tutto il mondo

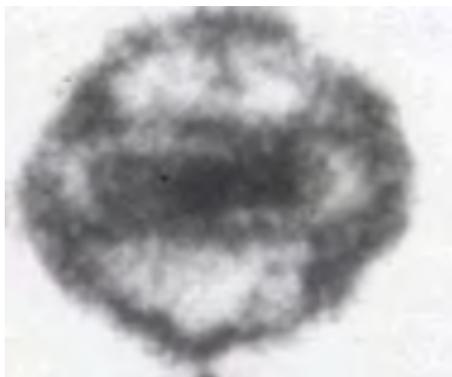
✓ Direttiva 2009/156/CE,
condizioni di polizia
sanitaria, che disciplinano i
movimenti di equidi e le
importazioni di equidi in
provenienza dai Paesi terzi

✓ Incluso nella Codice
dell'OIE insieme alle altre
10 malattie degli equidi

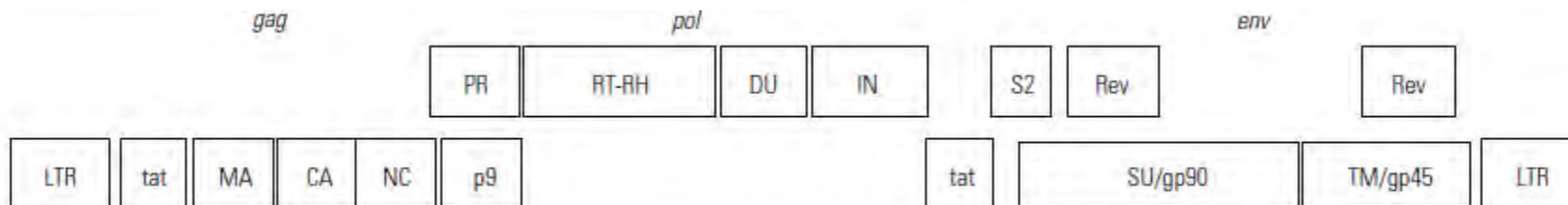
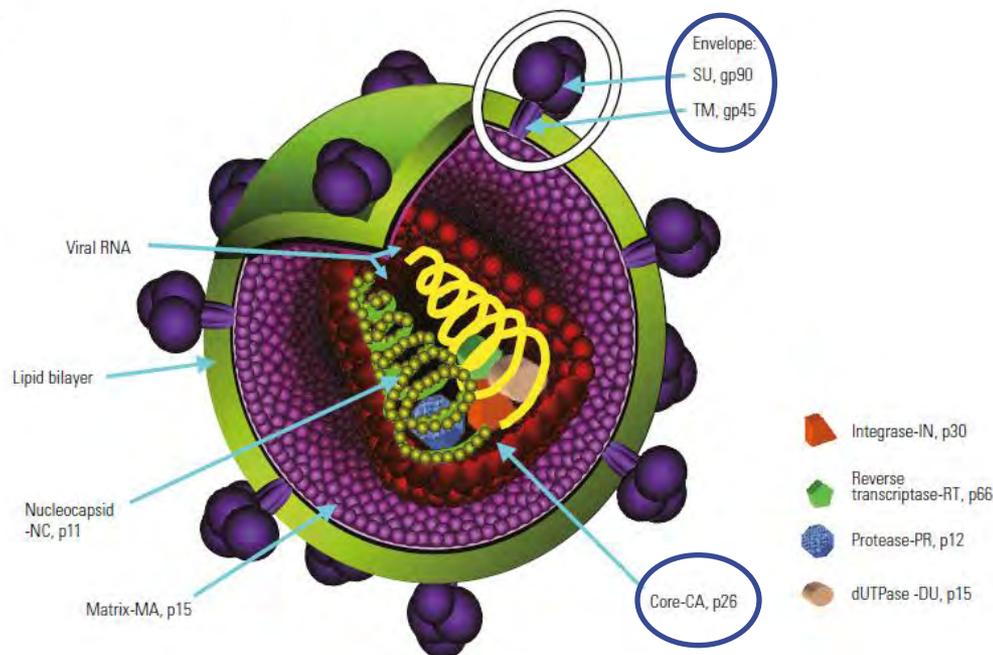


◁ Swamp fever - *Febbre delle Paludi* ▷

Il virus



a)



- ✓ Virus a RNA -Famiglia Retroviridae - genere lentivirus
- ✓ Unico sierotipo per la p26 gp45 e 90 - impiegati nella diagnosi
- ✓ Continue generazione di quasispecie virali responsabili anche della variabilità genetica del virus

Trasmissione dell'infezione -meccanica

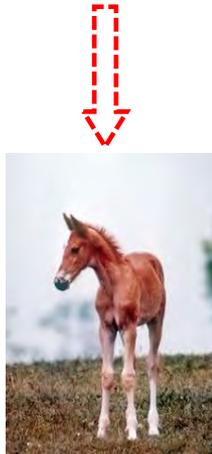
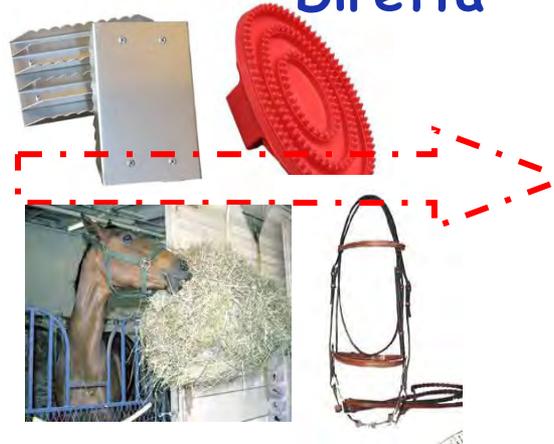
Tramite
vettore



Pasto interrotto

Indiretta

Diretta

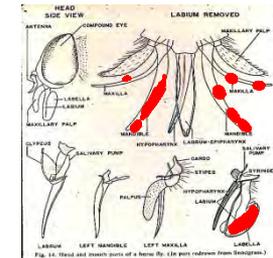


Iatrogena

Fattori che influenzano la diffusione del virus:

- ✓ Persistenza del virus negli equini
- ✓ Vita longeva dell'ospite
- ✓ Efficienza di trasmissione dipende dalla quantità di virus nel materiale infettante

Trasmissione Iatrogena



Ago - 10^{-1} a 10^{-3} ml

Tafano: 10^{-6} a 10^{-7} ml

- ✓ ago infetto può veicolare una quantità di sangue tra le $1000 - 10^6$ volte superiore a quella di un tafano
- ✓ nell'apparato buccale del vettore artropodi l'infettività si riduce del 99% ad 1h dal pasto, fino a scomparire dopo 4h
- ✓ negli aghi il virus infettante oltre 96h (Williams e al., 1981)

il rischio di trasmissione da interventi umani può essere più di 10^7 volte superiore alla rischio rappresentato dal vettore artropodo



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Major factors comparing vector potential for transmitting EIAV.

Parameter

Vector mouthparts

- Painful bites induce defensive behavior and interrupt feeding; this favors tabanids because of mouthpart design

Individual vector

- Blood on mouthparts: up to 0.00001 ml; probably less than 10% efficiency in transfer
- Virus content: up to 10 HID50 on mouthparts after partial feeding on acute case

Space and time

- Distance to second host important
- Likelihood of transmission decreases exponentially with increased distance from source after interrupted feeding
- Transit time: virus can remain viable on mouthparts for at least 30 min

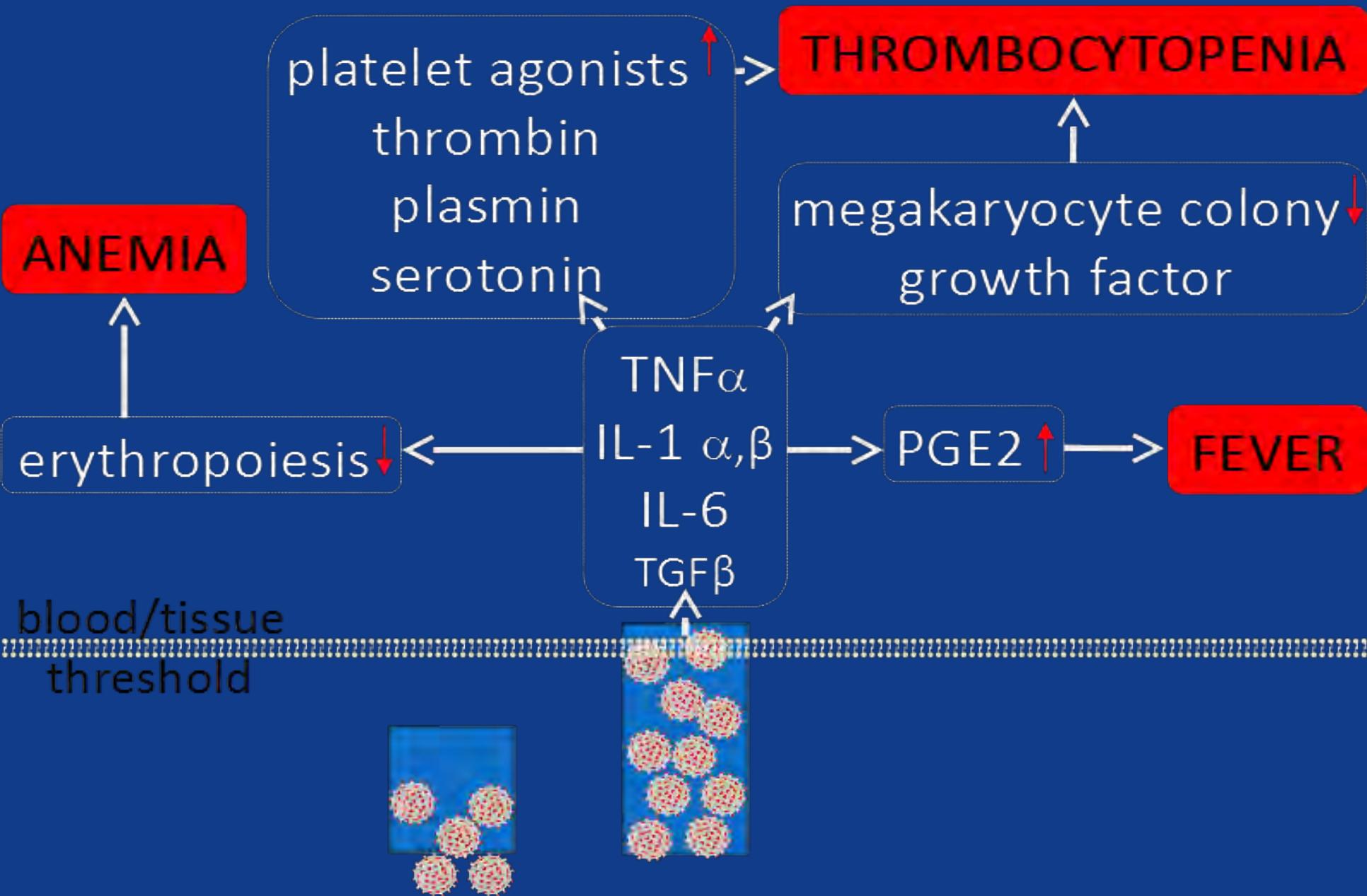
Summary	Vector group		
	Tabanids	Stableflies	Mosquitoes
Overall importance	Highest	High	Low to none
Rate of interrupted feeding	Highest	High	Low
Blood volume on mouthparts	High	Lower	Lower
Unassisted flight distance (actively seeking second host)	Longer	Shorter	Shorter



Tabanus sp.



Patogenesi della forma acuta di Aie



INCUBAZIONE: 15-20gg (4/5gg – 5 mesi)

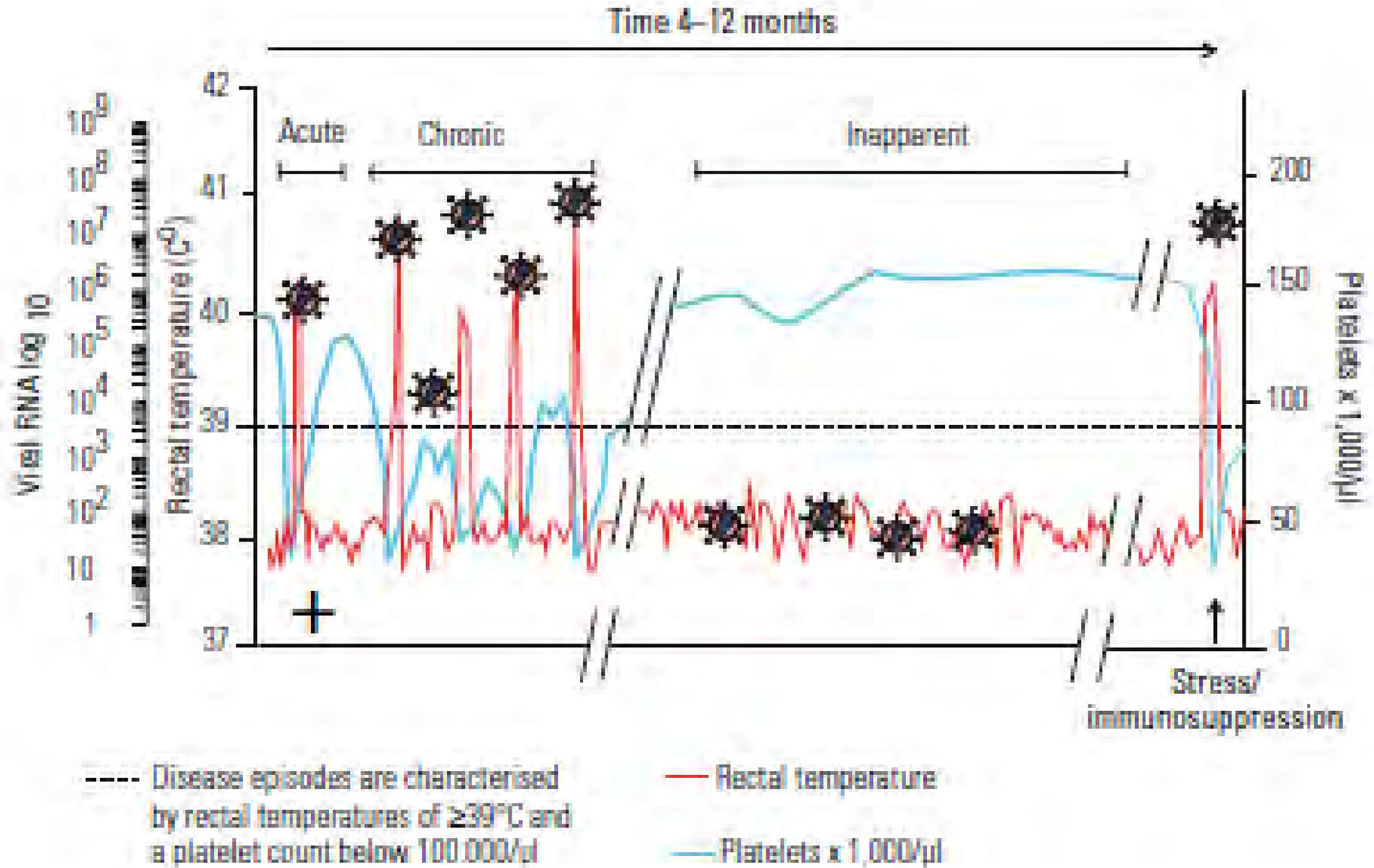
✓ Decorso: acuto/cronico/inapparente

sintomi legati a:

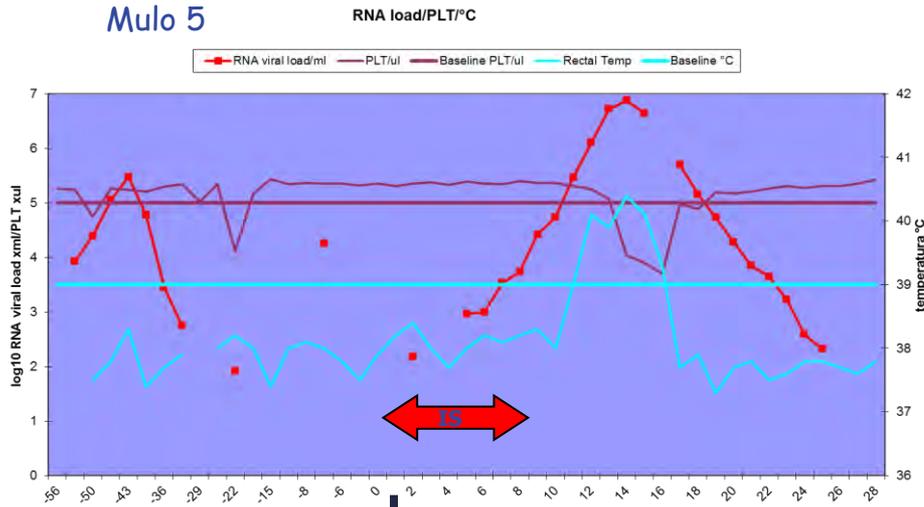
- ✓ specie; asino vs cavallo
- ✓ sensibilità individuale
- ✓ ceppo virale
- ✓ quantità di virus inoculato;



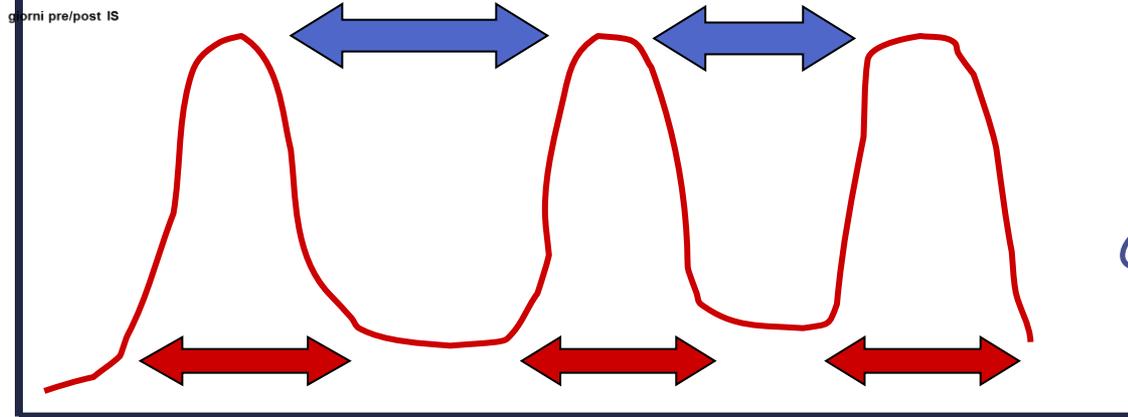
Evoluzione clinica di AIE



- ✓ Eventi stressanti (somministrazione di corticosteroidi, trasporto, modifiche ambientali, lavoro eccessivo ecc.) possono riattivare il ciclo viremico



Febbre e
viremia

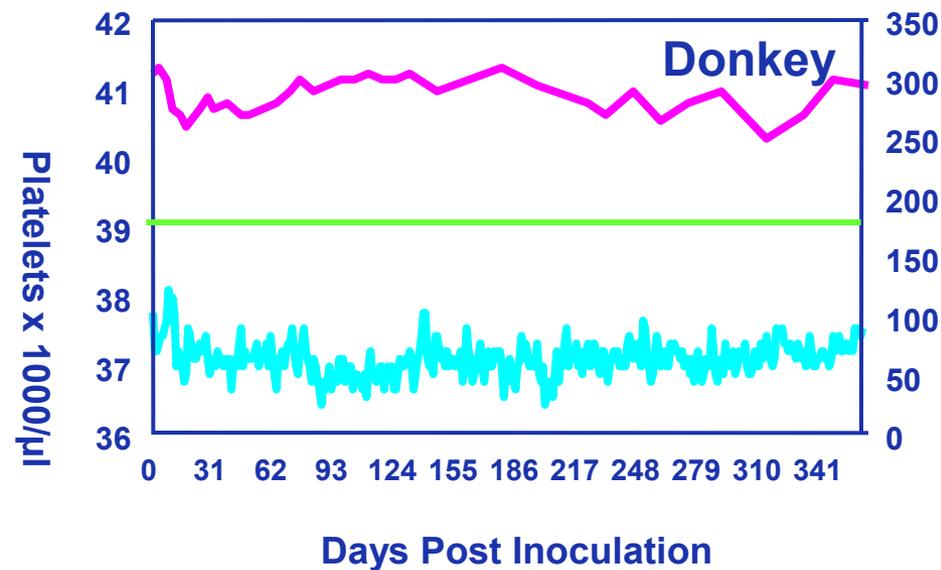
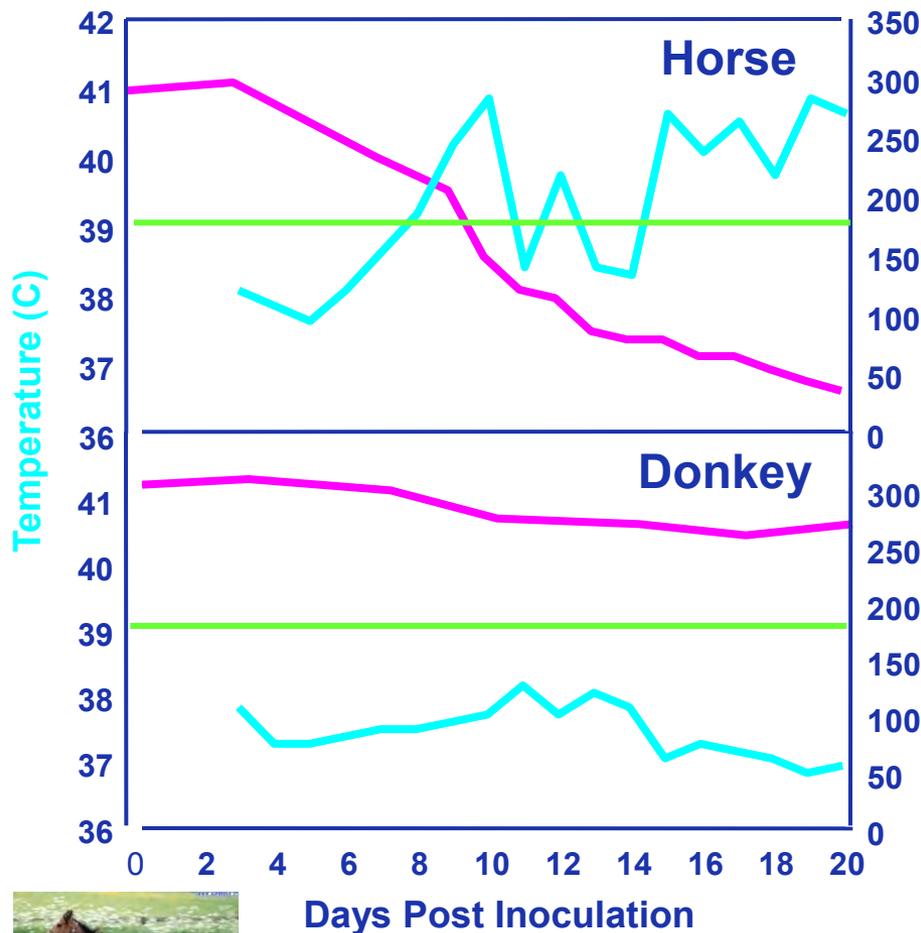


Fase
Infettiva

Cambiamenti
antigenici

Durante i picchi viremici: Febbre trombocitopenia, anemia e letargia

Differenze di specie



Cavalli - massima carica virale 20dpi = 1.9×10^8 *

Asini - massima carica virale 20dpi = 1.7×10^5 *

Muli - massima carica virale dopo riattivazione = 7.6×10^6 *

* Copie di RNA nel plasma



Segni clinici di AIE

Stadio	Segni clinici	Carica virale
Acuto	Febbre > 39°C Trombocitopenia letargia	Alta
Cronico	Febbre Trombocitopenia Petecchie emorragiche Anemia/Ittero Edema cachessia	Alta
Inapparente	nessuno	Bassa

AIE: rilievi clinici 1/3



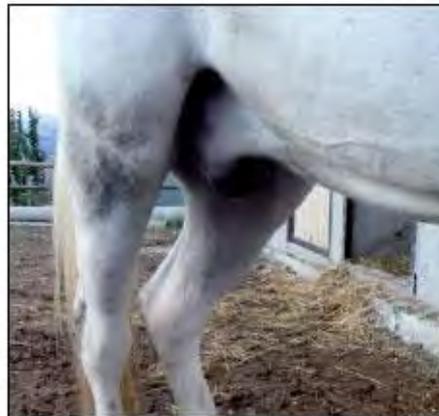


Petecchie emorragiche

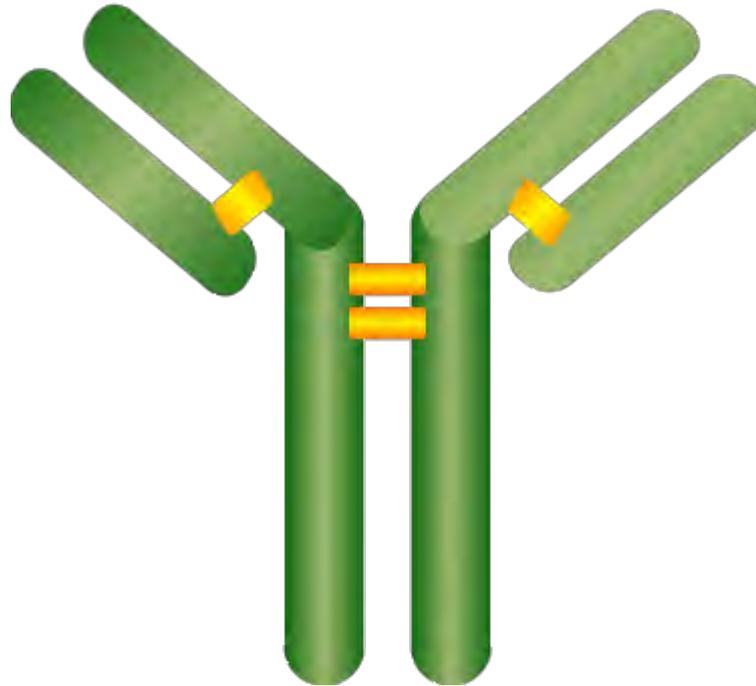


edema

AIE: rilievi clinici - 3/3



DIAGNOSI DELL'ANEMIA INFETTIVA



Major protein antigens of equine infectious anaemia virus used in current commercial test kits (all p26-based*)

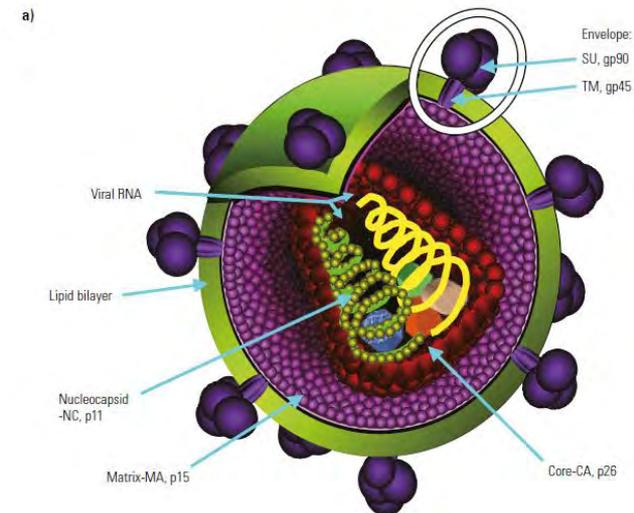
Molecular weight	Nomenclature	Tests using this antigen
p26	Core antigen	AGID, ELISA, immunoblot**
gp45	Transmembrane	ELISA, immunoblot
gp90	Surface unit	Immunoblot

AGID: agar gel diffusion

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

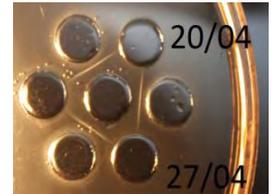
* One commercial ELISA kit includes p26 and a determinant of gp45, but a determinant between reactants is not made

** The immunoblot test is mainly a research test today but can detect immunoreactivity against all three major proteins of equine infectious anaemia virus

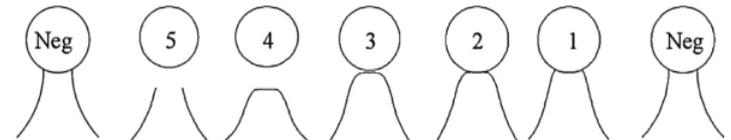


Risposta Immunitaria: ***periodo finestra 2-3 settimane***

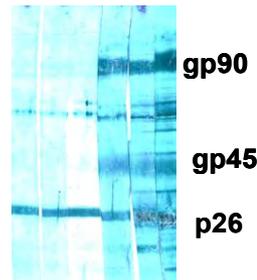
Screening - Tests ELISA anticorpi nei confronti dell'antigene p26
; 1 anche per gp45



Conferma -Agar Gel Immunodiffusione (Coggins test) Rileva anticorpi nei confronti dell'antigene p26 Correlato al test di inoculazione del cavallo



Esiti discordanti -Immunoblot impiegato in caso di esiti discordanti tra i test precedenti (α -p26, gp90 & gp45)

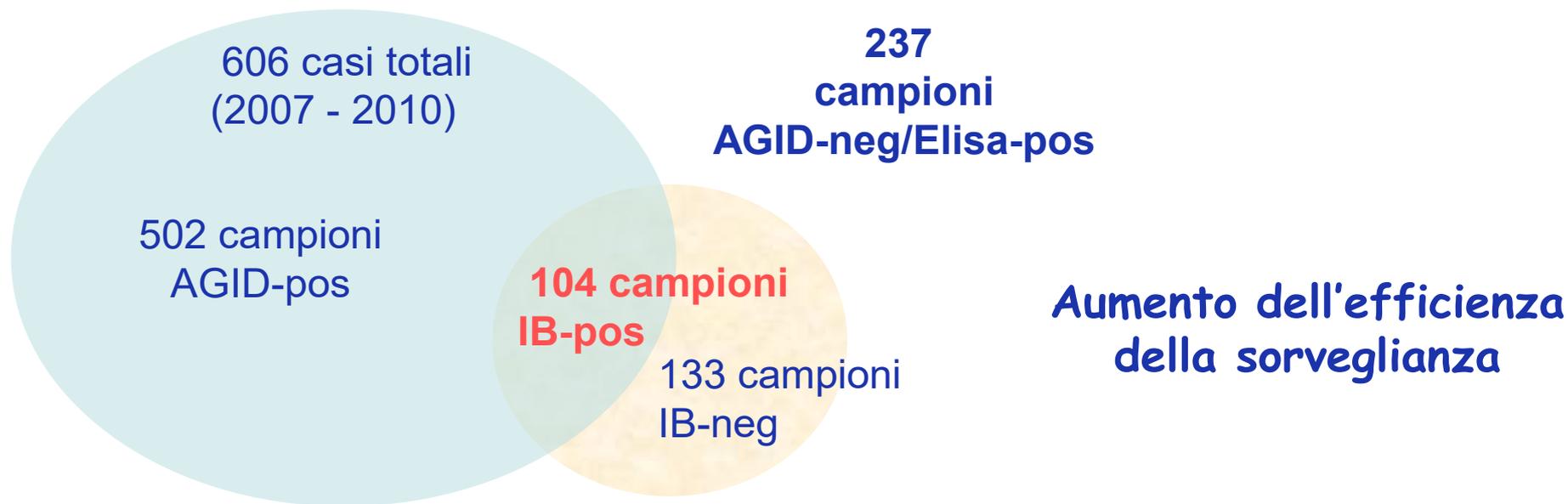


AGID: Bassa sensibilità – soggetti falsi negativi

Sensibilità dei metodi: Immunoblot > ELISA > AGID

Sistema diagnostico a tre livelli Novità del Piano Nazionale 2016!

Basato sull'uso in serie di diversi metodi diagnostici
in funzione della loro sensibilità e specificità!



Effetti dell'utilizzo dell'ELISA

N. casi confermati	Confermati in AGID	Elisa Pos/AGID neg	Confermati in Immunoblotting	casi persi senza ELISA
606	502	237	104 (44%)	104/606 (17%)



Evoluzione legislativo nazionale dell'AIE

- ✓ Sorveglianza: D.M.1976 controlli diagnostici su scambi, movimentazioni, qualifiche sanitarie e sospetto clinico; resto escluso;
- ✓ 1994, con il DPR n. 243, decade l'obbligo di controlli diagnostici
- ➔ ✓ Tornata all'attenzione nel 2006 per impiego di emoderivati infetti
- ✓ Piano sorveglianza – ORDINANZE 2006 al 2012
- ✓ **2013 -2015 - Vacatio Legis!**
- ✓ **2016 Nuovo Piano Anemia Infettiva Equina basato sul rischio**

Verifica dell'andamento del Piano Nazionale di Sorveglianza AIE 2007-2012

Fonte dati



04/05/2016 – Avviso: adeguamento dei nuovi flussi informativi nazionali relativi alla sorveglianza dell'AIE

Il 26-04-2016 è stato pubblicato su Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana (Serie generale n. 96) il Decreto Ministeriale del 2 febbraio 2016 "Piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo dell'anemia infettiva degli equidi".

Fra i nuovi moduli dell'allegato 1 vi sono le schede di prelievo campioni aggiornate che riportano 11 diversi motivi di prelievo. Si comunica che il CRAIE sta procedendo ad allineare le specifiche del nuovo tracciato record alle nuove disposizioni normative ed a breve fornirà indicazioni relativamente ai tempi ed alle modalità per l'aggiornamento dei flussi e della modulistica. Fino ad allora il flusso dati AIE rimane invariato.

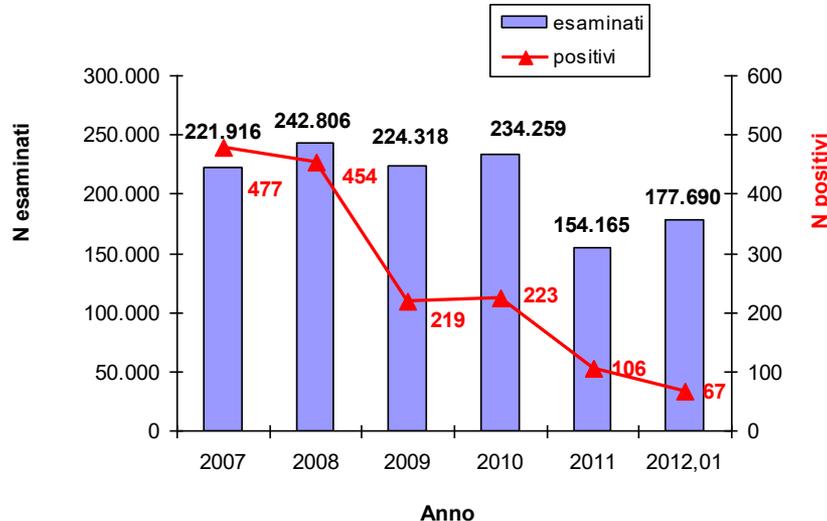
Grazie al lavoro delle:

✓ AA. SS. LL

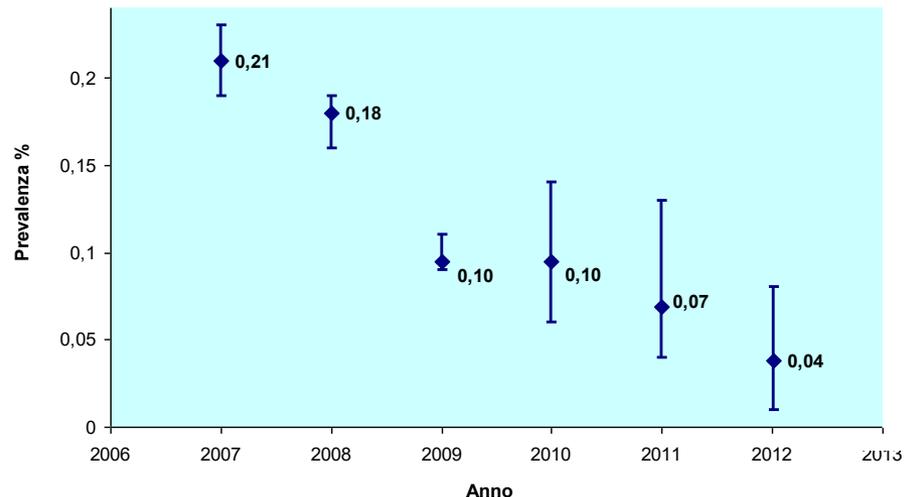
✓ II. ZZ. SS

✓ Osservatori Epidemiologici Regionali

CAVALLI



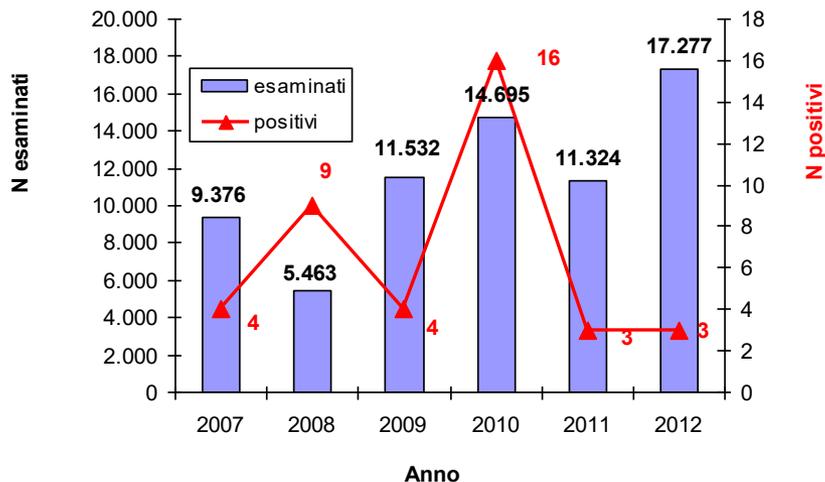
cavallo



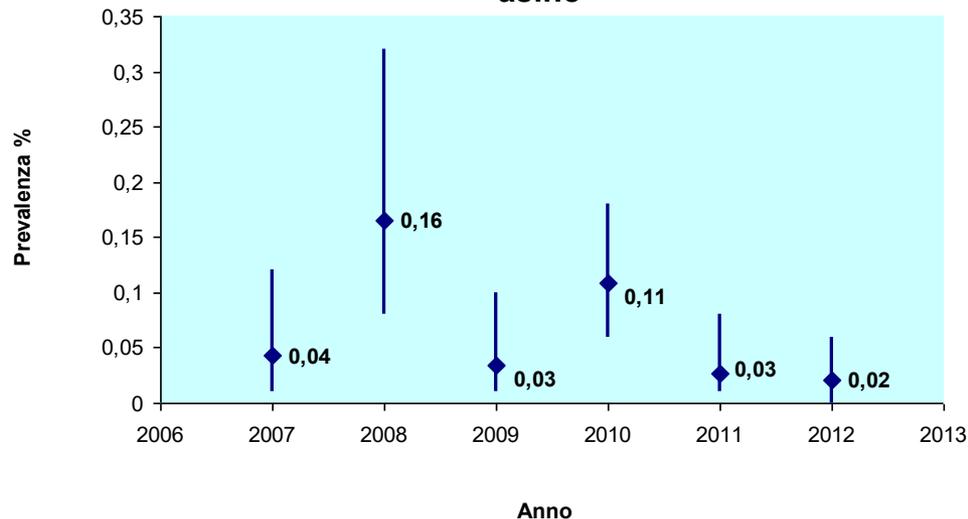
Pop. 2013 censimenti BDN (statistiche) 250.000

Stimata 400-600 mila

2007-2012: ASINI

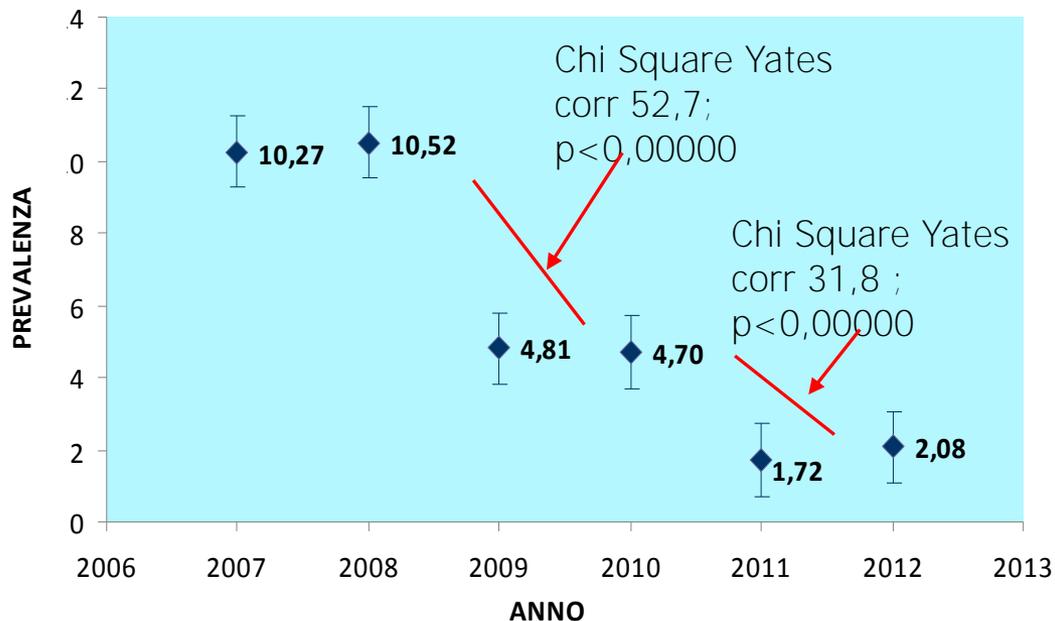
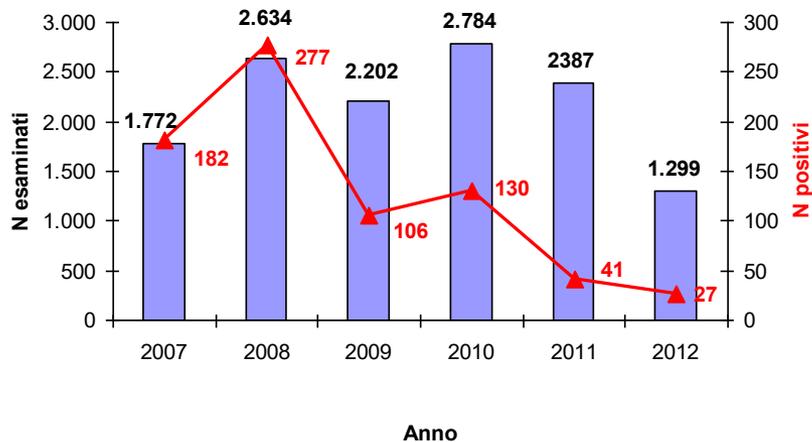


asino



- ✓ Primo biennio 2007-2008 campioni positivi "prevalenti" equidi mai testati prima
- ✓ Biennio (2009-2010) campioni positivi incidenti di equidi precedentemente testati e negativi

2007-2012: MULI



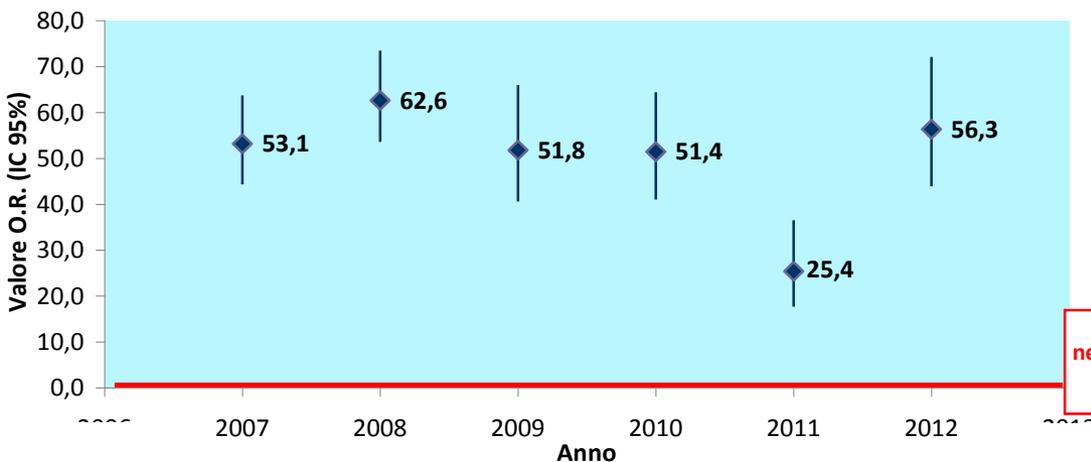
2007 – i muli positivi sono il 27% degli equidi positivi nazionale sebbene sono 0,76% del campione di equidi esaminati

Calo della Prevalenza il 2008

Rischio per Anemia Infettiva Equina cavalli vs muli

		campioni			O.R.	IC 95%	
		positivi	negativi	prevalenza %		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
2012	cavallo	67	177.623	0,04	baseline		
	mulo	27	1.272	2,08	56,3	43,9	72,04

Sierologia 2007-2012: Odds Ratio Muli vs Cavalli (campioni)



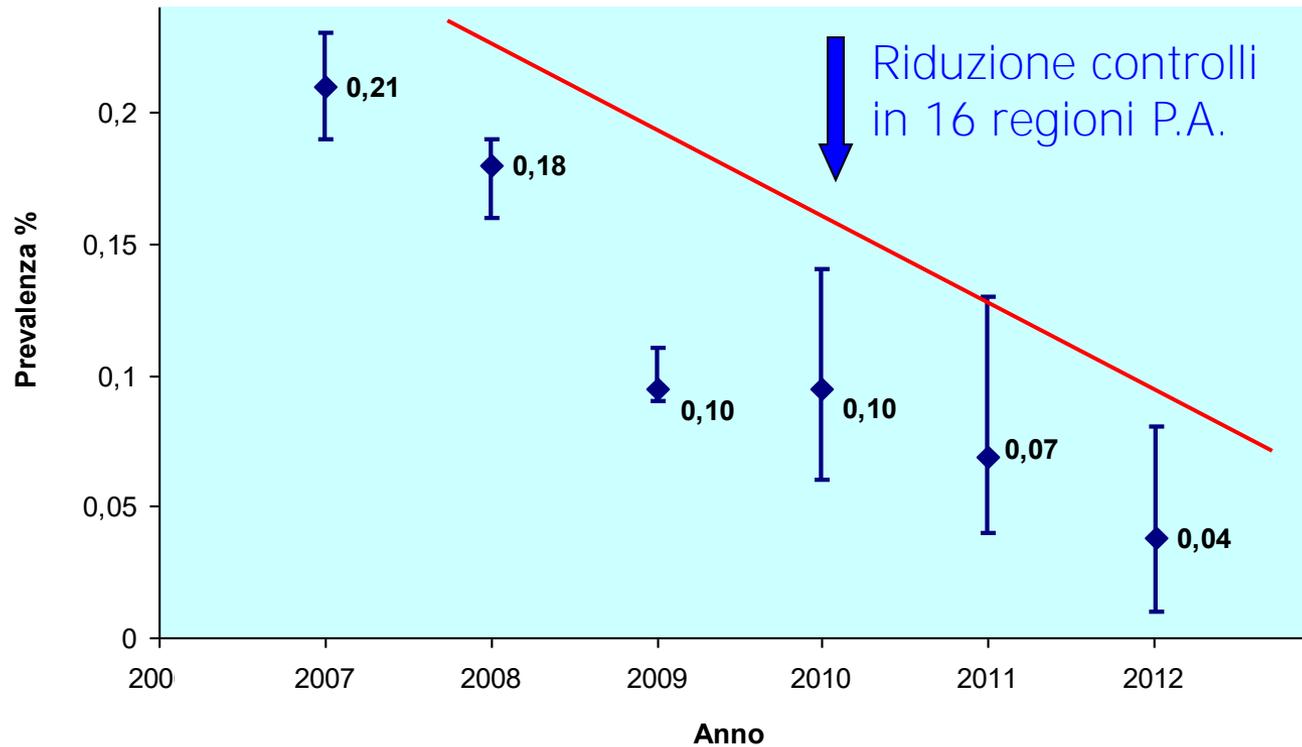
Per ogni annualità i muli hanno mostrato un rischio significativamente più elevato di risultare positivi per AIE rispetto ai cavalli

OR=1
nessun eccesso di rischio

Risultati 2007-2012

AIE - ITALIA: trend di **prevalenza equidi positivi** (IC 95%)

Cavalli



chi square for linear trends: 220,7; $p=0,00000$

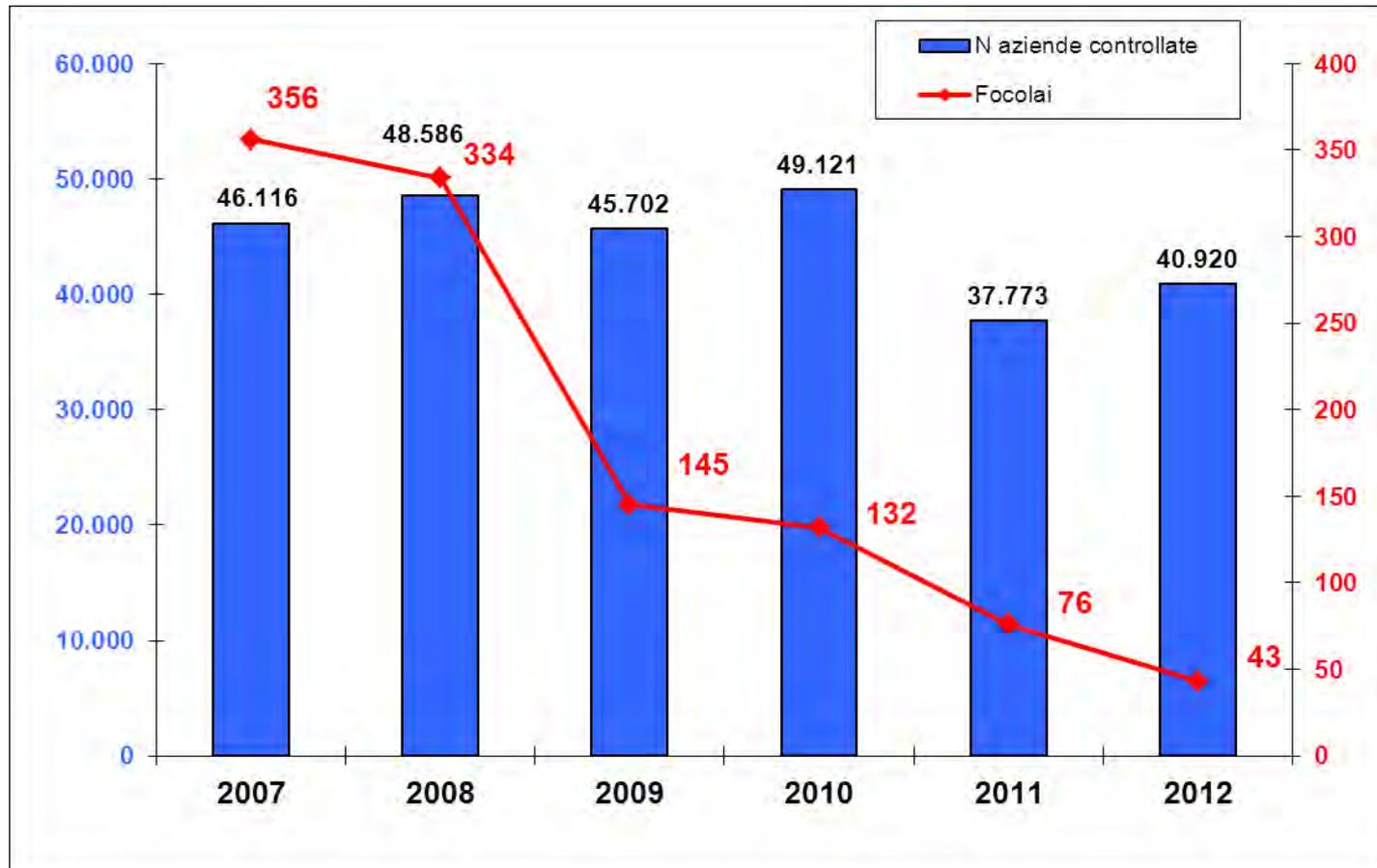
Risultati 2007-2012

numero di focolai & incidenza per azienda

ANNO	N° aziende Controllate	% controllate vs censite	N° focolai	Incidenza %	IC95%	
2007	46.116	38,1%	356	0,77	0,61	1
2008	48.586	40,1%	334	0,69	0,53	0,87
2009	45.702	37,7%	145	0,32	0,21	0,45
2010	49.121	40,5%	132	0,27	0,18	0,39
2011	37.773	30,8%	76	0,20	0,12	0,35
2012	40.920	33,3%	43	0,11	0,08	0,14
Cumulativa aziende testate almeno 1 volta	94.129	69,4%	1.086	1,11	1,09	1,23

Frequenza cumulata biennio 2011-2012= **0.191 %**

2007-2012 AIE - Italia: aziende controllate e N° focolai



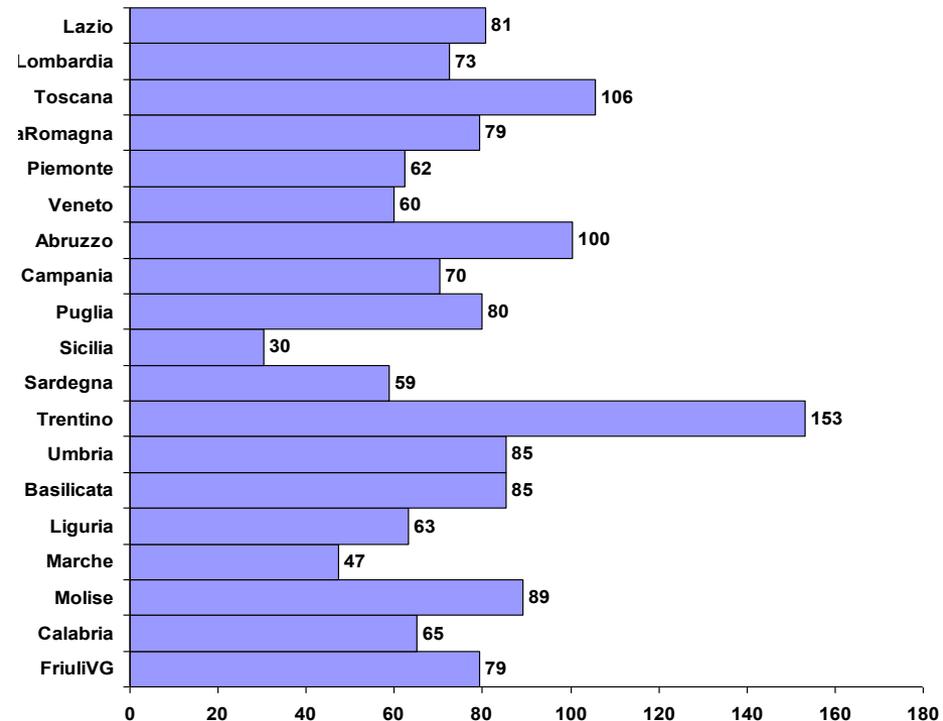
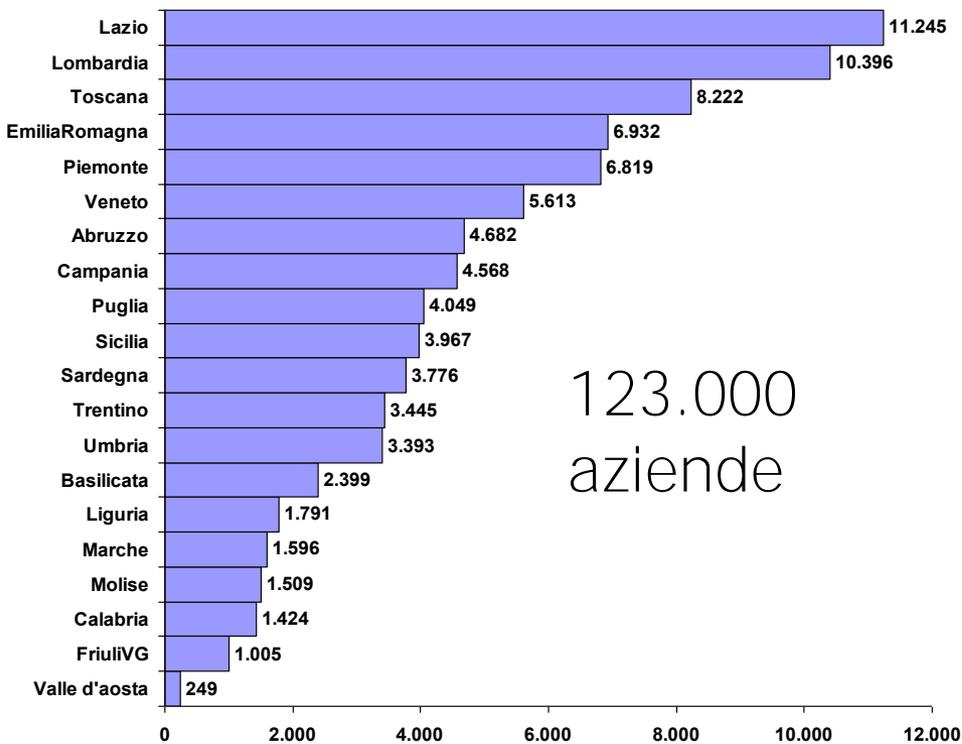
2007-2012: 1.086 focolai

Risultati 2007-2011

AIE - aziende controllate **almeno 1 volta** per regione disomogeneità nella sorveglianza

Frequenza cumulata aziende controllate

Proporzione cumulata (%) aziende controllate vs censite



Sorveglianza AIE basata sul Rischio

Nota 64642 08/10 del 09/04/2013



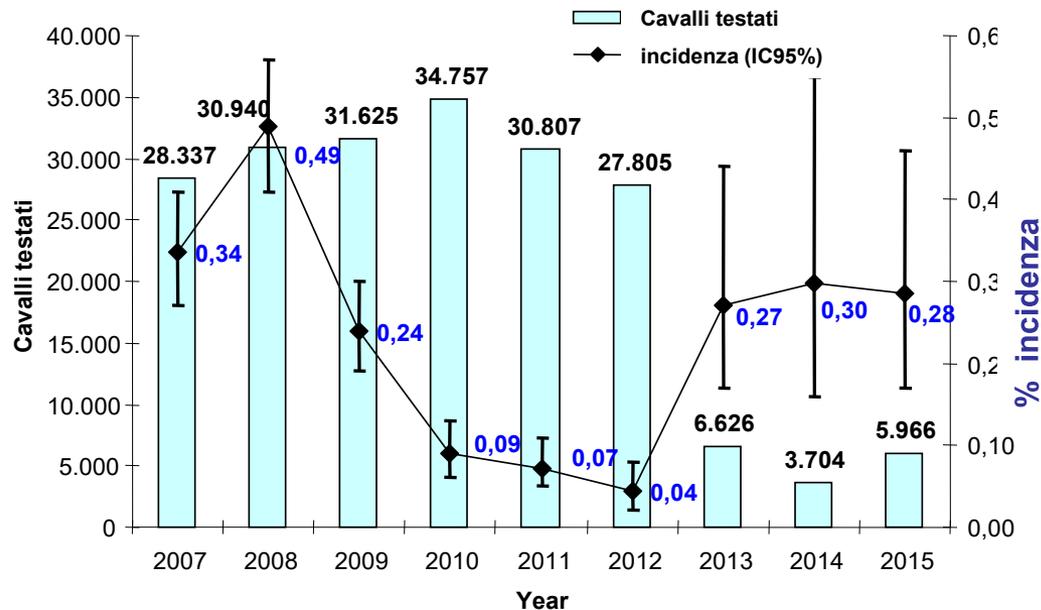
Dal 2013 - **Vacatio Legis!**

- Sorveglianza su base regionale e con strategie differenti da regione a regione

Regione Lazio adotta un piano di sorveglianza **basato sui fattori di rischio identificati dati sorveglianza 2007-2012** prevedendo il controllo di:

- ✓ **tutti gli equidi da lavoro;**
- ✓ **aziende con muli;**
- ✓ **animali mai testati;**
- ✓ **equidi macellati;**
- ✓ **equidi presenti all'interno di buffer di 3-km di raggio da focolai**

Sorveglianza Lazio 2007-2012 VS 2013-2015



N° medio di cavalli testati

2007-2012 = 30712

2013-2015 = 4835

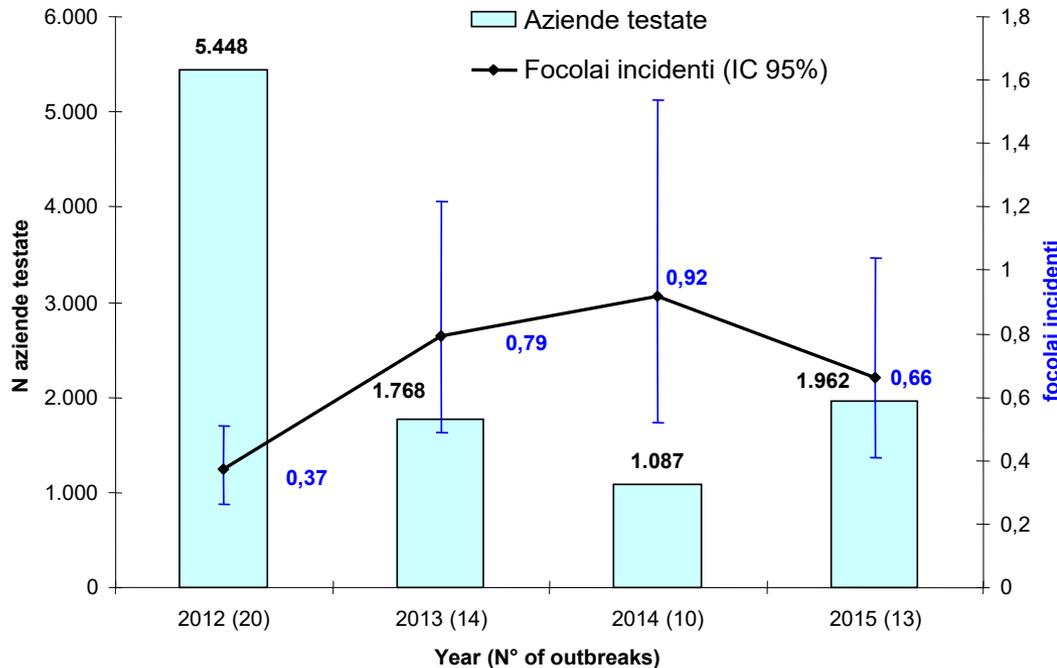
- 84% sorveglianza

Aumento casi incidenti rispetto al 2012

anno	positivi	negativi	exposure score	Odds Ratio
2012	12	27,793	1	1 (<i>baseline</i>)
2013	18	6,608	2	6.31
2014	11	3,693	3	6.90
2015	17	5,949	4	6.62

Chi squares for linear trends
in proportions 35.150
p level = 0.00000

Sorveglianza Lazio 2007-2012 VS 2013-2015



Numero medio di aziende testate

2007-2012 = 5687

2013-2015 = 1606

- 72%

Aumento di focolai incidenti VS 2012

anno	aziende positive	aziende negative	exposure score	Odds Ratio
2012	20	5,428	1	1 (<i>baseline</i>)
2013	14	1,754	2	2.17
2014	10	1,077	3	2.52
2015	13	1,949	4	1.81

Chi squares for linear trends
in proportions 4.280
p level = 0.038

Sorveglianza basata sul rischio della regione Lazio 2013-2015

10.6% (min 5.8 - max 16.5) di tutti gli equidi testati in Italia

58.9% (min 51.3 - max 66) di tutti gli equidi positivi (79/134)

10.8% (min 6.5 - max 16.1) di tutte le aziende testate in Italia

54.4% (min 38.5 - max 76.5) dei focolai di AIE (37/68)

Sorveglianza basata sul rischio Lazio 2013-2015 – Mattatoio

aziende

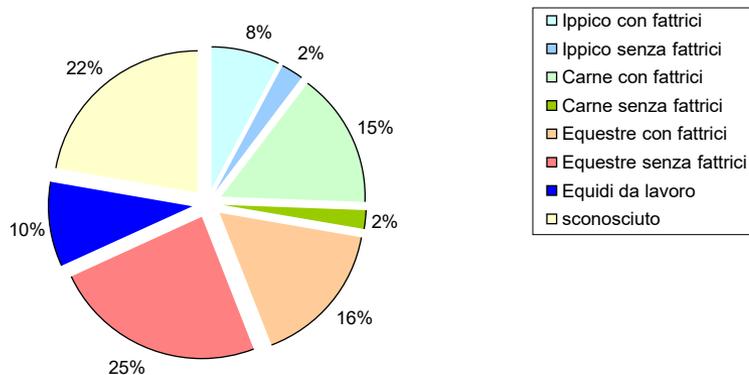
anno	testati	Positivi	già positivi prima	Positivi al macello	Toale positivi della sorveglianza
2013	253	0	0	0	14
2014	342	6	4	2	10
2015	290	8	6	2	13
2013-2015	885	14	10	4	37

- 37.8% di aziende positive (14/37)
- 10/14 focolai precedentemente rilevati in azienda
- 4/37 focolai non rilevati durante la sorveglianza (11% del totale dei focolai degli anni 2013-2015)

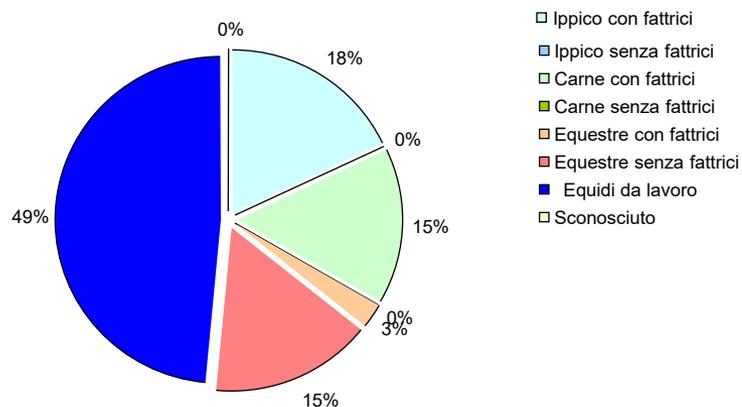
Sorveglianza Lazio 2013-2015

Categoria di azienda

Lazio 2013-2015: aziende tesate suddivise per categoria



Lazio 2013-2015: focolai suddivisi per categoria



Categoria di aziende	N° focolai	aziende negative	Totale
Equidi da lavoro	19	472	491
Altre categorie	18	4,584	4,602
Totale aziende	37	5,056	5,093

O.R. 10.25 (5.23-18.52)

Fisher exact test = 0.0000000

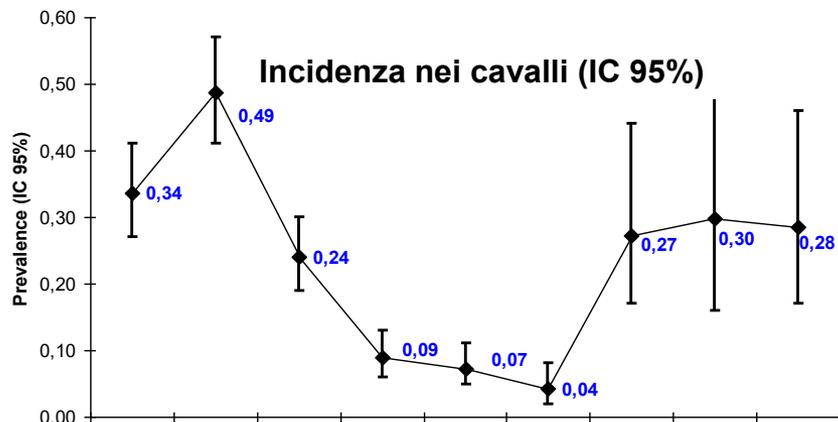
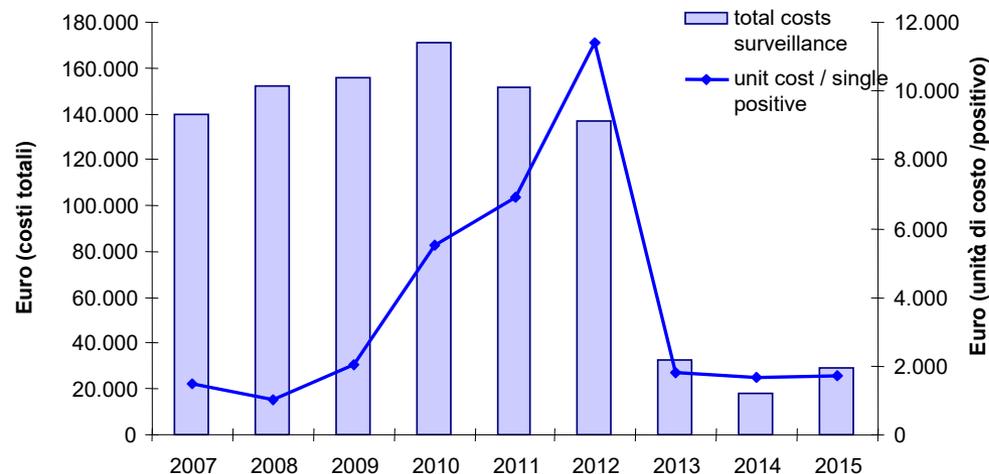
Probabilità di nuovi focolai di anemia è **10 volte maggiore** nelle aziende con **equidi da lavoro rispetto** ad altre categorie

Sorveglianza Lazio 2013-2015

Analisi dei Costi



**Lazio EIA 2007-2015: costi della sorveglianza nei cavalli
(raccolta prelievi e sierologia)**



Costi annuali della sorveglianza
(media)

2007-2012 = 160.720

2013-2015 = 30.299

- 81%

Costo unitario / singolo positivo
(media)

2007-2012 = 2874

2013-2015 = 1.151

Costo unitario / Popolazione (media)

2007-2012 = 3.21

2013-2015 = 0.61

**DECRETO 2 febbraio
2016 - Piano nazionale
per la sorveglianza ed il
controllo dell'anemia
infettiva degli equidi.**

**GURI Serie generale n. 96
del 26/4/2016**

Limitare la diffusione
dell'infezione.....



Adeguare sorveglianza in funzione
del livello di rischio di diffusione
dell'infezione a livello territoriale,
tenendo conto anche delle evidenze
epidemiologiche.....



Implementare i sistemi
informativi dedicati per
migliorare l'efficacia della
sorveglianza epidemiologica



DECRETO 2 febbraio 2016

Piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo dell'anemia infettiva degli equidi.

Art. 1 Ambito di applicazione e criteri

- **Divieto di movimentare equidi non controllati**
- **Obbligo per i proprietari o i detentori degli equidi di rendere disponibili gli equidi da sottoporre a controllo**

Art. 2 Diagnosi di malattia

- ✓ **I prelievi sono effettuati a cura dei servizi veterinari ASL o veterinari formalmente incaricati**

Le prove di screening sono effettuate presso i laboratori degli IIZZSS utilizzando uno fra i test ELISA approvati dal Centro di Referenza da impiegare ai fini della sorveglianza sierologica.

Area a rischio elevato

✓ in cui, a seguito dell'applicazione O.M. 6 agosto 2010, è stato **controllato meno del 50%** (% cumulativa) delle aziende registrate in BDN;

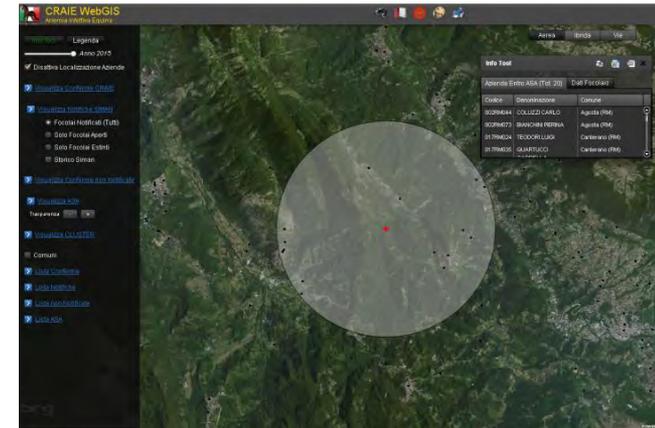
✓ controllato più del 50% delle aziende registrate in BDN ma **prevalenza** focolai osservata nell'ultimo anno di applicazione dell'O.M. 2010 è risultata **superiore a 0,5%** (limite superiore dell'intervallo di confidenza).

Area a rischio basso

✓ aree non comprese in quelle a rischio alto

Area di sorveglianza attiva (ASA): area con raggio 3 km da un nuovo focolaio incidente o di un focolaio prevalente di AIE.

Cluster di infezione: sono costituiti da aree in cui sono presenti almeno 2 focolai di AIE incidenti e/o prevalenti ad una distanza massima di 5 Km.



Dispositivo dirigenziale N° 0019423 del 11/08/2016 - criteri per l'attribuzione del rischio

Tabella 2: Attribuzione del rischio regionale in base ad attività condotte nel triennio 2010-2012.

REGIONE	Raggiungimento del target nel TRIENNIO 2010-2012				Aziende positive confermate nel biennio 2011-2012				Livello di rischio regionale** (50% target raggiunto)
	Target Annuale (%) aziende da testare (OM agosto 2010)	Target (%) aziende da testare triennio 2010-2012 (OM agosto 2010)	% testate vs censite nel triennio 210-2012	Target triennio raggiunto (ALMENO 50% TARGET RAGGIUNTO)	% positive vs testate	IC 95 % positive	Limite sup IC 95% inferiore a 0,5		
ABRUZZO	100	100	77	SI	1,57	1,34 - 1,85	NO	ALTO	
BASILICATA	50	100	68	SI	0,25	0,13 - 0,46	SI	BASSO	
CALABRIA	50	100	55	SI	0,29	0,13 - 0,58	NO	ALTO	
CAMPANIA	50	100	48	NO	0,58	0,38 - 0,85	NO	ALTO	
EMILIA ROMAGNA	50	100	60	SI	0,05	0,02 - 0,11	SI	BASSO	
FRIULI VENEZIA GIULIA	50	100	55	SI	0,00		SI	BASSO	
LAZIO	100	100	66	SI	0,49	0,4 - 0,6	NO	ALTO	
LIGURIA	50	100	65	SI	0,05	0,03 - 0,13	SI	BASSO	
LOMBARDIA	50	100	54	SI	0,03	0,01 - 0,07	SI	BASSO	
MARCHE	50	100	56	SI	0,10	0,06 - 0,22	SI	BASSO	
MOLISE	100	100	77	SI	0,59	0,41 - 0,87	NO	ALTO	
PIEMONTE	50	100	67	SI	0,03	0,02 - 0,05	SI	BASSO	
PUGLIA	50	100	60	SI	0,43	0,28 - 0,64	NO	ALTO	
SARDEGNA	50	100	45	NO	0,00		SI	ALTO	
SICILIA	50	100	38	NO	0,02	0,01 - 0,06	SI	ALTO	
TOSCANA	50	100	64	SI	0,25	0,16 - 0,39	SI	BASSO	
TRENTINO - ALTO ADIGE	50	100	60	SI	0,00		SI	BASSO	
UMBRIA	100	100	80	SI	0,34	0,28 - 0,44	SI	BASSO	
VALLE D'AOSTA	50	100	88	SI	0,00		SI	BASSO	
VENETO	50	100	50	SI	0,16	0,09 - 0,27	SI	BASSO	
ITALIA			58,1		0,26	0,2 - 0,37			

** combinazione rischio legato a copertura target (soglia minima 50%) e limite superiore IC 95% prevalenza positivi

Art. 5 *Vigilanza veterinaria e norme finali*

✓ Sulla base dell'evoluzione della situazione epidemiologica, l'allegato 1 al presente decreto è modificato con dispositivo del Direttore generale della sanità animale e dei farmaci veterinari del Ministero della salute



Area a rischio elevato

controlli su base annuale – esclusi equidi da macello non destinati alla riproduzione

Area a rischio basso

- ✓ tutti gli equidi di età superiore ai 12 mesi. Il controllo vale tre anni
- ✓ annualmente tutti gli equidi > 12 mesi presenti nelle ASA e nei cluster fino ad estinzione dei focolai

Categorie a rischio: controllo annuale

Rientrano: equidi da lavoro, tutti i muli, tutti gli equidi, nelle aziende in cui siano presenti uno o più muli;

Equidi macellati anche all'età inferiore di 12 mesi.



Art. 3 *Misure sanitarie in caso di focolaio*

In attesa della conferma di cui all'art. 2, comma 3, le autorità sanitarie competenti adottano le misure previste d

- ✓ all'art. 99 DPR n. 320 / 54 , dall'art. 4, comma 5 lettera *a)* ,
- ✓ punto *iii)* della direttiva n. 2009/156/CE e
- ✓ dall'art. 4 del presente decreto

Comma 2 - tali misure vengono revocate nel caso in cui il Centro di referenza non confermi la positività.

Comma 3 - focolai si considerano estinti e le misure di cui al comma 1 sono revocate quando gli equidi infetti sono venuti a morte o allontanati definitivamente dall'azienda e gli accertamenti diagnostici sui rimanenti soggetti mantenuti in azienda sono **risultati negativi in conformità all'art. 4, comma 5, lettera *a)*, punto *iii)* della direttiva n. 2009/156/CE.**

✓ **Le stesse misure di applicano anche a quelle strutture che ricevono equidi sieropositivi .**

- ✓ indagine epidemiologica – scheda specifica disponibile
- ✓ rintraccio (12 mesi)
- ✓ misure di biosicurezza
- ✓ Sottoporre a controllo equidi presenti in ASA entro 30 giorni dalla loro conferma come notificata su SIMAN



Soggetti dichiarati sospetti - controllo su base **semestrale**

Caso Sospetto di AIE:

1. **Ogni equide risultato positivo ad un test sierologico di screening, fino a conclusione dell'iter di conferma da parte del Centro di Referenza.**
2. Ogni caso di positività sierologica riferibile al punto 2 della definizione relativa ai test diagnostici di conferma – ELISA positivo/AGID negativo.
3. Ogni equide presente in un focolaio di anemia infettiva fino a conclusione negativa degli esiti.
4. I puledri nati da fattrici positive, fino al compimento del dodicesimo mese di età.
5. Ogni equide che presenti sintomi riferibili ad AIE fino ad accertamento diagnostico.

Misure di biosicurezza animali sieropositivi

Area per isolamento anche paddock esterno, purché sia **garantita una distanza minima di 200 metri** da ogni altro luogo ove siano tenuti, anche temporaneamente, altri equidi.



Diversamente l'equide deve essere detenuto in **un locale chiuso** garantendo il benessere

✓ **La movimentazione deve essere effettuata nelle ore serali e/o notturne** previa disinfestazione con idonei insetticidi dei mezzi di trasporto e degli animali stessi con sostanze ad azione repellente ed insetticida. Il mezzo utilizzato per il trasporto deve essere nuovamente pulito e **disinfestato dopo lo spostamento**. L'esito dei controlli va comunicato mediante relazione scritta al Servizio veterinario regionale/provinciale

WEB-based geographic information system (WEBGIS) uno strumento per il controllo dell'AIE

<http://195.45.99.77/craiegis/>



M.G. Sala¹, F. Cotroneo², G.L. Autorino¹, M.T.Sciicluna¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Roma, Italy

²Senior Consultant GIS Engineer