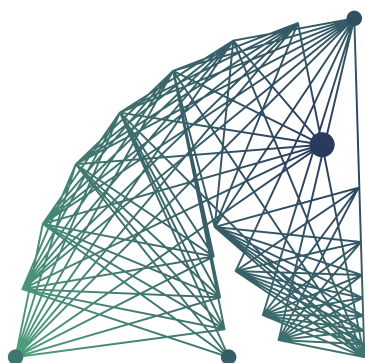




EquiNotio

Social Network Analysis e metodiche diagnostiche innovative per il controllo degli spostamenti e delle malattie infettive dei cavalli in Italia

Social Network Analysis e metodiche diagnostiche innovative per il controllo degli spostamenti e delle malattie infettive dei cavalli in Italia

Area tematica:

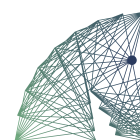
SA 1.1 Studio e messa a punto di nuovi protocolli e strumenti diagnostici per migliorare i sistemi di sorveglianza sulle malattie infettive o sulle patologie di interesse della medicina veterinaria.

Responsabile Scientifico

Giovanni Savini

Codice progetto IZS AM PS/19 RC

Data di scadenza del progetto 20/05/2023



Unità Operative impegnate nella ricerca:

N. identificativo	Ente appartenenza	Responsabile scientifico
U.O.01 IMS	IZS AM - Sanità Pubblica	Giovanni Savini
U.O.02 IMS	IZS AM - Scienze statistiche e GIS	Annamaria Conte
U.O.03 IMS	IZS AM – Benessere animale	Michele Podaliri-Vulpiani
U.O.04 IMS	IZS AM – Biologia molecolare e tecnologie omiche	Cesare Cammà
U.O.05 IMS	IZS AM – Bromatologia e residui	Giorgio Saluti
U.O.06 IMS	IZS AM – Formazione e Progettazione	Silvia D'Albenzio
U.O.07 IMS	Ministero della Salute – DGSAF Ufficio 2	Marco Ianniello
U.O.08 IMS	IZLT	Maria Teresa Scicluna
U.O.09 IMS	IZSLER	Alessandra Gaffuri
U.O.10 IEMS	ASL Roma 1	Mario Frega
U.O.11 IEMS	Esercito Italiano – Comando di Sanità Veterinaria	Simone Siena

Introduzione

Il progetto **“Social Network Analysis e metodiche diagnostiche innovative per il controllo degli spostamenti e delle malattie infettive dei cavalli in Italia”** si concentra sulla necessità di tutelare la salute e il patrimonio zootecnico degli equidi non Destinati alla Produzione di Alimenti (non DPA), in particolare per quanto riguarda la diffusione di malattie infettive attraverso gli spostamenti dei cavalli da competizione internazionali.

L'obiettivo generale è quello di implementare il concetto **“High Health, High Performance Horse”** (HHP) per individuare una popolazione equina rispondente ad elevati requisiti sanitari e di performance, per consentire una circolazione sicura dei cavalli e facilitare l'espansione del settore del **cavallo sportivo**, salvaguardando la sua salute e quella della popolazione equina del paese di destinazione, di residenza abituale e di transito.

Il progetto mira inoltre ad **implementare un'anagrafe nazionale funzionale degli equidi per garantire movimentazioni sicure**, indipendentemente dal fatto che interessino cavalli sportivi o che siano attuate a livello nazionale o internazionale.

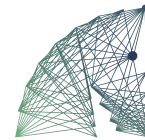
Infine, il progetto vuole **mitigare il rischio di diffusione di patogeni** come conseguenza dei sempre più frequenti spostamenti degli equidi e migliorare la velocità, l'efficienza e la precisione della diagnosi delle malattie infettive attraverso l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare nella diagnostica.

Obiettivi strategici

Il miglioramento della salute e del **benessere degli equini in Italia** viene perseguito dal Progetto attraverso più linee di sviluppo. Innanzitutto con la definizione di **indicatori specifici** per valutare i livelli di implementazione dell'anagrafe equina nazionale (**BDN-E**) e lo sviluppo di strumenti innovativi per individuare eventuali discrepanze tra i dati anagrafici registrati e quelli reali. In altri termini, si punta a fornire alle autorità competenti, in particolare ai Servizi Veterinari, strumenti efficaci per individuare eventuali discrepanze in questa fase di riorganizzazione dell'anagrafe equina.

Un altro obiettivo è valutare il rischio di introduzione e **diffusione di eventuali patogeni in Italia** attraverso l'analisi e la caratterizzazione del **network degli spostamenti dei cavalli**, attività che viene accompagnata da esercizi di simulazione. Ciò permetterà alle autorità competenti di rilevare le aree del territorio italiano maggiormente esposte al rischio di diffusione di agenti patogeni e di **rintracciare eventuali fonti di contagio**, permettendo interventi rapidi e mirati.





Obiettivi strategici

La ricerca dei patogeni viene poi innovata attraverso sviluppo di una **diagnostica** che utilizza **tecniche microarray innovative**, in grado di rilevare, contemporaneamente e in tempi brevi, un'ampia selezione di agenti patogeni degli equidi partendo da campioni di vario tipo.

Grazie alla sua elevata flessibilità, sensibilità ed affidabilità, il nuovo test microarray punta a costituire un valido strumento per migliorare l'efficienza diagnostica ed assicurare **certificazioni sanitarie affidabili** e sicure.

L'analisi viene effettuata utilizzando gli **acidi nucleici** (DNA e RNA) purificati direttamente dai campioni biologici di diversa natura quali organi interni, campioni di feci, urine, insetti, eventualmente presenti negli stabulari, sangue ed ectoparassiti. Viene inoltre messo a punto un ulteriore test *microarray* per l'identificazione simultanea di tutti i sierotipi del virus della **peste equina** (AHSV).

Infine, un obiettivo trasversale è promuovere il possesso responsabile e supportare la **piena implementazione dell'anagrafe equina nazionale** (BDN-E), contribuendo ad innalzare i livelli di ottemperanza alle norme che regolano la salute e il benessere degli equini in Italia. In questo modo, si intende promuovere la tutela del patrimonio zootecnico italiano e migliorare la competitività delle aziende zootecniche del settore.

Risultati ottenuti

Articolazione del Progetto:

Una fase fondamentale del progetto è rappresentata dall'analisi della diffusione epidemica di alcune malattie infettive nei cavalli, in particolare della Peste Equina e dell'Anemia Infettiva degli Equidi.

A tal fine sono state studiate **due diverse modalità di diffusione**:

1. Tramite **vettore competente**
2. Attraverso il **contatto diretto tra gli animali infetti**, in modo da ottenere un modello generalizzabile.

È stato utilizzato un approccio basato sui dati, innovativo e multidisciplinare, per affrontare il problema della diffusione o introduzione di malattie infettive causate dai movimenti degli equidi in Italia. Tecniche avanzate di data mining, di modellizzazione matematica e apprendimento automatico hanno permesso di identificare i fattori di rischio e di suggerire delle strategie di controllo efficienti per prevenire la diffusione di malattie o individuare le aree più a rischio di introduzione.

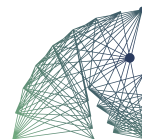
I dati sulla movimentazione degli animali e le informazioni sulle strutture che detengono gli equidi sono stati raccolti dalla **Banca Dati Nazionale**, mentre i dati relativi ai vettori sono stati estratti da un piano di sorveglianza entomologico. È stata anche effettuata una rilevazione strutturata sulle movimentazioni reali degli animali in una zona pilota del Paese per verificare la completezza delle movimentazioni tracciate nella Banca Dati Nazionale. I dati raccolti sono stati cruciali per definire nuovi indicatori e strumenti per la valutazione del livello di implementazione della Banca Dati Nazionale sulle diverse aree del territorio nazionale.

La visione d'insieme viene completata da una rete bipartita delle strutture in cui sono ospitati gli equidi, analizzandone le caratteristiche e identificando gli allevamenti ad **"alto rischio"** o **"Super Spreader"**. Infine, due modelli matematici hanno consentito di simulare la diffusione della malattia: uno basato sulle **caratteristiche ambientali** e l'altro sul **network delle movimentazioni degli animali**.

I risultati hanno evidenziato che il settore degli equidi è fortemente vulnerabile alle infezioni e questa evidenza ha portato alla necessità di implementare degli applicativi web in grado di favorire e supportare i controlli sul territorio come quello rappresentato da **EquiTracing**. Tutte le metodiche messe a punto sono esplicitamente data-driven e sono state utilizzate per sottolineare l'importanza di un dato completo e ben strutturato. Infatti, dal punto di vista epidemiologico, il gap dovuto a un dato incompleto non permette un'analisi esaustiva del fenomeno di diffusione o introduzione, in quanto non consente di individuare con certezza tutti i possibili percorsi di diffusione delle malattie o di individuare in modo accurato le aree più a rischio di introduzione dall'estero.

Le conoscenze acquisite saranno utili ai fini del processo decisionale per la definizione di piani di controllo efficienti (mirati ed economici) delle malattie degli equidi e sensibilizzeranno le autorità competenti verso il rafforzamento e il miglioramento delle attuali procedure di registrazione dei capi





per il raggiungimento di una BDN-E pienamente operativa. Inoltre, l'utilizzo di metodi innovativi di analisi costituirà la base per l'applicazione di tali metodi in ulteriori ricerche in ambito veterinario.

Sviluppo di saggi diagnostici innovativi

Questa fase del progetto ha perseguito l'identificazione rapida ed efficace degli **agenti patogeni del cavallo** al fine di **prevenirne la diffusione**.

L'obiettivo del progetto era lo sviluppo di un saggio diagnostico in grado di rilevare, contemporaneamente e in tempi brevi, un'ampia selezione di agenti patogeni degli equidi partendo da campioni di vario tipo. Per raggiungere un obiettivo così ambizioso è stata utilizzata la tecnologia nCounter della ditta NanoString che ha, come caratteristiche peculiari, una ottima capacità di multiplex, ossia la possibilità di identificare contemporaneamente e in una sola reazione, un notevole numero di target genetici. Ulteriori vantaggi della metodica NanoString sono: la possibilità di rivelare in unico saggio target a RNA e/o DNA, l'assenza di fenomeni di inibizione causati da diverse sostanze in quanto il protocollo non prevede l'utilizzo di enzimi (retrotrascrittasi o polimerasi), il tempo molto breve di manualità di laboratorio per la preparazione dei campioni. D'altra parte le metodiche basate sull'ibridazione degli acidi nucleici non prevedono un'amplificazione di sequenze target, e, di conseguenza, la sensibilità analitica non può essere paragonabile a quella della PCR o della RealTime PCR.

Dai risultati delle analisi effettuate utilizzando isolati virali, batterici e protozoari e campioni usati come controlli positivi per altre metodiche molecolari, si può concludere che il saggio NanoString sviluppato è in grado di rilevare in maniera specifica molti dei patogeni selezionati. È da considerare che, per una completa validazione del metodo, andrebbe analizzato un numero maggiore di campioni sia positivi che negativi, di non facile reperibilità specialmente relativamente ad alcuni patogeni virali.

Valutazione dello status nazionale nella gestione degli aspetti di salute e benessere dei cavalli; sviluppo di nuovi approcci alla valutazione del benessere; attività di supporto per lo sviluppo di sistemi informatici

Questa fase progettuale ha preso avvio dallo studio e dall'analisi della **legislazione vigente** in materia di gestione sanitaria e tutela del benessere degli equini non destinati alla produzione di alimenti (non DPA).

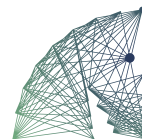
Le attività di ricerca hanno, poi, preso in esame **la gestione del cavallo non DPA**, in quanto caratterizzata dalla combinazione di molteplici fattori che, direttamente o indirettamente, determinano lo stato di salute e benessere dell'animale. Conoscere approcci e modalità adottati da chi, di fatto, pone in essere le scelte di management e dà ad esse concreta esecuzione nella pratica quotidiana riveste, infatti, una rilevanza cruciale per individuare i gap esistenti e le aree di miglioramento su cui intervenire a tutela del cavallo. A tal fine, lo studio – a memoria degli autori, mai realizzato precedentemente in Italia su così vasta scala – ha preso in esame la scuderizzazione, il rispetto della normativa vigente, le necessità sanitarie, il benessere animale e il “fine carriera” del cavallo non DPA. Questo ha consentito di definire un setting informativo di base su cui ipotizzare interventi mirati che in futuro, secondo la logica dello sviluppo continuo, perseguano come macro-obiettivo la crescita dei livelli di conoscenza e competenza esprimibili da proprietari, gestori e operatori rispetto alle tematiche trattate, coinvolgendo tutte le categorie interessate. Dai profili dei rispondenti a questa indagine risulta, infatti, non sufficientemente rappresentato il settore dell'ippica che merita, quindi, ulteriori approfondimenti.

In linea di principio, i dati ottenuti non presentano criticità significative e allarmanti, anzi la percezione complessiva è quella di una generalizzata consapevolezza circa le pratiche di corretta gestione del cavallo non-dpa in Italia. Questo aspetto può essere messo in correlazione con il livello culturale medio-alto dei rispondenti che rappresentano quasi prevalentemente quanti svolgono attività sportiva professionale o amatoriale e medici veterinari. Tali categorie sono, infatti, collocabili tra quelle in grado di esprimere una maggiore sensibilità verso tutto ciò che caratterizza la relazione uomo-animale, riconoscendo nella “responsabilità” la direttrice, la forma e la regola del rapporto che tra essi si instaura.

La crescente necessità di fornire nuovi indicatori di valutazione del benessere del cavallo ha portato, infine, ad ipotizzare **lo sviluppo di nuovi parametri** utili allo scopo e di metodiche laboratoristiche in grado di generare dati quanto più oggettivi, ripetibili ed affidabili possibili.

È conoscenza comune che il cortisolo rappresenti ad oggi uno dei principali marker imputabili ad accumulo di stress, e che la valutazione dello stesso in matrici quali il sangue possa invece essere rapidamente influenzato dalle manualità di cattura degli animali e dalle operazioni di prelievo. Si è quindi studiato di effettuare delle analisi della concentrazione di cortisolo accumulato nel crine, che rappresenta una sorta di “banca dati” indicativa di condizioni croniche e ripetute nel tempo.





È conoscenza comune che il cortisolo rappresenti ad oggi uno dei principali marker imputabili ad accumulo di stress, e che la valutazione dello stesso in matrici quali il sangue possa invece essere rapidamente influenzato dalle manualità di cattura degli animali e dalle operazioni di prelievo. Si è quindi studiato di effettuare delle analisi della concentrazione di cortisolo accumulato nel crine, che rappresenta una sorta di “banca dati” indicativa di condizioni croniche e ripetute nel tempo.

L'ipotesi iniziale è stata quella di unire la metodica consolidata dell'AWIN applicato per selezionare i soggetti idonei allo studio, e che non manifestassero in partenza appunto criticità di benessere, con la valutazione di un indicatore quale il cortisolo per valutare come questo potesse variare in soggetti che vivessero e fossero sottoposti a management diametralmente opposto ma standardizzato. Il presupposto iniziale è stato quello di individuare delle categorie di cavalli, di valutarli in base al protocollo AWIN, includere solo i soggetti ritenuti in buone condizioni di benessere e analizzare se vi fosse variabilità nella concentrazione di cortisolo nel crine. La metodica utilizzata per l'analisi del cortisolo rappresenta una novità assoluta nel panorama mondiale. La tecnica della cromatografia liquida unita alla spettrometria di massa ad alta risoluzione non è mai stata utilizzata in precedenza con tali modalità e con tali finalità nella specie equina. Inoltre, a scopi comparativi, i campioni sono stati anche analizzati con il metodo ELISA, maggiormente utilizzata in letteratura, ma con i ben noti limiti dipesi da fenomeni di cross-reattività.

È doveroso sottolineare come la valutazione del benessere risulti ad oggi uno degli argomenti più dibattuti e controversi sul quale la comunità scientifica non ha ancora una unicità di pensiero; vi sono posizioni scientifiche diametralmente opposte su ciò che si possa ritenere idoneo e conforme al miglior benessere. Si evidenzia una sostanziale variabilità di ciò che può essere considerato un buon indicatore di benessere, in relazione alla regione geografica, all'impiego dell'animale stesso, alle usanze locali, al considerare come “stress” fisiologico fattori come le lotte interne della mandria per stabilire la gerarchia e così discorrendo. Al netto di tutte queste considerazioni, l'obiettivo finale di quanto prodotto è stato quello di fornire un metodo, sicuramente da testare ulteriormente, necessitante di arricchimento dei dati ma che possa auspicabilmente rappresentare in futuro una valida alternativa o uno strumento complementare per oggettivizzare la valutazione dello stato di benessere degli equidi.

Comunicazione e disseminazione

Nel quadro generale della necessità di promuovere la proprietà responsabile dei cavalli non DPA in Italia, le attività di comunicazione, sensibilizzazione, *capacity building* e disseminazione dei risultati raggiunti hanno giocato un ruolo chiave lungo l'intero ciclo di vita del progetto e non si esauriscono con la conclusione di esso.

Attraverso una indagine dedicata, è stata innanzitutto realizzata la mappatura degli *stakeholders* in base alla rilevanza di essi quale risultante dalla relazione tra influenza e importanza degli stessi rispetto alle macro-tematiche di progetto.

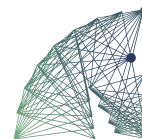
Coerentemente con tale analisi, nell'ambito della rilevazione sullo stato dell'arte delle metodiche gestionali relative al cavallo non DPA sono stati rilevati i fabbisogni formativi dei principali portatori di interesse: proprietari/allevatori, gestori, tecnici/istruttori/allenatori e medici veterinari.

I macro-temi su cui intervenire con azioni di formazione mirata sono i seguenti:

- I principi di tutela e gestione degli equidi
- L'antimicrobico resistenza
- La profilassi antielmintica, soprattutto per limitare l'insorgenza di antielmintico resistenza
- Il benessere del cavallo, con focus tematici dedicati (ad esempio sull'arricchimento ambientale)
- Lo smaltimento del letame in prospettiva One Health
- La lotta agli infestanti per la salute e il benessere dell'animale.
- Ai suddetti si aggiunge il delicato tema della gestione del cavallo non DPA a “fine carriera”.

Poiché ai medici veterinari *in primis* e poi ai tecnici/istruttori/allenatori è riconosciuto un ruolo informativo chiave da parte di proprietari e gestori, appare strategico promuovere delle azioni mirate e di sistema volte ad accrescere le capacità educative, formative e divulgative di questi operatori del settore, opportunamente supportate e completate da strumenti didattici di immediata e facile fruizione resi disponibili, per il grande pubblico, via WEB, su siti dedicati, al fine di attivare un'azione sinergica e complementare tra le varie fonti e – coinvolgendo, secondo una logica prospettica di lungo termine, anche le nuove generazioni – determinare un radicale cambiamento culturale nel paese che possa divenire un elemento distintivo, anche a livello internazionale, dei valori che esso è in grado di esprimere e trasmettere dal punto di vista etico.





Per quanto riguarda gli ispettori dei servizi veterinari, da una rilevazione mirata è emerso che – per migliorare l'accuratezza delle attività di controllo ufficiale e l'efficacia delle stesse – è rilevante o molto rilevante accedere alla formazione che tratti i seguenti temi:

- Osservazione degli animali in allevamento
- Comportamento sociale/bisogni sociali
- Libertà di movimento
- Mangime, acqua e altri aspetti nutrizionali
- Procedure dolorose
- Requisiti del personale dell'azienda agricola (compresa la formazione).

Tenuto conto del fatto che la proprietà responsabile del cavallo si fonda sull'applicazione della normativa vigente, gli interventi formativi realizzati nell'ambito del progetto hanno riguardato massivamente i due temi centrali su cui il Ministero della Salute è intervenuto con recenti disposizioni: il sistema di identificazione e registrazione degli equini e il sistema nazionale della farmacovigilanza. In quattro Webinar (due per ciascun tema) e un corso FAD dal titolo: "Il sistema I&R - identificazione e registrazione degli operatori, stabilimenti ed animali" sono stati complessivamente coinvolti circa 5.000 beneficiari.

Lo sviluppo della *visual identity* di progetto è avvenuto attraverso la definizione dei messaggi chiave intrinseci nei principali elementi che la determinano, quali: logo, sistema di colori e caratteri tipografici. La progettazione del sito WEB di progetto è avvenuta seguendo un approccio multidisciplinare ed ha coinvolto tutte le unità operative interne ed esterne.

Analizzando quelle che potessero essere le attuali necessità di formazione e divulgazione ed anche i dati ottenuti dall'indagine prevista e realizzata alla fase 2, le principali necessità emerse sono state quelle di fornire informazioni relative alle dominanti malattie infettive presenti e diffuse nella specie equina; ecco la ragione per la quale i temi trattati, con la collaborazione dell'IZSLT, sono stati quelli dell'Anemia infettiva, che rappresenta anche un caposaldo nella profilassi obbligatoria sancita dalla normativa vigente, dell'Influenza Equina ed Herpesvirus, di recente tornati in primo piano per lo sviluppo di focolai a carattere internazionale, dell'Arterite Virale e Piroplasmosi. Area di sicuro interesse e crescente sviluppo è quella del benessere animale; grazie anche alla collaborazione dell'IZSLER sono state prodotte schede sul tema e che proponessero in modo sintetico ed esaustivo un sunto di quelle che sono le principali conoscenze attuali sull'argomento. Non di minor importanza e per consentire un rapido orientamento nel mondo delle normative vigenti, la realizzazione di documenti esplicativi che orientassero il lettore ad una piena comprensione del quadro regolatorio. Un ulteriore tema trattato è stato quello delle parassitosi e dei trattamenti anti-parassitari, non sempre realizzati seguendo le corrette linee guida di profilassi. Pertanto una scheda informativa documento è stato fornito come "apripista" per ulteriori futuri approfondimenti in merito.

In collaborazione con la FISE è stato infine sviluppato un pieghevole finalizzato a diffondere informazioni per la prevenzione della Peste Equina.

Il **sito web di progetto** è finalizzato a raccogliere tutti i materiali esistenti in Italia a supporto della tutela della salute e del benessere dei cavalli non DPA, puntando a creare un **hub informativo italiano** del settore di riferimento.

Progetto multidisciplinare e inclusivo

- Un **team multidisciplinare** composto da esperti in Epidemiologia, Statistica, Sistemi Informativi Geografici (GIS), Virologia, Biologia molecolare e molte altre competenze.
- Un **percorso virtuoso** tra il campo, il laboratorio e le autorità, al fine di velocizzare il processo decisionale e migliorare le attività di lotta contro le malattie infettive, ma anche un'opportunità per unire le diverse istituzioni e i diversi attori. La **collaborazione dei ricercatori** è già stata testata con successo in precedenti progetti, il che garantisce una sinergia positiva che mette a confronto le migliori competenze e risorse necessarie per **affrontare le sfide** che si presentano nel campo della salute e del **benessere dei cavalli**.

