

Ricerca corrente anno finanziario 2011

Stima delle prevalenze delle infezioni da *Babesia caballi* e *Theileria equi* ed *Anaplasma phagocytophilum* nelle regioni Lazio e Toscana. Messa a punto di metodi quantitativi ed analisi di differenti metodi diagnostici in uso in relazione allo stato sanitario dei soggetti infetti.

Responsabile Scientifico: Dr.ssa Scicluna Maria Teresa

Durata del progetto: 36 mesi

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

- 1) D.ssa Maria Teresa Scicluna - IZSLT Direzione operativa Diagnostica delle malattie virali CERME
- 2) D.ssa Francesca Rosone - IZSLT Direzione operativa Diagnostica delle malattie virali CERME
- 3) D.ssa Gladia Macrì - IZSLT Direzione operativa Sierologia
- 4) D.ssa Olga Lai - IZSLT Direzione operativa Produzioni Zootecniche
- 5) D.ssa Antonella Cersini - IZSLT Ufficio di Staff Biotecnologie

Razionale del progetto

Tra gli agenti eziologici responsabili di sindromi anemico/emolitiche e di infezioni di cellule di derivazione midollare negli equini ci sono *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum*.

I primi due microrganismi sono responsabili della piroplasmosi ed mentre il terzo della anaplasmosi. I tre microrganismi sono trasmessi da zecche della famiglia Ixodidae che fungono da ospite intermedio e da vettore specifico dell'infezione. Inoltre, soprattutto per le piroplasmosi, è possibile la trasmissione diretta, da animale infetto ad uno sano, mediante seme, aghi o altri strumenti contaminati; l'infezione trans-placentare è rara. Si sottolinea l'importanza sanitaria dell'agente zoonotico *Anaplasma phagocytophilum* (già Ehrlichia equi ed Ehrlichia phagocytophila) parassita intracellulare obbligato dei granulociti neutrofili trasmesso prevalentemente dalla zecca *Ixodes ricinus* (zecca dei boschi). Tale batterio è responsabile dell'anaplasmosi granulocitica umana (HGA) e dell'anaplasmosi granulocitica equina, ovina, bovina e canina nelle quali specie è causa di forme febbrili, alterazioni ematologiche e di aborto nelle pecore. La distribuzione geografica di queste infezioni è strettamente connessa alla presenza del vettore: è endemica nelle aree tropicali e subtropicali ed in molte zone temperate. In Italia è interessato l'intero territorio nazionale. Mentre tutti i microrganismi parassitano gli eritrociti dell'ospite, *T. equi* può essere presente anche nei linfociti. L'incubazione varia da 12 a 19 giorni e da 10 a 30 rispettivamente per *B. caballi* e *T. equi*, per *A. phagocytophilum* da 3 a 14 giorni. Le infezioni possono decorrere in forma acuta, subacuta e cronica con sintomatologia clinica non sempre specifica. Per le piroplasmosi, spesso, sono rilevabili positività nei confronti di entrambi i parassiti che potrebbero essere riconducibili ad esposizione a entrambi gli agenti eziologici. In particolare, i soggetti colpiti da *T. equi* possono rimanere portatori asintomatici a vita, e, in assenza di adeguati trattamenti, sono possibili recidive sia a seguito di immunosoppressione, sia di resistenza acquisita alle molecole farmacologiche impiegate. Puledri che nascono in zone endemiche è probabile che contraggano un'infezione subclinica, poiché l'immunità materna viene gradualmente sostituita da uno stato di forte immunità attiva grazie a ripetute stimolazioni antigeniche.

Sia per la piroplasmosi che per l'anaplasmosi, l'individuazione del microrganismo negli eritrociti e nei granulociti neutrofili da striscio periferico o da buffy coat è possibile solo durante la fase acuta

Ricerca corrente anno finanziario 2011

dell'infezione e necessita di operatori esperti. In alternativa, vengono effettuati test sierologici, Immunofluorescenza Indiretta (IFAT) e Competitive Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assa

(cELISA), che comunque non forniscono indicazioni circa la fase dell'infezione, costituendo un problema soprattutto nelle aree endemiche.

In caso di piroplasmosi, l'imidocarb-dipropionato, oltre ad avere efficacia terapeutica sarebbe anche in grado, ad alti dosaggi, di sterilizzare i soggetti colpiti. Tuttavia, tali trattamenti comportano anche gravi effetti indesiderati, soprattutto in soggetti defedati, come in alcuni casi riconducibili a forme acute. Inoltre, le piroplasmosi ed l'anaplasmosi prevedono terapie come molecole farmacologiche diverse. Pertanto, la possibilità di correlare alla positività l'effettivo stato d'infezione con test diretti quantitativi, anche in presenza di modesti titoli anticorpali, assume particolare rilevanza ai fini delle indicazioni terapeutiche. Sebbene siano state stimate le prevalenze in alcune regioni Italiane, queste derivano dall'attività diagnostica effettuata sui casi clinici e non sono direttamente riferibili all'effettiva diffusione nelle popolazioni equine. Nel Lazio ed in Toscana, ad oggi, non sono stati condotti specifici studi di prevalenza ed in particolare sulle popolazioni autoctone allevate.

Infine, il miglioramento dell'efficienza di test diagnostici risulta importante anche ai fini della diagnosi differenziale di anemia infettiva equina nelle regioni ad elevata prevalenza, considerato che per quest'ultima la presenza di anticorpi può essere rilevabile anche a distanza di mesi.

Bibliografia di riferimento essenziale:

- De Waal DT. Equine piroplasmosis: a review. Br. Vet. J. 1992; 148: 6-14.
- Ikadai H., *et al.* Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007;76:694-697.
- Sellon C. Debra *et al.*, Piroplasmosis. Equine infectious disease. 2007. 469-470
- Gerrit U. Babesia -A historical overview. Vet. Par. 138 (2006) 3-10
- S.M. Abutarbush., *et al.* Equine Babesiosis: Seroprevalence, Risk factors and Comparison Of Different Diagnostic Method in Jordan. Transb. and Emer. Dis. 2011 Jul. 19.
- Ahmed J.S-The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. Parasitol Res (2002) 88: S48-S50
- S.Rochelle lewis ,*et al.* Equine Granulocytic Anaplasmosis :A case Report and Review. J. of Equin. Vet. Scie. Vol 29, N°3: 160-166

Descrizione complessiva del progetto

Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

I dati di prevalenza disponibili non sono confrontabili per metodologia di indagine, nonché per le modalità di campionamento spesso derivante da attività diagnostica a seguito di sospetto clinico. Infatti, la diagnosi diretta delle piroplasmosi/anaplasmosi resta un problema solo in parte risolto in quanto la ricerca diretta dei parassiti su striscio di sangue periferico o da buffy coat, è possibile solo durante le fasi acute. Pertanto, non ha elevata sensibilità in indagini di tipo epidemiologico, quindi in tale contesto, sicuramente un approccio ottimale è rappresentato dalle tecniche immunodiagnostiche. Per la diagnosi delle piroplasmosi/anaplasmosi equine, le metodiche sierologiche più usate sono l'IFAT e l'ELISA, sebbene utili ai fini di indagini di prevalenza e per i controlli ai fini delle movimentazioni non forniscono indicazioni circa la fase dell'infezione, costituendo un problema soprattutto nelle aree endemiche. Le problematiche legate all'impiego dei metodi sierologici sono riconducibili a possibili cross reattività, alla lettura soggettiva dell'operatore e, infine, all'elevato costo dei reagenti (Bakheit *et al.*, 2007). Nelle zone endemiche, in presenza di anticorpi nella popolazione, la PCR può costituire il metodo diretto più indicato ai fini diagnostici e per definire in maniera più precisa l'effettivo stato sanitario anche ai fini delle movimentazioni.

Un ulteriore limite della diagnosi sierologica è dovuto al fatto che, in particolare, per le piroplasmosi esistono animali con infezione cronica che presentano reazioni positive al limite

della rilevabilità quando esaminati con i metodi tradizionali. I test biomolecolari, ancora poco utilizzati nella pratica corrente, possono quindi trovare un utile impiego come test complementari a quelli sierologici, soprattutto quando è necessaria una diagnosi precoce e differenziale, o quando l'analisi sierologica non dà un esito conclusivo. Negli ultimi anni sono state ottimizzate e standardizzate alcune metodiche biomolecolari che possono essere valutate per l'utilizzo nella routine diagnostica. Gli stessi metodi possono pertanto essere utilizzati per effettuare un monitoraggio dell'infettività e per definire più chiaramente il ruolo epidemiologico dei soggetti positivi che non presentano sintomatologia clinica conclamata.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre

- 1- Definire la prevalenza delle infezioni sostenute da *B. caballi*, *T. equi* e *A. phagocytophilum* in popolazioni equine autoctone del Lazio e della Toscana.
- 2- Mettere a punto e/o standardizzare metodi diagnostici diretti quantitativi e valutare la loro correlazione con sintomatologia clinica, parametri ematobiochimici e sierologici. Sviluppare algoritmi diagnostici nei confronti della piroplasmosi ed anaplasmosi equina. Migliorare l'efficienza diagnostica ed indirizzare correttamente il conseguente trattamento terapeutico.
- 3- Ampliare le conoscenze di epidemiologia molecolare analizzando gli stiptipi parassitari circolanti in Italia.

Metodologia

W.P.1. Definire le prevalenze rispettivamente per *B. caballi*, *T. equi* ed *A. phagocytophilum* in popolazioni autoctone del Lazio e della Toscana.

Verranno definiti i criteri di campionamento a livello provinciale, usando come base campionaria i prelievi effettuati nell'ambito della sorveglianza dell'Anemia Infettiva Equina (AIE), previa definizione del campione in funzione delle prevalenze attese, considerando la possibilità di realizzare e somministrare un questionario per ottenere il dettaglio dei dati relativi a singoli soggetti. I campioni saranno esaminati con metodi di screening ed i dati derivanti dall'indagine elaborati mediante strumenti di epidemiologia descrittiva ed analitica, anche per individuare possibili fattori di rischio correlati all'esposizione agli agenti infettivi.

W.P.2. Realizzazione di un algoritmo diagnostico impiegato per il miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica per le sindromi anemico/emolitiche dell'equino.

Revisione e definizione dei protocolli di diagnosi sierologica e molecolare per le piroplasmosi/anaplasmosi e realizzazione di un sistema diagnostico differenziale nei confronti di malattie responsabili di sindromi anemico/emolitiche anche con riferimento alle leptospirosi ed all'AIE. Stima della precisione, accuratezza e concordanza fra i metodi mediante l'applicazione di parametri statistici. Follow-up su soggetti positivi per la valutazione dell'andamento della parassitemia, correlandone i parametri emato-biochimici ed immunologici.

Messa a punto e/o standardizzazione di metodi diagnostici molecolari diretti, parametri emato-biochimici ed immunologici per la valutazione della correlazione con status clinico e l'identificazione di un approccio diagnostico.

Valutazione del grado di parassitemia mediante Real-Time PCR in soggetti sieropositivi asintomatici.

Eventuale studio delle sequenze di stiptipi parassitari in funzione dell'origine geografica di provenienza.

W.P.3. Studio caso/controllo per l'identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi/anaplasmosi

Scelta dei parametri diagnostici per l'identificazione di standard ai fini della definizione di caso clinico.

Realizzazione di un supporto informativo ai fini della raccolta dei dati inerenti sintomatologia, sierologia, parametri emato-biochimici ed immunologici.

Sulla base di tale definizione verranno arruolati casi/non casi, ai fini della verifica della rispondenza alle ipotesi formulate per lo studio caso/controllo.

I campioni biologici raccolti saranno sottoposti ad esami diretti ed indiretti ed i risultati saranno elaborati mediante metodi statistici per stabilire le possibili correlazioni tra i parametri definiti e lo stato clinico.

W.P.4. Divulgazione dei risultati della ricerca.

I dati ottenuti dalle attività svolte nell'ambito del progetto di ricerca verranno raccolti ed analizzati ai fini di poter elaborare una relazione intermedia e finale . Inoltre i risultati ottenuti dalle diverse attività saranno pubblicate su riviste scientifiche, presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche ed eventi formativi per il personale del SSN e per tutti gli stakeholders coinvolti.

Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire

Il contributo fornito dalle diverse unità operative sarà utile per il miglioramento delle conoscenze epidemiologiche e patogenetiche delle piroplasmosi ed anaplasmosi e dei fattori di rischio correlati alla diffusione e persistenza delle infezioni.

Lo sviluppo e l'adozione di metodiche di laboratorio innovative, di rapida esecuzione e soprattutto dotate di maggiore sensibilità che permetteranno di migliorare l'efficacia dell'iter diagnostico delle piroplasmosi/anaplasmosi su tutto il territorio nazionale.

I risultati delle diverse attività saranno pubblicati sul sito internet del CERME, su riviste scientifiche e presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche, eventi formativi per il personale del SSN e per i professionisti operanti nel settore. Saranno inoltre resi disponibili agli Uffici competenti del Ministero della Salute, alle Regioni ed ai referenti degli Istituti Zooprofilattici.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Le differenti Unità Operative partecipanti sono in grado di apportare specifici contributi per la realizzazione di tutte le attività specialistiche previste dal progetto, garantendo, attraverso il coinvolgimento di epidemiologi, virologi, chimici e biologi molecolari, un approccio multidisciplinare integrato ai fini dello sviluppo di attività di ricerca nei confronti di malattie trasmesse da vettori quali le piroplasmosi/anaplasmosi e la conseguente messa a punto di un protocollo diagnostico differenziale nei confronti di altre infezioni con sintomatologia sovrapponibile.

Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi fra le varie UU.OO

W.P.1. Definire i dati di prevalenza rispettivamente per *B. caballi* e *T. equi* ed *A. phagocytophilum* in popolazioni autoctone del Lazio e della Toscana.

- a) Valutazione dei dati bibliografici disponibili relativi a studi di sieroprevalenza condotti sul territorio Nazionale ai fini di una possibile stima della prevalenza attesa. (1 mese U.O. 1, 2, 3, 4, 5)
- b) Definizione della base campionaria in funzione della prevalenza attesa e delle modalità di raccolta dei campioni di sangue (2 mesi U.O. 1, 2, 3)
- c) Messa a punto di una scheda informativa di accompagnamento dei campioni finalizzata alla raccolta di dati relativi ad orientamento produttivo, tipologia di allevamento e dati individuali. (2 mesi U.O. 1, 2)
- d) Raccolta campioni (3-19 mesi U.O. 2)
- e) Svolgimento dell'attività analitica. (4-20 mesi U.O. 1, 2, 3)
- f) Analisi statistica dei risultati ottenuti dall'indagine (22-24 mesi U.O. 1, 2, 3)

W.P.2. Realizzazione di un protocollo diagnostico impiegato per il miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica per le sindromi anemico/emolitiche dell'equino.

- a) Valutazione dei differenti metodi immunologici e molecolari disponibili per la diagnosi di laboratorio delle piroplasmosi/anaplasmosi (2-3 mesi U.O. 1, 2, 3, 4, 5)
- b) Messa a punto e/o standardizzazione di metodi diagnostici molecolari quali-quantitativi (3-6 mesi U.O. 5)
- c) Definizione di un protocollo diagnostico pilota sulla base dei metodi analitici scelti. (7 mesi U.O. 1, 2, 3, 4, 5)
- d) Integrazione del protocollo di cui al punto c) nel sistema di diagnosi differenziale nei confronti di altre malattie responsabili di sindromi anemico/emolitiche ed applicazione del sistema di diagnosi differenziale sui campioni di routine/mirati (8-33 mesi U.O. 1, 2, 3, 4, 5)
- e) Studio delle sequenze di stipiti parassitari in funzione dell'origine geografica di provenienza (8-33 mesi U.O. 5)
- f) Raccolta ed archiviazione informatica dei risultati (8-33 mesi U.O. 1, 2, 3, 4, 5)
- g) Valutazione dei risultati ottenuti (34-35 mesi U.O. 1, 2, 3, 4, 5)

W.P.3. Studio caso/controllo per l'identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi.

- a) Scelta dei criteri per la classificazione di caso clinico di piroplasmosi e messa a punto della scheda di accompagnamento campioni. (1-3 mesi U.O. 1, 2, 3, 4)
- b) Arruolamento campioni da cavalli sintomatici e non ed esecuzione delle prove di laboratorio (4-33 mesi U.O. 1, 2, 3, 4)
- c) Analisi statistica dei risultati (33-34 mesi U.O. 1, 2, 3, 4)

W.P.4 Divulgazione dei risultati della ricerca.

- a) Predisposizione relazioni intermedia e finale. (18-35 mesi U.O. 1, 2, 3, 4, 5)
- b) Organizzazione di eventi formativi per il personale del SSN e per gli stakeholders coinvolti e presentazione dei risultati nell'ambito di eventi scientifici (30-36 mesi U.O. 1, 2, 3, 4, 5)